

50376
1978
27

N° d'ordre : 716

50376
1978
27

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

par

Sylvie GALIEGUE

INTERACTION ENTRE LE DNA ET UN CANCEROGENE :

LE O,O'-DIACETYL -4- HYDROXYAMINOQUINOLEINE -1-OXYDE.



Soutenue le Octobre 1978, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury :

Président : M. C. LOUCHEUX

Rapporteur : M. G. BISERTE

Examineur : M. J. LHOMME

Membre Invité : M. M. DAUNE

Examineur : Mme M.H. LOUCHEUX

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,
CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET,
GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE,
LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,
MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN,
ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DER COURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique

M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Riologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BOSCOQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
M.	COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale
M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Physique
M.	DUBRULLE Alain	Physique
M.	DUEE Gérard	Géologie
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M.	FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FONTAINE Hubert	Physique
M.	GAMBLIN André	Géographie
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GREVET Patrick	Sciences Economiques
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mle	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOSFELD Joseph	Informatique
M.	MACKE Bruno	Physique
M.	MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M.	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	PARSY Fernand	Mécanique
Mle	PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RICHARD Alain	Biologie
M.	RIETSCH François	Chimie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M.	SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme	SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie

M^{lle} SPIK Geneviève
M. STERBOUL François
M. TAILLIEZ Roger
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. WALLART Francis
M^{me} ZINN-JUSTIN Nicole

Biochimie
Informatique
Biologie
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Chimie
Algèbre

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, où Monsieur le Professeur Gérard BISERTE a bien voulu m'accueillir. Qu'il trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance et de mes sentiments les plus respectueux.

Madame M.H. LOUCHEUX, Maître de Recherche au CNRS, m'a proposé le sujet de cette thèse et a toujours suivi ce travail avec le plus grand intérêt. Je lui adresse ici tous mes remerciements les plus sincères.

Monsieur C. LOUCHEUX, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Qu'il veuille bien accepter mes respectueux remerciements.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur G. BISERTE qui a bien voulu juger ce travail et en être le rapporteur.

Monsieur J. LHOMME, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, a accepté de participer au jury de cette thèse, je l'en remercie vivement. Depuis un an, nous entretenons une collaboration très enrichissante avec son laboratoire à Villeneuve d'Ascq.

Je remercie également Monsieur le Professeur M. DAUNE d'avoir accepté de juger ce travail. Je tiens particulièrement à lui exprimer ma reconnaissance pour l'accueil qu'il m'a fait dans son laboratoire, à Strasbourg, où j'ai pu effectuer deux séjours très enrichissants.

J'associe à ces remerciements Monsieur C. HOUSSTIER, Professeur à l'Université de Liège, au Sart-Tilman, pour les conseils très utiles qu'il m'a prodigués, pendant le séjour que j'ai pu effectuer dans son laboratoire, où l'accueil que j'y ai reçu a été très chaleureux.

Les études en spectroscopie de fluorescence présentées dans ce travail ont été réalisées dans le laboratoire de Monsieur le Professeur A. LABLACHE-COMBIER, à l'Université des Sciences et Techniques de Lille. Qu'il en soit ici remercié. Je remercie aussi Monsieur A. POLLET pour les conseils qu'il m'a donnés dans l'utilisation de cette technique.

Je suis reconnaissante à Madame M.N. VLAEMINCK, Chercheur à l'I.R.C.L., et à Madame M. THULLIER, pour l'aide précieuse qu'elles m'ont apportée dans le travail effectué sur les animaux de laboratoire.

Je remercie également Monsieur J.P. KERCKAERT, Chargé de Recherche INSERM à l'I.R.C.L., qui m'a apporté son aide et m'a fait bénéficier de sa grande expérience dans la technique d'extraction du DNA.

Je ne saurais oublier Monsieur G. LECOCQ qui a réalisé la mise au point, au laboratoire, de l'appareil d'enregistrement des températures de fusion.

Je remercie également Monsieur R. FUCHS, Chargé de Recherche au CNRS, et Mademoiselle M.C. LANG, pour les discussions très intéressantes que nous avons eues à Strasbourg.

Enfin, c'est avec plaisir que j'associe à ces remerciements tous mes camarades du laboratoire de Biophysique et de l'I.R.C.L. pour l'ambiance chaleureuse et détendue dans laquelle nous avons travaillé.

Mesdames M. BLANQUET et M.P. HILDEBRAND ont assuré avec soin la dactylographie de ce mémoire. Madame SAINLEGER en a réalisé l'impression. Qu'elles en soient ici vivement remerciées.

Je remercie la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique qui m'a accordé une allocation de recherche pendant les deux années de préparation de cette thèse.

ABRÉVIATIONS

AAF	Acétylaminofluorène
AAP	Acétylaminophénanthrène
AMP	Adénosine monophosphate
4 AQ	4-Aminoquinoléine
4 AQO	4-Aminoquinoléine-1-oxyde
ATP	Adénosine triphosphate
B.P.D.E.	Benzo(a)pyrène-diol-époxyde
di Ac-4HAQO	O,O'-Diacétyl-4-hydroxyaminoquinoléine-1-oxyde
DMS	Diméthylsulfonate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNA	Acide desoxyribonucléique
D.O.	Densité optique
EtOH	Ethanol
4HAQO	4-Hydroxyaminoquinoléine-1-oxyde
I.C.R. 170	Chlorure de 2-métoxy-6-chloro-9-[3-(éthyl-2-chloroéthyl) aminopropylamino] dihydroxy-acridine
I.F.	Intensité de fluorescence
I.R.	Infra Rouge
MMS	Méthyl-méthane-sulfonate
N-Ac-AAF	N-Acétoxy-acétylaminofluorène
N-Ac-AAFF	N-Acétoxy-acétylaminofluorofluorène
N-Ac-AAIF	N-Acétoxy-acétylaminiodofluorène
N-Ac-AAP	N-Acétoxy-acétylaminophénanthrène
NADPH ₂	Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit
4NQO	4-Nitroquinoléine-1-oxyde
4OHQO	4-Hydroxyquinoléine-1-oxyde
1'OH-Safrol	1'-Hydroxysafrol
P.A.P.S.	3'-Phospho-adénosine-monophosphate-5'-sulfate
P.B.S.	Phosphate buffered saline : tampon phosphate 20 mM + NaCl 0,15 M, pH 7,2
PPi	Diphosphate inorganique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNA	Acide ribonucléique
t/mn	Tours par minute
U.D.P.G.A.	Acide-uridine-diphosphate-glucuronique
U.V.	Ultra violet
V.S. 40	Virus Simien 40
X.P.	Xeroderma Pigmentosum

ERRATUM

Lire "détoxication" au lieu de "détoxification".

T A B L E D E S M A T I E R E S

	Pages
INTRODUCTION	1
GÉNÉRALITÉS	2
CHAPITRE I - LA CANCÉROGENESE CHIMIQUE	3
<i>Préliminaires</i>	3
<i>Les tendances générales actuelles</i>	6
I. <u>Le métabolisme des cancérogènes chimiques</u>	6
A - <u>La voie d'activation</u>	6
B - <u>La détoxification</u>	10
C - <u>La spécificité d'action des cancérogènes chimiques : rôle des systèmes enzymatiques</u>	10
II. <u>Interaction des cancérogènes chimiques avec les acides nucléiques</u>	13
A - <u>La nature des interactions et de l'altération résultante</u>	13
B - <u>Le destin des produits de l'interaction acides nucléiques-cancérogènes. Relation avec l'initiation du cancer</u>	19
CHAPITRE II - L'EXEMPLE DU 4-NITROQUINOLEINE-1-OXYDE, UN PRECANCEROGENE	31
I. <u>Les propriétés biologiques du 4NQO</u>	31
A - <u>Le pouvoir cancérogène</u>	31
B - <u>Propriétés caractéristiques de nombreux cancérogènes</u>	32
II. <u>La spécificité d'action du 4NQO : les organes cibles</u>	33
A - <u>Injection sous-cutanée</u>	34
B - <u>Injection intraveineuse</u>	34
C - <u>Administration orale</u>	35

	Pages
III. <u>Le métabolisme du 4NQO</u>	35
A - <u>La voie d'activation : la première étape</u>	35
B - <u>La voie de désactivation</u>	35
IV. <u>L'interaction avec les acides nucléiques</u>	38
A - <u>La mise en évidence de cette interaction</u>	38
B - <u>L'étude de la nature de cette interaction</u>	39
C - <u>La nature physique des perturbations induites sur les macromolécules cellulaires</u>	43
V. <u>La réparation des lésions induites par le 4NQO</u>	43
A - <u>Mise en évidence</u>	43
B - <u>La réparation par excision</u>	44
C - <u>La relation réparation-cancérogénèse</u>	46
CHAPITRE III - DISCUSSION SUR LE METABOLISME ULTIME	48
I. <u>Généralités</u>	48
II. <u>Cas du 4HAQO</u>	50
A - <u>Méthode d'investigation <i>in vitro</i> : <u>le di Ac-4HAQO</u></u>	50
B - <u>Méthode d'investigation <i>in vivo</i> : <u>Recherche d'une activité enzymatique</u></u>	52
III. <u>Bilan et conclusion</u>	55
 PARTIE EXPERIMENTALE	 60
I. <u>Les cancérogènes</u>	61
A - <u>Le 4NQO</u>	61
B - <u>Le 4HAQO</u>	61
C - <u>Le di Ac-4HAQO</u>	61

	Pages
II. <u>Le DNA</u>	64
A - <u>Matériel utilisé pour la comparaison <i>in vivo</i>- <i>in vitro</i></u>	64
B - <u>Matériel utilisé pour l'étude physico-chimique <i>in vitro</i></u>	65
III. <u>Les méthodes spectroscopiques</u>	66
A - <u>La spectroscopie d'absorption</u>	66
B - <u>La spectroscopie de fluorescence</u>	66
C - <u>L'anisotropie optique</u>	66
IV. <u>Préparation des solutions de DNA transformé <i>in vitro</i></u>	67
A - <u>Mise en solution des réactifs ; préparation du mélange réactionnel</u>	67
B - <u>Température de la réaction</u>	69
C - <u>Temps de réaction</u>	69
V. <u>Dosage du cancérogène fixé sur le DNA</u>	72
RÉSULTATS ET DISCUSSION	76
CHAPITRE I - LES PROBLEMES POSES PAR LA PURIFICATION DES ECHANTILLONS DE DNA IN VITRO. MISE EN EVIDENCE DE LA LIAISON COVALENTE DNA-CANCEROGENE	77
I. <u>La dialyse en continu : la première méthode employée</u>	77
II. <u>La précipitation à l'éthanol</u>	79
III. <u>Les tests effectués sur le DNA "modifié"</u>	82
A - <u>Dialyse dans un mélange tampon/éthanol : 50/50</u>	82
B - <u>Dialyse dans un milieu NaCl 1,5 M</u>	84

IV. <u>Amélioration de la méthode : diminution du temps de réaction</u>	86
CHAPITRE II - LA COMPARAISON IN VIVO-IN VITRO	89
I. <u>Etude in vivo</u>	89
II. <u>Etude in vitro</u>	89
III. <u>Conclusion</u>	91
CHAPITRE III - L'INTERACTION DNA-Di Ac-4HAQO IN VITRO	93
I. <u>Exploration de la réaction DNA-di Ac-4HAQO</u>	93
A - <u>Etude en fonction de la structure secondaire du DNA</u>	93
B - <u>Etude en fonction de la force ionique. Rôle de la structure dynamique du DNA</u>	106
II. <u>Les modifications de la structure du DNA, après fixation covalente du cancérogène</u>	110
A - <u>Mesure des températures de fusion</u>	110
B - <u>Mesure de la biréfringence électrique</u>	115
III. <u>Discussion sur le mécanisme chimique impliqué dans l'interaction DNA-di Ac-4HAQO. Intervention éventuelle d'une réaction d'acétylation</u>	117
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	121
BIBLIOGRAPHIE	124
APPENDICE TECHNIQUE	

I N T R O D U C T I O N

Depuis que l'on s'est aperçu que des facteurs d'environnement étaient présents pour une part importante dans l'étiologie du cancer chez l'Homme, la cancérogénèse chimique pose un problème de plus en plus alarmant.

Afin d'essayer de comprendre par quels mécanismes un agent chimique peut provoquer un cancer dans un organisme, de nombreuses recherches sont actuellement entreprises à l'échelon moléculaire. En effet, les cancérogènes chimiques qui sont pour la plupart des molécules organiques de petite taille, interagissent, après activation dans l'organisme, avec les macromolécules cellulaires, particulièrement le DNA. On conçoit donc la nécessité de multiplier les études d'interaction DNA-cancérogène, dans le but d'accumuler le plus grand nombre possible de schémas de mécanismes.

Nous avons choisi d'étudier la cancérogénèse chimique par le 4-nitroquinoléine-1-oxyde qui représente un modèle d'étude intéressant, ses propriétés biologiques étant très bien connues.

G É N É R A L I T É S

CHAPITRE I - LA CANCEROGENESE CHIMIQUE.

- Préliminaires -

A l'heure actuelle, de nombreuses données permettent d'énoncer que la cause du cancer chez l'Homme est essentiellement d'origine chimique. Le premier travail allant en ce sens est celui de l'Anglais Percival Pott qui remarqua, il y a de cela deux siècles, la fréquence anormalement élevée des tumeurs du scrotum chez les ramoneurs (132). Pott attribua à juste titre cette affection au contact continu avec la suie.

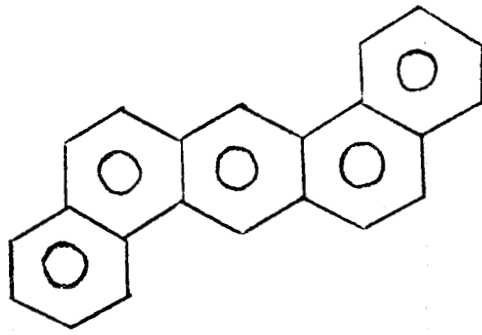
Environ cent ans plus tard, en 1861, le physicien Butlin nota qu'au Danemark, les ramoneurs arrivaient à se prévenir du cancer par la pratique d'une hygiène régulière, c'est-à-dire en évitant le plus possible le contact avec l'agent chimique contenu dans la suie (12). L'hypothèse de Pott était donc vérifiée, et les bases des premières mesures préventives contre le cancer étaient posées.

Dans les années qui suivirent, et ceci jusqu'à nos jours, d'autres observations, effectuées sur des groupes de personnes exposées à un même composé chimique, conduisirent à allonger la liste des cancérogènes connus chez l'Homme.

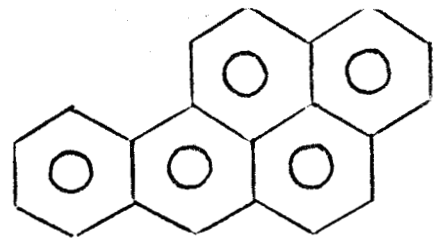
Parallèlement, dès le début du XX^{ème} siècle, les premières constatations sur l'Homme avaient incité certains chercheurs à tester différents produits chimiques sur des animaux. On assista alors à la découverte de toute une série de nouveaux composés, synthétiques et naturels, cancérogènes chez les animaux de laboratoire.

Un premier groupe de cancérogènes chimiques synthétiques a ainsi été identifié avant 1940 (Figure 1).

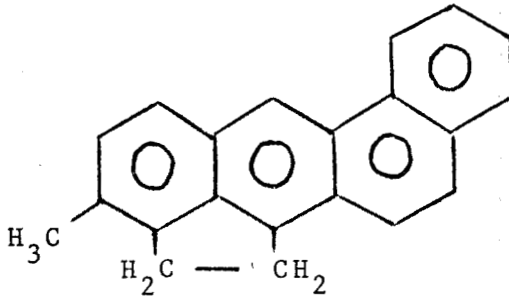
De 1940 à 1960, d'autres nouveaux composés furent inventoriés; parmi ceux-ci citons l'AAF et le 4NQO : le premier car son mécanisme d'action est maintenant totalement élucidé, le second car il constitue l'objet de notre travail. (Figure 2).



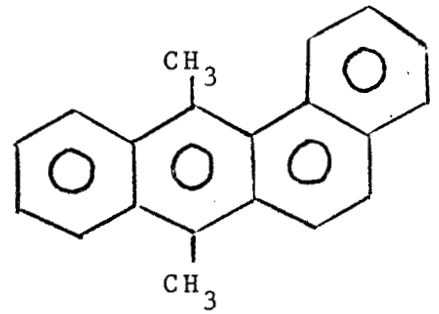
Dibenz(a,h)anthracène



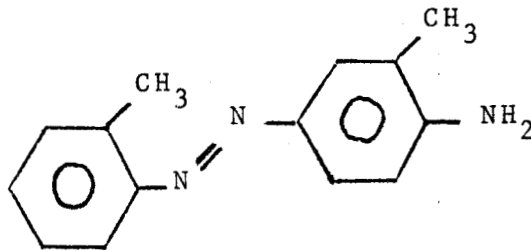
Benzo(a)pyrène



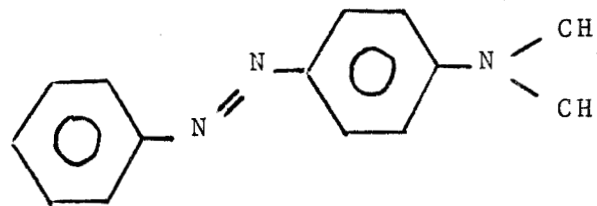
3-Méthylcholanthrène



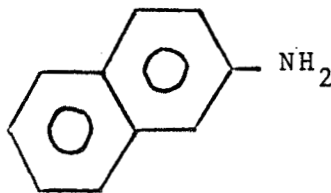
7,12-Diméthylbenz(a)anthracène



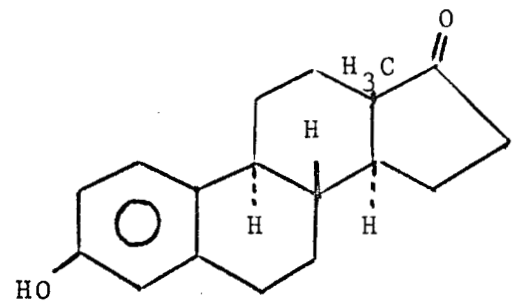
2'-3-Diméthyl-4-aminoazobenzène



N,N-Diméthyl-4-aminoazobenzène

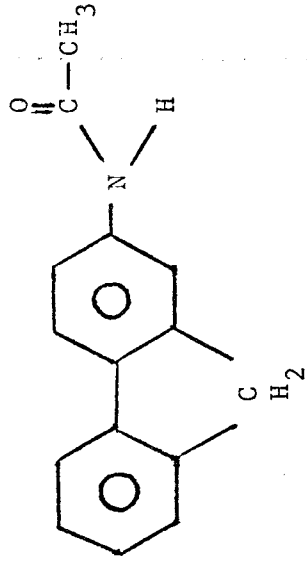


2-Naphthylamine



Estrone

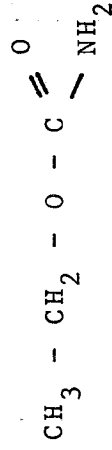
Figure 1.- Principaux cancérogènes chimiques synthétiques découverts avant 1940 (95).



2 - acétylaminofluorène

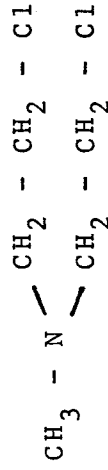


Tétrachlorure de Carbone

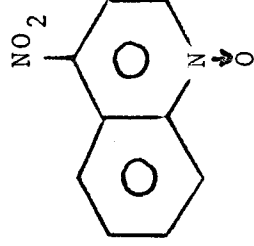


Carbamate d'Ethyle

Oxyde de Béryllium



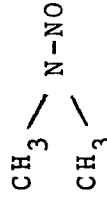
N-Méthyl-Bi-(β -Chloroethyl)-Amine



4-Nitroquinoléine 1-oxyde



Ethionine



Diméthylnitrosamine

Figure 2.- Structures de quelques agents chimiques cancérogènes découverts entre 1940 et 1960 (95).



On connaît également des cancérogènes chimiques naturels, qui seraient pour la plupart présents dans certaines alimentations (103), et dont le pouvoir cancérogène a été démontré chez les animaux de laboratoire. Quelques uns de ces composés sont présentés sur la figure 3.

Un défaut dans la conservation des aliments peut aussi être préjudiciable. Par exemple, on sait que l'aflatoxine, qui est un des constituants de la moisissure, est responsable de l'induction du cancer du foie dans certaines populations d'Afrique du Nord et de Thaïlande (78).

Au total, d'après E.C.Miller, plus d'une douzaine de classes de cancérogènes chimiques sont connues chez les animaux (95). Leur grande majorité est d'origine organique, mais on distingue parmi elles un petit groupe de composés métalliques, dérivant par exemple du béryllium, du cadmium, du chrome, du cobalt et du nickel.

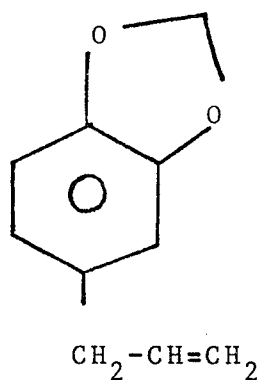
La mise en évidence de propriétés cancérogènes chez un animal n'implique pas du tout l'existence des mêmes propriétés chez l'Homme, et actuellement, seule une douzaine de substances peuvent être considérées avec certitude comme cancérogènes chez l'Homme.

Le tableau A en donne la liste la plus récente, établie par E.C.Miller en 1978 (95).

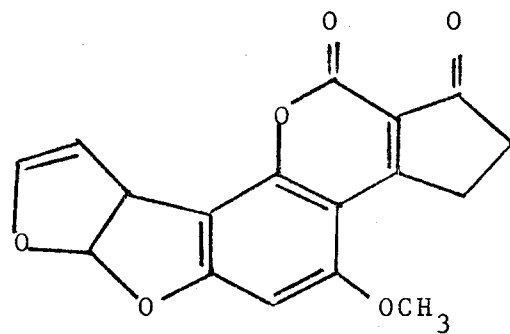
Nous n'avons pas mentionné dans cette liste les produits chimiques qui, comme les nitrosamines par exemple, ne sont pas cancérogènes mais le deviennent après ingestion, à la suite de réactions avec d'autres substances qui préexistent dans l'organisme (170).

Selon les Miller (102, 95), un phénomène marquant dans l'étiologie du cancer chez l'Homme est le rôle joué par le facteur environnement.

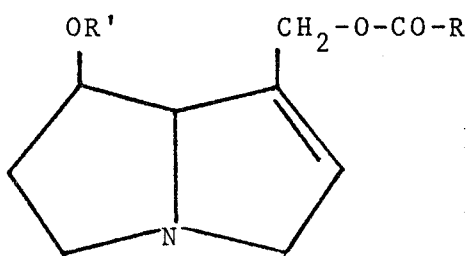
En effet, les conclusions tirées d'études épidémiologiques sur de petits groupes ethniques, exposés à de grandes quantités d'un même agent pendant de nombreuses années, montrent que 80 à 90 % des cancers chez l'Homme sont dûs à l'environnement.



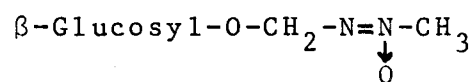
Safrol



Aflatoxine B₁



Alcaloïdes pyrrolizidiniques



Cycasine

Figure 3.-Cancérogènes chimiques naturels.

Agents chimiques	Sites de formation de la tumeur
<u>Origine industrielle</u>	
2-Naphtylamine	vessie
Benzidine (4,4'-Diaminobiphényle)	vessie
{4-Aminobiphényle 4-Nitrobiphényle	vessie
Ether Dichlorométhylique	poumons
Disulfure de chloroéthyle	appareil respiratoire
Chlorure de vinyle	mésenchyme du foie
Goudrons, suie, certaines huiles	peau, poumons
Composés du chrome	poumons
Composés du nickel	poumons, sinus nasaux
Amiante	plèvre, péritoine
Amiante plus fumée de cigarette	poumons, plèvre, péritoine
<u>Origine médicale</u>	
N,N-Bis(2 chloroéthyl)-2-naphtylamine	vessie
Diéthylstilbestrol	vagin
<u>Origine sociale</u>	
Fumée de cigarette	poumons, appareil urinaire, pancréas
Noix d'arec et chiques	muqueuse buccale

Tableau A . Agents chimiques reconnus cancérogènes chez l'Homme.
d'après Miller, E.C. Cancer Res. (1978), 38, 1479-1496.



Weisburger et Williams (170) donnent l'exemple des tumeurs de l'intestin et de l'estomac. Aux Etats-Unis le taux des cancers de l'estomac est relativement faible, alors que celui des cancers du colon est actuellement le plus élevé du monde. Au Japon, la situation est inversée : on y trouve énormément de cas de cancers de l'estomac, mais très peu de cancers du colon.

Les épidémiologistes ont suivi les immigrants Japonais aux Etats-Unis, et ont pu constater que le facteur environnement est bien prédominant, puisque ces immigrants, surtout ceux de la deuxième génération, souffrent de moins en moins de tumeurs de l'estomac, et de plus en plus de tumeurs du colon.

En conclusion, il apparaît que la prévention vis à vis d'agents cancérigènes devrait être une des préoccupations majeures dans la politique sanitaire pour l'Homme.

Jusque vers les années 1950-1960, la recherche sur la cancérogenèse chimique s'était surtout cantonnée dans l'énumération de nouveaux produits cancérigènes, et dans l'identification des tumeurs induites.

Par la suite, les énormes progrès de sciences nouvelles comme la Chimie Organique, la Biochimie et plus tard la Biophysique, donnèrent un élan déterminant à la recherche sur la cancérogenèse chimique.

- Les tendances générales actuelles -

Ces dix dernières années, deux concepts importants ont été énoncés qui ont permis d'aborder l'étude de la cancérogenèse chimique au niveau moléculaire :

- le métabolisme des cancérogènes chimiques; en particulier, l'activation de précancérogènes en cancérogènes ultimes réactifs,
- l'interaction chimique des métabolites actifs de la plupart des cancérogènes avec une grande variété de nucléophiles comprenant le DNA, le RNA et les protéines.

I. Le métabolisme des cancérogènes chimiques.

Il comprend deux voies enzymatiques différentes, qui agissent simultanément, en aboutissant à des résultats opposés:

- la voie d'activation, qui donne des métabolites actifs, nocifs pour la cellule, puisqu'ils réagissent directement avec les nucléophiles cibles;
- la voie de détoxification, qui métabolise le cancérogène en produits inactifs, inoffensifs pour la cellule et qui seront ensuite éliminés par l'organisme.

A) La voie d'activation.

Parmi toutes les réactions que peut subir un cancérogène chimique qui pénètre dans un organisme, il en est une, enzymatique, qui peut le transformer en une ou plusieurs formes actives. Ce sont surtout les Miller qui ont contribué, avec leurs collaborateurs, à cette découverte.

En 1947, ces chercheurs ont constaté que des Rats traités avec un cancérogène : le N,N diméthyl-4-amino azobenzène étaient capables de transformer ce composé en d'autres formes, qu'on retrouvait liées aux protéines dans le foie de ces animaux (98). Cette première observation leur donna l'intuition de l'existence d'une activation métabolique.

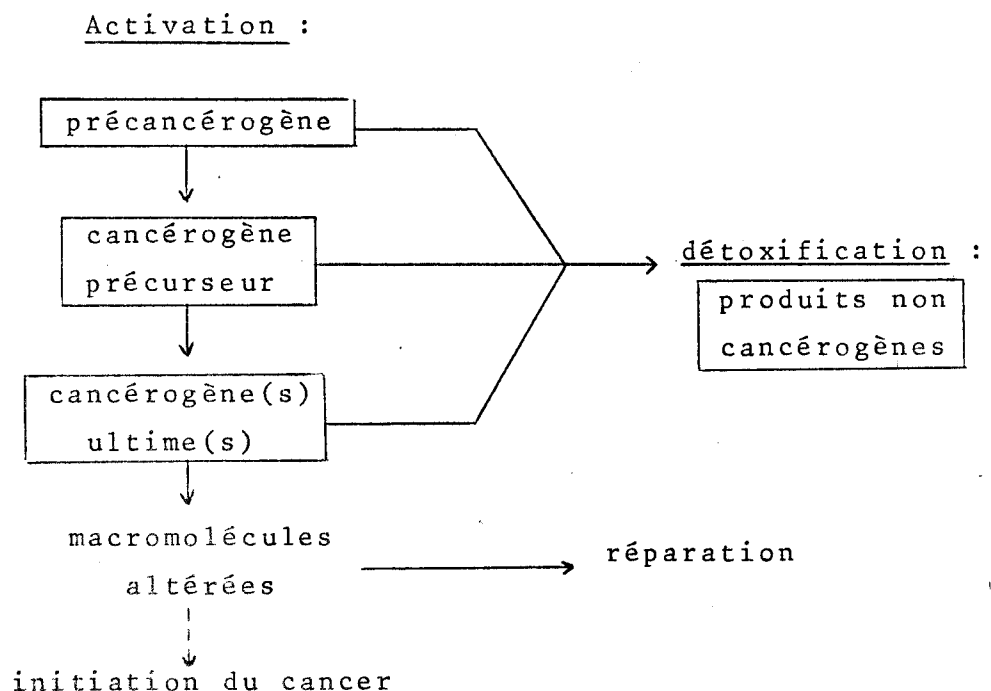
D'autres observations semblables, à propos d'autres cancérogènes, vinrent renforcer leur hypothèse. Par exemple ils constatèrent que l'acétylaminofluorène (AAF), puissant hépatocancérogène chez le Rat, induisait des tumeurs loin de son site d'injection et ne réagissait pas *in vitro* sur le DNA ou le RNA (99).

D'autres chercheurs notèrent également ce phénomène, tels Heidelberger (44) et les Weisburger (168), qui étudièrent le cas des hydrocarbures aromatiques et de l'AAF.

C'est en 1970, que J.A.Miller énonça clairement le concept de l'activation enzymatique des cancérogènes chimiques, se basant sur une large étude des divers composés connus à cette date (102).

En fait, la plupart des produits chimiques ayant le pouvoir d'induire une tumeur cancéreuse, ne sont en réalité que des précancérogènes qui sont métabolisés en un cancérogène précurseur, puis finalement convertis en un ou plusieurs cancérogènes ultimes. Ce sont les formes ultimes qui, sans activation enzymatique, réagissent avec les macromolécules cellulaires de l'organe cible.

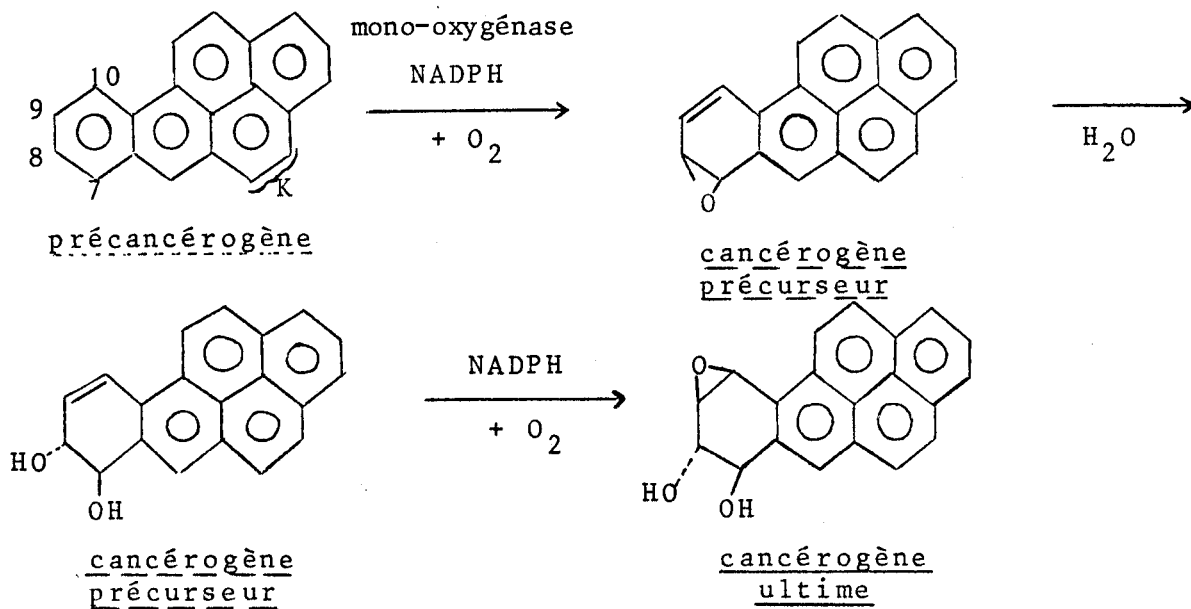
Le schéma simplifié présenté ci-dessous illustre ces mécanismes.



Le cas de l'AAF, de la série des arylamides, représente un des exemples les mieux connus actuellement. Le schéma de son activation est donné dans la figure 4.

La première étape de cette transformation consiste en une hydroxylation, comme l'ont montré Cramer *et al* en 1960 (20). La deuxième étape est une estérification du groupe hydroxyle, conduisant à la formation de plusieurs esters. De Baun *et al* (23) et Miller *et al* (97) ont beaucoup contribué à l'élucidation des mécanismes impliqués dans cette étape ultime. Les autres amides et amines aromatiques suivent le même schéma d'activation que l'AAF (23, 100).

Un autre exemple connu actuellement est celui des hydrocarbures aromatiques polycycliques, illustré dans le schéma ci-dessous par le cas du benzo(a)pyrène (51, 87) :



Contrairement à ce que certains auteurs avaient tout d'abord pensé (134), le métabolite précurseur intervenant dans la cancérogenèse chimique induite par ces composés n'est pas un époxyde de la région K. C'est ce qu'ont prouvé Borgen *et al* (11), puis Sims *et al* en 1974 (147).

Les brillantes études de Huberman *et al* en 1976, puis de Levin *et al* en 1977 ont montré par la suite que le métabolite ultime majeur du benzo(a)pyrène est le 7β, 8α-dihydroxy-9α,

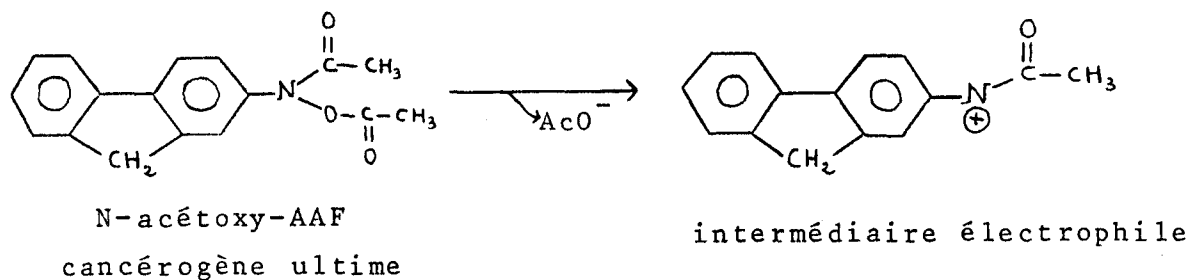
10 α -époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo(a)pyrène (51, 87) (Voir schéma précédent).

Le safrol, qui est un hépatocancérogène chez le Rat et la Souris, serait métabolisé de telle sorte qu'on aboutirait à plusieurs formes ultimes, la première étape d'activation conduisant d'abord à la formation du 1'OH-safrol (63).

Il existe de nombreux cancérogènes dont le métabolisme est encore mal connu. Une grande partie de la recherche sur la cancérogenèse chimique a toujours pour objet l'élucidation de ces mécanismes, qui sont parfois très complexes.

Le deuxième point fondamental souligné par les Miller (100, 102) est que les formes ultimes des cancérogènes chimiques, dans tous les cas connus, sont de très puissants électrophiles, qui n'ont aucun besoin d'être pris en charge par des enzymes pour interagir avec les nucléophiles cellulaires.

Le schéma ci-dessous montre la formation directe de l'intermédiaire réactif à partir du N-acétoxy-AAF, une des formes ultimes de l'AAF (100).



Il faut noter que certains cancérogènes, tels les agents alkylants, sont des cancérogènes à action directe (100, 170), c'est-à-dire que ces composés sont en eux-mêmes des électrophiles puissants; de ce fait, ils n'ont pas besoin d'être activés dans l'organisme, comme le sont les précancérogènes, pour pouvoir réagir avec leurs cibles (Tableau B). Ils seront donc moins spécifiques que les précancérogènes. Ils auront aussi un pouvoir cancérogène moins élevé : en effet, leur très grande réactivité implique une grande instabilité; ils sont donc plus facilement détruits dans l'organisme avant d'avoir pu atteindre leur cible.

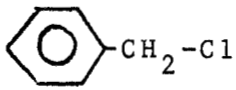
<p>β Propiolactone</p>	$\begin{array}{c} \text{O} - \text{CO} \\ \quad \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \end{array}$
<p>Ethylène imine</p>	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \end{array}$
<p>Diméthyl sulfate (D.M.S.)</p>	$\text{CH}_3 - \text{O} - \text{SO}_2 - \text{O} - \text{CH}_3$
<p>Disulfure de 2-chloro-éthyle (gaz moutarde)</p>	$\begin{array}{c} \text{Cl} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \backslash \\ \text{Cl} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \quad / \quad \text{S} \end{array}$
<p>chlorure de benzyle</p>	
<p>méthyl méthane sulfonate (M.M.S.)</p>	$\text{CH}_3 - \text{SO}_2 - \text{O} - \text{CH}_3$
<p>éthyl méthane sulfonate (E.M.S.)</p>	$\text{C}_2\text{H}_5 - \text{SO}_2 - \text{O} - \text{CH}_3$



Tableau B. Cancérogènes à action directe.

B) La détoxification.

Dans beaucoup de cas, la voie métabolique vers le cancérogène ultime ne représente qu'un faible pourcentage du métabolisme total; la majeure partie consiste en fait en une désactivation ou détoxification, qui entre en compétition avec la réaction d'activation.

Il existe donc dans la cellule des systèmes enzymatiques capables de transformer les cancérogènes en métabolites inactifs, qui sont ensuite excrétés par l'organisme (100, 170).

Ces réactions peuvent être oxydatives comme la plupart du temps, ou réductrices comme dans le cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des dérivés aromatiques nitrés. Dans ce cas, le système enzymatique de réduction est présent à la fois chez les mammifères et les bactéries. Un bon exemple est celui du 4-nitroquinoléine-1 oxyde qui est le précancérogène dont nous cherchons à élucider le mode d'action. C'est ce que nous montrerons dans le deuxième chapitre.

C) La spécificité d'action des cancérogènes chimiques: rôle des systèmes enzymatiques.

Les deux types de réactions, l'activation et la détoxification, sont donc enzymatiques. Ceci implique que l'induction d'un cancer, dans une espèce donnée, et pour une même espèce dans un tissu donné, dépend essentiellement de la présence, de l'activité et de la régulation des enzymes responsables de ces transformations métaboliques.

C'est ainsi par exemple, que le Cobaye, qui ne possède pas l'enzyme qui effectue l'hydroxylation, ne peut métaboliser l'AAF en N-OH-AAF (101).

Beaucoup de cancérogènes, dans certaines conditions expérimentales chez les animaux, mais aussi chez l'Homme, possèdent une activité spécifique pour certains organes cibles.

Par exemple, certaines amines aromatiques provoquent un cancer de la vessie chez l'Homme, le Chien et le Hamster, mais un cancer du foie chez la Souris (169).

D'autre part, le 2'-3-diméthyl-4 aminobiphényle donne des cancers de l'intestin chez le Rat (149), mais des tumeurs de la vessie chez le Hamster (148).

Pour expliquer ces phénomènes, Weisburger et Williams (170) proposent un mécanisme dans lequel le foie jouerait le rôle de distributeurs des métabolites actifs vers les autres organes; selon l'espèce concernée et selon la présence ou non de certains systèmes enzymatiques, la spécificité de tissu serait alors déterminée.

D'après Conney et Kuntzman (17), les substances cancérogènes qui pénètrent à l'intérieur de la cellule sont métabolisées par les systèmes enzymatiques ordinairement fonctionnels, et responsables du métabolisme de substances endogènes similaires. Le foie étant un organe impliqué dans le catabolisme de plusieurs composés endogènes, on comprend qu'il puisse posséder la plupart des systèmes d'activation et de détoxification spécifiques; selon Weisburger et Williams (170), il n'y aurait pas de cancérogène qui ne soit métabolisable dans le foie.*

Les réactions d'activation qui s'y passent ne conduisent pas seulement à des cancérogènes ultimes à action directe agissant sur place, mais également à des formes conjuguées qui servent à transporter le cancérogène vers un autre organe cible. Et c'est à l'endroit du tissu ou de la cellule où se trouvent des enzymes capables de détacher les entités actives de leur conjugué de transport, que le cancer risque d'être déclenché.

C'est ainsi que le cancer de la vessie induit par les aryl-amides, serait dû au déchargement dans cet organe des formes actives, préalablement transportées sous forme de glucuronides, synthétisés dans le foie. La figure 5, présentée par E.C. Miller en 1978 (95) montre ces mécanismes.

*Ces systèmes enzymatiques sont également présents dans d'autres organes, comme le rein, le poumon, le transit gastro-intestinal, mais à un moindre degré (170).

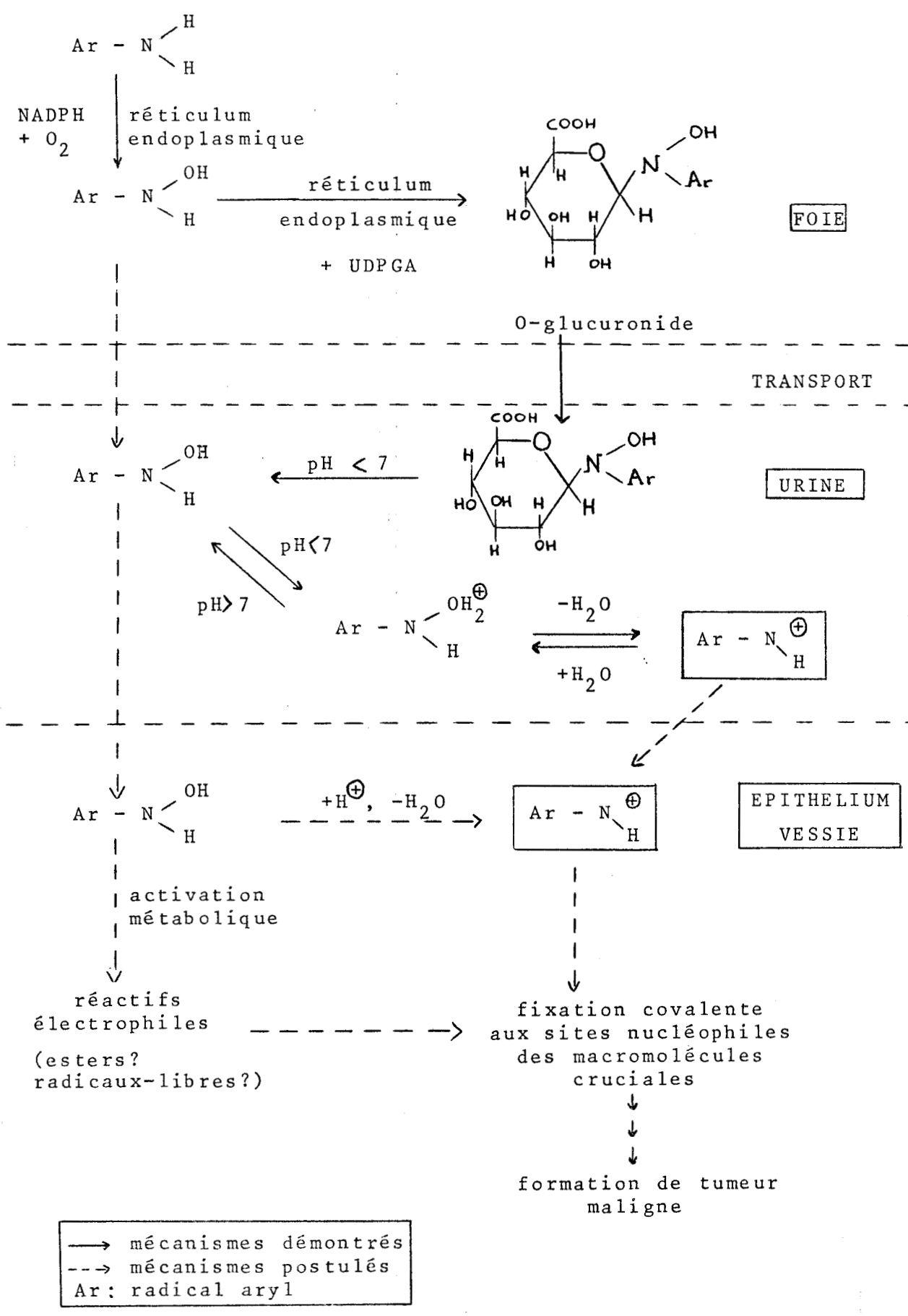


Figure 5.- Formation et transport des métabolites (précurseurs et ultimes) postulés dans l'induction du cancer de la vessie par les arylamides (95).

BHS
 LILLE

Il faut d'autre part noter le rôle joué par la flore bactérienne qui habite les intestins de tous les mammifères, dans l'activation de certains cancérogènes chimiques. En particulier, certaines de ces bactéries possèdent les enzymes nécessaires à l'hydrolyse des formes conjuguées que nous avons citées précédemment, comme les glucuronides (171). De plus, le métabolisme d'un cancérogène chimique dépend de toute une série d'autres variables, pour un même individu : l'âge, le sexe, la compétence immunitaire, l'alimentation, etc... (100 , 170).

Le métabolisme des cancérogènes chimiques est donc un phénomène complexe, spécifique de l'espèce et de l'individu dans une même espèce. Cette étape représente un facteur décisif pour l'activité d'un cancérogène, et la connaissance parfaite du métabolisme de chaque composé dangereux aiderait à la prévention contre le cancer.

Comme le suggèrent les Miller (100 , 102), la caractérisation des métabolites ultimes, dans tous les cas, permettrait de rechercher de façon théorique et pratique :

- . à inhiber ou prévenir la formation *in vivo* de ces formes électrophiles;

- . à rendre ces électrophiles forts inoffensifs pour la cellule, en les piégeant par de petites molécules nucléophiles, non toxiques pour l'organisme.

En ce qui concerne la production des métabolites ultimes, elle est sous la dépendance des systèmes enzymatiques activateurs et inhibiteurs, qui s'interrégulent entre eux. Une solution proposée par Weisburger et Williams (170), consisterait à essayer d'agir sur ces enzymes :

- . en cherchant à inhiber ceux qui sont responsables de l'activation du précancérogène en cancérogène ultime.

- . en essayant de stimuler ceux qui interviennent dans la détoxification.

La manipulation des systèmes enzymatiques paraît cependant délicate, ces enzymes étant impliqués avant tout dans le fonctionnement normal de la cellule. Par conséquent, en modifiant leur activité, on risque de faire apparaître des fonctions

cellulaires nouvelles qui pourraient être pathologiques, et probablement incontrôlables. Cette technique nécessitera sûrement encore bien des études avant de pouvoir déboucher sur une thérapeutique valable, en supposant qu'elle y parvienne.

II. Interaction des cancérogènes chimiques avec les acides nucléiques.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le deuxième point fondamental démontré par les Miller est le suivant : Les formes actives des cancérogènes chimiques sont des électrophiles puissants, qui se fixent directement et de façon covalente dans la majorité des cas, sur les acides nucléiques et les protéines.

Nous discuterons surtout des interactions avec les acides nucléiques, particulièrement le DNA qui a été l'objet d'études très nombreuses.

Sur les protéines, la fixation a lieu au niveau des atomes de soufre et d'azote (95). Ces macromolécules pourraient jouer un rôle dans le transport des formes ultimes, comme l'ont suggéré tout récemment Mainigi et Sorof (91).

A) La nature des interactions et de l'altération résultante.

1) *Nature des interactions.*

Selon la thèse des Miller, les interactions entre le RNA et le DNA et les métabolites actifs, aboutissent essentiellement à des liaisons covalentes, et seul ce type de lien, très stable, pourrait être en rapport avec l'induction d'un cancer (95, 102).

Depuis 1970, de nombreuses recherches ont été développées, afin de déterminer la nature des interactions rencontrées, pour tous les produits reconnus cancérogènes à cette date. Deux mises au point de ces travaux ont été faites, en 1973 par Irving (57), et en 1975 par Sarma *et al* (139).

Ces auteurs se sont surtout intéressés au DNA, les recherches sur le RNA étant moins nombreuses et moins avancées.

Il ressort de leur étude que les cibles de ces interactions, au niveau de la double hélice, sont principalement les quatre bases et parfois la liaison phosphodiester (139).

Les groupements les plus réactifs semblent être les atomes d'azote des bases puriques en position 3 et 7, qui ne sont engagés dans aucune liaison. Le N-7 de la guanine serait le site le plus réactif, suivi du N-3 et du N-7 de l'adénine (voir pour illustration la figure 6).

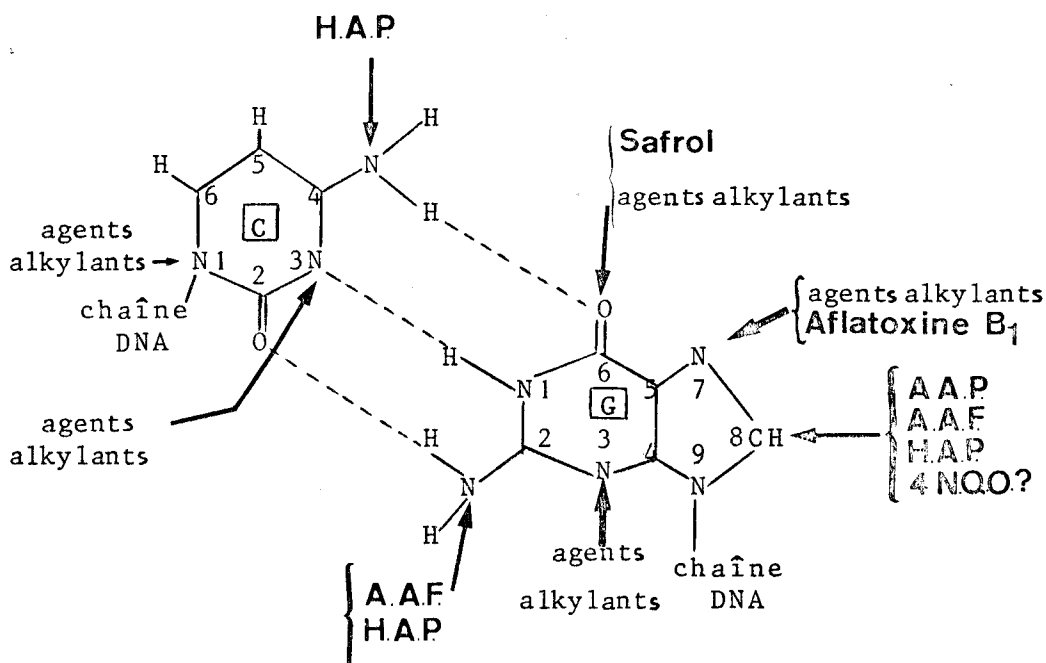
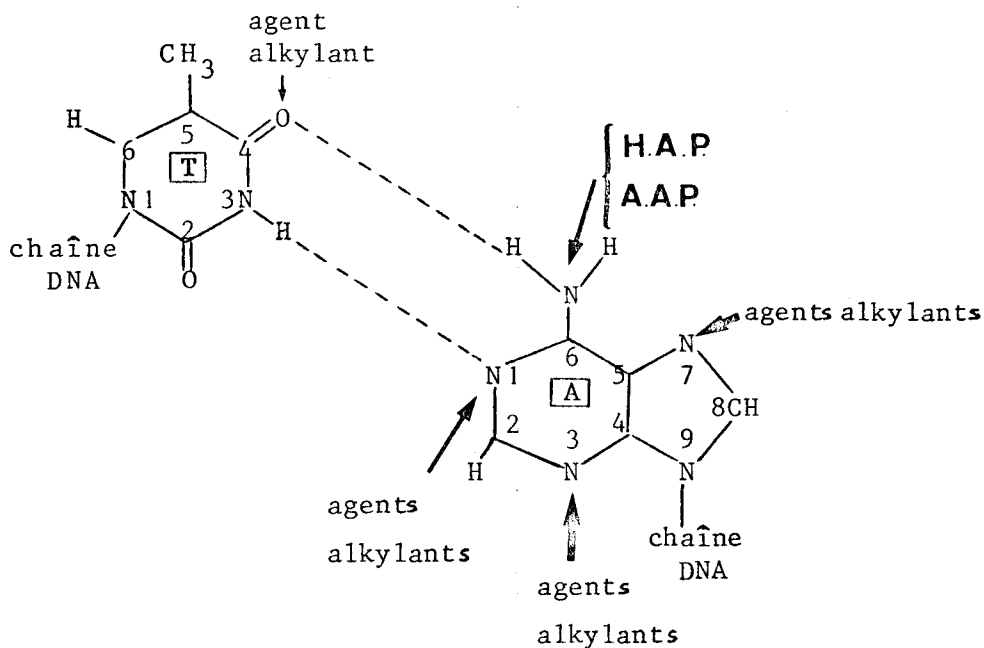
La plupart des cancérogènes réagissant sur ces sites sont des agents alkylants qui se fixent au DNA par substitution nucléophile, de type 1 ou de type 2, comme dans le cas du MMS et du DMS.

Cependant, beaucoup d'autres composés, particulièrement les cancérogènes ultimes dérivant de l'activation de précancérogènes, réagissent en d'autres sites des bases puriques et pyrimidiques. Les réactions se font alors à un degré plus faible, mais avec une plus grande spécificité, comme l'indique la figure 6.

Enfin, comme le souligne E.C. Miller (95), on peut observer plus d'un produit d'addition sur le DNA pour un cancérogène donné. Cela est dû d'une part, au fait que la plupart des cancérogènes peuvent être métabolisés en plusieurs formes ultimes, et que d'autre part, il existe de multiples sites nucléophiles dans la macromolécule de DNA.

Par exemple, dans le cas de l'AAF, on obtient sur le DNA deux composés différents : un produit majeur, par fixation de 80% du cancérogène sur le C-8 de la guanine (81, 96), et un composé mineur, résultant de l'addition des derniers 20% sur le 2-NH₂ de cette même base (80).

La situation est pratiquement inversée pour une autre arylamide, l'AAP : la réaction majeure a lieu sur le 6-NH₂ de l'adénine, et le produit d'addition mineur est situé sur le C-8 de la guanine. C'est ce qu'ont montré Scribner et Naimy (141, 142).



H.A.P. : hydrocarbure aromatique polycyclique.

→ sites très réactifs; pas de spécificité.

→ } sites moins réactifs; il peut exister une spécificité.

[A] Adénine [T] Thymine [G] Guanine [C] Cytosine

Figure 6.- Sites d'interaction de cancérogènes chimiques sur le DNA *in vivo* et *in vitro* (139).



En ce qui concerne les hydrocarbures aromatiques, la fixation covalente des métabolites ultimes sur le DNA a été montrée *in vivo* par Gelboin en 1969 (39). La réaction aurait lieu sur le 2-NH₂ et le C-8 de la guanine, le 6-NH₂ de l'adénine, et le 4-NH₂ de la cytosine (139). Très récemment, Groy *et al* (41) ont identifié le site majeur de fixation de l'aflatoxine B₁ sur le DNA comme étant le N-7 de la guanine.

Sur ces exemples, nous pouvons déjà constater qu'il existe une certaine spécificité au niveau de l'interaction chimique DNA-cancérogène. C'est ainsi qu'en plus de la spécificité d'espèce et de tissu, due aux systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des cancérogènes, nous trouvons une spécificité dans l'interaction chimique en elle-même, entre la petite molécule et la macromolécule.

La détermination des sites de fixation du métabolite ultime sur les macromolécules cibles apparaît donc comme un des problèmes de base à résoudre, pour mieux comprendre l'action d'un cancérogène.

Une autre question très importante à élucider par la suite, est de déterminer lequel de ces produits d'addition est le plus dangereux, et d'identifier le rôle spécifique de chacun d'eux dans le processus de la cancérogénèse.

Comme l'ont signalé Irving (57) et Sarma *et al* (139), nous rappelons que si la fixation covalente des métabolites ultimes au DNA est celle qui prédomine *in vivo*, donc la plus intéressante à étudier, il peut exister d'autres interactions entre le DNA et les cancérogènes obtenues *in vitro*. Ces interactions non covalentes peuvent être classées en deux groupes :

- la fixation interne ou intercalation, dans laquelle l'agent chimique est inséré entre les paires de bases du DNA;

- la fixation externe, dans laquelle il interagit avec les bases en des sites qui n'interviennent pas dans leur appariement. Il est alors fixé selon une direction pratiquement perpendiculaire au plan des bases.

Ces interactions, qui ont lieu *in vitro*, sont très difficilement extrapolables *in vivo*. C'est pourquoi nous ne développerons pas ici ces études, qui sont d'un intérêt moindre pour la compréhension des phénomènes d'induction de la cancérogenèse chimique.

2) Nature de l'altération résultante des macromolécules

a- altérations structurales

La connaissance du rôle central du DNA dans le stockage de l'information génétique, et de celui des RNA dans la transcription de cette information en protéines cellulaires, a amené de nombreux auteurs à étudier la nature de la perturbation induite sur ces macromolécules, après fixation covalente du métabolite ultime.

Nous discuterons plus particulièrement de l'altération de la structure du DNA modifié par un cancérogène, objet de l'étude que nous présentons dans ce mémoire.

Les méthodes d'étude sont essentiellement physico-chimiques, et plus particulièrement spectroscopiques. L'étude se fait sur le DNA isolé.

Des techniques comme la spectrophotométrie d'absorption, les profils de température de fusion, la fluorescence, le dichroïsme circulaire, la RMN, le dichroïsme et la biréfringence électriques, la viscosité, le gradient de sucrose alcalin, sont d'une très grande utilité pour la visualisation de la perturbation moléculaire obtenue.

L'exemple qui a été le plus étudié jusqu'ici est celui de l'AAF.

En 1971, Nelson *et al* (114) ont débuté par un travail sur des oligonucléotides modifiés par ce cancérogène, utilisant la technique de RMN et de dichroïsme circulaire. A partir de leurs

résultats, ces auteurs ont alors suggéré un modèle prévoyant au niveau du DNA une dénaturation locale de la double hélice, induite par la fixation covalente du cancérogène.

Peu de temps auparavant, d'autres chercheurs avaient observé de telles régions dénaturées, en examinant par microscopie électronique le DNA extrait de foies d'animaux traités par l'AAF (33).

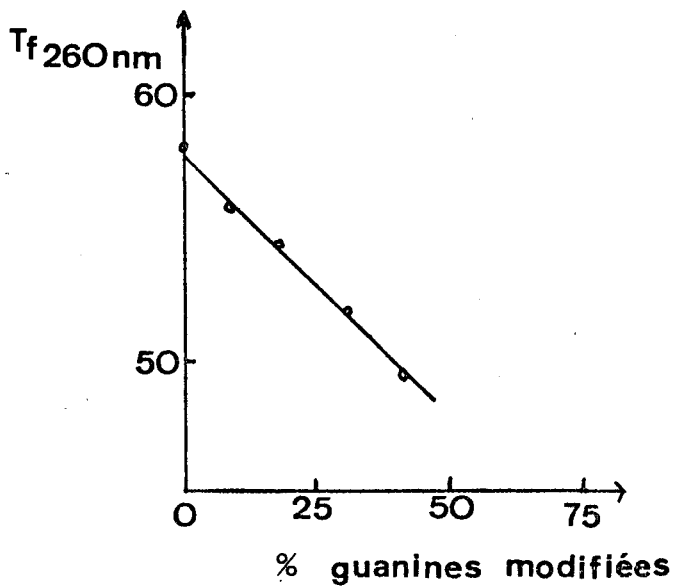
Fuchs *et al* ont proposé plus récemment un modèle original d'interaction DNA-cancérogène, basé sur de nombreuses études *in vitro*, après fixation du N-Ac-AAF sur le DNA libre en solution (37). Leurs résultats sont d'ailleurs en bon accord avec ce que prévoyaient Nelson *et al* (114). Dans ce modèle, présenté dans la figure 7, le cancérogène fixé sur le C-8 de la guanine* est inséré profondément dans la double hélice, provoquant une ouverture partielle de celle-ci. La guanine est alors rejetée à l'extérieur (37). Ce phénomène se manifeste en particulier par une modification de la température de fusion du DNA transformé, qui est inférieure à celle d'un DNA non traité (34, 37).

Fuchs *et al* avaient pensé pouvoir établir une corrélation entre cette pénétration du noyau fluorène à l'intérieur de la double hélice et le pouvoir cancérogène de l'AAF. Dans ce but, ils avaient étudié la fixation sur le DNA du N-Ac-AAFF et du N-Ac-AAIF (36, 37), l'empêchement stérique de ce dernier lui interdisant de s'insérer entre les plans des bases, comme il est montré dans la figure 7.

Très récemment, Lefèvre, Fuchs et Daune ont complété ces travaux en analysant les modèles obtenus avec les dérivés de l'AAF, sur des trinuécléotides (85).

Des études similaires sont actuellement entreprises par M.C. Lang, R. Fuchs et M. Daune, sur l'AAP. Ils ont examiné les modifications structurales du DNA après réaction avec le N-Ac-AAP, qui est le cancérogène ultime (83). Leurs résultats montrent que, contrairement à l'AAF, ce cancérogène n'est pas inséré profondément dans la double hélice.

* Selon ces auteurs, le cancérogène fixé sur le 2-NH₂ pourrait être couché dans le grandsillon du DNA, et ne provoquerait qu'une très faible dénaturation (21).



Fuchs, R.P.P. and
 Daune, M.P.
FEBS Letters (19
 14, 206-208.

Décroissance de la Température de fusion T_f en fonction du pourcentage de cancérigène fixé.

N.AcO.AAFF est cancérigène, mais
N.AcO.AAIF ne l'est pas.

Fuchs, R.P.P., Lefèvre,
 J.F., Pouyet, J. and
 Daune, M.P.
Biochemistry (1976), 15,
 3347-3351

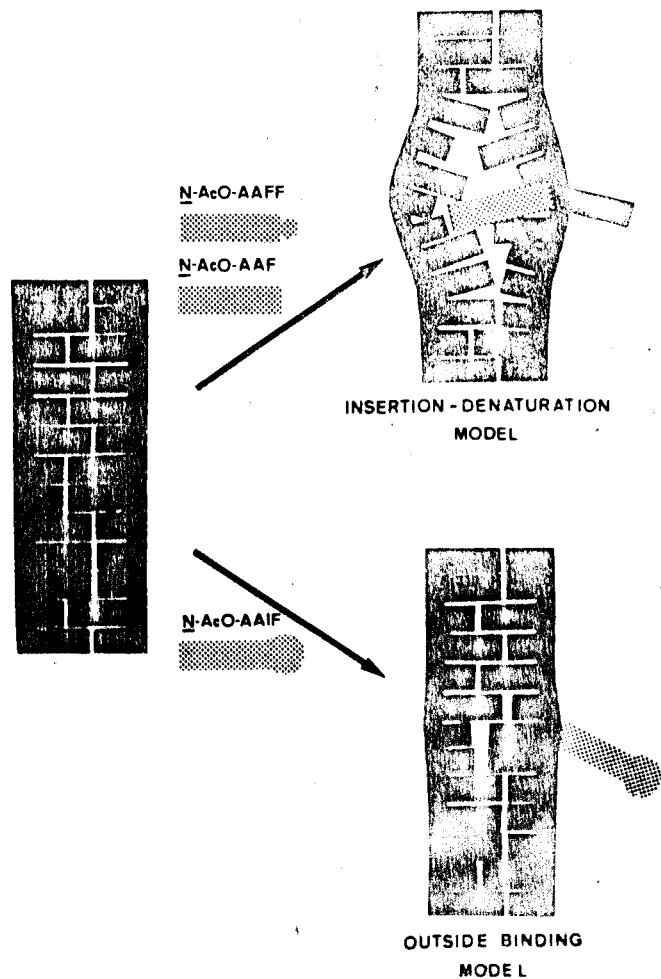


Figure 7

Anderson *et al*(4) ont également travaillé *in vitro*; ils ont constaté dans le cas de la 2-naphtylamine, une diminution de la température de fusion du DNA traité par une forme ultime de ce cancérogène. Leurs études cependant restent très incomplètes.

Il est intéressant de pouvoir étudier la modification de la structure du DNA *in vitro*, la condition impérative étant bien entendu de pouvoir synthétiser chimiquement le métabolite ultime. En effet, la propriété des cancérogènes ultimes de se fixer directement sur le DNA, permet d'employer une méthodologie relativement simple. La préparation des échantillons est plus rapide et demande un investissement de matériel moins important qu'une technique *in vivo*.

Bien souvent d'autre part, les effets obtenus *in vivo* sont trop faibles pour être décelés par des techniques spectroscopiques (57). La technique *in vitro* permet donc, en accentuant le défaut, de le visualiser.

Cependant, comme le soulignent Irving (57) et Sarma *et al* (139), il faut tout de même rester prudent dans l'interprétation biologique de résultats obtenus *in vitro*. Le fait que le DNA puisse être beaucoup plus altéré par un cancérogène *in vitro* que *in vivo*, s'explique par la différence de conformation de la macromolécule, à l'état libre et à l'état compact dans la chromatine.

Cependant, et tout en sachant que la lésion observée *in vitro* doit être minimisée, il est possible grâce à ces études d'établir des comparaisons entre différents cancérogènes; en particulier, elles permettent d'évaluer la perturbation plus ou moins importante de la structure en double hélice du DNA modifié, selon la nature du cancérogène étudié.

La fixation sur les acides nucléiques d'une petite molécule organique peut, dans certains cas, modifier profondément la structure de ces macromolécules, ce qui peut entraîner une altération fonctionnelle de celles-ci. Cette perturbation peut être dramatique pour la cellule, et pourrait être responsable de la perte du contrôle de la division cellulaire, qui est la cause principale de l'initiation du cancer.

b- altérations fonctionnelles.

L'interaction d'un cancérogène chimique avec le DNA peut conduire à plus d'un changement dans ses propriétés biologiques. Parmi les effets cités par Irving (57), citons plus spécialement :

- l'inhibition de la synthèse du DNA;
- l'inhibition de la transcription;
- la production de mutations.

Sarma *et al* relatent également un effet sur le cycle cellulaire, mais les études sont encore peu nombreuses à ce sujet, et l'effet n'est pas toujours en nette corrélation avec la fixation du cancérogène sur le DNA (139).

B) Le destin des produits de l'interaction acides nucléiques-cancérogènes. Relation avec l'initiation du cancer.

Dans l'ensemble, il apparaît que la liaison cancérogène-DNA soit une condition nécessaire, mais non suffisante pour donner lieu à l'induction de tumeurs malignes. Il n'existe en effet pas toujours une bonne corrélation entre la fixation des composés chimiques au DNA et leur pouvoir cancérogène (95, 100). C'est que, comme nous allons le décrire brièvement, il existe toute une série de réactions sophistiquées, correspondant à des mécanismes de réparation, qui sont mises en jeu dès qu'un cancérogène se fixe sur les acides nucléiques. Ceci n'est pas surprenant du tout puisque l'on sait qu'un changement dans la structure du DNA, même s'il est minime, peut être dangereux ou létal pour la cellule.

Actuellement, les auteurs s'intéressent de plus en plus à ces phénomènes, et l'hypothèse d'une relation de cause à effet, existant entre une défaillance dans le processus de la réparation et l'induction de tumeurs cancéreuses a été émise.

On connaît surtout la réparation du DNA, le cas du RNA étant beaucoup moins étudié. Nous insisterons donc sur l'importance de cette étape, puisqu'il semble logique, après avoir étudié l'interaction DNA-cancérogène, de relier cette première phase à l'événement fondamental pour la cellule qu'est la répa-

ration des altérations du DNA. Nous montrerons que ces mécanismes, bien qu'ils représentent un processus de défense cellulaire, peuvent aller à l'encontre du bon fonctionnement de la cellule, en induisant des fonctions anormales qui peuvent aboutir à la transformation néoplasique.

1) *Les différents mécanismes de réparation.*

Actuellement, trois types de mécanismes sont connus :

- . la réparation photoenzymatique, très spécifique et très efficace;
- . la réparation par excision, qui est fidèle et n'introduit pas d'erreur dans la portion de DNA néoformée;
- . la réparation par tolérance, ou répllication post-répllicative, qui supprime la lésion en donnant une copie du DNA inexacte par rapport à la matrice primitive. Ce mécanisme est donc source d'erreurs.

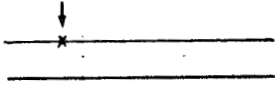
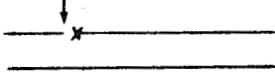
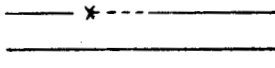
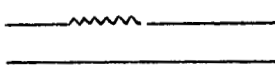
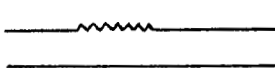
Le processus de photoréactivation est le plus simple et le plus spécifique des trois procédés. Il répare uniquement les lésions dues aux rayons ultra-violetts, c'est-à-dire les dimères de pyrimidine (76). Dans l'ordre de complexité viennent ensuite la réparation par excision et la réparation post-répllicative. Ces processus sont enzymatiques, les enzymes impliquées se trouvant dans le noyau. Elles ont été énumérées par Irving en 1973 (57). Cependant, dans la plupart des cas, leur fonctionnement exact est mal connu.

Sur la figure 8, on trouvera un schéma des trois processus cités précédemment. L'explication détaillée de ces mécanismes est donnée dans différentes revues : Kondo (1975), Dévoret *et al* (1975), Setlow (1978) et Marx (1978). (76, 26, 143, 93).

Ces trois processus de réparation fondamentaux sont connus chez la bactérie et il existe des systèmes analogues chez les animaux supérieurs, l'Homme en particulier.

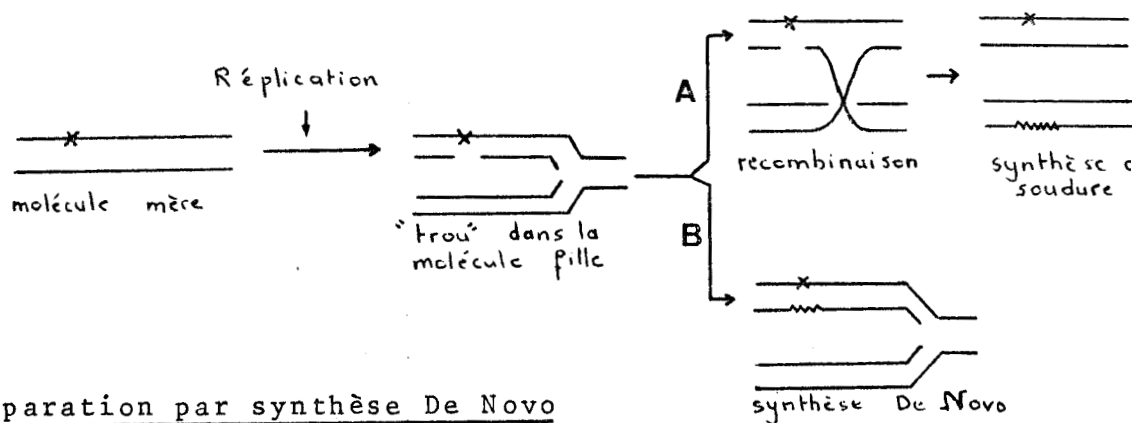
Il nous paraît intéressant de souligner maintenant que, si un organisme est capable de réparer les lésions de son DNA, il peut également tolérer le défaut. C'est-à-dire qu'il effectue sa division cellulaire, la répllication de son DNA, etc..., en dépit de l'existence de ces altérations; elles sont alors perpétuées

Réparation par excision

Étapes		Enzymes
1) Reconnaissance		Endonucléase
2) Incision		Endonucléase
3) Suppression de la lésion		Exonucléase
4) Remplacement par de nouvelles bases		DNA polymérase
5) Liaison		Ligase

Réparation par tolérance

A) Réparation par recombinaison



B) Réparation par synthèse De Novo

Réparation par photoréactivation

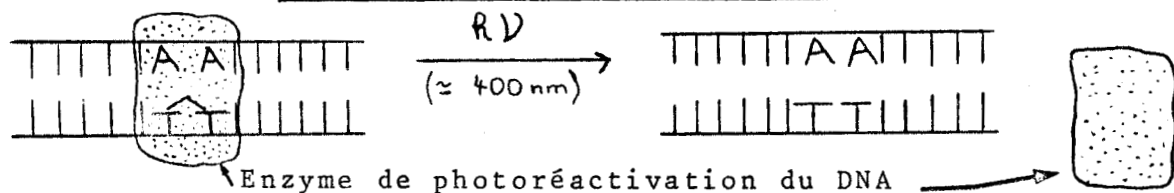


Figure 8.- Les trois mécanismes de réparation

sur la macromolécule. C'est le cas de certaines lésions induites par les cancérogènes chimiques, comme nous le verrons dans le prochain paragraphe.

2) *Les processus impliqués dans le cas des cancérogènes chimiques.*

L'existence de la réparation des lésions induites par les cancérogènes a été montrée chez la bactérie, et plus récemment chez les mammifères, en utilisant des cellules en culture. En faisant une post-incubation de ces cellules en présence de nucléotides marqués, après les avoir traitées avec un cancérogène donné, on peut observer, d'une part, la disparition des lésions, et d'autre part, une incorporation de la radioactivité. Ceci signifie qu'un processus de réparation a été déclenché. En fait, les études en cours actuellement semblent montrer qu'un composé cancérogène fixé au DNA peut avoir trois destins différents :

. la cellule étant au repos, la lésion est reconnue et excisée par les systèmes de réparation, ce qui est le cas le plus favorable (réparation par excision);

. la lésion est reconnue et éliminée tardivement, au cours de la réplication ou après cette même réplication, ce deuxième cas étant particulièrement dangereux pour la cellule (réparation post-répllicative);

. la lésion n'est pas reconnue du tout et persiste sur la macromolécule, ce dernier cas étant également redoutable, à plus ou moins longue échéance.

a- l'élimination des produits de l'interaction cancérogène-DNA.

La réparation par excision, qui représente la phase positive, a été étudiée par de nombreux auteurs, dans des cellules en culture traitées par des cancérogènes. *

* De tous récents travaux parus en 1978 permettent maintenant l'étude des phénomènes de réparation dans l'animal tout entier, et dans les différents organes (Petzold et Swenberg (130); Craddock et Henderson (19)).

Un premier modèle d'étude est celui de Regan et Setlow (136) qui ont examiné ce mécanisme, dans des cellules humaines en culture traitées par des agents physiques et chimiques : le rayonnement ultra-violet, les radiations ionisantes, et certains cancérrogènes. Ces auteurs ont constaté que les lésions induites par les radiations ionisantes, qui sont principalement des cassures sur un brin du DNA, sont réparées rapidement, le nombre de bases excisées étant très faible. Par contre, dans le cas des dimères de pyrimidines induits par les rayons ultra-violet, l'excision est plus lente, le nombre de bases remplacées étant beaucoup plus important.

Les cancérrogènes chimiques étudiés par Setlow et Regan peuvent être classés de la même manière en deux groupes majeurs :

- . ceux qui sont réparés selon le modèle rapide, comme les radiations ionisantes : c'est une réparation sur une courte distance;

- . ceux qui sont excisés de la même manière que les dimères de pyrimidine, par excision lente : c'est une réparation sur une grande distance.

Les résultats de ces auteurs sont schématisés dans la figure 9. Ainsi les agents alkylants, dont on sait qu'ils induisent des cassures sur un seul brin du DNA, suivent le même processus d'excision que les radiations ionisantes. Par contre, les précancérrogènes peuvent induire une lésion plus importante sur le DNA, qui est réparée par un mécanisme plus élaboré, similaire à celui induit par les rayons U.V.

Il est utile de noter à ce niveau que l'on s'est aperçu assez récemment que ce classement en deux catégories est en fait à nuancer. Par exemple, dans le cas de l'AAF, on sait qu'il existe des différences notables entre le mécanisme impliqué et celui qui répare les lésions induites par U.V. (1, 2). Le travail de Setlow et Regan montre cependant bien que la nature de la réparation, en particulier sa durée, est influencée par la nature de la lésion du DNA.

La compréhension des phénomènes de réparation chez l'eucaryote, l'Homme en particulier, a été facilitée par la découverte de Cleaver, en 1968 (14). Ce chercheur a montré que




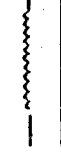

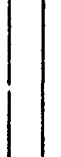
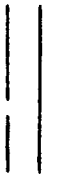
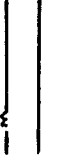

Excision sur une grande distance ("type U.V.")	Excision sur une courte distance ("type radiations ionisantes")
 <p>lésion induite par les rayons U.V. sur le DNA</p>  <p>l'endonucléase spécifique incise le DNA près de la lésion</p>  <p>l'exonucléase excise la lésion et un grand nombre de bases</p>  <p>la polymérase place 80 à 100 nouvelles bases</p>  <p>la ligase soude le brin</p>	 <p>cassure induite par les rayons γ sur le DNA</p>  <p>l'exonucléase excise quelques bases</p>  <p>la polymérase place quelques nouvelles bases</p>  <p>la ligase soude le brin</p>
Classification des agents étudiés	
AAF I.C.R-170	EMS MMS
précancérogènes	agents alkylants

Figure 9

D'après Regan, J.D. and Setlow, R.B., Cancer Res. (1974) 34, 3318-3325.



des cellules humaines de *Xeroderma Pigmentosum* (X.P.) sont incapables d'exciser les lésions induites par les rayons U.V., mais peuvent éliminer celles dues aux radiations ionisantes. D'autres auteurs par la suite, tels Stich *et al*, en 1973 (153), ont noté la grande sensibilité de ces cellules X.P. à divers cancérrogènes chimiques. La propriété des cellules X.P. a alors été utilisée systématiquement, de la manière suivante : il suffit de mesurer parallèlement l'amplitude de la réparation dans des cellules X.P. et des cellules normales, après traitement par le cancérrogène chimique que l'on veut étudier. Un autre classement des cancérrogènes en deux catégories a ainsi pu être effectué :

- les agents dont les lésions sont réparées de la même manière dans les cellules X.P. et les cellules normales;
- les agents dont les lésions ne sont pas ou sont mal réparées dans les cellules X.P., alors qu'elles le sont dans les cellules normales.

La corrélation entre les deux méthodes de travail est d'ailleurs très bonne, comme nous le montre l'étude réalisée par Cleaver en 1973 (16). Il obtint le classement suivant :

- les agents alkylants, comme les radiations ionisantes, causent des lésions réparables par les cellules X.P.;
- les précancérrogènes donnent des produits qui sont peu ou pas éliminés par ces mêmes cellules.

D'après Cleaver (15) et Setlow *et al* (144), l'incapacité des cellules X.P. à réparer par excision proviendrait du manque ou du mauvais fonctionnement de l'endonucléase responsable de l'incision du DNA, au cours de la première étape de l'excision lente. On comprend ainsi que ces cellules soient capables d'effectuer une excision rapide.

De la même manière que Cleaver, Setlow (143) en 1978 a ainsi examiné un large éventail d'agents cancérrogènes. Son étude aboutit à un classement plus nuancé, où les deux catégories précédemment citées, les agents alkylants et les précancérrogènes, s'interpénètrent à plusieurs reprises.

Setlow souligne donc que l'image n'est pas si simple, et critique cette technique de recherche : elle ne permet pas de tenir compte des éventuelles lésions qui ne seraient pas réparées, c'est-à-dire de la sélectivité de la réparation.

Le mécanisme de la réparation post-répllicative a été également mis en évidence, dans certaines conditions, après traitement de cellules de mammifères par des cancérogènes. Comme nous le verrons par la suite (p. 27) ce processus peut être dangereux pour la cellule. Il intervient plus tardivement que la réparation par excision, et n'est probablement mis en route que si la cellule doit effectuer la réplication de son DNA, alors qu'il y persiste encore certaines lésions. D'Ambrosio et Setlow (3) ont décelé le fonctionnement d'un tel mécanisme, dans des conditions d'expérience particulières, les agents utilisés étant l'AAF et l'U.V.. Fujiwara a noté également ce phénomène dans le cas de certains agents alkylants (38). Setlow (143), puis Marx (93) ont décrit tout récemment un groupe de complémentation dans les cellules X.P., où la défaillance est dans la réparation post-répllicative. L'utilisation de telles cellules permettra probablement de mieux comprendre ce mécanisme dans l'avenir.

b- La sélectivité de la réparation.

Nous avons montré (§II.A).1) de ce chapitre p. 13) que la fixation d'un cancérogène chimique peut se faire en différents sites du DNA, avec une certaine spécificité selon le composé. D'autre part, les travaux décrits dans le précédent paragraphe démontrent qu'il existe des lésions qui sont réparées plus vite que d'autres, selon la nature globale de la perturbation structurale du DNA. Plus précisément, il semble que le site de substitution, sur les bases puriques ou pyrimidiques, soit le facteur déterminant, aussi bien de l'aptitude à réparer que de la vitesse de la réparation. C'est ainsi qu'il existe des lésions qui ne sont pas excisables, car non reconnues par l'endonucléase initiale (Voir Figure 8). Par ailleurs, pour un même cancérogène, les différentes altérations qui sont supprimées peuvent l'être avec des vitesses qui ne sont pas forcément identiques. Dans le cas de l'agent méthylant le N-méthyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine (NMNG), Lawley et Orr (84) ont montré que les bases alkylées sont excisées avec une certaine sélectivité, la N₃-méthyl-guanine étant la plus facilement réparée. Pour le 7-bromo-méthyl-benz(a)anthracène, les lésions sur l'adénine sont plus facilement

éliminées que celles qui affectent la guanine (88).

Dans le cas de l'AAF, Fuchs et Daune ont essayé en 1976 de corrélér leur modèle d'insertion-dénaturation avec les phénomènes de réparation (21). Comme nous l'avons noté plus haut (p.14), les sites de fixation de ce cancérogène sur le DNA sont au nombre de deux : un produit majeur sur le C-8 de la guanine, et un composé mineur sur le 2-NH₂ de cette même base. Il se trouve, comme le relatent Daune et Fuchs, que le produit fixé sur le 2-NH₂ n'est pas encore réparé au bout de 8 semaines alors que le produit d'addition sur le C-8 est éliminé en sept jours. La persistance de cette fixation de l'AAF en cette position signifie que le cancérogène ne peut apparemment pas être éliminé par excision. Fuchs et Daune supposent que ce produit pourrait être supprimé par un mécanisme de réparation post-réplivative. Ces auteurs d'autre part, ont montré que la dénaturation obtenue dans le DNA modifié par l'AAF est due à une fixation interne du cancérogène, sur le C-8 de la guanine (37), les résidus fixés en position N-2 étant couchés dans le grand sillon (21). Par conséquent, de ces deux lésions, c'est celle qui induit la plus petite perturbation structurale sur le DNA qui semble être la plus dangereuse.

Plus récemment, en 1977, l'étude de Yamasaki *et al* (172) a également montré que la fixation de l'AAF sur le 2-NH₂ de la guanine serait la plus impliquée dans l'induction de la cancérogénèse par ce composé. Ces auteurs ont en effet constaté que les deux produits d'addition sont éliminés avec des vitesses très différentes, par deux endonucléases spécifiques de chaque lésion.

Ces exemples nous ont montré l'intérêt qu'il y a à connaître la nature de la perturbation induite sur le DNA, ainsi que les sites d'interaction, pour faciliter la compréhension du ou des mécanismes par lequel un cancérogène peut agir dans un organisme. Marx note d'ailleurs que dans certains cas cette information manque cruellement (93).

La probabilité pour un agent chimique d'induire une transformation néoplasique serait donc fonction de deux facteurs :

- . tout d'abord de sa capacité de se lier au DNA, et à altérer sa fonction de matrice,

. ensuite, de la nature de sa liaison au DNA, qui introduirait un défaut qui ne serait pas excisé, parce que non reconnu par l'endonucléase.

En 1973, Cleaver (16) soulignait en effet que le danger résidait plutôt dans le pourcentage de lésions résiduelles non réparées. On peut imaginer facilement que la réplication d'un DNA non réparé soit désastreuse. Sarma *et al* (139) en donnent pour exemple celui de l'alkylation : un mauvais codage dans le brin parental, dû à une lésion telle que le O₆-alkyl-guanine, ou le N₇-alkyl-guanine, doit introduire des erreurs dans le nouveau brin synthétisé, au cours de la réplication. La réplication d'un tel DNA doit conduire à l'impression permanente de l'erreur, au niveau de la séquence en bases du DNA.

Il semble maintenant évident qu'il existe une relation entre la défaillance dans la réparation et le cancer chez l'Homme. Cette hypothèse est étayée par la découverte du fait que des sujets atteints de certaines maladies héréditaires ont un risque élevé de développer un cancer. Ces maladies sont caractérisées par une déficience en l'un ou l'autre des processus de la réparation du DNA. Setlow (143) et Marx (93) ont minutieusement décrit ces affections, qui, à ce jour, sont au nombre de trois : le *Xeroderma Pigmentosum* (XP), l'*Ataxia Telangiectasia* (AT), et l'anémie de Fanconi (AF).

Nous avons signalé l'existence de cellules XP au paragraphe a), p. 21. Les patients atteints de cette maladie sont très sensibles au rayonnement ultra-violet et développent facilement des cancers de la peau (93, 143). On sait également que les cellules XP sont incapables de réparer les lésions du DNA produites par ces mêmes radiations (14).

L'existence de telles anomalies a conduit certains auteurs, tels Setlow et Marx à émettre l'hypothèse d'une relation entre l'altération persistante du DNA et l'induction d'un cancer chez l'Homme. Setlow nuance cependant son jugement, en notant que tous les cancers ne proviennent pas d'un déficit dans la réparation (143). Mais il souligne que même chez les individus normaux, c'est l'appétitude à la réparation, par rapport aux autres processus cellulaires, qui est le paramètre important dans l'étape initiale de la cancérogenèse.

La connaissance du contrôle et de la cinétique des processus de réparation semble donc aussi importante que celle des voies d'activation et d'inactivation d'un cancérigène chimique, pour aider à la compréhension du phénomène de la cancérogénèse chez l'Homme.

3) Rôle de certains processus de réparation dans la cancérogénèse; relation mutagenèse-cancérogénèse.

a- La réparation post-répllicative.

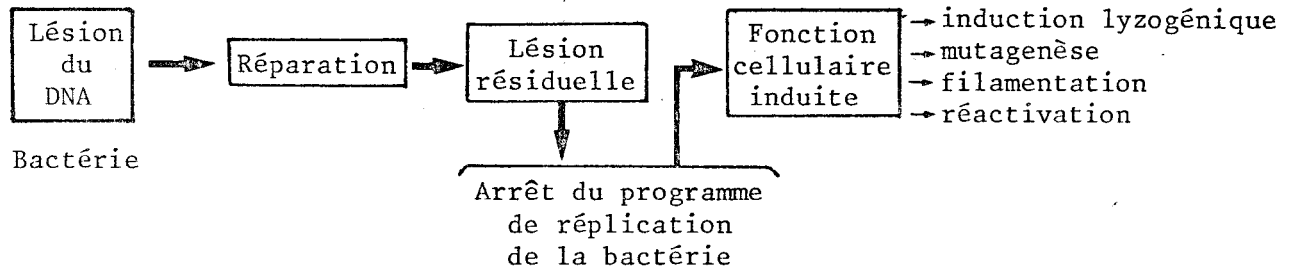
Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, ce mécanisme peut être déclenché tardivement, à la suite de la non-reconnaissance de certaines lésions sur le DNA, et peut être à l'origine de nombreuses erreurs.

En 1974, Loeb *et al* ont donné la preuve que les erreurs introduites au cours d'une telle réparation peuvent être la cause de l'induction de transformations malignes (89). Kondo a également souligné en 1975 qu'un tel processus "tolérant" serait en partie responsable de l'induction néoplasique par les cancérigènes chimiques. Le développement de la capacité de réparation post-répllicative, qui provient de l'évolution de la cellule vers des systèmes de plus en plus complexes, augmente inévitablement la probabilité des erreurs dans la réparation du DNA, ce qui peut conduire à des mutations, des aberrations chromosomiques et au cancer (76).

b- les fonctions de réparation "S.O.S."

Une autre hypothèse d'explication du mécanisme d'induction de cancers par les agents chimiques a été émise par Radman (135) et Dévoret (25), en 1977. Ces auteurs ont montré que le traitement de certaines bactéries par des cancérigènes, peut induire dans ces organites de nouvelles fonctions cellulaires, appelées "fonctions S.O.S.". L'une d'entre elles est la réactivation du phage dans la bactérie.

Le schéma ci-dessous illustre l'hypothèse de Dévoret.



Ce mécanisme de sauvegarde permet une meilleure réparation sur le plan quantitatif, mais désastreuse sur le plan qualitatif. Le phénomène est caractérisé par un pouvoir hautement mutagène, les erreurs commises étant encore plus nombreuses que dans le cas de la réparation "tolérante". Radman et Dévoret ont postulé que l'existence de tels mécanismes chez les êtres supérieurs pourraient expliquer le déclenchement d'un cancer (25, 135). Un an plus tard, deux chercheurs français en collaboration avec des équipes américaines, ont montré pour la première fois, que des fonctions "S.O.S." pouvaient être induites par les cancérigènes chimiques dans les cellules eucaryotes (Sarasin et Hanawalt, 1978 (138); Lytle, Coppey et Taylor, 1978 (90)). Ils ont constaté la réactivation du virus V.S.40 (138), et du virus de l'Herpès (90), dans des cellules supérieures traitées par différents agents chimiques et physiques, et ont fait l'analogie entre cette réactivation et l'induction lysogénique du phage chez la bactérie (135, 25).

Un tel processus, enclin à produire ces erreurs, pourrait être responsable à la fois de l'activité mutagène de nombreux cancérigènes, et aussi porter une grande responsabilité dans l'induction de tumeurs malignes chez les mammifères (138, 90).

c- relation mutagenèse-cancérogenèse.

Comme l'ont noté de nombreux auteurs, il semble que la plupart des cancérigènes soient des mutagènes (57, 139, 95). De plus, nous venons de voir que des mécanismes générateurs de mutations peuvent être induits par des cancérigènes. De ce fait, il peut être tentant pour le théoricien d'attribuer à un événement essentiellement mutagène, la responsabilité de

l'induction d'un cancer; en effet, la cancérogénèse et la mutagenèse ont ceci de commun qu'elles provoquent toutes deux une perturbation héréditaire du génotype.

Le concept de l'origine du cancer par mutation somatique est discuté depuis plusieurs années. E.C. Miller (95) a pris position très récemment sur ce problème, et a noté que la corrélation mutagenèse-cancérogénèse, qui n'est que qualitative, est basée sur deux faits :

- . la plupart des formes ultimes des cancérogènes chimiques sont de puissants électrophiles;

- . la plupart des mutagènes chimiques se transforment également en de puissants électrophiles.

Cependant, les mutagènes n'agissent que sur le DNA, alors que les cancérogènes attaquent aussi le RNA et les protéines. E.C. Miller en conclut que la corrélation soulignée plus haut ne peut pas être utilisée seule pour montrer que la cancérogénèse implique essentiellement des événements mutagènes.

En conclusion, le phénomène de la cancérogénèse chimique, et les mécanismes qui y sont impliqués, sont loin d'être clairement compris à l'heure actuelle. En particulier, le problème de l'identification de la cible reste encore non résolu.

On sait que les cancérogènes chimiques interagissent non seulement avec le DNA, mais également avec le RNA et les protéines. D'autre part, il est clair que le déclenchement d'un cancer consiste en une véritable perte du contrôle de la division cellulaire.

Deux grands types de mécanismes moléculaires ont été proposés par les Miller et d'autres auteurs, pour expliquer un tel changement dans le comportement cellulaire (102, 100, 95, 139) :

- . un mécanisme génétique, basé sur l'hypothèse que la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse dépend de l'altération directe du génôme. Les arguments en faveur de cette théorie sont les suivants :

- la modification directe du DNA, qui peut, en altérant le génôme, perturber totalement le mode de vie d'une cellule,

- la possibilité de l'implication d'un évènement mutagène,

- la mise en évidence de maladies comme XP, AT, FA, chez l'Homme, où le déficit de la réparation du DNA est associé au cancer induit chez ces malades,

- l'activation de virus dans des cellules traitées par des cancérogènes.

. un mécanisme épigénétique, basé sur le fait que les cancérogènes ultimes réagissent sur le RNA et les protéines. Selon cette théorie, c'est le contrôle de l'expression de l'information génétique qui se trouve affecté, par exemple, à la suite de changements subis par les protéines répresseurs ou dérèpresseurs du génôme.

Les Miller ont également proposé des mécanismes qu'ils ont appelés épigénétiques indirects, en notant :

- le rôle de la compétence immunitaire (on sait en effet qu'il peut exister dans certains cas une relation entre le cancer et l'immunodépression),

- la conséquence des altérations dans la balance hormonale,

- la possibilité pour l'hôte de sélectionner des cellules précancéreuses à l'état latent. On connaît l'effet promoteur de certains agents, qui déclenchent la division cellulaire de ces cellules précancéreuses.

Le schéma de la figure 10 illustre ces deux théories.

Quoiqu'il en soit, ce sont les altérations que subit le DNA qui jouent le rôle déterminant dans le processus de la cancérisation.

Nous avons donc choisi de prendre la théorie génétique directe comme hypothèse de travail ; nous avons entamé une étude des modifications physiques du DNA, après fixation covalente *in vitro* sur la macromolécule, du di Ac-4HAQO, pris comme forme ultime du 4NQO.

Une telle étude se justifie par la nécessité de mieux connaître la nature de la perturbation induite par ce composé chimique sur le DNA, afin d'essayer de comprendre son mode d'action.

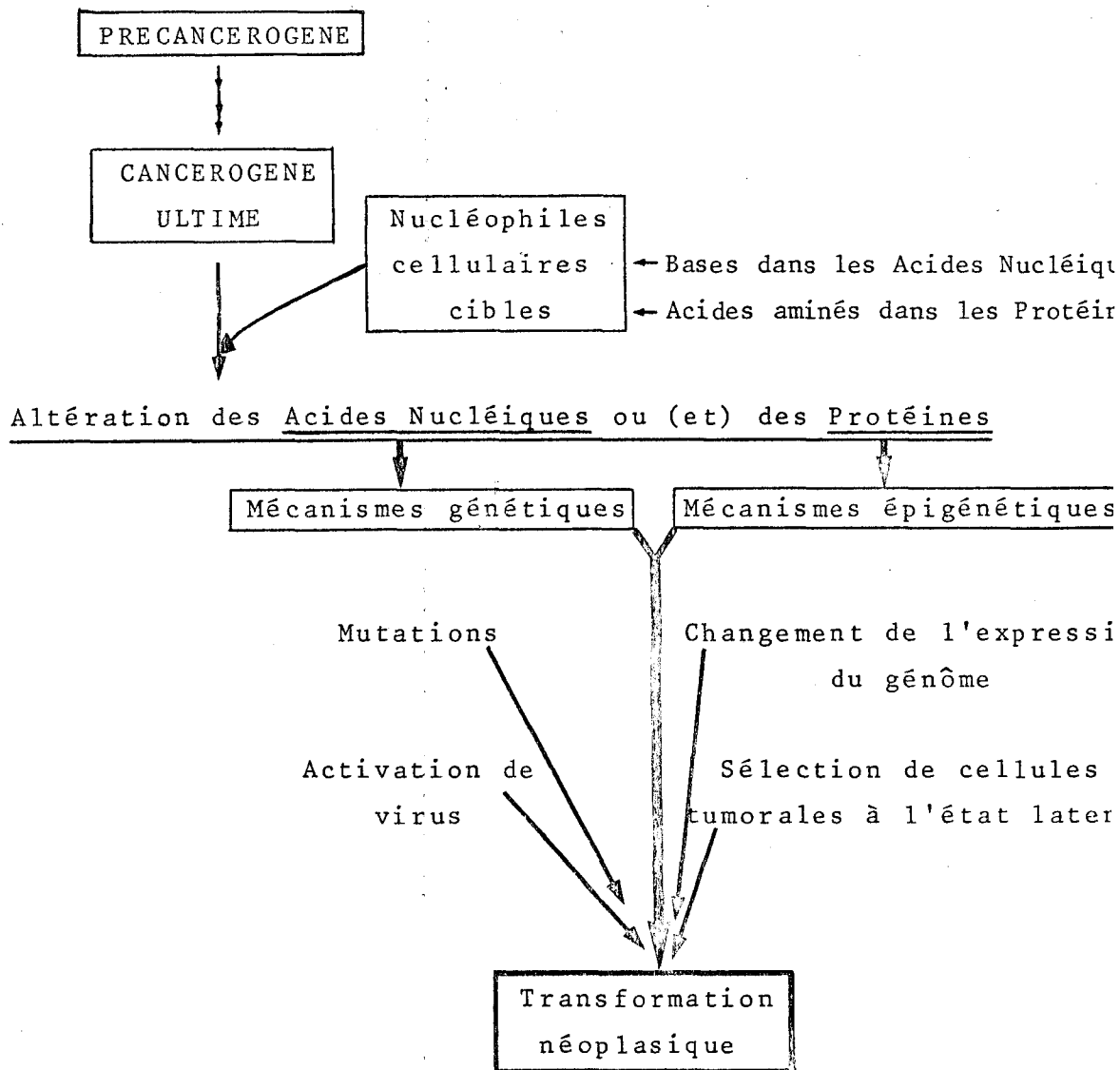


Figure 10. Mécanismes moléculaires postulés dans l'initiation du cancer (102).

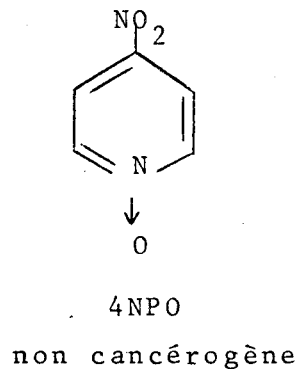
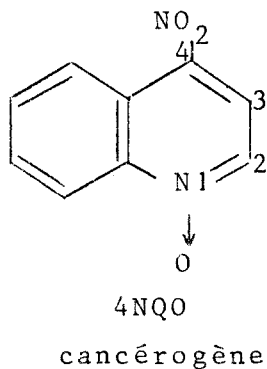
CHAPITRE II - L'EXEMPLE DU 4-NITROQUINOLEINE-1-OXYDE, UN PRECANCEROGENE.

Ce composé chimique synthétique a été l'objet de nombreuses études depuis la découverte de son pouvoir cancérogène, chez les animaux de laboratoire. Si ses propriétés biologiques sont très bien connues, il n'est pas de même de son mode d'action, en particulier des mécanismes moléculaires intimes intervenant dans la cancérogenèse induite par ce composé. Deux revues générales sur ce précancérogène ont été publiées en 1971 (30), et plus récemment en 1976 (108).

I. Les propriétés biologiques du 4NQO.

A) Le pouvoir cancérogène.

C'est en 1957 que ce pouvoir cancérogène a été montré pour la première fois par Nakahara *et al*, chez la Souris (112). Depuis cette date, de nombreux auteurs ont rapporté le pouvoir cancérogène puissant du 4NQO. Selon Kawazoe *et al*, ce pouvoir d'induire des tumeurs malignes aurait une cause structurale, puisqu'il proviendrait de la présence du noyau quinoléique (68). En effet, la 4-nitropyridine-1-oxyde n'est pas cancérogène, ce qui démontre l'existence d'une telle relation entre la structure et la fonction du 4NQO. Le schéma ci-dessous en donne l'illustration rapide :



D'autre part, Nakahara *et al*, après avoir étudié de nombreux dérivés du 4NQO, ont attribué la spécificité d'action de ce dernier à la présence du groupement nitro en position 4 et de la fonction N-oxyde en position 1 (111). Kawazoe *et al* ont obtenu après eux des résultats identiques (73).

Le pouvoir cancérologène du 4NQO a été mis en évidence chez des animaux de laboratoire autres que la Souris, tels le Rat, le Hamster, le Lapin, et même le Cobaye qui résiste habituellement à de nombreux précancérologènes (30). Il peut être intéressant de noter que le 4NQO a été testé, très récemment, dans des cellules humaines mises en culture. Il semblerait que la transformation maligne obtenue soit alors beaucoup moins marquée que dans des cellules de Souris soumises aux mêmes doses de ce cancérologène (113).

B) Propriétés caractéristiques de nombreux cancérologènes.

1) *Le pouvoir mutagène.*

Comme la plupart des cancérologènes, le 4NQO est un mutagène.

De nombreux auteurs ont mis en évidence cette propriété chez des bactéries : *Neurospora Crassa* (126), *Aspergillus Nidulans* (9), et d'autres organites (117). Ishizawa et Endo ont observé cet effet sur le bactériophage T₄ (61).

En 1974, Prakash *et al* ont examiné la nature des mutations introduites par le 4NQO, sur le DNA de levure de bière, en comparant la structure primaire du DNA normal et du DNA des mutants (133). Ils ont constaté que la modification se situait au niveau des paires de bases G-C, qui peuvent être substituées, donnant des transitions : G-C → A-T, ou des transversions : G-C → T-A.

2) *L'induction de fonctions nouvelles chez les procaryotes et les eucaryotes.*

Endo *et al* ont montré, en 1963, que des bactéries, traitées au 4NQO, étaient capables de réactiver un phage en leur sein (27).

Un phénomène similaire a été observé par la suite chez l'eucaryote : des cellules de Hamster peuvent en effet activer le virus V.S.40, si on les soumet à une certaine dose de 4NQO (45). Nous avons noté dans le premier chapitre que de tels processus peuvent être induits par des cancérogènes chimiques, en liaison avec la réparation des lésions du DNA produites par ces agents. Il n'est donc pas surprenant de constater de tels faits dans le cas du 4NQO.

3) *Modification de la réponse immunitaire.*

Cette propriété est également commune à de nombreux cancérogènes.

En 1972, Phillips a noté que le 4NQO peut dans certaines conditions altérer la réponse immunitaire chez la Souris (131).

Un an plus tard, Outzen et Prehn ont associé cet effet à la perturbation de l'immunité à médiation cellulaire (127).

4) *Le pouvoir antitumoral.*

Cette propriété du 4NQO a été découverte deux ans avant que son pouvoir cancérogène ne soit connu, par Sakai *et al* (137). Il faut noter que ceci n'a rien de paradoxal, puisqu'il existe des cancérogènes qui possèdent également un pouvoir antitumoral; le DNA est d'ailleurs dans ce dernier cas également la cible principale (86).

II. La spécificité d'action du 4NQO : les organes cibles.

De nombreux tests ont été réalisés sur différents animaux de laboratoire, en utilisant le 4NQO. Il en ressort que pour un même animal, le site de la tumeur obtenue dépend du mode d'administration du cancérogène; les trois organes cibles principaux étant les poumons, le pancréas et l'estomac.

A) Injection sous-cutanée.

Ce procédé conduit chez l'animal à la formation de tumeurs du poumon et de l'appareil respiratoire. Un des premiers travaux réalisés en ce sens est celui de Mori et Yasuno, chez la Souris, en 1961 (106). Des résultats identiques ont été obtenus par Suzuki (158) et Mori *et al* (104) en injectant le 4NQO à des Lapins et à des Rats. Certains auteurs ont pu provoquer l'apparition de ces tumeurs par une seule injection du cancérogène à des Souriceaux âgés de 1 à 3 jours (46).

Comme nous l'avons montré dans le premier chapitre, la spécificité de tissu d'un cancérogène peut avoir deux origines :

- tout d'abord l'accumulation dans l'organe cible des métabolites actifs;

- dans un deuxième temps, le déficit de réparation du DNA, altéré par la fixation de ces formes activées .

Dans le cas du 4NQO, l'étude de la répartition des métabolites dans l'organisme, après injection sous-cutanée, explique en partie la première spécificité de tissu. Kawazoe *et al* ont ainsi suivi le cheminement de 4NQO radioactif chez des Souris (75); ils ont constaté que la quantité maximale de métabolites actifs se retrouvait dans le poumon, augmentant le risque de cancer dans cet organe.

Plus récemment, Cox et Irving ont évalué le pourcentage relatif de lésions du DNA dans le foie, le poumon et le rein d'un animal traité au 4NQO, ainsi que le taux de réparation du DNA dans ces trois organes (18). Leurs résultats ont montré que le tissu dont le DNA est le plus altéré et le moins réparé est le tissu pulmonaire.

B) Injection intraveineuse.

La tumeur préférentiellement obtenue dans ce cas est une tumeur du pancréas plutôt que du foie. C'est ce qu'ont rapporté Hayashi et Hasegawa chez le Rat (43) et Konishi *et al* chez le porc (77).

Les résultats tout récents de Denda *et al* peuvent expliquer cette spécificité (24). En effet, ces chercheurs ont mesuré, dans chaque organe de l'animal traité au 4NQO, l'intensité de la réparation du DNA; ils ont constaté que le foie était capable de réparer les lésions beaucoup mieux que le pancréas.

C) Administration orale.

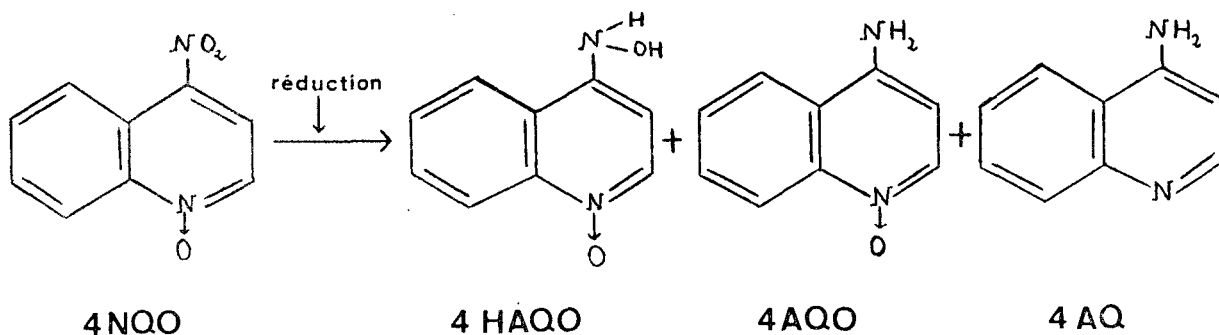
Ce type d'administration donne lieu selon Mori et Ohta (105) à des cancers de l'estomac; ces auteurs sont en accord avec Kato *et al* qui ont détecté *in vivo* l'accumulation d'environ 80% des métabolites actifs du 4NQO dans cet organe (67).

III. Le métabolisme du 4NQO.

Le 4NQO, comme tous les précancérogènes, peut induire des tumeurs en des sites éloignés de l'endroit d'administration, ce que nous venons de montrer. Ce composé peut donc être métabolisé dans l'organisme et, comme dans le cas de tous les cancérogènes, on distingue une voie d'activation et une voie de détoxification.

A) La voie d'activation : la première étape.

En 1962, Okabayashi et Yoshimoto (118) ont montré que, chez les microorganismes, le 4NQO pouvait être réduit, donnant lieu à la formation de trois métabolites différents : le 4 hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde (4HAQO), le 4-aminoquinoléine 1-oxyde (4AQO), et le 4-aminoquinoléine (4AQ).



Ces auteurs ont alors noté que, de ces trois composés, le 4HAQO est le composé majeur retrouvé dans les organites. Trois ans plus tard, Sugimura *et al* ont pu déceler chez le Rat la conversion enzymatique du 4NQO en 4HAQO et 4AQO (154). Ils ont mesuré les quantités de ces deux métabolites dans différents organes de l'animal; le résultat de leurs investigations indique que dans le foie le métabolite formé est principalement le 4AQO, alors que dans le poumon, c'est l'hydroxylamine qui prédomine.

D'autres travaux, tels ceux de Hoshino *et al* (48), sont venus renforcer l'hypothèse de l'existence d'une conversion du 4NQO en 4HAQO d'une part, et 4AQO d'autre part, par deux formes enzymatiques différentes dont l'activité serait plus ou moins développée selon l'organe.

En 1966, Sugimura *et al* ont identifié l'enzyme qui catalyse la réduction du 4NQO en 4HAQO (155), que d'autres auteurs appelèrent la 4NQO-réductase. Cette enzyme a été détectée par la suite chez les animaux sensibles à l'action du 4NQO et préférentiellement dans les organes cibles; par contre son activité est beaucoup plus faible chez le Chien qui n'est pas sensible au pouvoir cancérogène du 4NQO (157).

Le pouvoir cancérogène du 4HAQO et celui du 4AQO avaient déjà été testés en 1963 par Shirasu (145, 146). Ces premiers essais avaient alors montré que le 4HAQO est cancérogène, alors que le 4AQO ne l'est pas. Par ailleurs, de ces deux métabolites, seul le 4HAQO possède des propriétés biologiques voisines de celles du 4NQO, comme l'ont noté Endo et Kume (28). Les deux composés ont en effet deux propriétés communes caractéristiques des cancérogènes. La première est l'induction du prophage chez la Bactérie (27) et la deuxième, le pouvoir mutagène (116).

En faisant l'analogie avec les arylamides, pour lesquelles la forme précurseur est une hydroxylamine, de nombreux chercheurs ont émis l'hypothèse suivante : le pouvoir cancérogène du 4NQO s'exprime par sa réduction en 4HAQO, qui serait le métabolite précurseur.

Les travaux de Endo et Kume (28, 29), puis ceux de Hozumi (50) sont tout à fait en accord avec cette hypothèse : en comparant le pouvoir cancérigène du 4HAQO avec celui du 4NQO, ils ont constaté que l'hydroxylamine est plus cancérigène que le dérivé nitré. Ceci a été ensuite vérifié par de nombreux auteurs.

La première étape de l'activation métabolique du 4NQO, c'est-à-dire sa réduction en 4HAQO, était donc démontrée.

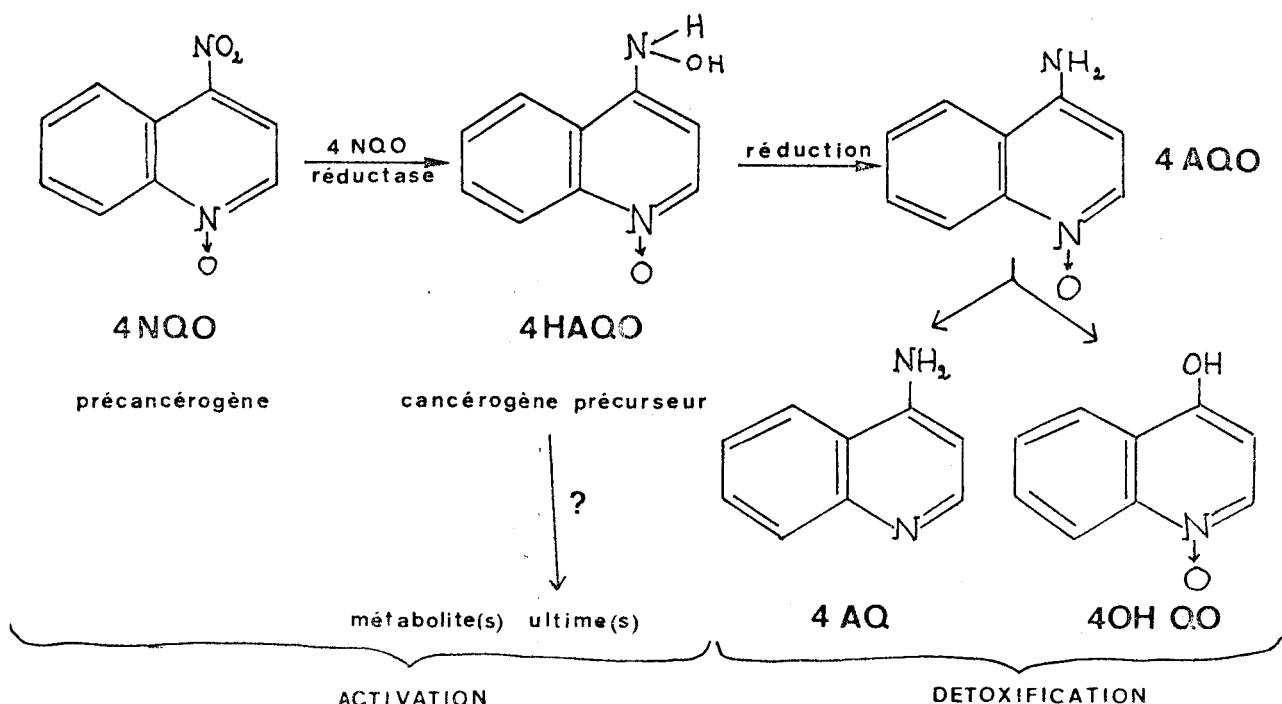
B) La voie de désactivation.

Comme tous les cancérigènes, le 4NQO subit aussi une détoxification dans l'organisme.

C'est principalement le 4AQO, dont nous avons noté la mise en évidence précédemment, qui intervient dans cette désactivation. En effet, ce composé n'est pas cancérigène (29, 145) et il s'accumule principalement dans le foie qui n'est pas un organe cible (145).

Kawazoe *et al* (74) ont étudié le métabolisme du 4HAQO chez la Souris et ils ont constaté qu'après injection sous-cutanée, trois composés sont formés: le 4AQO, le 4AQ, le 4-OH-QO, qui ne sont pas cancérigènes. Les deux derniers métabolites interviendraient donc également dans la détoxification du 4NQO.

Le schéma ci-dessous illustre ces voies métaboliques.



Comme nous l'indique ce schéma, le 4HAQO doit subir lui aussi une transformation dans l'organisme, avant d'être vraiment actif. En effet, comme nous le montrerons dans le paragraphe suivant, ce métabolite seul ne réagit pas avec le DNA *in vitro*.

Cette phase de l'activation du 4NQO est primordiale, puisqu'elle aboutit à la formation des métabolites ultimes qui interagissent directement avec les cibles cellulaires. Actuellement, les études effectuées pour déterminer la (les) forme(s) ultime(s) de ce précancérogène ne sont pas encore tout à fait terminées; nous nous sommes donc trouvée dans l'obligation de les reprendre en partie.

Le choix de la forme ultime employée dans une étude *in vitro* étant particulièrement crucial et le problème assez long à débattre, nous avons préféré discuter ce point dans un chapitre précis : le chapitre III, p. 48 à 59).

IV. L'interaction du 4NQO avec les acides nucléiques.

Le 4NQO, qui est un précancérogène, se fixe sur les acides nucléiques et les protéines *in vivo*, après activation métabolique.

A) La mise en évidence de cette interaction.

Ishizawa et Endo ont été parmi les premiers à mettre en évidence cette interaction en montrant, en 1967, l'action du 4HAQO sur le DNA de phage T₄ (60). D'autres chercheurs se sont intéressés par la suite à cette propriété du cancérogène, et ont démontré que le 4NQO se lie *in vivo* non seulement au DNA, mais également sur le RNA et les protéines. Kuroki *et al* (82), puis Andoh *et al* (7) ont ainsi étudié l'incorporation de 4NQO radioactif dans des cellules de mammifères en culture. Ils ont constaté qu'après un certain temps, la radioactivité s'accumulait au niveau des protéines et des acides nucléiques de ces cellules.

Plus récemment, en 1974, Morita et Mifuchi ont démontré que l'action du 4NQO pouvait, dans certains organismes, être dirigée spécifiquement vers le DNA mitochondrial (107).

Endo *et al* ont noté que cette fixation du cancérogène aux macromolécules cellulaires conduisait à des perturbations dans leur fonctionnement : la réplication et la transcription sont perturbées et peuvent être inhibées; la synthèse des protéines est également affectée (30).

B) L'étude de la nature de cette interaction.

Dans le but de comprendre par quels mécanismes moléculaires le 4NQO exerce son pouvoir cancérogène, l'étude de l'interaction de ce composé avec les acides nucléiques et les protéines a été abordée, les recherches ayant été orientées de deux manières différentes :

. une approche *in vitro*, qui a montré la fixation non covalente du 4NQO sur le DNA et les protéines. L'interaction serait dans ce cas de nature ionique (110, 92, 125, 121, 123, 128, 129, 122, 124). Ces études ne tiennent pas compte de l'activation enzymatique du 4NQO *in vivo*, et ne vont donc pas dans le sens de la théorie de Miller. Actuellement, de tels résultats semblent difficilement concevables *in vivo* et sont donc d'un moindre intérêt dans l'étude de la cancérogénèse chimique induite par le 4NQO.

. une approche *in vivo*, où les auteurs ont étudié les propriétés physicochimiques des acides nucléiques extraits de cellules traitées au 4NQO ou au 4HAQO. Dans ce cas, les chercheurs ont pu mettre en évidence la fixation du cancérogène sur le DNA et le RNA, la liaison étant covalente. Cette approche a donc donné des résultats en accord avec la théorie de Miller.

C'est bien sûr la deuxième étude qui nous fournit les renseignements les plus intéressants. D'ailleurs les travaux *in vitro* sur l'interaction 4NQO-DNA n'ont jamais été repris depuis 1971. Nous décrirons ici les résultats précédemment obtenus à partir de l'étude *in vivo*.

Une propriété intéressante du 4NQO et de ses dérivés est que ces composés sont fluorescents. Ceci a rendu possible la détection du faible pourcentage de cancérogène fixé sur les acides nucléiques *in vivo*, la spectroscopie de fluorescence

étant une technique très sensible.

La première étude *in vivo* a été réalisée par Tada *et al* en 1967 (160). Ces auteurs ont injecté du 4HAQO par voie intrapéritonéale à des Rats portant une ascite hépatomateuse ; après un certain temps, ils ont extrait le DNA et le RNA des cellules tumorales. Après purification des échantillons, ils ont pu constater qu'un composé fluorescent était resté fixé sur les macromolécules.

D'autre part, le DNA ainsi recueilli, après plusieurs lavages et précipitation à l'éthanol, est toujours fluorescent; par contre le DNA obtenu après action *in vitro* du 4HAQO et après avoir subi la même technique de purification, ne présente aucune fluorescence après précipitation à l'éthanol.

La réaction *in vitro* aboutissant à une fixation non covalente, Tada *et al* en conclurent que les complexes formés *in vivo* et *in vitro* étaient différents. De plus, le produit fixé *in vivo* était encore présent après digestion enzymatique du DNA; il semble donc que la liaison formée soit très stable.

La démonstration était donc faite que le 4HAQO, ou l'un de ses dérivés, se fixe sur le DNA *in vivo*, non par interaction ionique, mais par l'intermédiaire d'une liaison covalente.

Tada *et al* ont pu calculer facilement le pourcentage de cancérogène fixé sur le DNA, en utilisant un produit enrichi en carbone 14 sur le noyau quinoléique. Ils ont montré que la fixation était de l'ordre de 0,5% à 1,2%, ce qui est vraiment peu. Ceci cependant n'a rien d'étonnant, car les quantités fixées *in vivo* sont le plus souvent peu importantes (57).

Ces mêmes chercheurs ont montré d'autre part que cette fixation du 4HAQO activé *in vivo* inhibait la synthèse du RNA (160).

La même année, Matsushima *et al* (94) ont repris les travaux de Tada *et al* avec le 4NQO et le 4HAQO, et ont relié cette fixation sur le DNA *in vivo* au pouvoir cancérogène de ces deux composés chimiques. En effet, le DNA extrait de cellules traitées au 4NQO ou au 4HAQO est fluorescent, alors qu'après traitement de ces mêmes cellules avec le 4AQO qui n'est pas cancérogène, on récupère un matériel non fluorescent.

Deux ans plus tard, Ikegami *et al* ont également travaillé *in vivo*, avec du 4NQO marqué au carbone 14 en utilisant la même technique sur une ascite d'Ehrlich (52). Ils ont réalisé une étude plus approfondie, en essayant de déterminer les sites de fixation du cancérogène sur le DNA.

Pour cela ils ont effectué une dépurination du DNA extrait après traitement des cellules au 4NQO. En mesurant la radioactivité située dans la fraction de dépurination et la fraction apurinique, ils ont constaté que 90% du cancérogène était fixé sur les bases puriques. Ces auteurs soulignèrent alors la nécessité d'étudier la nature précise des complexes quinoléine-purine.

Une première information a été fournie en 1971 par Tada *et al* qui ont cultivé des cellules ascitiques en présence de 4NQO marqué au tritium (161). Ils ont extrait le DNA et le RNA de ces cellules et ont soumis ces macromolécules à une hydrolyse chimique, suivie d'une chromatographie sur papier. Les fractions ainsi obtenues se sont révélées être au nombre de trois et ont été identifiées comme étant :

. une fraction dont la mobilité correspond à celle de l'adénine;

. une deuxième fraction dont la mobilité correspond à celle de la guanine;

. une troisième fraction constituée de 4AQO, que Tada *et al* interprètent comme provenant de la dégradation d'un autre produit d'addition quinoléine-purine.

Comme l'ont observé Tada *et al* (160), le 4HAQO ne se fixe pas de façon covalente sur le DNA *in vitro*. D'autre part, Tanooka et Takahashi ont montré que ce métabolite ne peut réactiver à lui seul le DNA de phage *in vitro* (166). Ceci signifie que le 4HAQO doit être activé *in vivo* pour pouvoir interagir de façon covalente sur les macromolécules. Tada *et al* ont mis en évidence, en 1972, une enzyme qui pourrait, selon ces auteurs, jouer un rôle dans l'activation du 4HAQO *in vivo* (162). Leurs résultats seront discutés de façon plus détaillée dans le chapitre III, p. 52 à 55.

En faisant réagir leur préparation enzymatique avec le 4HAQO, sur des homopolynucléotides *in vitro*, ces chercheurs ont pu déterminer les sites de fixation du cancérogène, après hydrolyse et chromatographie des macromolécules (164). Ils ont ainsi noté l'existence de quatre composés :

. deux produits stables, le cancérogène étant fixé sur la guanine;

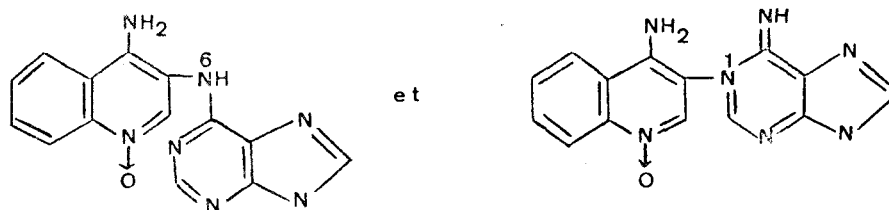
. un produit stable, le cancérogène étant fixé sur l'adénine;

. un produit mineur instable, le cancérogène étant fixé sur la guanine ; il se décompose pendant l'hydrolyse acide, en donnant du 4AQO.

La même expérience réalisée parallèlement *in vivo* leur a donné les mêmes produits (164).

Il semble donc que le 4NQO réagisse plus particulièrement sur les bases puriques du DNA, surtout sur la guanine. Cependant, les atomes concernés sur ces bases ne sont pas encore déterminés. On peut penser que sur la guanine, deux ou trois atomes soient impliqués, alors que sur l'adénine, un seul site participerait à la liaison au cancérogène. Une seule hypothèse précise a été émise, par Kawazoe *et al*, en 1975, au sujet du site de fixation sur l'adénine (71). Ces chercheurs ont étudié, à l'aide de la spectroscopie d'absorption, de la RMN et de la spectrométrie de masse, la structure du produit d'addition obtenu après hydrolyse d'acide polyadénylique, traité *in vitro* avec le 4HAQO et le système enzymatique isolé par Tada *et al*. Leurs résultats les ont amenés à postuler deux sites de fixation sur l'adénine : le 6-NH₂ et le N-1 de cette base (71).

Le schéma ci-dessous présente les deux structures proposées par Kawazoe *et al* (71).



C) La nature physique des perturbations induites sur les macromolécules cellulaires.

A l'heure actuelle, nous possédons peu de renseignements à ce sujet.

Certains auteurs ont observé la production de cassures sur un seul brin, et sur les deux brins du DNA de cellules cultivées en présence de 4NQO ou de 4HAQO (156, 47, 5). Stich et San ont mis en évidence dans des cellules traitées au 4NQO deux types d'anomalies chromosomiques : une perte de la structure enroulée de la chromatine et des cassures le long de la chaîne de DNA (150).

Andoh *et al*, en 1975, ont noté que le 4NQO pouvait être responsable de la dissociation *in vivo* de complexes DNA-protéines (6).

Rien n'a été fait cependant pour étudier plus précisément la perturbation structurale éventuelle du DNA après fixation du cancérogène, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

V. La réparation des lésions induites par le 4NQO.

Depuis 1970, ces mécanismes sont beaucoup étudiés, car de nombreux auteurs perçoivent actuellement l'importance des phénomènes de réparation.

La première étape a été la mise en évidence de ces processus dans des cellules en culture traitées par le 4NQO ou le 4HAQO.

A) Mise en évidence.

En 1970, Stich et San ont montré que des cellules de mammifère, après traitement au 4NQO, étaient le siège d'une réparation assez intense pendant huit à dix heures. Cette activité chute ensuite brutalement, pour persister cependant faiblement pendant une assez longue période de temps (150).

Ils notèrent également que suivant la dose de cancérogène employée, les cellules peuvent commencer à répliquer leur DNA avant que la réparation des lésions ne soit terminée. La même année, Horikawa *et al* ont mis en évidence des cassures sur un seul brin du DNA de cellules traitées au 4NQO et au 4HAQO (47). Ils ont alors constaté que ces ruptures disparaissaient après traitement au cancérogène et que le DNA reprenait sa taille initiale.

Deux ans plus tard, Andoh et Ide (5) observèrent aussi des cassures, à la fois sur un seul et deux brins du DNA, dans des cellules de Souris. Ces ruptures étaient réparées, mais avec des vitesses différentes : il fallait 24 heures pour que les lésions sur les deux brins disparaissent, alors qu'en trois heures les cassures sur un seul brin étaient résorbées.

Ce phénomène de réparation du DNA a été mis en évidence plus récemment dans des cellules de pancréas de Cobaye cultivées dans un milieu enrichi en 4HAQO (56). Comme nous l'avons noté au paragraphe II, le pancréas est un organe cible du 4NQO. Ceci peut expliquer que ces auteurs aient observé dans ce tissu une réparation limitée qui ne dure que deux heures.

En mesurant le taux de réparation du DNA induit par le 4NQO et le 4NPO qui n'est pas cancérogène, Stich *et al* (152) ont montré que ce phénomène, à l'échelon cellulaire, est bien en relation avec l'altération de la macromolécule, par fixation du cancérogène. En effet, le 4NPO dont aucun métabolite ne se fixe au DNA, est incapable d'induire une telle activité en culture de cellules.

B) La réparation par excision.

Dans leur première étude, Stich et San (150) avaient constaté que la durée de l'élimination des lésions, induites par les rayons ultra-violetts, était pratiquement la même que celle de la phase de réparation principale déclenchée par le 4NQO.

D'autres auteurs par la suite ont comparé les deux phénomènes, en utilisant des cellules de *Xeroderma Pigmentosum*. Nous avons noté dans le chapitre I (p.23) que ces cellules possédaient une anomalie, qui provient de mutations génétiques ayant affecté leur aptitude à réparer le DNA; plus spécialement, leur matériel enzymatique est inapte à inciser le DNA au niveau des lésions. De nombreux travaux ont montré que de telles cellules, cultivées en présence de 4NQO, avaient une activité de réparation presque nulle - sans l'être jamais totalement- (151, 153 , 165).

En 1972, Takebe *et al* (165) en conclurent que dans les cellules normales, les lésions induites par le 4NQO peuvent être réparées par un mécanisme d'excision. La même année, Tanooka et Takahashi ont également mis en évidence une réparation par excision dans des bactéries traitées par le 4NQO (166).

Il a fallu attendre l'étude générale de Setlow et Regan, en 1974 (136) reprise par Setlow en 1978 (143) pour préciser la nature exacte du mécanisme de la réparation du 4NQO. Ces deux chercheurs ont montré que ce cancérogène était éliminé selon les deux sortes de mécanismes d'excision : l'excision rapide et l'excision lente, cette dernière constituant le processus le plus impliqué. Ce résultat est bien en accord avec les premières observations des auteurs que nous avons cités plus haut (151, 153, 165).

Il semble donc que les lésions induites par le 4NQO sur le DNA soient de deux types :

- . une lésion mineure réparable selon le mécanisme qui excise les lésions dues aux radiations ionisantes, et que les cellules X.P. sont capables d'éliminer;

- . une lésion majeure réparable par un processus analogue à celui qui fonctionne dans le cas de l'ultra-violet, et qui n'est pas éliminée par les cellules X.P.

Walker et Sridhar ont également comparé la réparation de certains agents méthylants, de l'ultra-violet, et du 4NQO dans des cellules de mammifères (167). Une conclusion intéressante de ces auteurs est la suivante :

Les cassures sur un seul brin du DNA, induites par le 4NQO

correspondent en réalité à une fragilisation de la chaîne en certains points, celle-ci ne se cassant réellement qu'à l'analyse en gradient de sucrose alcalin. Les agents méthylants au contraire, induisent ces ruptures de façon directe sur le DNA.

C) La relation réparation-cancérogénèse

En 1975, Ikenaga *et al* ont démontré que l'inactivation et la mutagénèse induites chez *Escherichia coli*, après traitement de ces bactéries au 4NQO, provenaient en majeure partie de la non excision des quatre produits d'addition quinoléine-purine formés sur le DNA (53). En effet, dans une bactérie normale, capable d'exciser les lésions de son DNA, le 4NQO ne peut exercer son pouvoir mutagène. Par contre, chez la bactérie mutante qui ne peut éliminer ces produits, on voit les lésions persister sur son DNA.

Ces auteurs émirent alors l'hypothèse, en soulignant la relation mutagenèse-cancérogénèse, que l'existence d'une telle propriété chez l'eucaryote pourrait être à l'origine de l'induction de cancers par le 4NQO (53).

Deux ans plus tard, Ikenaga reprit ces travaux avec Takebe et Ishii, et cette fois sur des cellules humaines (55). Ils ont alors observé que le 4NQO induisait dans ces cellules des lésions identiques à celles obtenues chez *E. coli*, qui pouvaient être excisées dans les cellules normales, alors qu'elles ne l'étaient que faiblement dans des cellules X.P.

Ikenaga et Kakunaga ont encore souligné, en 1977, le rôle vital de l'excision pour la cellule traitée au 4NQO, notant que chez la Souris les lésions non éliminées conduisaient au cancer (54). Selon ces auteurs, le mécanisme impliqué serait alors la réparation post-réplivative : nous avons vu au chapitre I (p.27) le rôle néfaste de ce processus de réparation et son effet mutagène.

En bloquant la réplication du DNA avec de l'hydroxy-urée, Ikenaga et Kakunaga ont réussi à inhiber la transformation maligne dans ces cellules de Souris (54). Kakunaga avait déjà réussi précédemment (64, 65) à empêcher le développement de

cette transformation dans des cellules traitées au 4NQO, en utilisant la caféine qui, comme l'hydroxy-urée, est un inhibiteur de la réplication du DNA; la réparation "tolérante" ne pouvait donc agir. En 1976, Nomura a constaté le même phénomène chez la Souris (115).

Comme le pense Kondo, les cancers induits par le 4NQO seraient donc dûs à la persistance sur le DNA d'une ou plusieurs lésions, non reconnues par les enzymes de l'excision, la réparation "tolérante" étant alors mise en jeu (76).

Nous avons noté au début de ce chapitre que le 4NQO pouvait induire la survie du virus V.S.40 dans des cellules de mammifères (45). Ce processus, qu'on pourrait assimiler aux fonctions "S.O.S." dont nous avons parlé au chapitre I (p.27), est probablement impliqué dans la cancérogenèse induite par le 4NQO.

Comme nous l'avons signalé dans le paragraphe III, à propos du métabolisme du 4NQO, nous allons maintenant consacrer un chapitre spécial à une discussion sur le métabolite ultime de ce précancérogène.

CHAPITRE III - DISCUSSION SUR LE METABOLITE ULTIME.

I. Généralités.

Si la première étape de l'activation métabolique du 4NQO est bien connue et parfaitement démontrée chez les procaryotes et les eucaryotes (Chapitre II, III, p. 35), le problème est plus complexe en ce qui concerne le (les) métabolite (s) ultime (s) réagissant directement sur les cibles cellulaires.

Chez l'eucaryote, on peut imaginer qu'il existe plusieurs formes activées du 4HAQO qui seraient spécifiques du tissu où la tumeur est induite, et également spécifiques de la cible moléculaire : surtout le DNA, dans le noyau ou la mitochondrie, mais aussi le RNA et les protéines dans le cytoplasme. C'est ce qui a lieu dans le cas du N-hydroxy AAF, cancérogène précurseur, qui dans le foie du Rat est transformé en différents métabolites ultimes, suivant la cible avec laquelle il interagit. Les travaux de E.Kriek (79), J.A.Miller (102), Miller *et al* (97) et Irving *et al* (58, 59), illustrent bien ces mécanismes *in vivo*.

Très récemment d'ailleurs, E.C.Miller (95) a noté que l'activation des cancérogènes chimiques en plusieurs formes était générale.

Les connaissances actuelles en ce qui concerne le 4HAQO sont encore incomplètes et le problème n'est pas clairement élucidé. On peut cependant comprendre la difficulté d'isoler et de caractériser ces métabolites ultimes, très instables, qui ont donc un temps de vie très court dans la cellule. En général, l'étude de la dernière étape d'activation d'un cancérogène chimique peut s'orienter de deux façons différentes :

- on peut rechercher la forme active *in vivo*; nous citerons en exemple les travaux de De Baun *et al* (23) qui ont mis en évidence, dans les protéines solubles du foie de Rats traités

au précancérogène AAF, un ester sulfurique du N-OH-AAF.

On peut déceler dans certains cas l'apparition d'une activité enzymatique nouvelle, ou son augmentation si elle préexistait déjà. C'est ainsi que Bartsch *et al* (10) ont montré l'action d'une transacétylase qui transforme le N-OH-AAF en une forme ultime, le N-Acétoxy-AAF, dans le foie et d'autres tissus de rongeurs.

De Baun *et al* (23) ont mis en évidence une activité sulfo-transférasique dans le cas de tumeurs induites par deux autres cancérogènes précurseurs : le 4-acétylamino-stilbène et le 4-acétylamino-biphényle.

- une démarche *in vitro* consiste à tester la réactivité avec des nucléophiles simples ou complexes, de composés synthétiques considérés comme modèles de la forme ultime postulée.

Les travaux de Scribner *et al* (140) illustrent cette méthode d'investigation dans le cas de l'AAF. De même Miller et Miller (100) proposent comme forme activée du safrol un ester du 1'-hydroxysafrol, en partant de la réactivité *in vitro*, sur le DNA, du 1'-Acétoxysafrol synthétisé chimiquement.

Les deux méthodes sont complémentaires l'une de l'autre. En particulier un résultat positif *in vitro* demande à être vérifié *in vivo*.

Le cas des arylamides et plus spécialement de l'AAF, représente un bon exemple d'étude complète de l'activation métabolique d'un cancérogène chimique. Nous en trouvons un exemple dans les travaux de De Baun *et al* (22), sur le N-Acétoxy-AAF qui est une des formes ultimes de l'AAF; après hydrolyse du DNA traité *in vivo* par le cancérogène précurseur, puis chromatographie de l'hydrolysate, ces auteurs ont obtenu des produits identiques aux modèles synthétisés *in vitro*, par réaction du cancérogène ultime sur la guanosine.

Dans le cas du benzo(a)pyrène, Ivanovic *et al* (62) ont réalisé très récemment une étude similaire chez le Hamster. Ils ont comparé les spectres de fluorescence obtenus *in vivo* et *in vitro* avec le métabolite ultime postulé, ainsi que les composés formés dans les deux cas après hydrolyse des DNA et chromatographie liquide en haute pression.

Leurs travaux ont montré l'identité des spectres de fluorescence *in vivo* et *in vitro*. Par ailleurs, le profil chromatographique des composés d'addition obtenus *in vivo* est strictement le même que celui des modèles synthétisés *in vitro*. Ivanovic *et al* concluent donc que chez le Hamster, le B.P.D.E. est le métabolite ultime majeur du benzo(a)pyrène, responsable de la modification du DNA par fixation covalente.

II. Cas du 4HAQO.

A) Méthode d'investigation *in vitro* : le di Ac-4HAQO.

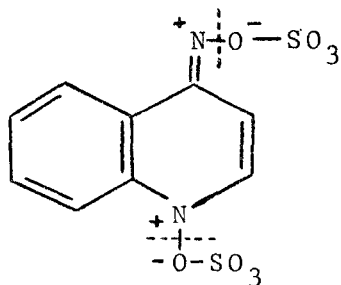
1) *L'interaction DNA-di Ac-4HAQO.*

Dans le cas du 4HAQO, une première étude a été réalisée en 1968 par Enomoto *et al* (32) qui ont travaillé *in vitro*. Ces auteurs ont montré que le dérivé diacétylé synthétique du 4HAQO (di Ac-4HAQO) réagissait directement sur le DNA, le RNA et les protéines, sans activation enzymatique. La liaison formée est alors une liaison covalente.

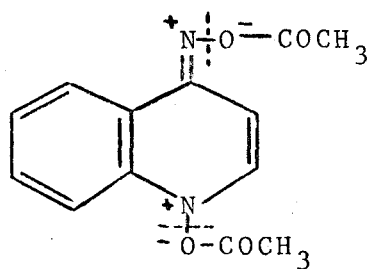
Le di Ac-4HAQO est un électrophile puissant. Reprenant la théorie des Miller (102, 100), et faisant l'analogie avec l'AAF, dont les formes activées sont les esters de l'OH-AAF, Enomoto *et al* proposent alors le di Ac-4HAQO comme modèle synthétique d'un des métabolites ultimes du 4HAQO. Ils notent d'ailleurs que d'autres esters pourraient être impliqués dans l'activation.

En 1970, Miller (102) a postulé, par analogie avec l'AAF, que le dérivé disulfate du 4HAQO pourrait représenter un métabolite ultime.

Il souligne alors la similitude de structure de ce composé et du di Ac-4HAQO qui représenterait le modèle *in vitro*, et conclut que ces deux produits pourraient réagir de façon identique sur le DNA. C'est ce que montre le schéma ci-après, proposé par Miller (102) :



disulfate 4HAQO



di Ac-4HAQO*

* Cette structure a été démontrée par Kawazoe et Araki (69).

Pour renforcer leur hypothèse, et c'était l'originalité de leur travail, Enomoto *et al* (32) ont comparé les spectres de fluorescence obtenus *in vitro* après réaction du di Ac-4HAQO sur le DNA, avec ceux obtenus *in vivo* avec les métabolites précurseurs, par Tada *et al* (160) et Matshusima *et al* (94). Ces auteurs avaient montré que le DNA extrait de cellules ascitiques, traitées au 4NQO ou au 4HAQO, était fluorescent. La comparaison des deux résultats montre des spectres de fluorescence très semblables (32) et Enomoto *et al* en concluent que le di Ac-4HAQO s'est fixé sur le DNA de façon covalente, et que la réactivité du 4HAQO *in vivo* dépend de son estérification. Ce premier travail n'est cependant qu'une ébauche, comme le soulignent d'ailleurs ces auteurs; en effet, pour pouvoir affirmer que le di Ac-4HAQO peut représenter une forme ultime du 4HAQO, il faut avoir montré que les produits d'addition base-cancérogène obtenus *in vitro* sont identiques à ceux qui sont formés *in vivo*. Le travail de Enomoto *et al*, qui montre seulement la similitude des spectres de fluorescence, est donc à compléter.

2) Les propriétés du di Ac-4HAQO.

D'autres auteurs ont travaillé *in vitro* sur le di Ac-4HAQO, étudiant sa réactivité et son comportement chimique. Kawazoe *et al* (69, 70) et Araki *et al* (8) ont examiné les propriétés chimiques de ce produit. Ils ont noté sa grande réactivité et son instabilité, particulièrement en milieu aqueux. Ce diacétate peut se décomposer, en présence d'eau ou d'autres solvants, en donnant des radicaux libres par coupure homolytique d'une des liaisons N-O (8, 70).

Kawazoe *et al* ont étudié le pouvoir cancérigène du di Ac-4HAQO (72) et ont montré que par injection sous-cutanée à des Souris, ce composé induisait des tumeurs au site d'introduction : essentiellement des fibrosarcomes et des rhabdomyosarcomes. Deux ans plus tard, Enomoto *et al* ont obtenu des tumeurs de la peau sur des Souris, après injection sous-cutanée de di Ac-4HAQO à ces animaux (31).

Araki *et al* (8) ont fait la corrélation entre la formation de radicaux libres, mentionnée précédemment et l'induction de tumeurs par le di Ac-4HAQO. *

Dans sa revue des cancérigènes chimiques, en 1973 (57), Irving reprend, à propos du 4NQO, le schéma proposé par Miller (p. 51), en y incluant les arguments de Kawazoe *et al* et Araki *et al*. La figure 11 nous en donne l'illustration.

Sarma *et al* en 1975 (139), citent également les travaux de ces auteurs japonais, en suggérant que la formation de ces radicaux libres à partir du di Ac-4HAQO pourrait être liée à la fixation de cette éventuelle forme ultime du 4HAQO sur le DNA.

En conclusion, le premier travail de physicochimie de Enomoto *et al* (32) et les hypothèses de Kawazoe *et al* (69, 70), Araki *et al* (8), Miller (102) et Irving (57) semblent constituer une base de recherche solide pour entreprendre une étude *in vitro* de l'interaction DNA-di Ac-4HAQO.

B) Méthode d'investigation *in vivo* : recherche d'une activité enzymatique.

Plus récemment, l'étude biochimique et enzymologique de l'activation du 4HAQO n'a été abordée que par une seule équipe japonaise : Tada et Tada. Ils ont tout d'abord cherché à déceler une enzyme qui serait responsable de l'activation du 4HAQO *in vivo*.

* Nous rappelons ici les travaux de Nagata *et al* (109) et de Hozumi (49) qui ont remarqué également la formation de radicaux libres à partir du 4HAQO *in vitro*, et ont fait l'hypothèse d'une relation entre cette propriété et le pouvoir cancérigène du 4HAQO *in vivo*.

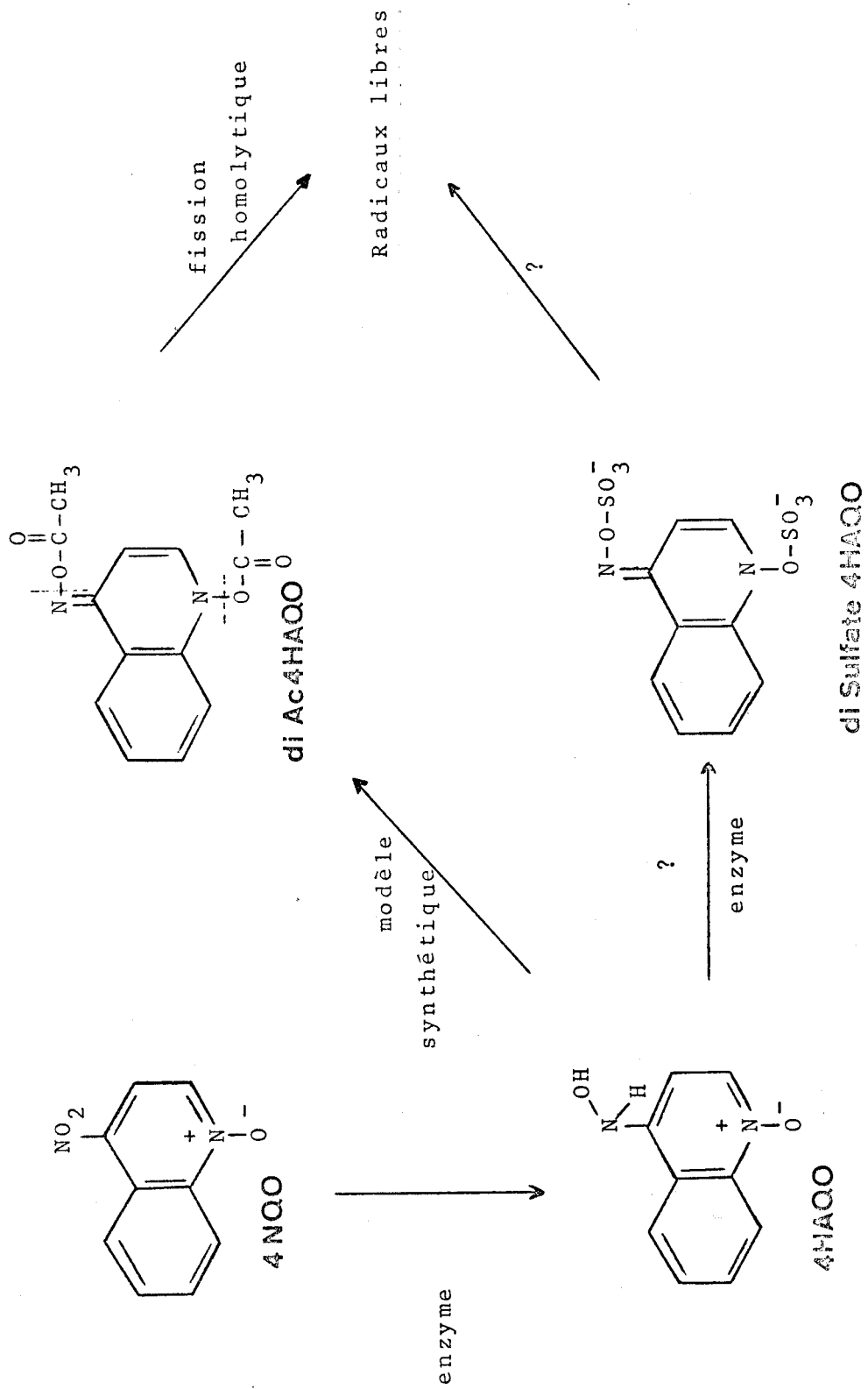


Figure 11.- Mécanisme radicalaire hypothétique, à partir du 4HAQO et du di Ac-4HAQO (57).

Leurs premières recherches en 1972 (162) avaient abouti à l'isolement d'une fraction enzymatique, à partir du cytosole de cellules tumorales d'ascite traitées au 4HAQO. Cette fraction ayant une activité de phosphotransférase, les Tada pensaient alors à la formation *in vivo* d'un ester phosphorique du 4HAQO.

Par la suite, une meilleure purification de cette première fraction enzymatique (159, 163) leur a suggéré que l'enzyme responsable de l'activation du 4HAQO pourrait être une aminoacyl tRNA synthétase, ATP dépendante et sérine dépendante : une séryl tRNA synthétase (163); ces auteurs ont purifié cette enzyme à partir de deux fractions cytoplasmiques d'origine différente : l'une provenant de cellules ascitiques (159, 163), et l'autre de levure de bière (163).

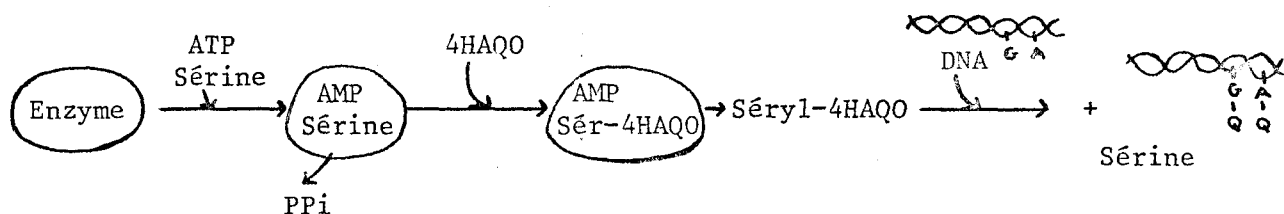
Après avoir ajouté cette séryl tRNA synthétase *in vitro*, à du DNA libre en solution en présence de 4HAQO, ils constatèrent en effet la présence d'un substituant lié au DNA de façon covalente en fin de réaction et, d'après eux, ce substituant serait le 4HAQO lui-même. Ils proposèrent alors, comme forme ultime du 4HAQO, un aminoacyl-4HAQO, en l'occurrence le séryl-4HAQO. Dans cette hypothèse, la fonction N-oxyde ne serait donc pas impliquée dans l'activation.

Ces mêmes chercheurs ont pu réaliser, à l'aide de produits marqués au tritium et au carbone 14, une comparaison "*in vivo*-*in vitro*" des composés d'addition obtenus sur le DNA (162, 163). Ils ont examiné les composés base-cancérogène obtenus *in vivo*, après traitement des cellules au 4NQO ou au 4HAQO (162, 161), ainsi que les produits résultant de l'action du 4HAQO *in vitro* sur le DNA, en présence de la séryl tRNA synthétase (162). La caractérisation a été faite par chromatographie sur papier, après hydrolyse acide. Dans les deux cas, les résultats sont semblables, ce qui est un point positif de leur travail.

Cependant, si les Tada ont bien isolé une enzyme qui semble activer le 4HAQO *in vivo*, ils n'ont pas identifié la forme activée qu'ils postulent, c'est-à-dire le séryl-4HAQO, ni

le complexe enzyme-4HAQO*. Ils mentionnent d'ailleurs que l'isolement de la forme ultime leur a été impossible, à cause de sa très grande instabilité.

Dans leur dernier travail (163), ils présentent un schéma hypothétique de mécanisme :



Nous pensons que ce schéma est criticable; en effet, si un tel système d'activation peut se concevoir *in vivo* chez le pro-caryote, où le DNA est libre dans la cellule, et s'il est concevable pour la fixation du cancérogène aux RNA et aux protéines chez l'eucaryote, on s'explique mal l'interaction du séryl-4HAQO avec le DNA nucléaire dans cette même cellule eucaryote. Si l'on admet la formation de ce séryl-4HAQO *in vivo*, avec comme corrolaire sa très faible durée de vie, comment imaginer son passage dans le noyau à travers la membrane cellulaire? En effet, ce mono-ester serait formé par action d'une séryl tRNA synthétase qui, chez l'eucaryote, est une enzyme essentiellement cytoplasmique. Les Tada l'extraient d'ailleurs du cytosole des cellules qu'ils utilisent (162, 159, 163).

Dans son étude *in vivo* du métabolisme de l'OH-AAF, Kriek (79) note que l'une des formes ultimes détectées dans le cytoplasme, le N-sulfate AAF, ayant une très faible durée de vie, ne peut pénétrer dans le noyau et se fixe surtout au rRNA cytoplasmique et aux protéines du foie du Rat. Irving *et al* ont d'ailleurs proposé un autre ester, intermédiaire, le N-O-glucuronide du N-OH AAF qui interviendrait dans la réaction avec le DNA, probablement comme forme de transport (59, 58).

* D'autres auteurs japonais, Tanooka et Takahashi (166) reprenant les travaux des Tada, retrouvèrent l'activité enzymatique de la séryl tRNA synthétase, mais ils soulignent que la forme ultime obtenue avec l'enzyme isolée est inconnue. Ils proposent d'ailleurs le schéma suivant :



La réaction du séryl-4HAQO sur le DNA *in vitro*, suggérée par les japonais, peut donc se concevoir : la barrière membranaire du noyau n'existe pas dans ce cas. Pour qu'il puisse réagir sur le DNA *in vivo*, cet ester devrait donc être formé dans le noyau de la cellule. Ceci est incompatible, dans le système proposé par les japonais, avec les fonctions d'une aminoacyl tRNA synthétase qui sont strictement cytoplasmiques. La séryl tRNA synthétase isolée par ces auteurs jouerait peut-être le rôle de transporteur du 4HAQO jusqu'au noyau de la cellule eucaryote.

En résumé, le système d'activation du 4HAQO proposé par Tada et Tada, ne serait valable chez l'eucaryote, que pour expliquer la fixation aux RNA et aux protéines cytoplasmiques, mais pas au DNA.

Il semble donc que l'activation du 4HAQO *in vivo* relève de mécanismes complexes. On peut supposer d'ailleurs, par analogie avec d'autres cancérrogènes chimiques, tel l'AAF, qu'il existe plusieurs formes ultimes du 4HAQO suivant la cible de l'interaction.

Les résultats des deux études, l'une *in vitro* avec le di Ac-4HAQO, l'autre *in vivo*, ne sont pas forcément en contradiction; et même, comme le suggèrent les Miller (100), elles se compléteraient plutôt: en effet, il se peut qu'*in vitro*, le di Ac-4HAQO et l'ester-hypothétique-monoacylé du 4HAQO, tous deux fortement électrophiles, donnent les mêmes composés d'addition sur le DNA. Une meilleure connaissance des mécanismes chimiques impliqués dans les deux cas pourrait nous permettre de discuter cette hypothèse.

III. Bilan et conclusion.

Comme nous l'avons déjà souligné, il semble que les travaux de Enomoto *et al* (32), et l'hypothèse correspondante des Miller (102, 100) et d'autres auteurs (57, 139) peuvent fournir une bonne base de travail. Il semble possible d'attribuer au di Ac-4HAQO le rôle de forme ultime du 4HAQO, du moins

comme modèle synthétique d'un métabolite actif disulfate, comme l'ont suggéré les Miller (102, 100) puis Irving (57).

Miller ne rejette cependant pas la possibilité de la formation du dérivé diacétylé *in vivo*; cette suggestion du modèle synthétique vient de ce que le di Ac-4HAQO n'a été obtenu jusqu'à présent que par synthèse chimique et que sa réactivité sur le DNA n'est connue qu'*in vitro*.

Endo *et al* ont présenté en 1971 une étude générale sur le 4NQO (30). Au sujet du métabolisme de ce cancérigène, ils soulignent, évoquant le travail de Enomoto *et al*, que l'activation enzymatique du 4HAQO en di Ac-4HAQO reste à démontrer. Cependant, à part les travaux de Tada et Tada qui restent d'ailleurs incomplets, rien n'a été fait sur la recherche des formes d'activation du 4HAQO *in vivo*. En particulier, on n'a jamais isolé une enzyme responsable de la diacétylation du métabolite précurseur, qui pourrait être, comme dans le cas du N-Ac-AAF, une transacétylase (10).

Aucun chercheur n'a jamais mentionné non plus, dans le cas du 4HAQO, l'action d'une sulfotransférase qui effectuerait la disulfonation de ce composé.

La démonstration, par Kawazoe *et al* (72) puis Enomoto *et al* (31) du pouvoir cancérigène du di Ac-4HAQO *in situ* pourrait être un argument en faveur de l'hypothèse d'une forme ultime diacétylée *in vivo* * .

En effet, comme le relate Miller (102), une propriété des cancérigènes ultimes est de donner des tumeurs uniquement au lieu d'injection; le phénomène s'explique par la très grande réactivité de ces formes qui n'ont pas besoin d'être métabolisées dans les tissus pour interagir avec leurs cibles. Weisburger et Williams (170) indiquent, quant à eux, que les métabolites ultimes des cancérigènes chimiques, par injection sous-cutanée, sont incapables d'induire des tumeurs à un endroit éloigné de leur site d'injection.

* Un premier test négatif avait été effectué par Shirasu (145) en appliquant le di Ac-4HAQO sur la peau des animaux testés.

Comme l'a suggéré ensuite Kawazoe (69), la grande instabilité du di Ac 4HAQO semble expliquer le résultat de Shirasu, le composé s'étant probablement dégradé à l'air libre, avant de pouvoir pénétrer les tissus.

Cependant, les résultats de Kawazoe *et al* (72) et Enomoto *et al* (31) ne suffisent pas à eux-seuls, car ce pouvoir cancérogène *in situ* est intrinsèque au di Ac-4HAQO, et ne signifie en rien que l'introduction de 4NQO ou de 4HAQO dans un organisme entraîne en son sein une formation de dérivé diacétylé. Les travaux de ces auteurs sont cependant à retenir.

Dans un domaine de recherche tout à fait différent, les travaux effectués sur la réparation du DNA altéré par le 4NQO, aboutissent à des résultats qui pourraient renforcer l'hypothèse de l'interaction d'un dérivé diacétylé avec le DNA *in vivo*. Comme nous l'avons noté dans le chapitre II, Setlow et Regan (136) puis Setlow en 1978 (143) ont constaté que les lésions dues au 4NQO étaient réparées de deux manières différentes :

. par un mécanisme "u.v.like", qui correspondrait à la réparation d'une perturbation du DNA relativement importante, supprimée par un mécanisme d'excision;

. par un mécanisme "X Ray like", observé dans des cellules de *Xeroderma Pigmentosum* qui ne peuvent effectuer la réparation par excision (14). Nous avons noté que les agents alkylants induisaient des lésions qui sont réparées par ce deuxième mécanisme.

Il semblerait donc que le 4NQO soit responsable de deux sortes de perturbations du DNA et que les vitesses de réparation ne soient pas les mêmes dans les deux cas :

. une lésion majeure, qu'on pourrait attribuer selon Setlow et Regan (136) à la dénaturation locale de la double hélice, après fixation covalente du noyau quinoléique sur le DNA,

. une lésion mineure, représentée par des cassures sur un seul brin du DNA et qui pourrait provenir d'une alkylation.

Si l'on considère le dérivé diacétylé du 4HAQO, on peut envisager la possibilité d'une acétylation qui se rapproche de l'alkylation (méthylation ou éthylation) en ce sens qu'elle introduit sur le DNA un défaut de petite taille : fixation de quelques atomes seulement.

Actuellement, le mécanisme d'action du di Ac-4HAQO sur le DNA *in vitro* est encore mal connu, mais nos connaissances nous permettent de retenir cette hypothèse.

Tout ceci n'en est encore qu'au stade de la suggestion et l'acétylation du DNA doit être démontrée *in vitro* et *in vivo*. Ceci fera partie de nos investigations futures.

Ikenaga *et al* (55) ont également étudié la réparation du DNA dans le cas du 4NQO et leurs résultats sont en accord avec ceux de Setlow et Regan (136, 143). Cependant ces auteurs attribuent à la lésion mineure du DNA une autre origine que celle que nous venons de postuler : cette perturbation proviendrait selon eux de la décomposition du composé d'addition 4NQO-guanine très instable, entraînant sur le DNA une cassure sur un seul brin qui serait rapidement réparée.

Les deux hypothèses ne sont pas forcément incompatibles. Il est possible également que ce soit la thèse de Ikenaga *et al* qui soit la seule valable : c'est-à-dire qu'une acétylation ne donnerait pas de coupure sur un seul brin du DNA. De ce fait, la lésion induite ne serait pas réparée rapidement, ou pas réparée du tout, les endonucléases ne reconnaissant pas le défaut.

On sait en effet qu'il existe des agents alkylants qui induisent des altérations qui persistent sur le DNA. Par exemple, Goth et Rajewsky (40) ont montré que la persistance de l'O₆-ethyl-guanine sur le DNA du cerveau de Rats, traités à l'éthylnitrosourée, est en relation avec l'induction du cancer du système nerveux chez ces animaux.

Une acétylation persistante représenterait une deuxième origine du pouvoir cancérigène du 4HAQO, la première provenant de la persistance sur le DNA de produits d'addition 4NQO-purine (53, 54, 55).

La fixation de résidus acétyles sur le DNA reste donc à démontrer dans le cas du 4NQO. Son existence *in vivo* renforcerait l'hypothèse selon laquelle le di Ac-4HAQO serait une forme ultime du 4HAQO.

En conclusion, il reste beaucoup à faire pour identifier exactement le(s) métabolite(s) ultime(s) du 4HAQO intervenant dans la réaction de ce cancérogène avec les nucléophiles cibles de la cellule, particulièrement le DNA. La figure 12 représente un bilan des connaissances actuelles sur le métabolisme du 4NQO.

Comme nous l'avons montré dans ce chapitre, il existe un faisceau d'arguments permettant de proposer comme forme ultime le dérivé diacétylé du 4HAQO, tout au moins comme modèle synthétique *in vitro*.

Nous avons donc choisi de réaliser une étude *in vitro* de l'interaction entre le DNA et le di Ac-4HAQO, tout en sachant bien que :

1. Il faut d'abord mettre au point une méthode correcte de préparation et de purification des DNA modifiés par le cancérogène *in vitro*.

- 2- Ce premier résultat obtenu, il est alors nécessaire de faire le travail *in vivo* avec les métabolites précurseurs (4NQO, 4HAQO) pour pouvoir effectuer une comparaison des résultats trouvés dans les deux cas.

- 3- Une étude physico-chimique *in vitro*, dont nous avons noté l'intérêt au chapitre I, p. 18, devrait permettre de proposer un modèle d'interaction DNA-cancérogène.

- 4- L'élucidation du mécanisme de cette interaction ne pourra être obtenue que si les processus chimiques sont parfaitement connus. Ce travail est entrepris depuis une année au laboratoire par Bernard Bailleul, en collaboration avec Madame M.F.Lhomme et Monsieur le Professeur J.Lhomme, à l'Université des Sciences et Techniques de Lille.

PARTIE EXPERIMENTALE



I. Les cancérogènes.

Toutes les manipulations du 4NQO et de ses dérivés ont été effectuées sous une hôte puissante et avec des gants.

A) Le 4NQO.

Le produit que nous employons est un produit du commerce (Fluka) que nous utilisons tel quel. Son point de fusion est de 155°C, ce qui est en accord avec la littérature (119).

Ce composé étant sensible à la lumière, nous le conservons à l'obscurité et à - 20°C.

Poids moléculaire du 4NQO : 190 g.

B) Le 4HAQO.

La synthèse du cancérogène précurseur est effectuée au laboratoire, par réduction du 4NQO.

Nous utilisons la méthode de Enomoto *et al* (32). L'hydrogénation modérée se fait par l'acide ascorbique. Le mode opératoire détaillé est décrit dans l'appendice technique de ce mémoire, p. I.

Nous avons caractérisé le 4HAQO et nos résultats sont en accord avec ceux de Okano *et al* (119, 120) :

- point de fusion : 202°C

- spectre d'absorption. Il a été enregistré après avoir dissout le 4HAQO dans du tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7. Nous avons noté deux maxima :

. une bande à 358 nm

. une bande à 256 nm (Figure 13)

Poids moléculaire du 4HAQO : 176 g.

C) Le di Ac-4HAQO.

Nous synthétisons ce composé à partir du cancérogène précurseur, le 4HAQO.

Cette étape est réalisée selon la méthode de Kawazoe et Araki (69).

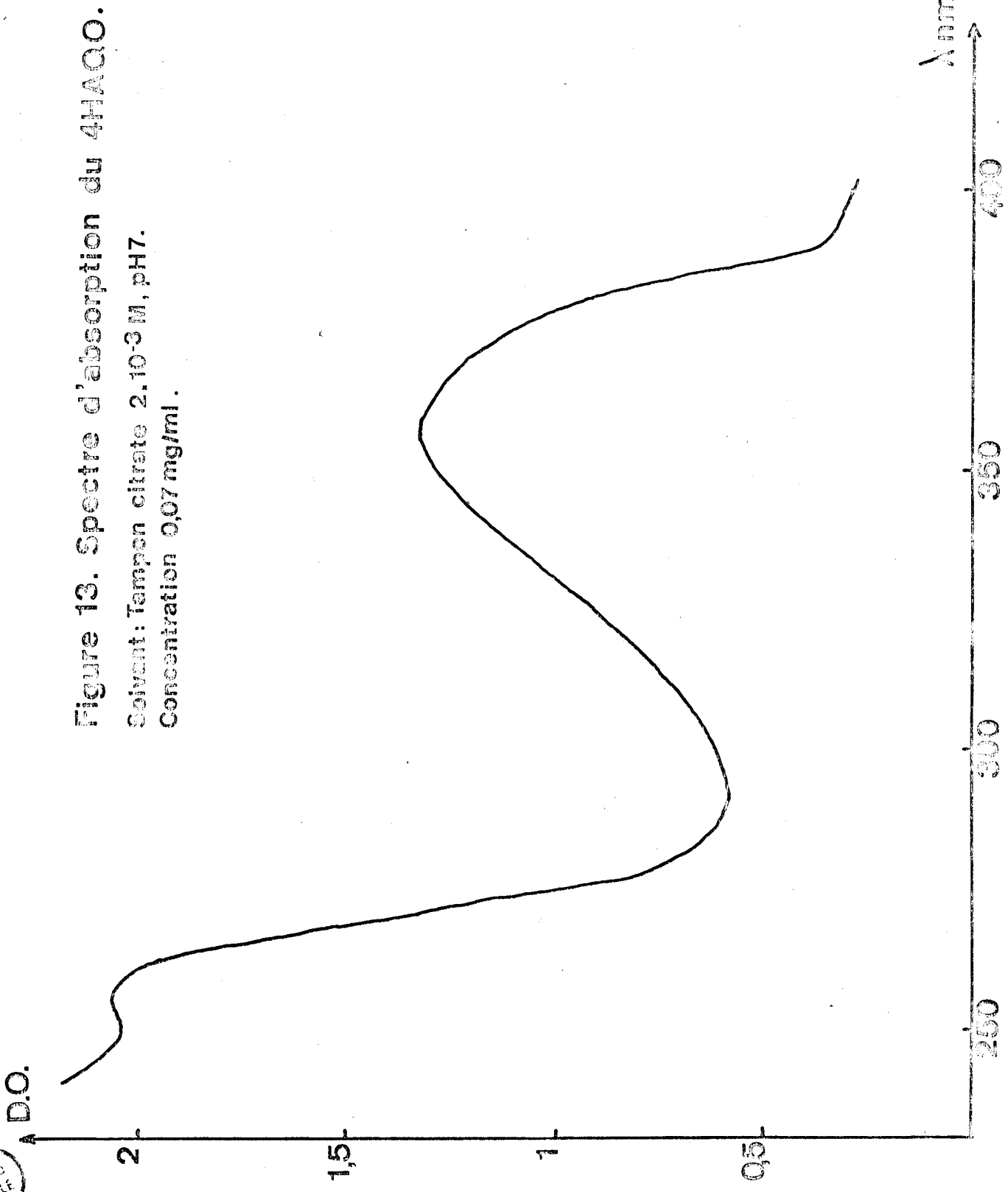


Figure 13. Spectre d'absorption du 4HAQO.

Solvant: Tampon citrate 2.10⁻³M, pH7.

Concentration 0,07 mg/ml.

L'agent acétylant utilisé est l'anhydride acétique. Le mode opératoire est décrit dans l'appendice technique, p. I.

Nous avons toujours synthétisé de petites quantités de di Ac-4HAQO. En effet, la préparation de grandes quantités s'est avérée impossible, du fait de l'instabilité du produit ; en particulier, la recristallisation finale présentait dans ce cas des difficultés.

Contrôles de pureté.

Le composé que nous avons obtenu possède les caractéristiques annoncées par Kawazoe et Araki (69) :

- cristaux légèrement colorés (beige)
- point de fusion : 110°C
- analyse élémentaire : en accord avec la formule brute du di Ac-4HAQO ; poids moléculaire : 260 g.

L'analyse spectroscopique a apporté d'autres preuves de la validité du produit synthétisé.

Le spectre d'absorption d'une solution éthanolique de notre composé a montré qu'il s'agissait bien de di Ac-4HAQO. Les bandes observées sont identiques à celles mentionnées dans la littérature (120) :

- un maximum à 351 nm
- un maximum à 258 nm

Ce spectre est représenté sur la figure 14.

Nous avons calculé les valeurs des ϵ :

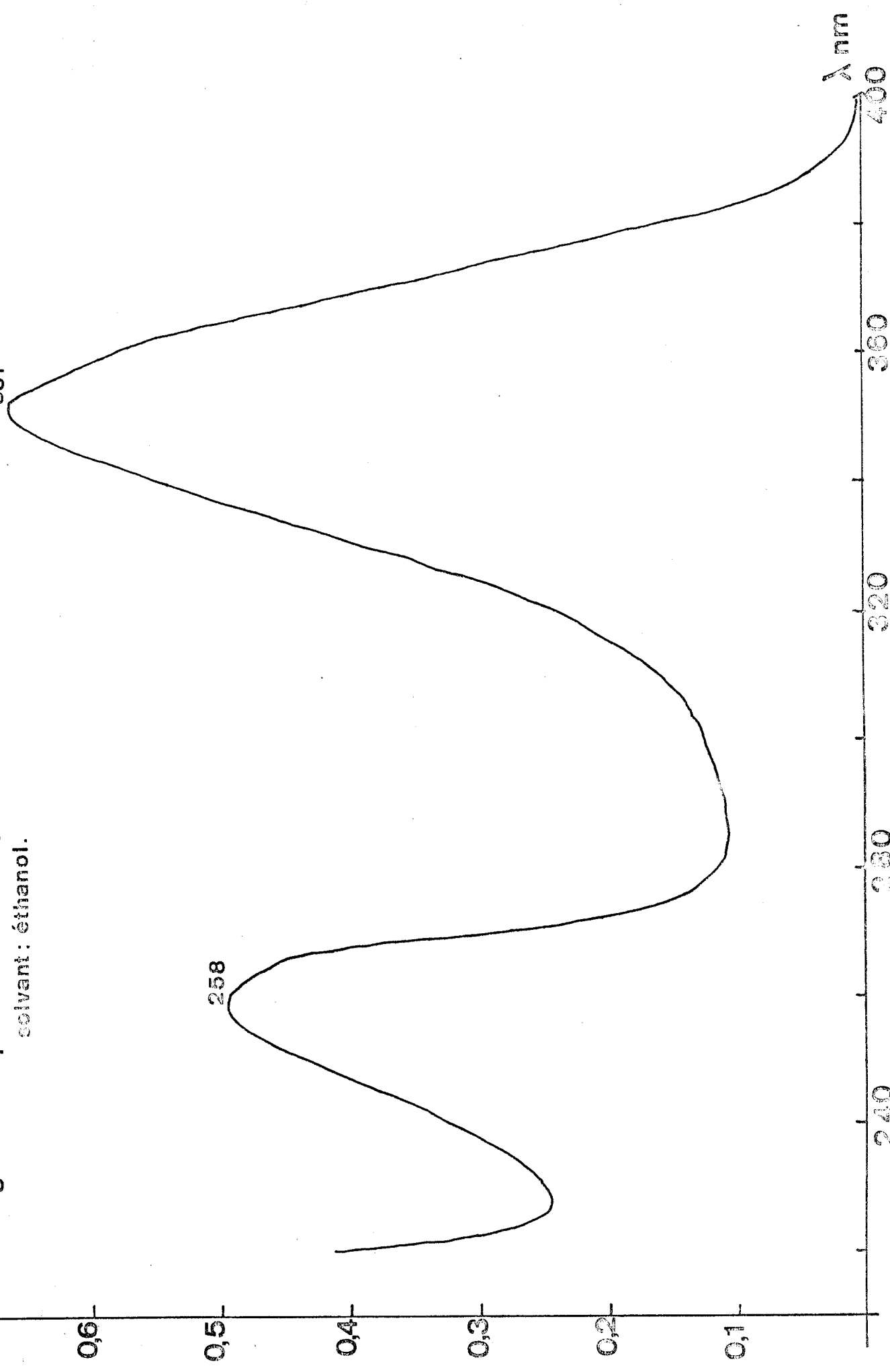
- $\epsilon_{351} = 13000 \text{ mole}^{-1} \times \text{l} \times \text{cm}^{-1}$
- $\epsilon_{258} = 9700 \text{ mole}^{-1} \times \text{l} \times \text{cm}^{-1}$

La RMN du proton nous a également permis de vérifier les données de Kawazoe et Araki (69). Le spectre de notre produit, effectué en onde continue, montre les mêmes valeurs de déplacements chimiques que celles notées par ces auteurs (Fig. 15) :

- 2 pics correspondant aux 2 groupements acétyle
 - $\delta = 2,23 \text{ ppm}$
 - $\delta = 2,38 \text{ ppm}$

BHS
LILLE

↑D.O. Figure 14. Spectre d'absorption du diAc4HAQO.
solvant: éthanol.



Solvant : CDCl_3

Concentration : 50 mg/ml

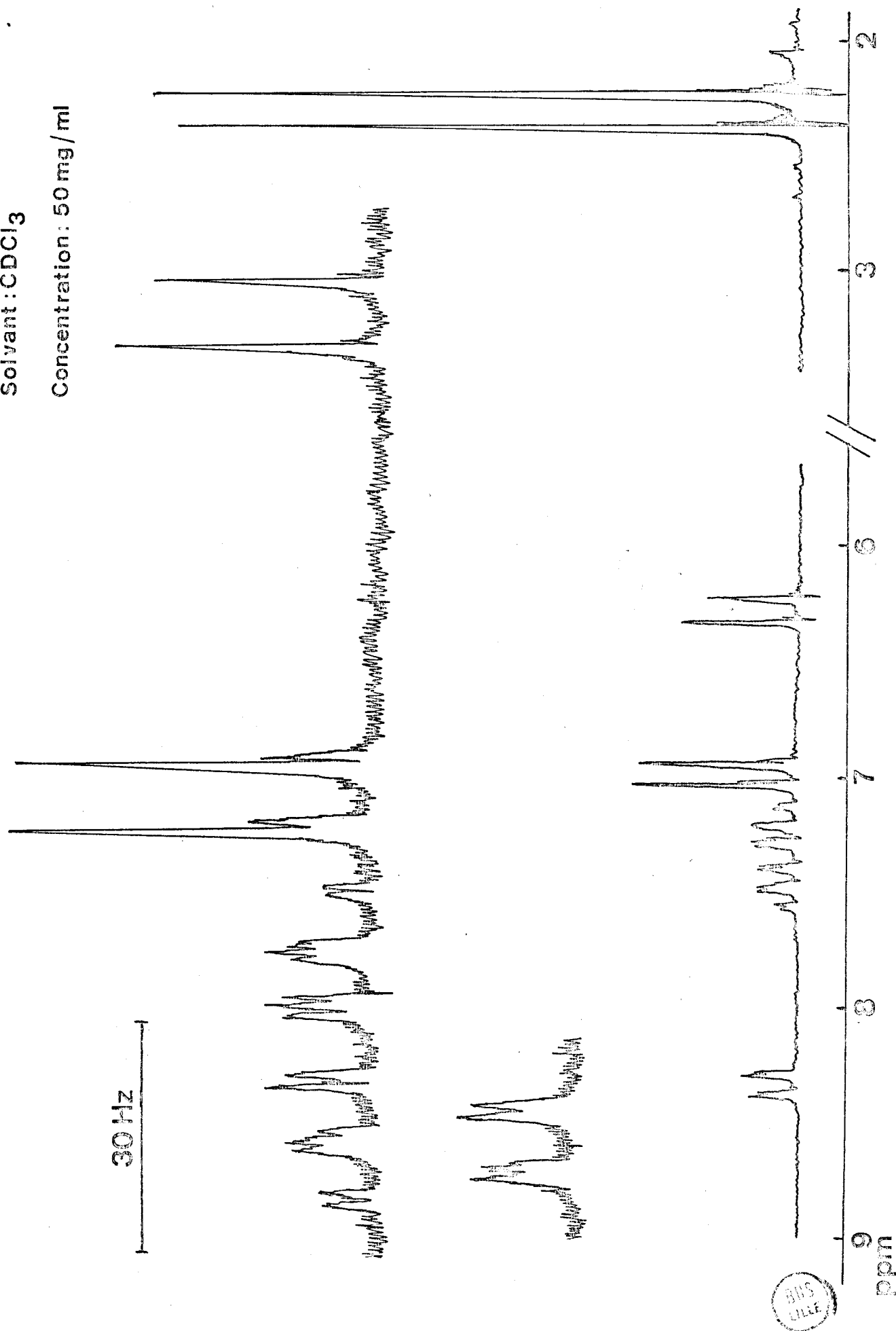
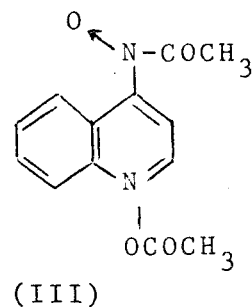
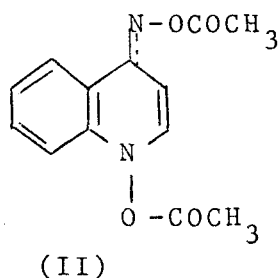
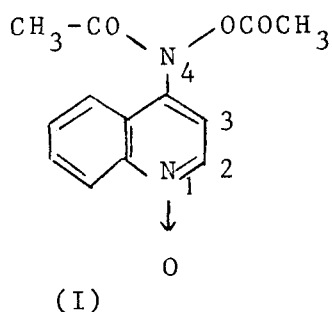


Figure 15.

Spectre RMN du di Ac 4HAQO.

- 2 doublets AB dûs aux protons en position 2 et 3
- = 6,97 ppm
- = 6,28 ppm

D'après ce spectre RMN, Kawazoe et Araki suggèrent trois structures possibles selon les positions des groupements acétyle sur le noyau :



En examinant le spectre I.R. de son produit, Kawazoe et Araki éliminent les possibilités (I) et (III) quant à la structure. Nous avons enregistré le spectre I.R. du di Ac-4HAQO préparé au laboratoire, en pastille de KBr. Le résultat, présenté sur la figure 16, est identique à celui obtenu par Kawazoe et Araki (69). Nous retenons donc la formule (II).

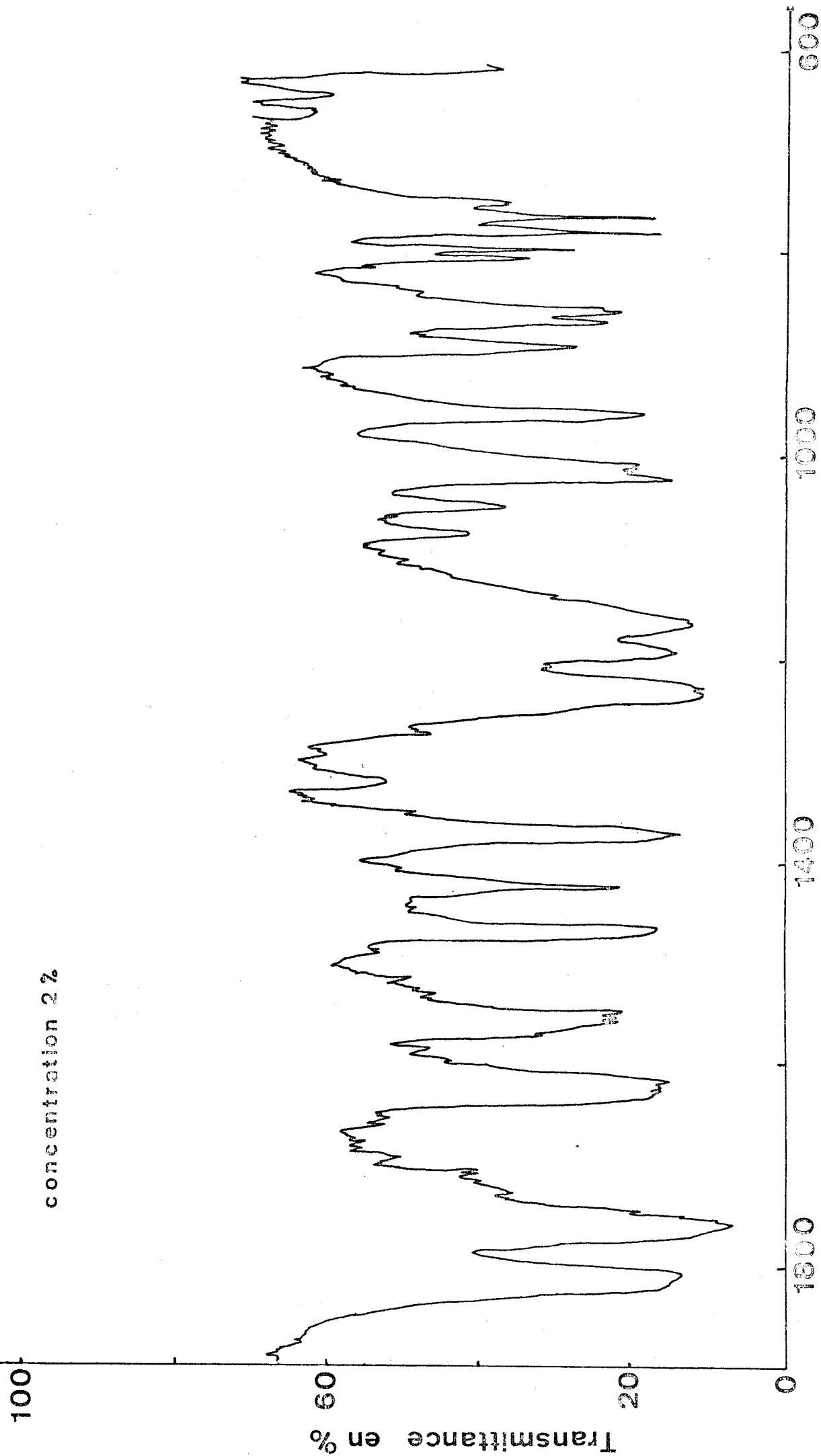
La pureté de notre produit a également été vérifiée par chromatographie sur couche mince, sur des microplaques de silice contenant un révélateur fluorescent. La composition du solvant employé est la suivante :

- 5 % acétone
- 95 % chloroforme

Pratiquement une seule tache est observée ; elle est révélée à deux longueurs d'onde différentes : 254 nm et 366 nm. Cependant deux taches de très faible intensité sont toujours présentes. Nous les avons attribuées à un début de dégradation du di Ac-4HAQO sur la silice.

Figure 16. IR du diAc-4HAQO.

concentration 2%



BUS
LILLE

$\tilde{\nu}$ en cm^{-1}

Conservation du di Ac-4HAQO.

Le dérivé étant très réactif, il se décompose facilement, à l'air, en présence d'eau et à la lumière. Nous le conservons donc dans un récipient fermé purgé à l'azote, en présence de desséchant, à l'obscurité, à - 20°C.

II. Le DNA.

A) Matériel utilisé pour la comparaison *in vivo-in vitro*.

Les méthodes de Ikegami *et al* (52) et Tada *et al* (160) ont été utilisées.

Le DNA a été extrait de cellules ascitiques. Nous avons travaillé sur l'hépatome de Zajdela, qui est entretenu au laboratoire ; l'ascite est portée par des Rats Wistar.

L'isolement du DNA a été effectué de deux manières différentes :

- après traitement des cellules au 4HAQO ou au 4NQO, de manière à étudier la fixation du cancérogène *in vivo*.
- à partir de cellules non traitées au cancérogène ; ce matériel est utilisé, d'une part, comme témoin dans l'étude *in vivo* et, d'autre part, dans la préparation des échantillons *in vitro* par action du di Ac-4HAQO.

La transplantation sur l'animal est effectuée de la manière suivante : on injecte par voie intrapéritonéale environ 10^6 cellules tumorales à des Rats Wistar mâles âgés de 3 mois. Sept jours après la transplantation, le 4 NQO ou le 4HAQO est injecté aux Rats, toujours par voie intrapéritonéale, c'est-à-dire dans l'ascite.

Etant donnée l'insolubilité du 4NQO dans l'eau, les solutions de 4NQO et de 4HAQO servant aux injections ne sont pas préparées de la même manière :

- solution de 4NQO.

Le 4NQO est d'abord dissous dans une quantité minimale de DMSO ; la solution obtenue est ensuite diluée de façon appropriée avec de l'eau physiologique, afin d'obtenir une concentration de 0,32 M (52).

- solution de 4HAQO.

Une solution à 0,4 M est obtenue en dissolvant directement le 4HAQO dans de l'eau physiologique.

Dans les deux cas, 0,5 ml de solution ont été injectés.

Après un temps d'action du cancérogène d'une heure ou deux selon l'essai effectué, les rats sont tués par décapsulation. Le liquide ascitique est ponctionné et son volume mesuré.

Les cellules sont obtenues par centrifugation, à 1500 tours/mn, pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est remis en suspension dans une solution de sucrose 0,25 M, tamponnée par 10 % de P.B.S. Les cellules sont alors centrifugées en gradient de sucrose [0,88 M/0,25 M, 10 % P.B.S.], afin d'éliminer les hématies contaminantes. On effectue ainsi trois lavages successifs.

La technique d'extraction employée est celle de Marmur ; elle est décrite dans l'appendice technique de ce mémoire, p. II à IV. Les échantillons obtenus ont été contrôlés en spectroscopie d'absorption ; le spectre UV du DNA présente un maximum à 260 nm. Le rapport des densités optiques à 260 nm et à 280 nm, D.O. 260 nm/D.O. 280 nm, indique le pourcentage résiduel de protéines. Nous avons toujours obtenu un rapport très voisin de 2, qui est le critère d'une absence de protéines.

L'utilisation de cellules ascitiques est intéressante, la quantité de matériel récupéré étant abondante : nous recueillons environ 15 mg de DNA par rat. Nous avons travaillé sur deux rats, ce qui nous a fourni 30 mg de DNA à chaque essai.

B) Matériel utilisé pour l'étude physico-chimique *in vitro*.

En plus du DNA extrait de l'ascite, nous avons aussi travaillé sur un DNA de Poulet qui nous a été fourni par le laboratoire de Monsieur le Professeur M. DAUNE, à Strasbourg. Les caractéristiques de ce matériel sont les suivantes :

- coefficient de sédimentation moléculaire

$$S_w^{20} = 22 \text{ S.}$$

- coefficient d'extinction molaire à 260 nm,

$$\epsilon_{260} \approx 6600 \text{ mole}^{-1} \times \text{l} \times \text{cm}^{-1}.$$

- pourcentage d'hyperchromicité : $H = 41 \%$.
- température de fusion en milieu $0,1 \text{ M NaCl}$,
 $T_f = 87^\circ \text{C}$.

La préparation du DNA dénaturé est effectuée de la manière suivante : On incube la solution de DNA à 100°C pendant 15 minutes, en tube scellé. Le tube est ensuite plongé brutalement dans la glace.

III. Les méthodes spectroscopiques.

Nous avons employé trois techniques différentes : la spectroscopie d'absorption, la spectroscopie de fluorescence, et la biréfringence linéaire électrique.

A) La spectroscopie d'absorption.

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 118 M, qui a été équipé au laboratoire, par Gérard Lecocq, d'un système d'enregistrement des températures de fusion. Etant donnée la grande sensibilité de la température de fusion vis-à-vis de la force ionique, les mesures d'une même série ont été réalisées strictement à la même force ionique, c'est-à-dire en utilisant la même solution stock comme tampon.

B) La spectroscopie de fluorescence.

L'appareil utilisé est un spectrofluorimètre différentiel FICA, totalement corrigé. Il est situé à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, à Villeneuve d'Ascq, dans le laboratoire de Monsieur le Professeur A. Lablache-Combier. Toutes les manipulations ont été effectuées en eau bidistillée.

C) L'anisotropie optique.

Les mesures de biréfringence électrique ont été effectuées dans le laboratoire de Monsieur C. Houssier à l'Université de Liège, au Sart-Tilman.
La force ionique des solutions correspond à une molarité en sel de 10^{-3} M .

La description détaillée des précédentes méthodes est donnée dans l'appendice technique, p. V à XIV.

IV. Préparation des solutions de DNA transformé *in vitro*.

La réaction a été effectuée sur le DNA natif aussi bien que sur le DNA dénaturé. Les manipulations ont été réalisées à pH 7, dans deux tampons correspondant à deux forces ioniques différentes : l'un des deux tampons contient 0,05 M de NaCl, alors que l'autre n'en contient pas. La mise au point de la technique de préparation des échantillons a été réalisée pour le DNA natif dans le tampon ne contenant pas de NaCl. Elle a été légèrement modifiée pour l'étude dans le tampon de force ionique plus élevée.

A) Mise en solution des réactifs ; préparation du mélange réactionnel.

Conditions de solvant.

Nous nous sommes placée dans des conditions de tampon analogues à celles utilisées par Miller *et al* (96) et Fuchs et Daune (34), et qui sont très voisines de celles employées par Enomoto *et al* (32). Le DNA est mis en solution dans un tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7. Le di Ac-4HAQO est solubilisé dans l'éthanol. La réaction est donc effectuée en milieu tampon citrate/éthanol et dans les proportions : 80 % ; 20 %.

Conditions de concentration.

La solution de DNA employée est à 0,5 mg/ml, ce qui nous semble être l'ordre de grandeur le plus favorable. En effet, cette concentration relativement élevée favorise la fixation du du cancérogène sur le DNA, aux dépens de la réaction d'hydrolyse du di Ac-4HAQO. Une concentration en DNA supérieure serait difficilement utilisable : la viscosité de la solution rendrait sa manipulation moins aisée.

Une solution mère de di Ac-4HAQO dans l'éthanol est préparée ; elle est ensuite diluée de façon appropriée au cours du mélange avec la solution de DNA. La concentration de cette solution mère est donc conditionnée par celle de la solution de DNA : les quantités de cancérogène et de DNA mises en présence sont définies par le rapport R (34) :

$$R = \frac{\text{Concentration en cancérogène, en mole/litre}}{\text{Concentration en nucléotides, en mole de phosphore/litre}}$$

dans le mélange réactionnel.

Nous utilisons une solution mère de cancérogène à 6 mg/ml. L'éthanol employé est à 99,9 % de pureté (Prolabo) ; il est conservé sur tamis moléculaire afin d'éliminer les éventuelles traces d'eau, pour éviter la décomposition du di Ac-4HAQO dans l'éthanol avant réaction. Après mélange des deux réactifs, le volume final de l'échantillon est de 2,5 ml :

$$2,5 \text{ ml} \left\{ \begin{array}{l} 80 \% \left\{ \begin{array}{l} - 2 \text{ ml de solution de DNA dans le tampon citrate} \\ - 2 \times 10^{-3} \text{ M, pH 7.} \end{array} \right. \\ 20 \% \left\{ \begin{array}{l} - (500 - x) \mu\text{l d'éthanol.} \\ - x \mu\text{l de solution de di Ac-4HAQO dans l'éthanol.} \end{array} \right. \end{array} \right.$$

A partir des concentrations des deux solutions mères (DNA : 0,5 mg/ml, di Ac-4HAQO : 6 mg/ml), nous avons calculé, pour chaque valeur de R, les quantités respectives d'éthanol et de di Ac-4HAQO à ajouter aux 2 ml de la solution de DNA (voir le Tableau ci-dessous) :

R	Solution de DNA en ml	EtOH (500 - x) μl	Solution de di Ac-4HAQO en μl (x)
0	2	500	0
0,1	2	487	13
0,2	2	474	26
0,5	2	434,4	65,6
1	2	368,7	131,3
1,5	2	303,4	196,6
2	2	238,4	261,6
3	2	106,7	393,3

La réaction est effectuée en tubes Sovirel de 10 ml à bouchons vissés, préalablement purgés à l'azote, pour éviter l'oxydation du di Ac-4HAQO. La solution de DNA est également purgée, ainsi que la solution mère éthanolique de cancérogène. On répartit tout d'abord les 2 ml de solution de DNA dans chaque tube, ainsi que les quantités d'éthanol correspondant à chaque valeur de R. Le cancérogène est ajouté en dernier lieu ; après forte agitation au vibreur, les tubes sont incubés au bain-marie, à l'obscurité, à 37°C. Le temps d'incubation a été déterminé expérimentalement, comme nous le verrons ci-dessous.

B) Température de la réaction.

Les tubes sont incubés à 37°C. Cette température est utilisée par Enomoto *et al* (32) pour le di Ac-4HAQO, Miller *et al* (96) et Fuchs et Daune (34) pour le N-Ac-AAF.

C) Temps de réaction.

La durée d'incubation a été déterminée en effectuant une cinétique de solvolysé du di Ac-4HAQO, en milieu tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7 / éthanol : 80/20, à 37°C. Le paramètre temps dépend donc essentiellement du comportement chimique du di Ac-4HAQO dans ce milieu à la température de 37°C. Le rapport $\frac{\text{éthanol}}{\text{tampon}}$, la force ionique et la température sont en effet des facteurs déterminants de la vitesse de décomposition du di Ac-4HAQO.

Cette cinétique de solvolysé a été analysée à l'aide de la spectroscopie d'absorption.

La solution utilisée correspond à la composition suivante :

- 2 ml de tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7
 - 500 µl de di Ac-4HAQO dans l'éthanol
- } 80/20

La solution mère de di Ac-4HAQO est à 0,1 mg/ml. Après mélange avec le tampon, le cancérogène est donc à une concentration de 0,02 mg/ml.

Nous avons suivi les variations du spectre d'absorption du di Ac-4HAQO dans le mélange tampon citrate/EtOH : 80/20, à 37°C, en fonction du temps.

Le mélange est réalisé dans la glace. Un premier spectre est

tracé à $t = 0$, de 450 nm \rightarrow 220 nm, et la cellule de mesure est ensuite directement incubée à 37°C ; on trace un spectre tous les quarts d'heure.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 17 : nous constatons que la cinétique d'hydrolyse du di Ac-4HAQO est très rapide, puisqu'après 3/4 d'heure d'incubation nous n'observons plus aucune variation notable du spectre d'absorption du composé. De plus, nous pouvons observer sur ce spectre d'absorption des modifications importantes :

- L'intensité de la bande à 351 nm est fortement diminuée, ce qui indique que le(s) produit(s) formé(s) possède(nt) à cette longueur d'onde un coefficient d'extinction molaire, ϵ , beaucoup plus faible que le di Ac-4HAQO.

- L'intensité de la bande à plus faible longueur d'onde est par contre augmentée, ce qui signifie une augmentation du ϵ au maximum de cette bande. Ce maximum est légèrement déplacé, puisqu'il est situé à 254 nm, au lieu de 257 nm.

- Nous notons l'apparition d'une nouvelle bande, à 232 nm.

- Dans la zone 450 nm-400 nm, nous observons une augmentation de la densité optique, qui était pratiquement nulle au temps $t = 0$.

Nous avons calculé les valeurs des ϵ du di Ac-4HAQO hydrolysé, au temps $t = 3/4$ d'heure, qui représente le temps limite, au-delà duquel le spectre d'absorption ne varie plus.

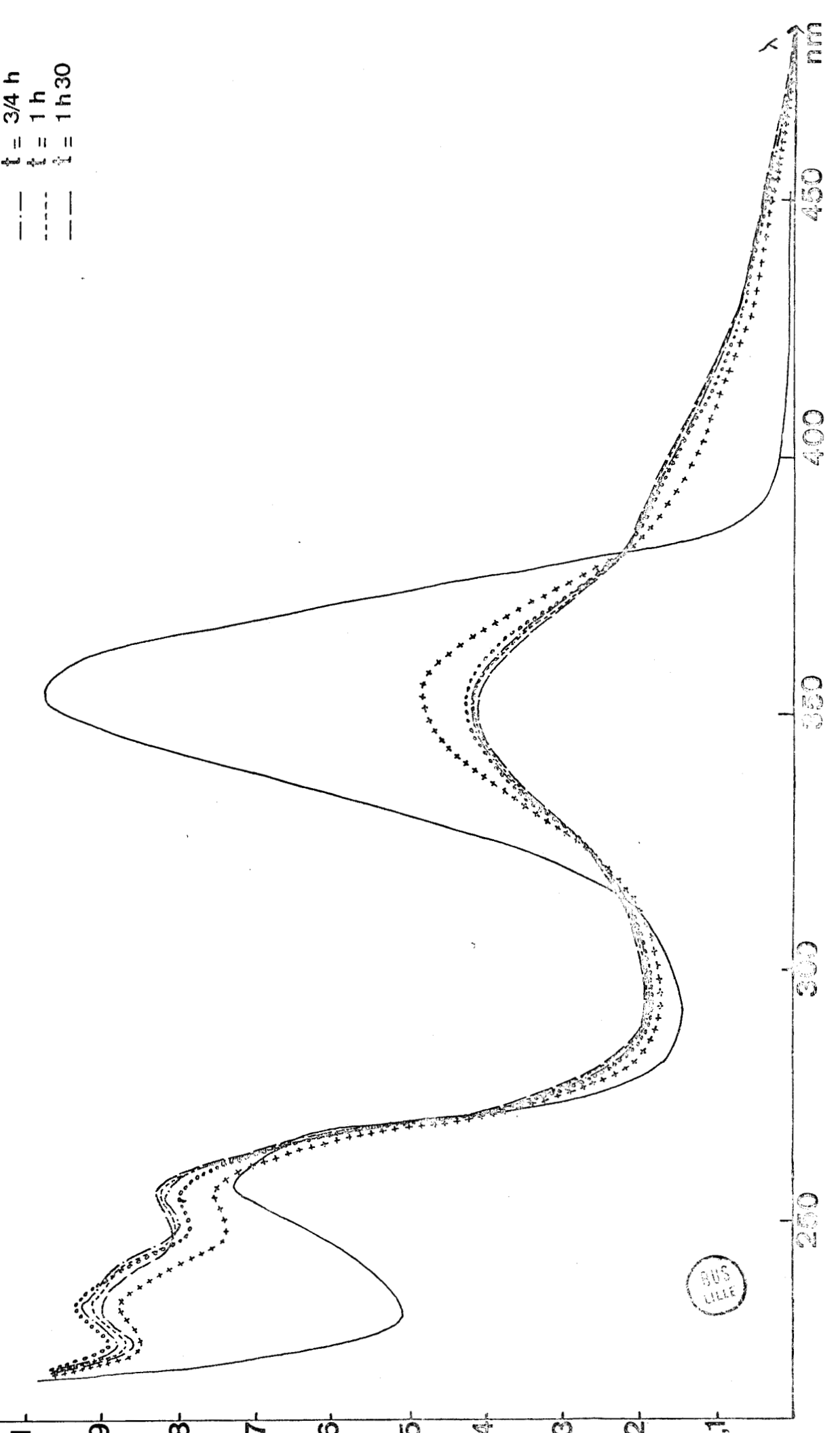
$$\begin{aligned} - \epsilon_{351} &= 5300 \text{ mole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1} \\ - \epsilon_{254} &= 10600 \text{ mole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1} \\ - \epsilon_{260} &= 10200 \text{ mole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1} \\ - \epsilon_{232} &= 12000 \text{ mole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1} \end{aligned}$$

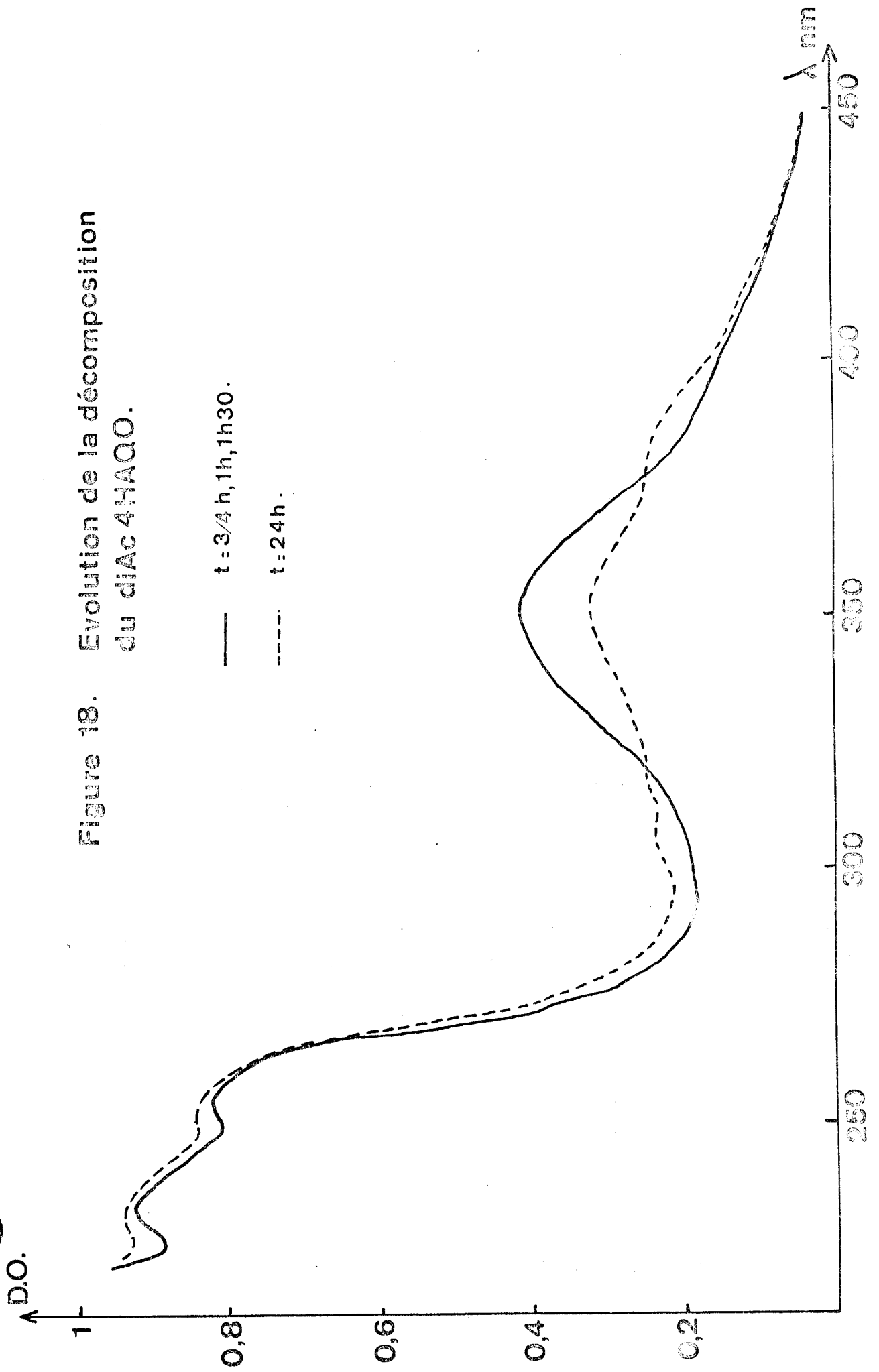
Après 24 heures d'incubation à 37°C, le spectre obtenu présente une allure très différente ; en particulier, nous pouvons noter l'apparition de nouvelles bandes d'absorption qui correspondent vraisemblablement à la présence de nouveaux produits de dégradation du cancérigène (Figure 18).

Figure 17. Cinétique de solvolysse du diAc4HAQO.

Tampon citrate $2 \cdot 10^{-3} M$, pH7 / Ethanol: 80/20.

- $t = 0$
- + + + + $t = 1/4 h$
- o o o o $t = 1/2 h$
- - - - $t = 3/4 h$
- · · · $t = 1 h$
- - - - $t = 1 h 30$





Nous avons tracé la courbe de solvololyse du di Ac-4HAQO, c'est-à-dire la variation du pourcentage de décomposition en fonction du temps, afin de déterminer le temps de demi-solvololyse, $t_{1/2}$, au bout duquel 50 % du produit est décomposé. Le pourcentage de décomposition est calculé de la manière suivante :

$$\begin{array}{l} \% \text{ de décomposition, au temps } t, \\ \text{et à la longueur d'onde } \lambda \end{array} = \left(\frac{DO_{t=0} - DO_t}{DO_{t=0} - DO_{t \text{ limite}}} \right)_{\lambda} \times 100$$

Nous avons pris comme spectre limite le spectre correspondant au temps $t = 3/4$ d'heure puisque, comme nous pouvons le voir sur la figure 17, les spectres correspondants aux temps $t = 3/4$ d'heure, 1 heure et 1 heure 30, sont superposables, aux erreurs d'expérience près.

Nous avons effectué les calculs à 351 nm.

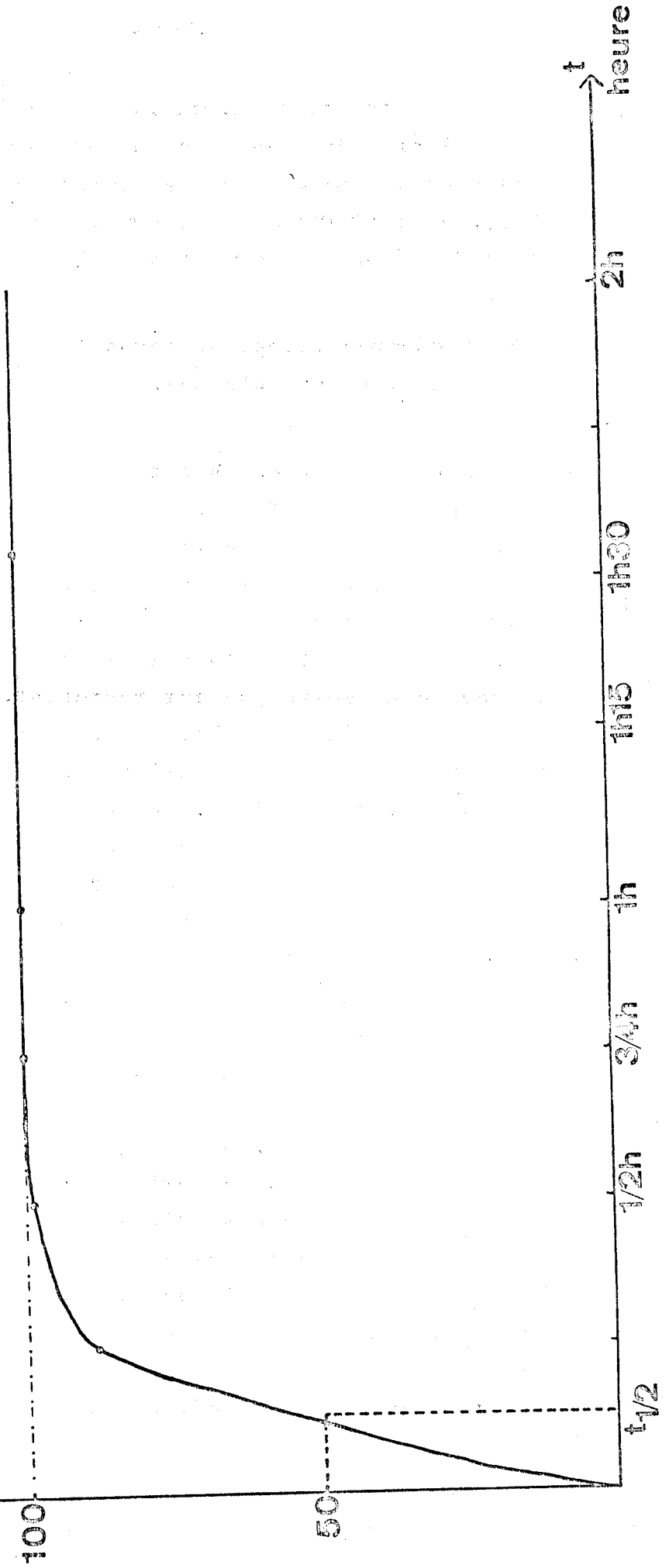
La courbe de solvololyse est représentée dans la figure 19. Elle est imprécise au début, étant donnée la rapidité de la solvololyse. Le temps de demi-solvololyse ne peut être déterminé avec exactitude : il est au maximum de 8 minutes. Cependant, nous avons choisi, dans un premier temps, une durée d'incubation de 1 h 30 pour la réaction DNA-di Ac-4HAQO, puisqu'il est bien connu que l'hydrolyse du cancérogène est moins rapide en présence du DNA qui, dans ce cas, "protégerait" le cancérogène. Pour chaque essai effectué, nous incubons toujours un DNA témoin sans cancérogène ($R = 0$) qui nous servira de référence dans l'analyse des résultats.

Après réaction du di Ac-4HAQO sur le DNA, la méthode de purification des échantillons s'est avérée très délicate, et a nécessité beaucoup d'essais avant d'être définitivement mise au point. Nous présenterons ce travail dans la partie "Résultats", puisqu'il nous a été possible à partir de ces essais d'affirmer que le cancérogène était bien lié de façon covalente au DNA. C'est également à la suite de ces travaux que nous avons été amenée à modifier le temps de réaction.

↑ % de décomposition

Figure 19. Courbe de solvolysse du diAc4HAOO.

Tampon citrate $2 \cdot 10^{-3}M$, pH7/Ethanol:80/20.



V. Dosage du cancérogène fixé sur le DNA.

Nous avons calculé les pourcentages de cancérogène fixé sur le DNA en utilisant la spectroscopie d'absorption. L'utilisation d'un produit radioactif, marqué sur le noyau quinoléique, nous aurait permis d'effectuer un dosage plus précis : l'obtention d'un tel produit nous a été impossible jusqu'à présent.

Après purification des échantillons, les spectres d'absorption sont enregistrés, de 500 nm à 220 nm :

- La zone spectrale de 500 nm à 310 nm correspond au cancérogène.

- La zone spectrale de 300 nm à 220 nm correspond principalement au DNA, mais il existe aussi dans ce domaine une contribution due au cancérogène.

Puisque, comme nous le verrons par la suite, la quantité de cancérogène fixée au DNA est très faible, il existe un important facteur entre l'ordre de grandeur de la D.O. due à l'absorbance du DNA et celui de la D.O. due à l'absorbance du cancérogène fixé sur la macromolécule. Ce facteur est de 100 environ.

Le dosage est effectué de la manière suivante :

Le pourcentage de fixation du cancérogène est donné par le rapport $\frac{[C]}{[P]}$, où $[C]$ représente la concentration en cancérogène fixé, exprimée en mole/l, et $[P]$ la concentration en DNA, exprimée en mole de P/l.

La valeur de $[C]$, en mole/litre, est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$[C] = \frac{D.O. \text{ cancérogène}}{\epsilon \text{ lié }_{\text{canc.}} \times l} \quad \text{dans laquelle,}$$

D.O. cancérogène : densité optique au maximum de la bande d'absorption due au cancérogène, dans la région visible du spectre. $\epsilon \text{ lié }_{\text{canc.}}$: coefficient d'extinction molaire du cancérogène à l'état fixé, au maximum d'absorption de la bande, exprimé en mole⁻¹.l.cm⁻¹.

$$l = 1 \text{ cm, donc } [C] = \frac{D.O. \text{ canc.}}{\epsilon \text{ lié }_{\text{canc.}}}$$

La valeur D.O._{canc.} nous sera donnée à partir du spectre, au maximum d'absorption de la bande du cancérogène. Nous ne possédons malheureusement pas la valeur du $\epsilon_{\text{canc.}}^{\text{lié}}$, les études de l'interaction entre le di Ac-4HAQO et les nucléotides n'ayant pas encore abouti à la synthèse d'un modèle base-cancérogène. Or, cette valeur du ϵ du cancérogène à l'état fixé est probablement différente de celle du ϵ du produit à l'état libre*. Nous avons donc dû faire une approximation en considérant que la valeur du ϵ du cancérogène libre, hydrolysé, était la même que celle du ϵ correspondant au cancérogène fixé de façon covalente. Cette approximation introduit une erreur dans nos résultats, mais la comparaison des échantillons entre eux reste toujours valable.

Les calculs ont été réalisés à partir de la bande située à 351 nm, uniquement due au cancérogène. En milieu tampon citrate/éthanol 80/20, la valeur limite du ϵ_{351} du di Ac-4HAQO à l'état libre, après hydrolyse, est donnée par le spectre limite obtenu lors des deux solvolyses effectuées :

- 1'une en tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7/éthanol 80/20
(Figure 17)

- 1'autre en tampon citrate 2×10^{-3} M + 0,05 M NaCl, pH 7 éthanol 80/20 (Figure 25).

Dans un premier cas, nous avons obtenu une valeur de :

$$\epsilon_{351} = 5300 \text{ mole}^{-1} \times 1 \text{ x cm}^{-1}$$

Dans le deuxième cas :

$$\epsilon_{351} = 5800 \text{ mole}^{-1} \times 1 \text{ x cm}^{-1}$$

La valeur de [C] est donc donnée par :

$$[C] \text{ mole/l} = \frac{\text{D.O.}_{\text{canc.}}}{5,3 \times 10^3}, \text{ en tampon citrate } 2 \times 10^{-3} \text{ M, pH 7}$$

$$[C] \text{ mole/l} = \frac{\text{D.O.}_{\text{canc.}}}{5,8 \times 10^3} \text{ NaCl, pH 7, en tampon citrate } 2 \times 10^{-3} \text{ M + 0,05 M}$$

*Fuchs et Daune (35) ont présenté, en 1972, une méthode de dosage spectrophotométrique du N-Ac-AAF fixé sur le DNA, en utilisant la valeur du ϵ du cancérogène lié, qui avait été déterminée par Kriek *et al* en 1967 (81).

Le calcul de la concentration en DNA, $[P]$, est effectué de manière analogue :

$$[P] = \frac{D.O._{260} \text{ (DNA)}}{\epsilon_{260} \times l}$$

$[P]$: exprimée en mole P/l

l en cm

$D.O._{260}$ (DNA) : densité optique provenant de l'absorbance du DNA

ϵ_{260} : coefficient d'extinction molaire du DNA, à 260 nm

$$l = 0,1 \text{ cm} \rightarrow [P] = \frac{D.O._{260} \text{ (DNA)}}{\epsilon_{260} \times 10^{-1}}$$

Le cancérogène absorbe également à 260 nm avec un coefficient d'extinction $\epsilon_{260} = 10200$ en tampon citrate 2×10^{-3} M, et un $\epsilon_{260} = 9000$ dans le tampon contenant du NaCl (0,05 M). Nous retrancherons donc la contribution du cancérogène à 260 nm, y , de la façon suivante :

. en tampon 2×10^{-3} M, pH 7 : $y \approx [C] \times 10^4$

. en tampon 2×10^{-3} M, pH 7 + 0,05 M NaCl : $y \approx [C] \times 9 \times 10^3$

En ce qui concerne le DNA natif, une deuxième contribution s'ajoute à 260 nm : celle due à l'hyperchromicité éventuelle du DNA, qui proviendrait de la dénaturation partielle de la double hélice après fixation du cancérogène.

Donc $D.O._{260} = D.O._{260} \text{ (DNA)} + D.O._{260} \text{ (cancérogène)} + D.O._{260} \text{ (hyperchromicité)}$

Nous n'avons cependant pas tenu compte de cette contribution : nous verrons par la suite, à partir de l'examen des températures de fusion des DNA transformés, que ce facteur correctif est sûrement très faible.

Donc, $D.O._{260} \text{ (DNA)} = D.O._{260} \text{ (totale)} - y$

Pour le DNA natif, le ϵ_{260} est égal à $\approx 6600 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$$\text{Donc } [P] = \frac{D.O._{260} \text{ (DNA)}}{6,6 \times 10^3 \times 10^{-1}}$$

Le pourcentage de fixation du cancérogène sur le DNA natif sera donc donné par :

$$\frac{[C]}{[P]} = \frac{D.O. \text{canc.} \times 6,6}{D.O._{260} \text{ (DNA)} \times 5,3} \times 10^{-1}, \text{ dans le tampon sans NaCl.}$$

Dans le cas du DNA dénaturé, la contribution due à l'hyperchromicité éventuelle n'existe pas. Nous avons calculé le ϵ_{260} pour le DNA dénaturé ; il est égal à $8800 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{l. cm}^{-1}$. Le pourcentage de fixation du cancérogène sur le DNA dénaturé sera donc donné par :

$$\frac{[C]}{[P]} = \frac{D.O. \text{canc.} \times 8,8}{D.O._{260} \text{ (DNA)} \times 5,3} \times 10^{-1}, \text{ dans le tampon sans NaCl.}$$

Dans ces déterminations, nous avons adopté une même valeur pour les coefficients d'extinction ϵ_{260} et ϵ_{351} du cancérogène, qu'il soit lié au DNA natif ou au DNA dénaturé. En d'autres termes, nous n'avons pas tenu compte de l'effet hypochrome que pourrait subir le cancérogène lorsqu'il est lié au DNA natif, du fait de son interaction avec le champ interne de la double hélice. Il ne nous est pas possible d'en tenir compte, dans l'état actuel de nos connaissances concernant la liaison DNA-di Ac-4HAQO.

Les spectres d'absorption seront toujours présentés avec des valeurs de D.O. correspondant à une largeur de la cellule de mesure de 1 cm.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I - LES PROBLEMES POSES PAR LA PURIFICATION DES ECHANTILLONS DE DNA IN VITRO.

MISE EN EVIDENCE DE LA LIATSON COVALENTE DNA-CANCEROGENE.

Une fois la réaction DNA-cancérogène effectuée, de nombreux problèmes de purification du DNA transformé se sont posés. La mise au point de méthodes nous permettant d'obtenir des échantillons de DNA débarrassés des produits n'ayant pas réagi de façon covalente a été longue : nous allons la décrire dans ce chapitre.

Le mélange réactionnel (environ 2,5 ml) est refroidi dès la fin de la réaction et le cancérogène en excès est éliminé par extraction à l'éther éthylique. La présence du cancérogène dans la phase éthérée est révélée par sa couleur jaune. Des extractions successives sont donc réalisées avec, à chaque fois, 2 ml d'éther jusqu'à obtention d'une phase éthérée incolore.

La deuxième phase de la purification consiste à éliminer une autre fraction de cancérogène qui, bien que n'ayant pas réagi de façon covalente sur le DNA, n'est pas éliminée par l'extraction à l'éther. Cette étape est très délicate et nous a posé de nombreux problèmes. Nous insistons particulièrement sur cette mise au point technique, cette phase finale de la purification conditionnant par la suite tous les résultats obtenus au cours de l'analyse physico-chimique et spectroscopique des DNA modifiés par le cancérogène.

I. La dialyse en continu : la première méthode employée.

Cette méthode de purification a été utilisée par Fuchs et Daune (34) dans le cas du N-Ac-AAF. Après extraction à l'éther, les échantillons sont mis en dialyse dans le tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7. Le bain de dialyse est protégé de la lumière environnante et gardé au froid,

sous agitation. Ce même bain est remplacé à différents intervalles de temps, les premiers changements n'étant espacés que d'une heure.

Nous avons effectué la cinétique suivante : Les échantillons ont été contrôlés en spectroscopie d'absorption après 9, 15, 17 et 19 changements du bain de dialyse. La durée totale de la manipulation a été de 4 x 24 heures

Le spectre d'absorption du cancérogène libre présentant deux bandes, l'une à 351 nm, l'autre à 258 nm (Figures 14 et 17), et le spectre du DNA isolé présentant une bande intense à 260 nm, on s'attend à une contribution du cancérogène fixé à 260 nm dans la bande du DNA ; par contre, la zone 500 nm-300 nm correspond au cancérogène seul. Nous avons donc enregistré chaque spectre, de 500 nm à 220 nm, et avons examiné à chaque fois ces deux zones spectrales.

La figure 20 montre les spectres obtenus après 9 changements du bain de dialyse pour des valeurs de R égales à 1 et 2.

La première constatation est que, dans la région 500 nm-300 nm, la présence de bandes notables signifie que le di Ac-4HAQO, ou plutôt l'un de ses produits d'hydrolyse, a interagi avec le DNA. Le maximum de la bande due au cancérogène se situe à 330 nm ; on peut noter également la présence d'un épaulement dans la région 390 nm-370 nm.

Dans la zone d'absorption U.V., nous constatons qu'à 260 nm, la D.O. des DNA ayant réagi avec le cancérogène est supérieure à celle du DNA témoin (R = 0). La valeur à 260 nm à elle seule n'est cependant pas utilisable, la dialyse introduisant toujours, d'un échantillon à un autre, un facteur de dilution non reproductible. De même, pour cette raison, la valeur à 330 nm à elle seule n'est pas utilisable.

D'autre part, nous ne considérerons pas, dans cette mise au point, les effets hyperchromes ou hypochromes pouvant exister dans les bandes respectivement à 260 nm et 330 nm.

Nous avons caractérisé chaque échantillon par le rapport

$\frac{D.O._{330}}{D.O._{260}}$ et avons ainsi suivi la cinétique de dialyse.

$\frac{D.O._{330}}{D.O._{260}}$

Comme nous le montre le Tableau I (p.79), ce rapport reste constant au bout de 17 changements du bain de dialyse :

Figure 20. Cinétique de dialyse. DNA natif.

Tampon citrate $2 \cdot 10^{-3} M$, pH 7.

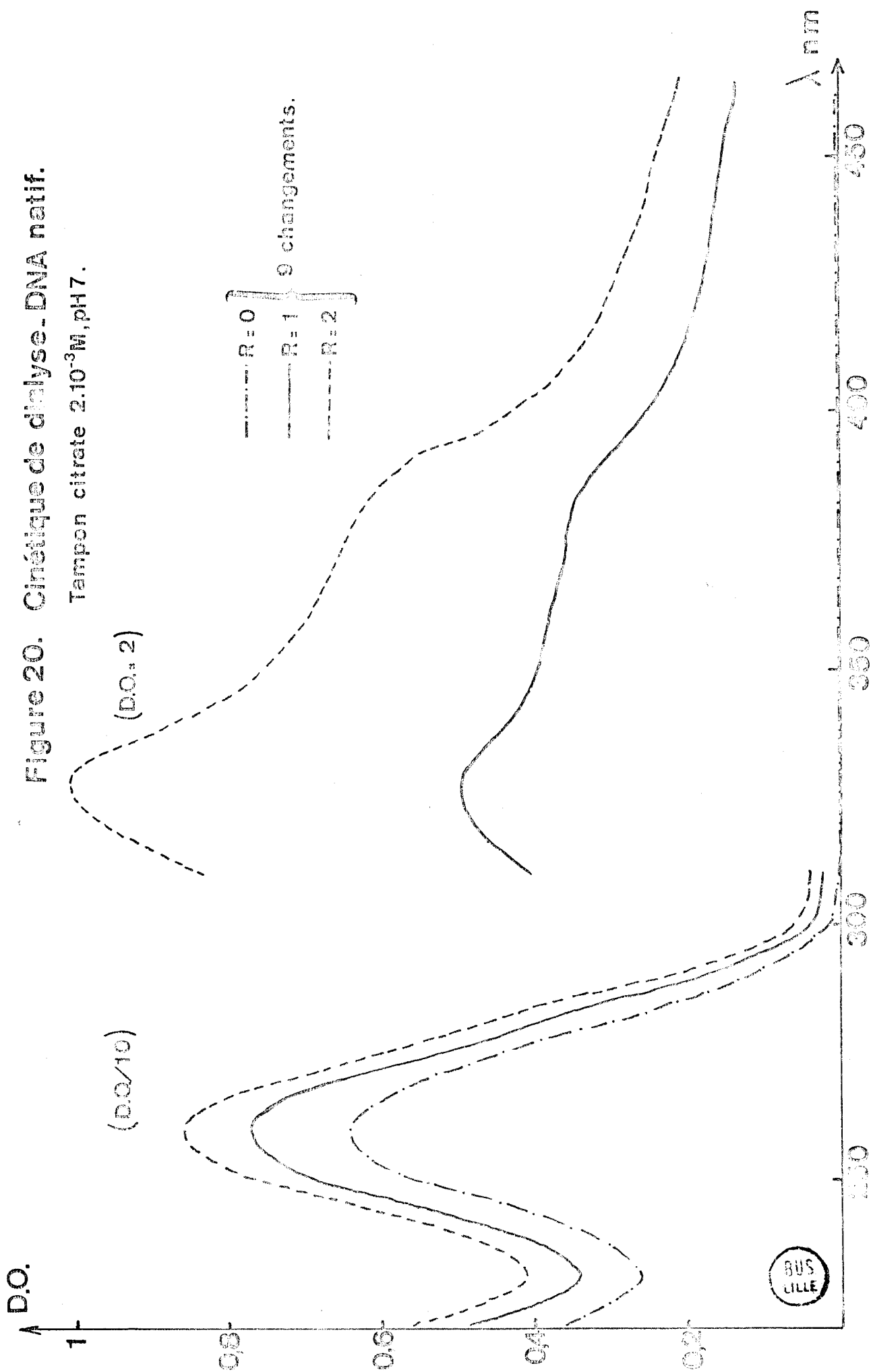


Tableau I

Nombre de changements	Valeurs du rapport $D.O._{330}/D.O._{260}$ pour différents R		
	R = 1	R = 2	R = 0
9	0,03	0,06	0
15	0,025	0,05	0
17	0,02	0,04	0
19	0,02	0,04	0

La figure 21 en donne l'illustration, pour un rapport de départ $R = 2$: le spectre d'absorption ne varie plus au bout de 17 changements du bain de dialyse.

Nous avons donc atteint une limite ; cependant, ceci est à interpréter avec prudence : la présence de la bande à 330 nm, après dialyse en continu, ne signifie en rien que le produit fixé au DNA l'est de façon covalente.

II. La précipitation à l'éthanol.

Puisqu'un certain nombre d'auteurs, tels Tada *et al* (160) et Enomoto *et al* (32) ont utilisé la précipitation à l'éthanol pour purifier leurs échantillons de DNA après réaction, soit avec le 4HAQO, soit avec le dérivé di Ac-4HAQO, nous avons voulu tester cette méthode sur nos échantillons. Nous avons donc soumis les échantillons précédents, purifiés par dialyse en continu, à une précipitation à l'éthanol.

La technique est la suivante : on ajoute à chaque échantillon :

- 0,1 volume de NaCl 5 M
- 2 volumes d'éthanol froid

Les tubes sont alors fortement agités et le DNA précipite.

On centrifuge les solutions 20 minutes à 5000 t/mn ; le culot est séché et remis en solution dans le tampon.

D.O.

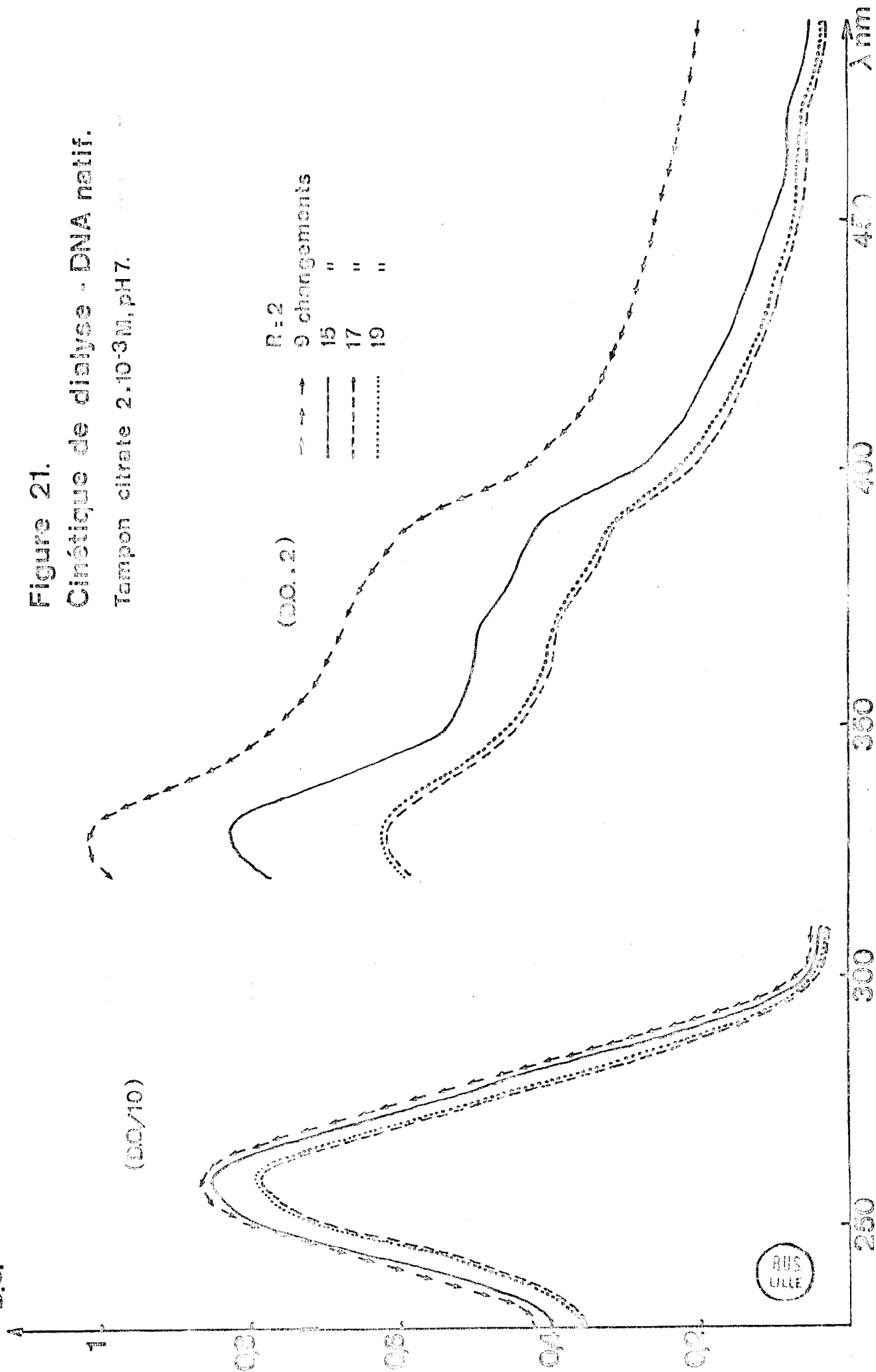


Figure 21.

Cinétique de dialyse - DNA natif.

Tampon citrate $2 \cdot 10^{-3} M$, pH 7.

Après dissolution du DNA, les spectres d'absorption des solutions ont été enregistrées. Nous avons alors constaté que, dans la zone spectrale correspondant au cancérogène, l'intensité de la bande d'absorption était fortement diminuée. Les valeurs des rapports $D.O._{330}/D.O._{260}$, avant et après précipitation à l'éthanol, sont données dans le Tableau II ci-dessous

Valeurs du rapport $D.O._{330}/D.O._{260}$ pour différents R		
	R = 1	R = 2
Avant précipitation à l'EtOH	0,02	0,04
Après précipitation à l'EtOH	0,01	0,015

Il semble donc qu'une grande partie du cancérogène soit éliminée par l'éthanol. On peut d'ailleurs s'en rendre compte même à l'oeil nu : le surnageant est coloré en jaune.

Pour affiner la détection du cancérogène lié au DNA, nous avons mis à profit le fait que le di Ac-4HAQO est fluorescent. Nous avons donc tracé les spectres de fluorescence, après un certain nombre de précipitations successives à l'éthanol afin de montrer qu'un seuil peut être atteint, au-delà duquel le cancérogène reste définitivement fixé.

Le volume de l'échantillon est soigneusement mesuré avant chaque précipitation. Après centrifugation du précipité, on le dissout à nouveau dans un volume de tampon identique à celui noté au départ, de façon à maintenir, d'une précipitation à une autre, une concentration en DNA constante pour un même échantillon. Après chaque précipitation à l'éthanol, l'échantillon est dialysé deux heures (2 changements du bain) dans le tampon, pour éliminer l'éthanol restant.

Nous avons étudié deux échantillons différents : $R = 0,5$ et $R = 1$, ainsi qu'un témoin sans cancérrogène, $R = 0$. Les spectres de fluorescence sont réalisés à partir de fractions de $100 \mu\text{l}$, diluées de façon identique d'un échantillon à l'autre, pour que les résultats puissent être comparés entre eux.

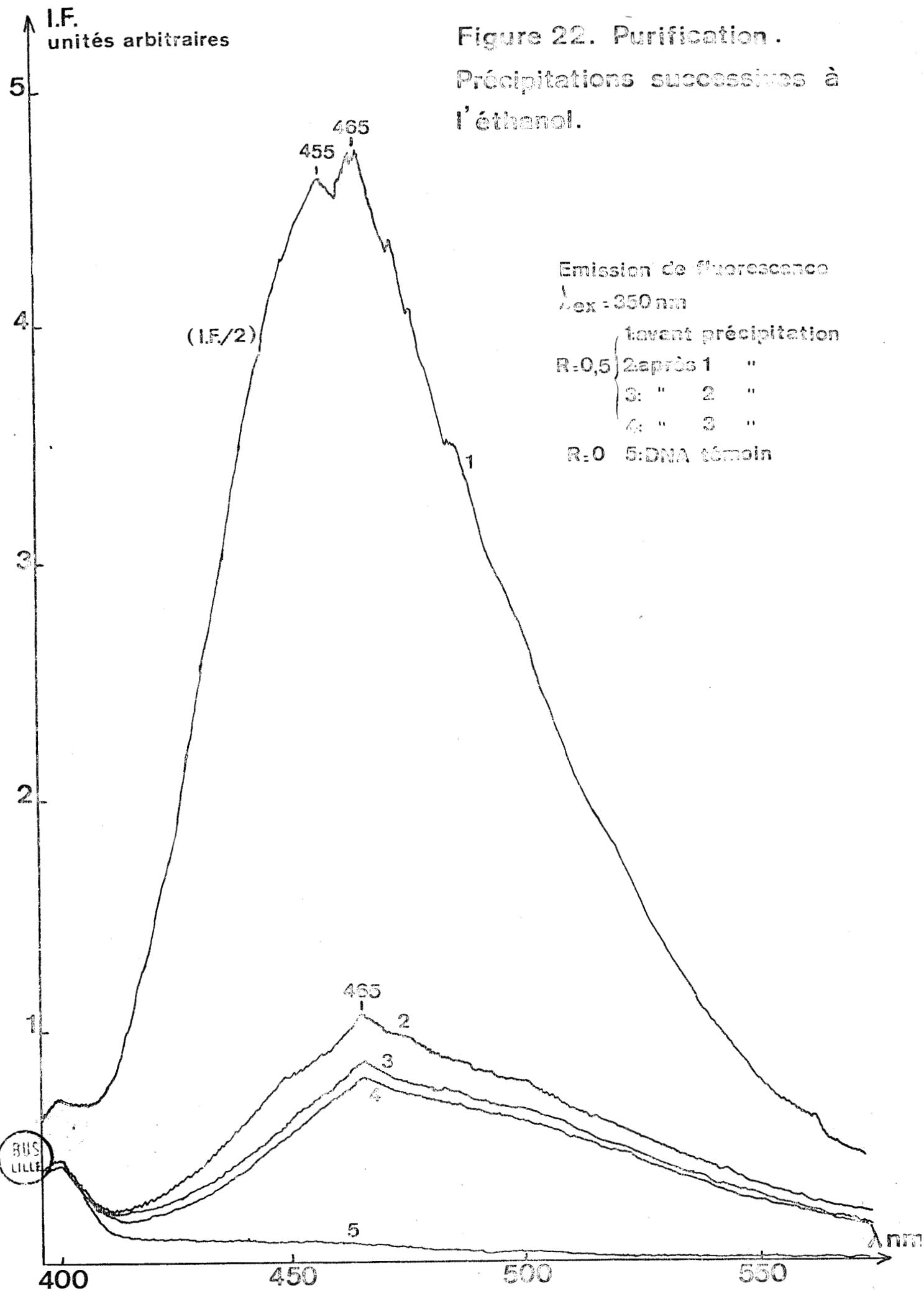
Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés, la longueur d'onde d'excitation étant fixée à 350 nm . La concentration du DNA est de $0,43 \text{ mg/ml}$ pour l'échantillon $R = 0,5$ et de $0,52 \text{ mg/ml}$ pour l'échantillon $R = 1$.

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 22 et 23. Puisque le DNA n'est pas fluorescent, la bande d'émission observée est due au cancérrogène fixé sur la macromolécule. Dans les deux cas, nous pouvons constater qu'une limite est atteinte après deux précipitations à l'éthanol, puisque l'intensité du spectre obtenu ne varie pratiquement plus ensuite ; le résultat est d'ailleurs quasiment atteint après la première précipitation.

Nous attribuons les variations minimales, observées entre la deuxième et la troisième précipitation, à l'erreur introduite alors dans la concentration. En effet, nous avons effectué les spectres d'absorption des liquides de précipitation obtenus à partir du témoin $R = 0$, de 300 nm à 220 nm . Nous avons alors pu constater que les deux premières précipitations à l'éthanol n'entraînaient aucune perte en matériel, la D.O. des liquides de précipitation correspondants étant nulle, à 260 nm . Par contre, le spectre d'absorption du liquide de troisième précipitation montre une légère absorbance à 260 nm : $D.O. = 0,05$. En considérant que les échantillons $R = 0,5$ et $R = 1$ ont subi la même perte que le témoin $R = 0$, on peut supposer que cette perte en matériel puisse expliquer la variation minimale notée entre la 2ème et la 3ème précipitation.

Le maximum de la bande d'émission est situé à la même longueur d'onde, avant et après précipitation : 465 nm . La forme de la bande est pratiquement la même dans les deux cas ; on peut cependant noter, avant le traitement à l'éthanol, la présence d'un épaulement à 455 nm qui disparaît dès la première précipitation.

Il semble donc que certains produits, qui sont éliminés par l'éthanol, ne différeraient de ceux qui restent fixés sur le



DNA que de par leur rendement quantique Φ .

Le fait qu'une certaine quantité de cancérogène soit éliminée par l'éthanol peut être interprété de deux manières différentes :

. Après dialyse, tout le cancérogène n'est pas fixé de façon covalente ; cette hypothèse serait en accord avec les résultats de Enomoto *et al* (32) et de Tada *et al* (160). On admet dans ce cas que la précipitation à l'éthanol élimine les molécules de cancérogène qui sont fixées sur la macromolécule par des liaisons de faible énergie : de type ionique, ou de type hydrophobe, ou (et) liaisons hydrogène.

. Tout le cancérogène est bien fixé de façon covalente ; dans ce cas, la précipitation à l'éthanol, qui implique le passage du DNA de l'état dissous à l'état de précipité, est trop brutale et peut favoriser l'hydrolyse de la liaison DNA-cancérogène.

La deuxième hypothèse nous paraît fort peu probable, l'éthanol n'étant pas en général un agent d'hydrolyse. Cependant, les mécanismes chimiques impliqués dans l'interaction DNA-di Ac-4HAQO et les sites de cette interaction étant encore mal connus, nous ne pouvons éliminer directement cette éventualité. Une troisième étape du travail a donc consisté à chercher, à l'aide de différents tests, la nature de la liaison du cancérogène qui reste fixé sur le DNA, après dialyse.

III. Les tests effectués sur le DNA "modifié".

Nous avons soumis les échantillons de DNA, après extraction à l'éther ou après dialyse, à deux tests différents qui nous ont montré que la majeure partie du cancérogène retrouvé sur le DNA après dialyse n'était pas fixée de façon covalente sur la macromolécule.

A) Dialyse dans un mélange tampon/éthanol : 50/50.

Cette technique de purification a été utilisée par Chang *et al* dans le cas du N-Ac-AAF (13). La méthode est plus lente que la précipitation à l'éthanol, mais elle présente l'avantage d'être moins brutale.

Nous avons dialysé deux séries d'échantillons identiques, après extraction à l'éther : l'une dans le tampon seul et l'autre dans le mélange tampon/éthanol : 50/50. Les résultats sont indiqués dans le Tableau III ci-dessous :

Changements		Valeurs du rapport $D.O._{330}/D.O._{260}$	
		R = 1	R = 2
Dialyse dans tampon seul	5	0,035	0,07
	10	0,03	0,06
	15	0,025	0,05
Dialyse dans tampon Ethanol 50/50	5	0,02	0,04
	10	0,01	0,016
	15	0,01	0,015

On remarque que :

. Après 5 changements des deux bains de dialyse, on obtient, pour le solvant tampon/éthanol, la même valeur du rapport $D.O._{330}/D.O._{260}$ que celle obtenue dans le tampon seul, après 19 changements (voir Tableau I, p. 79).

. Après 10 changements du bain tampon/éthanol, on obtient une valeur du rapport $D.O._{330}/D.O._{260}$ identique à celle obtenue lors de la précipitation à l'éthanol (voir Tableau II, p. 80).

. Quand le tampon seul est utilisé comme bain de dialyse, la limite obtenue pour le rapport $D.O._{330}/D.O._{260}$ est toujours supérieure à la valeur obtenue par précipitation à l'éthanol.

En conclusion, ceci nous montre que la précipitation à l'éthanol précédemment effectuée n'hydrolyse pas la liaison covalente entre le DNA et le cancérrogène, puisque la dialyse dans un mélange tampon/éthanol aboutit au même résultat. Le cancérrogène qui est éliminé par l'éthanol est donc fixé au DNA par l'intermédiaire d'une liaison non covalente, de faible énergie.

B) Dialyse dans un milieu NaCl 1,5 M.

Afin de montrer le caractère non covalent de la liaison du cancérogène éliminé à l'éthanol, nous avons essayé de prouver le caractère ionique de cette interaction. En effet, Paul *et al* (128) ont montré que le 4NQO, qui se fixe par liaison essentiellement ionique sur le DNA *in vitro*, était dissocié de la macromolécule par augmentation de la force ionique du milieu.

Nous avons donc dialysé les échantillons de DNA, après limite de dialyse dans le tampon seul, contre un tampon NaCl 1,5 M. Les résultats obtenus après plusieurs changements du bain de dialyse (Tableau IV ci-dessous) nous ont amenée à penser que l'effet de la force ionique était le même que celui de l'éthanol : la bande à 330 nm disparaît presque totalement, comme l'indiquent les rapports $D.O._{330}/D.O._{260}$:

Changements	Valeurs du rapport $D.O._{330}/D.O._{260}$	
	R = 1	R = 2
Dialyse :		
Tampon seul	19	0,02
	4	0,01
Dialyse :	8	0,01
1,5 M NaCl	12	0,01
Après précipitation à l'éthanol	0,01	0,015

Par conséquent, nous avons montré que la dialyse dans le tampon seul était inefficace. Nous avons choisi de purifier nos échantillons par précipitation à l'éthanol : en effet, contrairement à une dialyse, cette méthode présente l'avantage d'être très rapide, ce qui nous semble

être un facteur favorable dans le cas du di Ac-4HAQO dont nous avons souligné précédemment l'instabilité en milieu aqueux.

L'examen des spectres d'absorption obtenus au cours de dialyses dans le tampon seul semble montrer une évolution importante du di Ac-4HAQO quand il reste trop longtemps en solution aqueuse. Dans la figure 21, représentant le spectre du di Ac-4HAQO en cours de dialyse dans le tampon, on peut noter la présence d'un épaulement à 390 nm, puis, quand la durée augmente, d'un autre à 370 nm. L'épaulement à 390 nm correspondrait à la bande observée à cette longueur d'onde dans le spectre du di Ac-4HAQO seul, après 24 heures de solvolysse (Fig. 18). On peut donc penser que pendant l'incubation de 1 h 30, à 37°C, des produits d'hydrolyse du di Ac-4HAQO viendraient en contact avec la macromolécule, par l'intermédiaire de l'éthanol présent dans la solution. Par la suite, l'éthanol étant éliminé au cours de la dialyse, ces produits seraient libérés dans le milieu aqueux et subirait la dégradation notée en solvolysse, en 24 h et plus. Cette hypothèse ne peut encore être vérifiée avec précision actuellement, nos connaissances sur les propriétés chimiques du di Ac-4HAQO étant trop incomplètes. Mais cette observation nous donne cependant de fortes présomptions pour supposer que la dialyse, même en présence d'éthanol, est une mauvaise méthode de purification dans le cas du di Ac-4HAQO. Cette technique est, en effet, trop lente et peut donc favoriser la dégradation du composé en milieu aqueux, donnant des produits de décomposition qui risquent de souiller les préparations.

La précipitation à l'éthanol présente un autre avantage : elle est utilisée pour extraire le DNA *in vitro*.

En 1971, Kapuler et Michelson (66) avaient observé, dans le cas du N-Ac-AAF, un phénomène semblable à celui que nous venons de décrire. Ils montrèrent que, après réaction de ce cancérogène ultime sur le DNA *in vitro* puis séparation du cancérogène n'ayant pas réagi sur une colonne de Sephadex G 25, les spectres d'absorption de leurs échantillons présentaient une large bande, à environ 340 nm. Cette bande disparaissait après précipitation des DNA à l'éthanol, démasquant alors la bande à 305 nm, qui correspond au cancérogène fixé de façon covalente.

Ils avaient alors émis l'hypothèse de la formation d'un complexe à transfert de charge entre le N-Ac-AAF et les bases du DNA, ce complexe étant détruit par précipitation à l'éthanol. Il se peut qu'une telle interaction ait lieu dans le cas du di Ac-4HAQO, puisque nous avons montré que le cancérogène était éliminé en milieu NaCl 1,5 M. Nous ne sommes cependant pas en mesure de conclure avec précision actuellement ; ceci n'est d'ailleurs pas le but de notre travail, puisque nous nous intéressons à la liaison covalente du cancérogène sur le DNA.

Un travail tout récent sur l'interaction entre les polynucléotides synthétiques et le N-Ac-AAF a été entrepris par Harvan *et al* en 1977 (42). Ces chercheurs ont purifié leurs échantillons de deux manières différentes :

- dialyse en continu dans le tampon seul ;
- précipitations et lavages à l'éthanol.

Ils ont montré que la façon la plus sûre d'éliminer tout le cancérogène non fixé de façon covalente était la précipitation à l'éthanol.

En conclusion, puisque dans le cas du di Ac-4HAQO, après deux précipitations à l'éthanol, la même quantité de cancérogène reste fixée sur le DNA, nous avons adopté la méthode de purification suivante : deux précipitations à l'éthanol, après extraction à l'éther et dialyse rapide pour éliminer l'éther restant.

IV. Amélioration de la méthode : diminution du temps de réaction.

Pendant la durée de l'incubation du di Ac-4HAQO, en présence de DNA, il y a concurrence entre deux phénomènes chimiques :

- l'un qui représente la réaction favorable : formation, à partir du di Ac-4HAQO, de composés réactifs qui se fixent sur le DNA de façon covalente ;
- l'autre qui est défavorable : une dégradation plus poussée du cancérogène, qui aboutit à la naissance dans le milieu de produits divers qui pourraient alors :

. soit se fixer au DNA par liaison de faible énergie ;

. soit interagir entre eux par des réactions intermoléculaires pour donner d'autres composés plus complexes.

Nous avons noté dans la partie expérimentale (Paragraphe IV, C ; p. 69) que le temps de 1/2 solvolysse du di Ac-4HAQO en milieu tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7/éthanol : 80/20, à 37°C, était de l'ordre de 8 minutes. Par conséquent, au bout d'environ 1/4 d'heure, tout le di Ac-4HAQO est décomposé. En présence de la macromolécule de DNA, la solvolysse est ralentie. Pour cette raison, nous avons tout d'abord choisi un temps d'incubation de 1 h 30, mais il se peut qu'avec une durée de réaction plus courte on arrive au même résultat final. Nous avons donc essayé de diminuer le temps de réaction de moitié afin de limiter, pendant l'interaction DNA-di Ac-4HAQO, le deuxième phénomène chimique défavorable que nous avons cité plus haut.

Pour cela, nous avons fait réagir deux échantillons DNA-cancérogène R = 0,5, préparés de façon identique, l'un étant incubé pendant 1 h 30 et l'autre pendant 3/4 d'heure. Nous avons alors comparé, après précipitation à l'éthanol, les spectres d'absorption obtenus dans les deux cas, en calculant les rapports $D.O. \text{cancérogène} / D.O. \text{DNA}$. Dans la zone spectrale correspondant au cancérogène, l'absorbance est très faible. En augmentant d'un facteur 10 la largeur de la cellule de mesure et en amplifiant 10 fois la sensibilité de l'appareil, nous obtenons cependant un signal précis.

Les calculs des rapports $D.O. \text{cancérogène} / D.O. \text{DNA}$, dans les deux cas, nous ont donné des résultats identiques, aux erreurs d'expérience près :

$$\begin{array}{l} \underline{t = 1 \text{ h } 30} \\ D.O. \text{cancérogène} = 0,042 \\ D.O. \text{260} = 7,00 \end{array} \Rightarrow \frac{D.O. \text{cancérogène}}{D.O. \text{DNA}} = \frac{0,042}{7} = 6 \times 10^{-3}$$

$$\begin{array}{l} \underline{t = 3/4 \text{ h}} \\ D.O. \text{cancérogène} = 0,046 \\ D.O. \text{260} = 7,60 \end{array} \Rightarrow \frac{D.O. \text{cancérogène}}{D.O. \text{DNA}} = \frac{0,046}{7,60} = 6,05 \times 10^{-3}$$

Nous avons donc finalement choisi un temps d'incubation de 3/4 d'heure qui nous permet de limiter la dégradation du di Ac-4HAQO en milieu aqueux.

Enfin, nous terminons la purification des échantillons par une centrifugation de 20 minutes à 5000 t/mn.

En résumé, la méthode de préparation des échantillons de DNA *in vitro* est la suivante :

- Incubation à 37°C, pendant 3/4 d'heure, à l'obscurité
- Extraction à l'éther
- Dialyse rapide afin d'éliminer l'éther restant
- Deux précipitations à l'éthanol
- Dialyse rapide afin d'éliminer l'éthanol restant
- Centrifugation des solutions 20 minutes à 5000 t/mn.

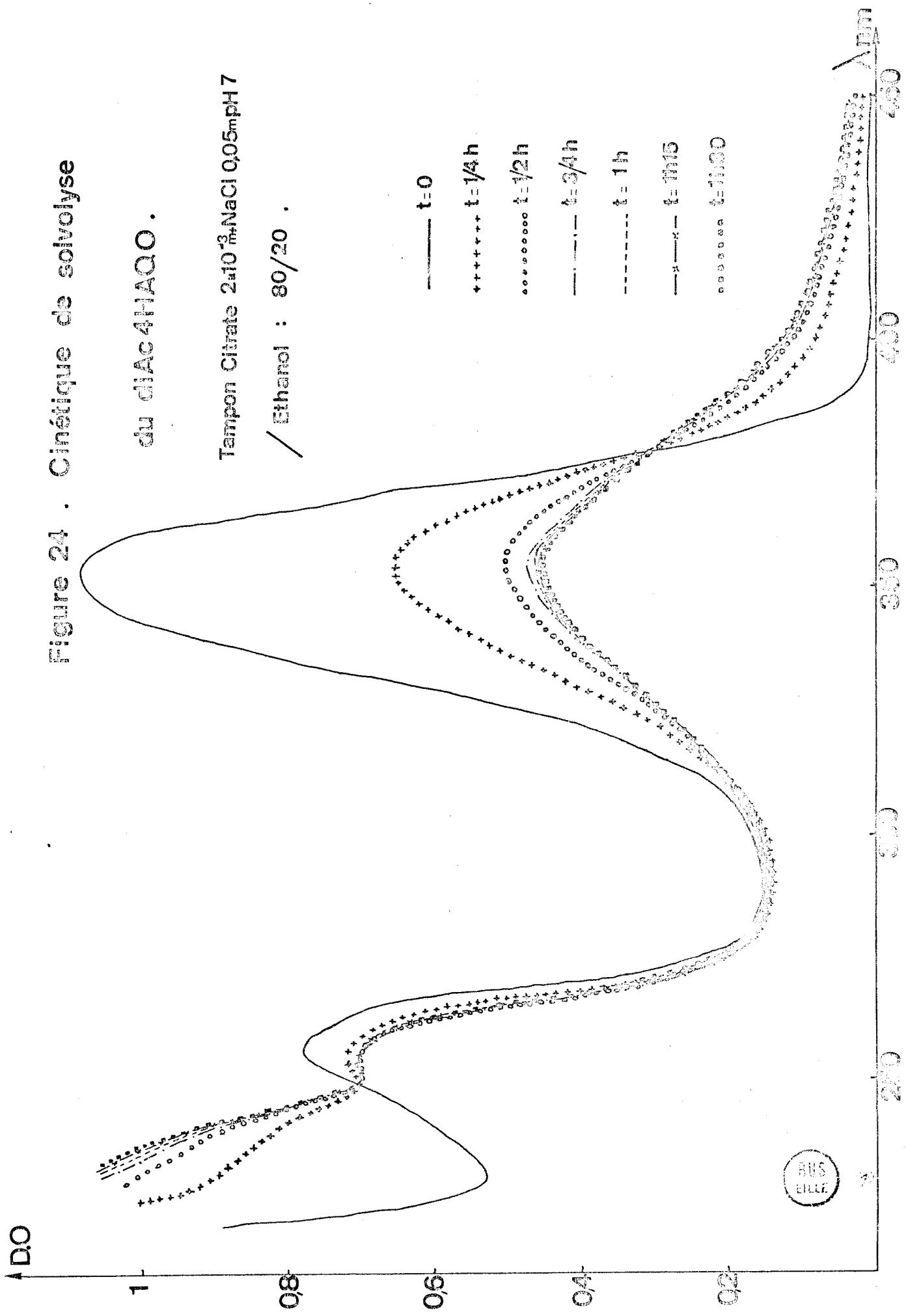
Ces conditions ont été légèrement modifiées pour les manipulations en force ionique élevée. Elles sont réalisées dans un tampon citrate 2×10^{-3} M + 0,05 M NaCl, pH 7 et ceci nous a amenée à modifier le paramètre temps de la réaction DNA-di Ac-4HAQO. Nous avons effectué une cinétique de solvolysse du di Ac-4HAQO dans le tampon 2×10^{-3} M + 0,05 M NaCl, pH 7/ éthanol ; 80/20, de la même manière que nous l'avions fait dans les autres conditions de force ionique. Les résultats de l'analyse spectroscopique sont présentés dans la figure 24. Nous constatons que dans ces conditions de force ionique, la solvolysse est légèrement ralentie, le temps limite étant de 1 heure. Nous avons également tracé la courbe de solvolysse qui est présentée dans la figure 25. Le temps de demi-solvolysse, $t_{1/2}$, est d'environ 10 minutes. Par analogie avec le temps adopté dans le tampon sans NaCl, nous avons incubé ces échantillons pendant 1 h 15. Les autres conditions de préparation de ces solutions sont identiques à celles que nous avons énumérées précédemment.

Figure 24 . Cinétique de solvolysse

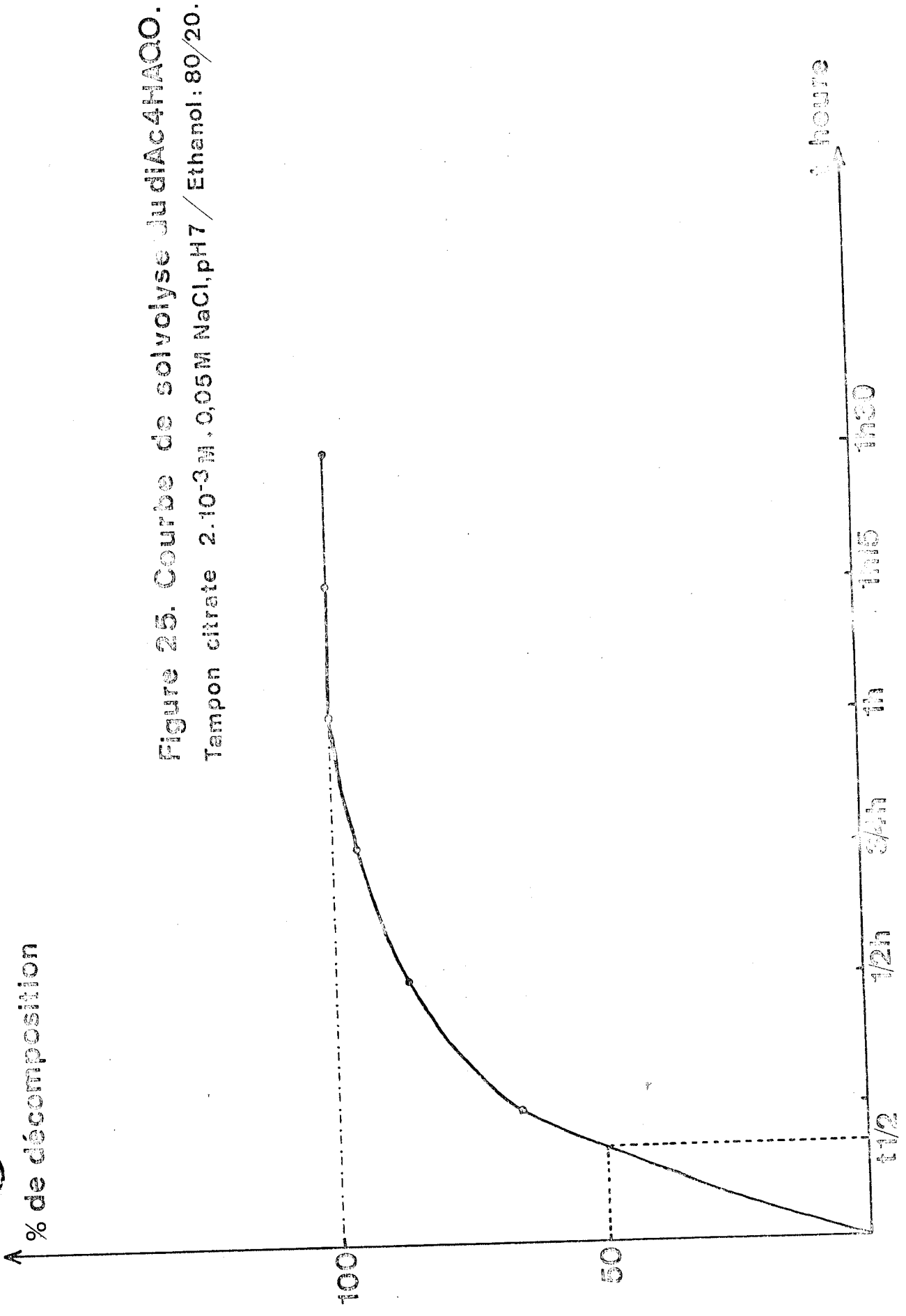
du diAc4HAQO .

Tampon Citrate 2×10^{-3} M NaCl 0,05 M pH 7

/ Ethanol : 80/20 .



BUS
BILIZ



CHAPITRE II - LA COMPARAISON *IN VIVO*-*IN VITRO*.

Dans un travail que nous avons déjà cité, Enomoto *et al* (32) ont étudié l'interaction DNA-di Ac-4HAQO *in vitro*. Ils ont comparé leurs résultats à ceux obtenus *in vivo* par d'autres auteurs (Tada *et al* (160) ; Matsushima *et al* (94)) après traitement de cellules ascitiques par les cancérogènes précurseurs et extraction du DNA transformé. Ils ont utilisé la fluorescence comme méthode de caractérisation de leurs DNA. Malgré son intérêt, le travail d'Enomoto *et al* comporte, nous semble-t-il, quelques faiblesses. En particulier :

- la comparaison *in vivo-in vitro* est faite sur des DNA d'origines différentes ;
- les études spectroscopiques qui ont servi à faire cette comparaison ne sont pas décrites avec précision ;
- enfin, l'appareillage permettant l'étude de la fluorescence a été suffisamment amélioré ces dix dernières années pour espérer réaliser, à ce jour, une étude plus fine.

Nous avons repris cette étude comparative *in vivo-in vitro* en prenant, dans les deux cas, un DNA extrait de cellules ascitiques.

I. Etude *in vivo*.

Après extraction, le DNA est mis en solution dans le tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7. La concentration des solutions est de 1 mg/ml.

Les spectres d'émission de fluorescence de cinq échantillons différents ont été enregistrés :

- DNA extrait des cellules après traitement au 4NQO pendant 1 heure ;
- DNA extrait des cellules après traitement au 4NQO pendant 2 heures ;

- DNA extrait après traitement au 4HAQO, pendant 2 heures
- DNA témoin extrait de cellules non traitées.

Ces spectres sont présentés dans les figures 26 et 27, pour le 4NQO et le 4HAQO respectivement. Le signal de fluorescence est très faible, surtout pour les échantillons de DNA obtenus après traitement au 4NQO (Fig. 26). Nous avons dû pousser pratiquement à fond la sensibilité de l'appareil, ce qui explique le bruit de fond observé.

Les spectres des deux DNA témoins nous montrent que le DNA seul n'est pas fluorescent quand on l'excite à 350 nm, ce qui est logique puisqu'il n'absorbe pas à cette longueur d'onde. La bande fine que nous observons à 400 nm est due à la raie Raman de l'eau du milieu.

Dans les deux cas, nous observons une bande d'émission principale dont le maximum est à 465 nm. Ceci signifie que le 4NQO et le 4HAQO, après activation métabolique *in vivo*, ont donné une forme ultime qui s'est fixée au DNA de façon covalente, puisque nous retrouvons ce produit sur la macromolécule après extraction du DNA, la méthode comportant plusieurs précipitations à l'éthanol. Nos résultats sont donc en accord avec ceux de Tada *et al* (160) et Matsushima *et al* (94) qui ont obtenu une bande de fluorescence dont le maximum est à 465 nm.

Dans le cas du DNA extrait après traitement des cellules au 4HAQO, nous pouvons noter la présence d'épaulements à 475 nm, 485 nm et 495 nm (Fig. 27). Les épaulements à 475 nm et à 495 nm sont également visibles sur le spectre du DNA extrait après traitement au 4NQO, pendant 2 heures (Fig. 26).

Les spectres ont été effectués à une même sensibilité de l'appareil, mais en position variable (non calibrée). Il nous a donc été impossible de faire une comparaison quantitative précise. Nous pouvons seulement constater, pour chacun des deux cancérogènes, que la quantité de produit fixé de façon covalente est vraisemblablement supérieure pour un temps d'action de 2 heures, la bande d'émission de fluorescence étant alors plus intense qu'après un temps d'action d'une heure.

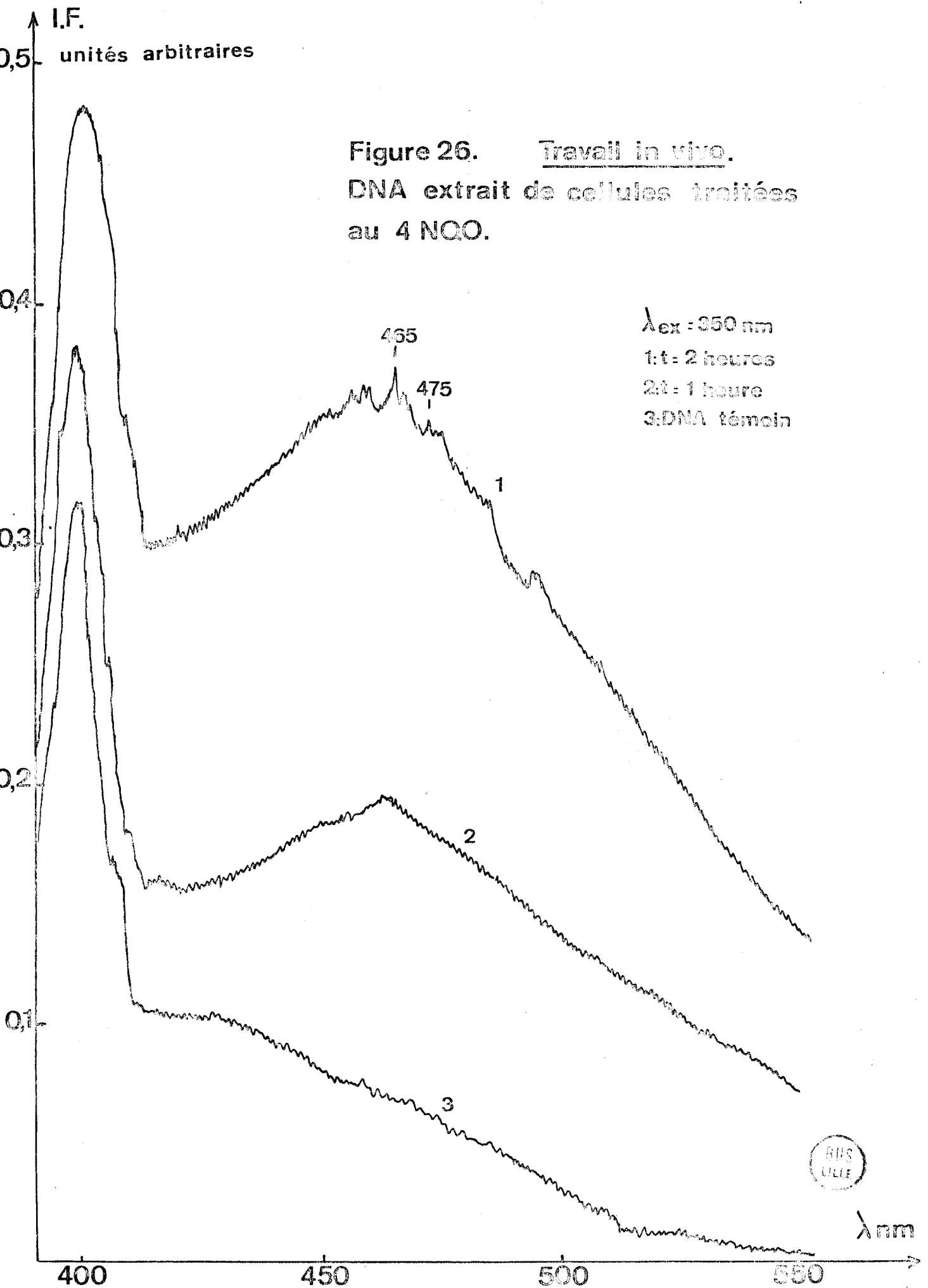
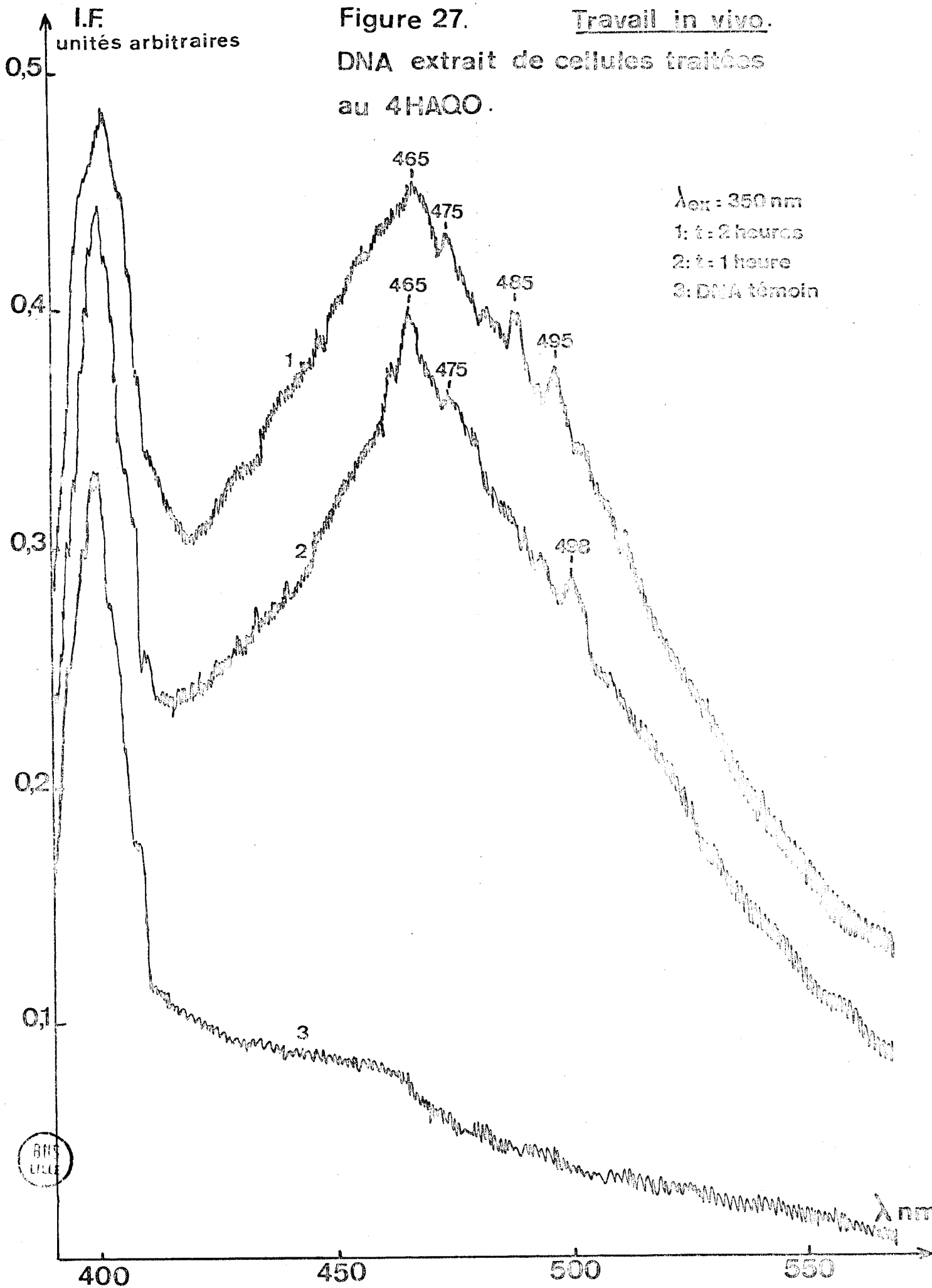


Figure 27. Travail in vivo.
DNA extrait de cellules traitées
au 4HAQO.



II. Etude *in vitro*.

Nous avons utilisé le DNA extrait des cellules non traitées au cancérogène et nous l'avons fait réagir avec le di Ac-4HAQO, selon la méthode que nous avons décrite dans la partie expérimentale, p. 67 à 71.

Nous avons préparé deux échantillons de DNA :
R = 0,2 et R = 0,5.

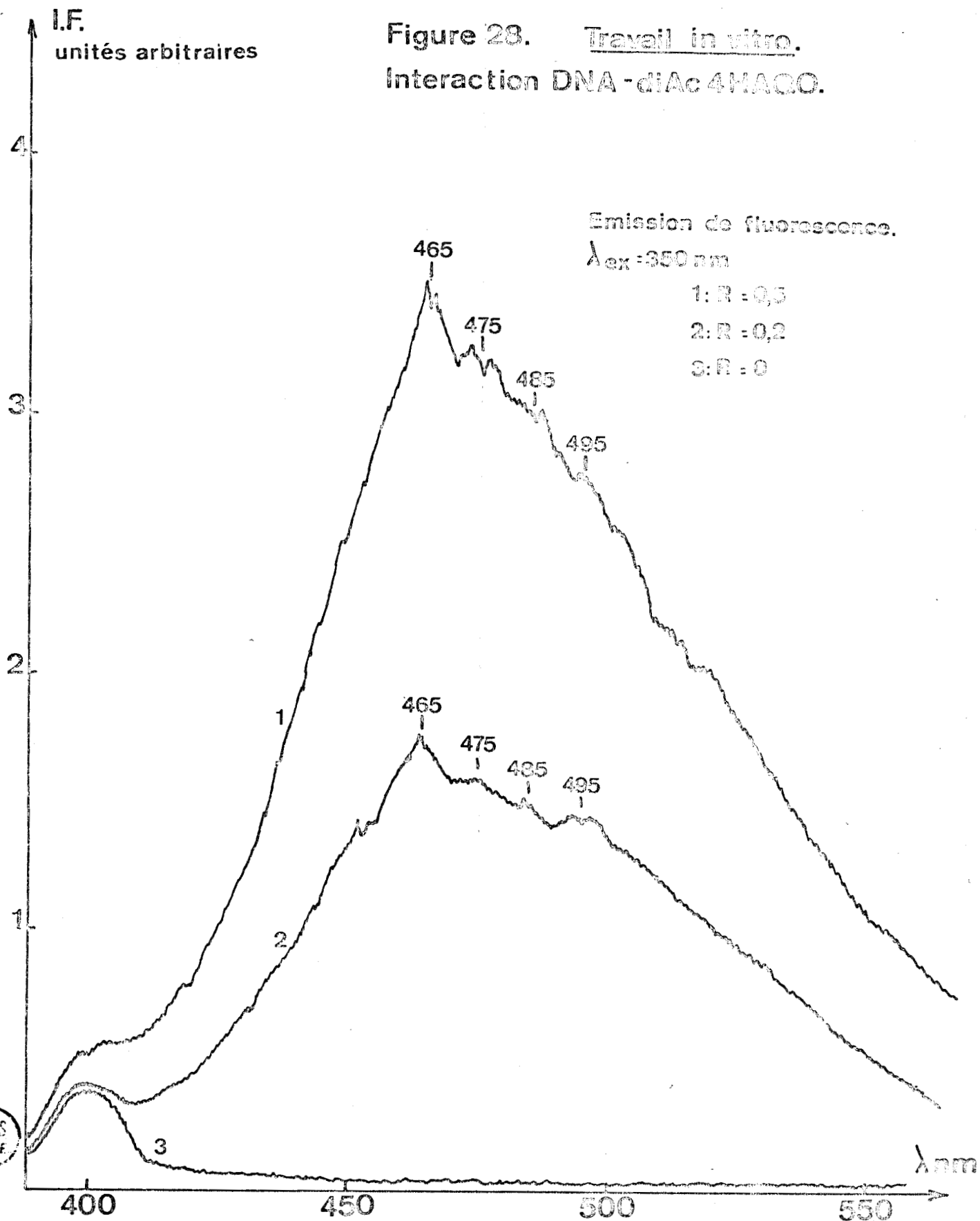
Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés, la longueur d'onde excitatrice étant toujours fixée à 350 nm. Les concentrations en DNA des deux échantillons étaient de 0,26 mg/ml pour R = 0,2 et de 0,3 mg/ml pour R = 0,5. Nous avons pu effectuer l'enregistrement à une sensibilité de l'appareil environ 10 fois plus faible que dans le cas des échantillons *in vivo*. Il semble donc qu'*in vitro* le cancérogène se soit fixé en plus grande quantité sur le DNA. Ces spectres d'émission sont présentés dans la figure 28 : le maximum de la bande est à 465 nm et nous distinguons très nettement des épaulements à 475 nm, 485 nm et 495 nm. La présence de ces épaulements indique qu'il y aurait plusieurs bandes d'émission de fluorescence, la principale étant celle dont le maximum est à 465 nm.

Dans leur étude d'interaction du di Ac-4HAQO avec le DNA, Enomoto *et al* (32) ont observé un maximum d'émission en fluorescence à 470 nm. Ils n'ont cependant pas montré leurs spectres dans leur publication.

III. Conclusion.

Dans les deux cas, nous avons donc obtenu des spectres de fluorescence dont les bandes sont situées aux mêmes longueurs d'onde. La seule différence réside dans l'intensité des bandes qui est beaucoup plus faible *in vivo*. Il semble logique d'attribuer cette différence à une fixation plus faible du cancérogène *in vivo*, les réactions étant toujours très peu marquées dans ce cas, ce que nous avons signalé dans la partie "Généralités", p. 18.

Figure 28. Travail in vitro.
Interaction DNA - diAc 4HACO.



La similitude des spectres de fluorescence *in vivo* et *in vitro* ne signifie cependant pas forcément que les produits base-cancérogène soient identiques dans les deux cas. Autrement dit, pour pouvoir conclure si oui ou non le di Ac-4HAQO peut représenter l'une des formes ultimes du 4HAQO *in vivo*, il faut avoir comparé les produits d'addition obtenus dans les deux cas, après hydrolyse des DNA transformés et chromatographie des hydrolysats (voir Discussion sur le métabolite ultime, p. 59).

Actuellement, nous n'avons pas encore pu réaliser ce travail. En effet, ceci nécessite une méthode de séparation très fine après hydrolyse des DNA, ainsi qu'un moyen de détection très précis du cancérogène fixé.

Nous disposons depuis peu au laboratoire d'un appareil de chromatographie liquide haute pression qui nous permettra d'effectuer une bonne séparation après hydrolyse. Quant au repérage des produits d'addition, il ne sera fait précisément que si on a introduit un marquage radioactif sur le noyau quinoléique des différents cancérogènes utilisés : le 4NQO, le 4HAQO *in vivo* et le di Ac-4HAQO *in vitro*. Les auteurs qui ont réalisé une telle étude ont d'ailleurs toujours utilisé cette technique de marquage (62, 162, 161).

L'obtention de 4NQO marqué sur le noyau quinoléique nous a été impossible jusqu'à présent. Nous disposerons cependant de ce produit dans un très bref délai ; nous aurons alors le matériel nécessaire pour terminer la comparaison *in vivo-in vitro*.

L'utilisation d'un tel produit nous permettra également de doser avec précision la quantité de cancérogène fixée sur le DNA, *in vivo* d'une part, et *in vitro* d'autre part, en utilisant du di Ac-4HAQO marqué sur le noyau quinoléique.

CHAPITRE III - L'INTERACTION DNA-di Ac 4HAQO IN VITRO.

I. Exploration de la réaction DNA-di Ac-4HAQO.

A) Etude en fonction de la structure secondaire du DNA.

Cette étude a été réalisée en milieu tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7/éthanol 80/20, la réaction étant effectuée sur les DNA natif et dénaturé dont les structures sont, respectivement, en double hélice et monocaténaire.

1) *Le dosage en spectrophotométrie d'absorption : Introduction d'un facteur correctif.*

Les spectres d'absorption de tous les échantillons préparés ont été enregistrés afin de doser le cancérogène fixé sur le DNA, selon la méthode décrite précédemment dans la partie expérimentale (p. 72 à 75).

Les figures 29 et 30 montrent les résultats obtenus pour une série d'échantillons de DNA natif et une série d'échantillons de DNA dénaturé, respectivement.

La première constatation est que le maximum de la bande due au cancérogène fixé est situé à environ 350 nm pour le DNA natif, alors qu'il est observé à 360 nm pour le DNA dénaturé.

Nous pouvons également constater que l'intensité des bandes du cancérogène est beaucoup plus grande dans le cas du DNA dénaturé. Il semble donc que la quantité de produit fixé dans ce cas soit plus importante.

Comme nous l'avons déjà signalé dans la partie expérimentale (Paragraphe V, p. 75), nous ne tenons pas compte, dans nos calculs, de l'effet hypochrome éventuel pouvant exister au niveau du cancérogène à 350 nm, après fixation sur le DNA natif ; c'est-à-dire de la différence des valeurs des ϵ du cancérogène fixé, sur le DNA natif et le DNA dénaturé.

Dans les deux cas, nous avons donc utilisé la valeur du ϵ_{350}

Figure 29.
 Interaction DNA natif - diAc 4 HA00.
 Tampon citrate 2.10⁻³M, pH 7.

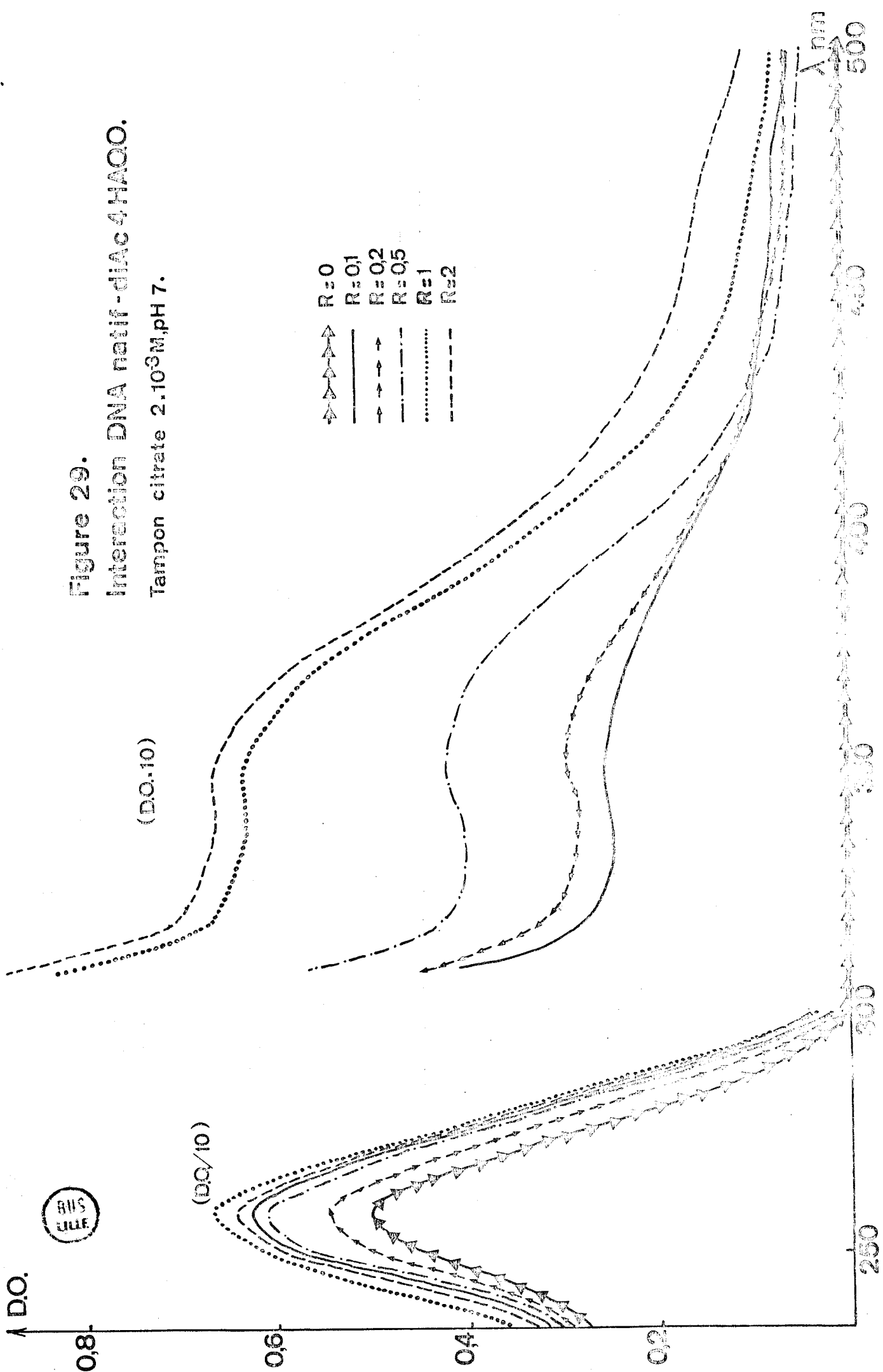
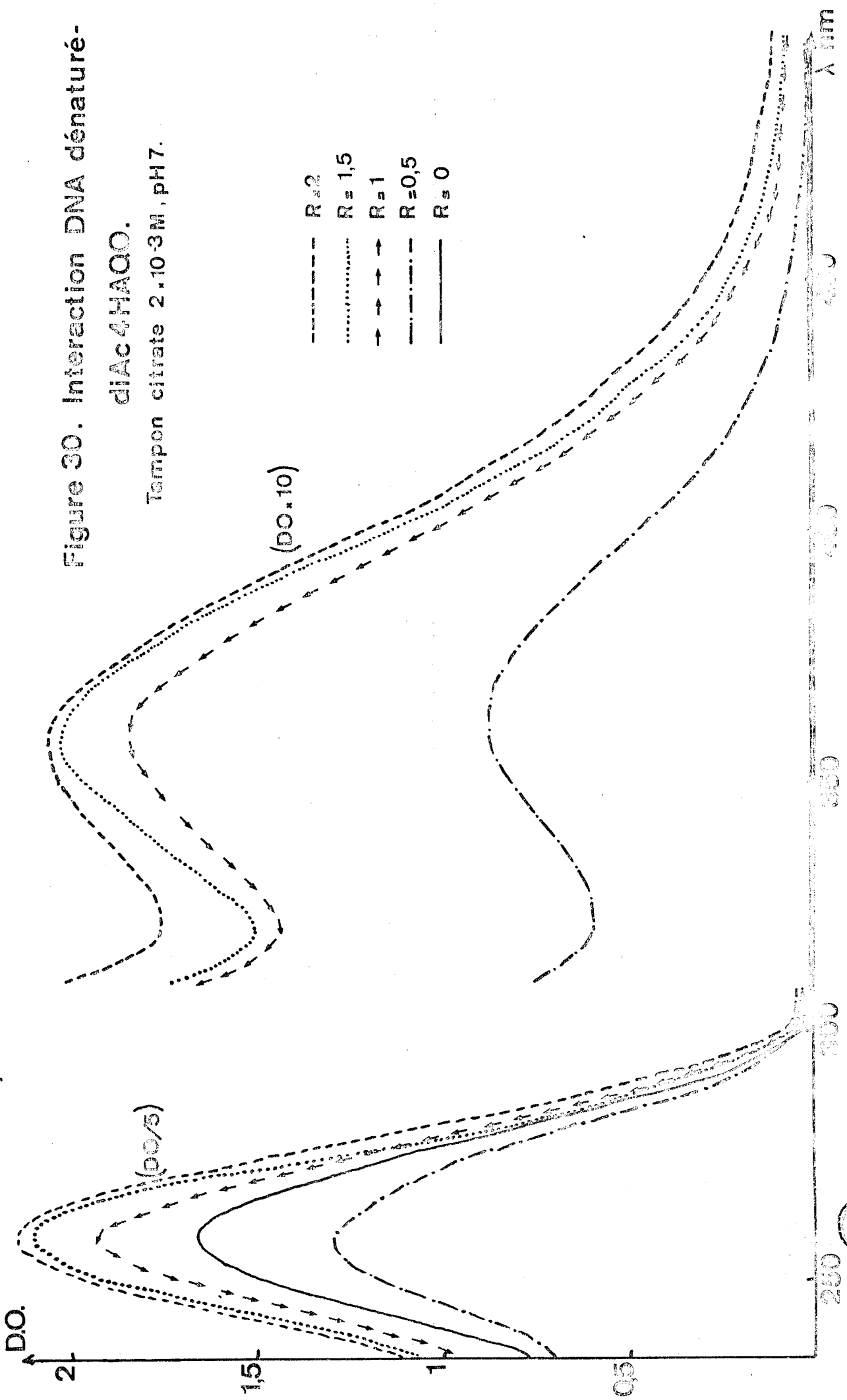


Figure 30. Interaction DNA dénaturé-
diAc 4HAQO.

Tampon citrate 2.10⁻³M, pH7.



- R = 2
- R = 1,5
- - - - - R = 1
- · - · - R = 0,5
- R = 0

qui correspond au maximum de la bande du produit de solvolysé (Fig. 17) : $\epsilon_{350} = 5300 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ et nous avons relevé sur les spectres de DNA transformés les D.O. au maximum de la bande du cancérrogène : 350 nm pour le DNA natif et 360 nm pour le DNA dénaturé.

Si l'on examine dans les figures 29 et 30 la région spectrale de 450 nm à 500 nm, on constate qu'à 500 nm la densité optique n'est pas nulle. Or, le cancérrogène seul n'absorbe pas à cette longueur d'onde : nous avons noté précédemment que la bande obtenue au temps limite de solvolysé prenait naissance à 470 nm (Fig. 17; partie expérimentale, paragraphe IV, C ; p. 69). L'effet est d'ailleurs beaucoup plus marqué dans le cas du DNA natif.

D'autre part, nous observons que la bande d'absorption du cancérrogène fixé est disymétrique, particulièrement dans le cas du DNA natif. Le maximum est alors difficilement repérable avec précision.

Il semble donc qu'une absorbance parasite vienne s'ajouter à celle due au composé fixé, ce qui modifie alors la forme de la bande d'absorption.

Pour essayer d'expliquer la présence de cette absorption parasite, nous avons émis deux hypothèses :

. Cet effet proviendrait de la turbidité des solutions. Ce phénomène de diffusion serait dû à la présence d'aggrégats moléculaires dans le milieu par accolement de molécules de DNA.

. Ce même effet pourrait provenir de la fixation sur le DNA, en très petite quantité, de produits de décomposition du di Ac-4HAQO qui seraient fixés de façon suffisamment stable sur la macromolécule pour ne pas être éliminés lors de la précipitation à l'éthanol. Malgré la purification des échantillons, ces composés "X", inconnus, donneraient alors cette légère absorbance parasite.

Quelle que soit l'origine de cette bande d'absorption parasite, le fait est qu'elle introduit une contribution, particulièrement au maximum de la bande du cancérrogène, ce qui doit introduire une erreur dans la valeur de la D.O. à cette longueur d'onde, l'erreur intervenant ensuite dans le pourcentage

de fixation du cancérogène. Nous avons donc pensé qu'il était nécessaire de corriger la D.O. lue sur les spectres, à 350 nm et à 360 nm, en tenant compte de la contribution de cette bande parasite.

Les calculs ont donc été effectués après mise au point de deux méthodes de correction qui tiennent compte des deux hypothèses émises précédemment.

a) Première hypothèse : la diffusion (correction I).

Selon cette hypothèse, dans la région spectrale extérieure à la bande d'absorption du cancérogène, c'est-à-dire pour des longueurs d'onde supérieures à 470 nm, l'absorbance que nous observons est uniquement due au phénomène de diffusion. La loi physique répondant à ce phénomène peut s'exprimer de la manière suivante :

$$\text{D.O.}_{\lambda}^{\text{diffusion}} = \kappa \times \frac{1}{\lambda^4}$$

κ : constante de diffusion ou de Rayleigh

λ : longueur d'onde

Pour chaque spectre de DNA natif et de DNA dénaturé, les valeurs des densités optiques entre 500 nm et 480 nm nous ont permis de calculer la constante κ qui est donnée par la pente de la droite :

$$\text{D.O.}_{\lambda}^{\text{diffusion}} = f\left(\frac{1}{\lambda^4}\right)$$

Connaissant la valeur de κ , on peut calculer, pour chaque échantillon, la contribution à soustraire à 350 nm et à 360 nm, qui correspondent aux maxima des bandes du cancérogène pour les DNA natif et dénaturé respectivement :

$$\text{D.O.}_{\text{corrigée}} = \text{D.O.}_{\text{lue}} - \frac{\kappa}{(350)^4}$$

$$\text{D.O.}_{\text{corrigée}} = \text{D.O.}_{\text{lue}} - \frac{\kappa}{(360)^4}$$

Nous avons également calculé la contribution à 260 nm, dans la bande du DNA :

$$D.O. \text{ corrigée} = D.O. \text{ lue} - \frac{\kappa}{(260)^4}$$

Nous avons toujours obtenu à cette dernière longueur d'onde une valeur de la correction relativement faible, du fait du facteur d'environ 100 entre l'ordre de grandeur des D.O. dues au DNA et au cancérogène seul.

La figure 31 montre le résultat obtenu après correction totale dans la bande due au cancérogène, pour un échantillon R = 0,5 de DNA natif. Les contributions dues à la diffusion ont été calculées tous les 10 nm.

Sur cette courbe corrigée, on peut faire deux remarques dont la première nous a fait mettre en doute la possibilité de l'intervention d'un phénomène de diffusion :

- la bande du cancérogène obtenue après correction prend naissance à 440 nm au lieu de 470 nm ;

- le maximum de cette bande est déplacé et se trouve à 360 nm au lieu de 350 nm avant correction.

Nous avons également effectué une telle correction sur toute la bande du cancérogène dans le cas du DNA dénaturé pour un échantillon R = 0,5. Le résultat est présenté dans la figure 3. La densité optique à 500 nm, avant correction, étant beaucoup plus faible dans ce cas et l'intensité des bandes plus importante, le phénomène intervient peu.

Nous avons noté que le maximum d'absorption, après correction, était déplacé de 2 nm.

En résumé, nous constatons que la correction intervenant pour le DNA dénaturé est pratiquement négligeable, comparativement à celle intervenant sur le DNA natif.

Les résultats du dosage, en tenant compte de cette première hypothèse, sont donnés ci-dessous :

BIIS
LILLE

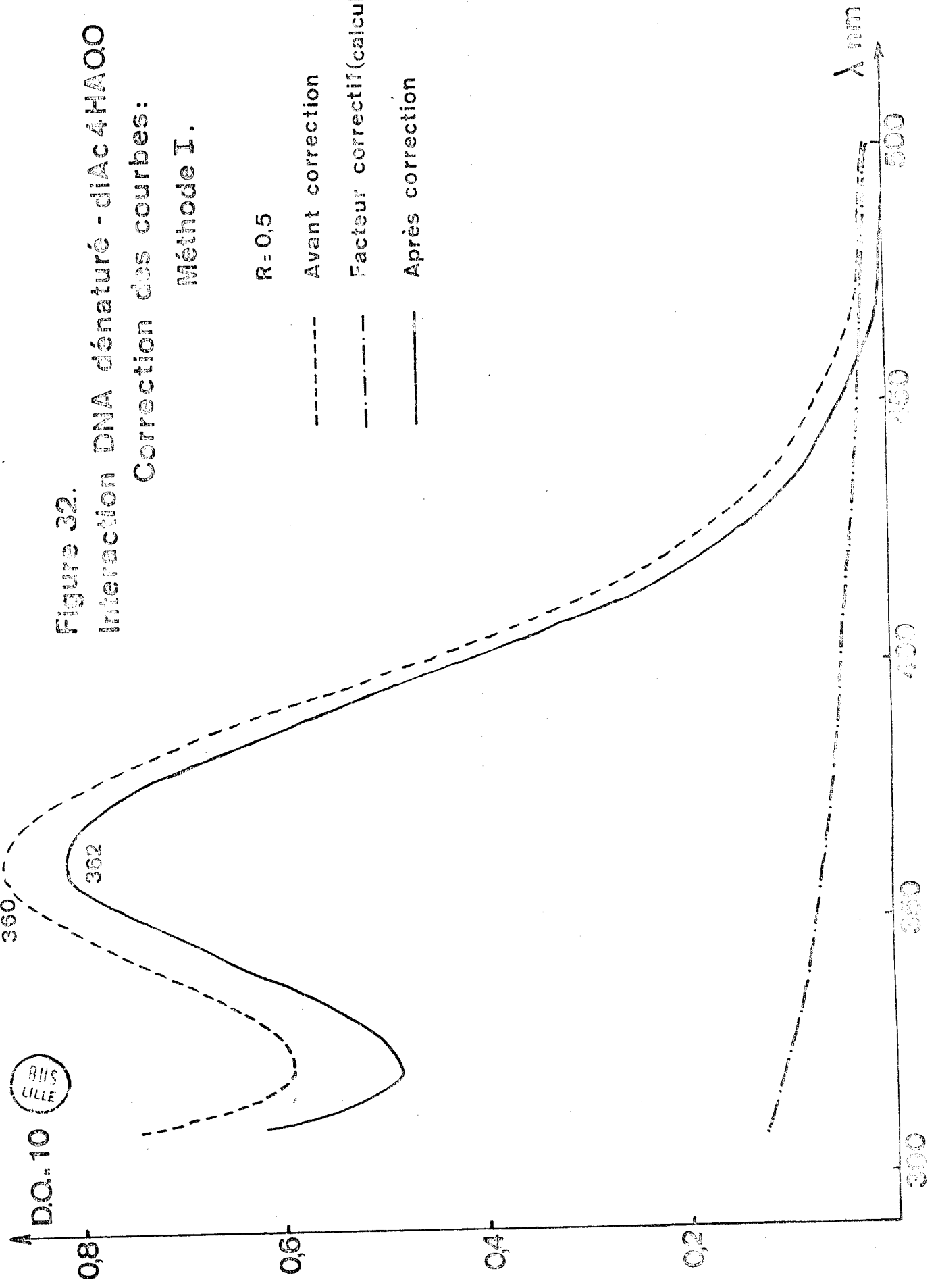


Figure 32.
Interaction DNA dénaturé - diAc4HAQO
Correction des courbes:
Méthode I.

α) Réaction sur le DNA natif

Les pourcentages de fixation pour différents rapports R sont présentés dans le Tableau V :

R	% de fixation
0,1	0,02
0,2	0,16
0,5	0,49
0,5	0,67
0,5	0,17
1	0,65
1	0,78
1	0,49
1	0,8
1,5	0,63
2	non calculable
2	0,43

Nous pouvons constater que nous obtenons des résultats qui ne sont pas reproductibles pour des échantillons de même rapport R de départ. La courbe : % de fixation = $f(R)$ est d'ailleurs impossible à tracer (Fig. 33).

De plus, dans certains cas, le pourcentage de fixation a été impossible à calculer, la soustraction de la contribution "due à la diffusion", à 350 nm, ayant donné une valeur de D.O. négative à 350 nm.

β) Réaction sur le DNA dénaturé.

Les pourcentages de fixation sont donnés dans le Tableau VI, p. 98.

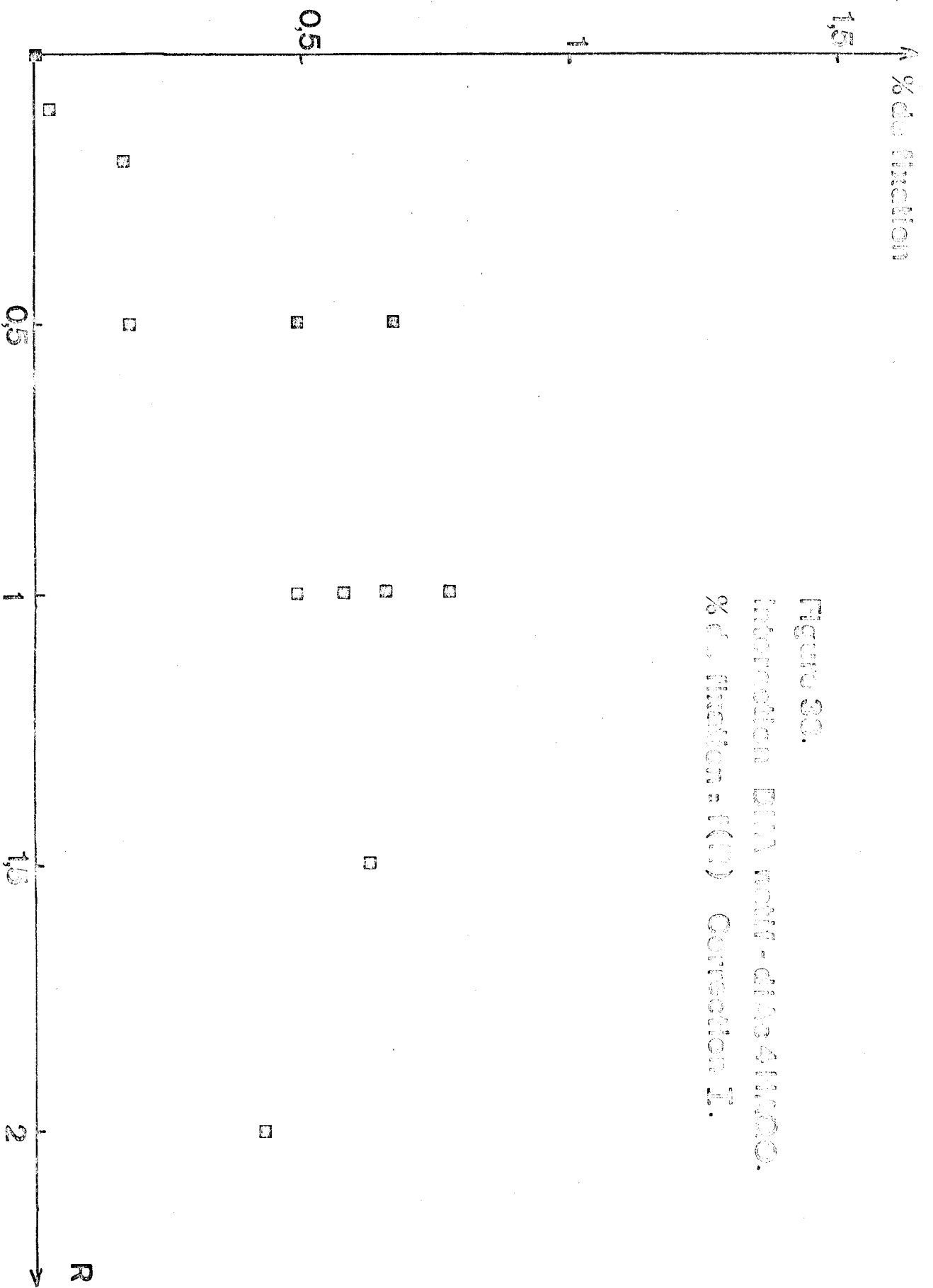


Figure 30.

Information DMV non-division 41/100.

% de fixation = f(R) Correction I.

Tableau VI

R	% de fixation
0,1	0,75
0,2	1,3
0,5	2,2
1	2,8
1	3
1,5	3,1
2	2,8

Dans ce cas (Fig. 34), les mesures se placent à peu près correctement sur une courbe de variation continue, ce qui n'est pas surprenant puisque le terme correctif est très faible.

Comme nous l'avons noté précédemment, les résultats du dosage sur le DNA natif, à l'aide de cette méthode de correction, semblent aberrants. D'autre part, nous avons observé que la valeur de la constante de diffusion κ variait d'une longueur d'onde à une autre dans des proportions non négligeables, et qu'enfin le spectre "différence" obtenu, qui devrait correspondre au cancérogène seul lié sur le DNA, n'est pas le même pour les DNA natif et dénaturé (début d'absorption à 440 nm dans un cas et à 470 nm dans l'autre ; Figs. 31 et 32).

Pour toutes ces raisons, il nous a semblé que cette correction n'était pas valable et nous nous sommes tournée vers la deuxième hypothèse (émise p. 94) dont nous exposons les résultats dans le paragraphe suivant.

b) Deuxième hypothèse : Les produits de dégradation du di Ac-4HAQO (correction II).

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons effectué le test suivant :

BUS
LILLE

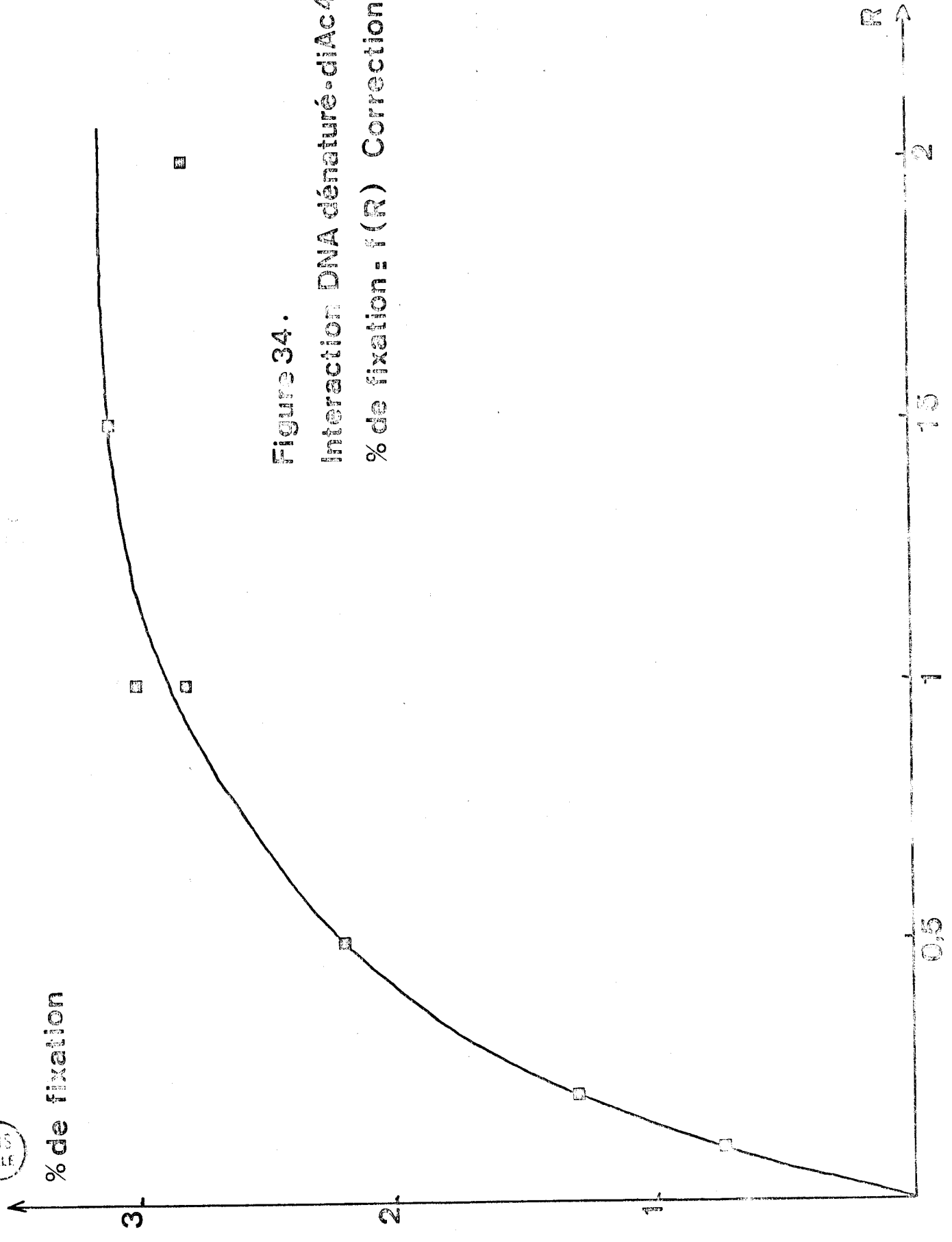


Figure 34.

Interaction DNA dénaturé-diAc4HAQO.

% de fixation = f(R) Correction I.

Nous avons préparé simultanément deux échantillons de DNA R = 1, l'un obtenu dans les conditions normales de réaction et l'autre en utilisant une solution de di Ac-4HAQO déjà totalement hydrolysé après incubation de 3/4 d'heure à 37°C (R = 1 (X)). Dans ce dernier cas, les produits électrophiles réactifs qui, dans les conditions normales, sont susceptibles de se fixer par liaison covalente sur le DNA, sont absents du milieu et ne peuvent plus y être formés.

La manipulation a été effectuée sur le DNA natif, d'une part, et sur le DNA dénaturé, d'autre part. Dans les deux cas, nous avons comparé les spectres d'absorption des échantillons R = 1 préparés dans les conditions normales, avec l'échantillon R = 1 (X). Un témoin R = 0, sans cancérigène, a servi de référence. Les figures 35 et 36 montrent les résultats obtenus, dans la zone spectrale du cancérigène pour le DNA natif et le DNA dénaturé, respectivement.

Le spectre de l'échantillon de DNA natif R = 1 (X) présente une absorbance notable, de 500 nm à 300 nm, qui augmente de façon irrégulière pour devenir assez importante de 380 nm à 300 nm.

BUS
LILLE

Dans le cas du DNA dénaturé, cette absorbance est moins intense. L'allure générale du signal d'absorption est cependant la même que dans le cas du DNA natif.

Nous avons enregistré le spectre de fluorescence de l'échantillon de DNA natif R = 1 (X), la longueur d'onde d'excitation étant fixée à 350 nm et nous avons noté sur ce spectre la présence d'une faible bande d'émission, dont le maximum est situé à environ 510-520 nm (Fig. 37).

L'analyse des échantillons R = 1 (X) nous a donc montré que des produits d'hydrolyse ou de dégradation du di Ac-4HAQO restent fixés sur le DNA après purification. Il se peut que, dans les conditions normales de réaction, ces mêmes composés formés en milieu aqueux viennent se fixer, également de façon covalente, sur la macromolécule, mais en quantité beaucoup plus faible, la réaction prédominante étant toujours la fixation covalente à partir du di Ac-4HAQO.

D.O. $\times 10$

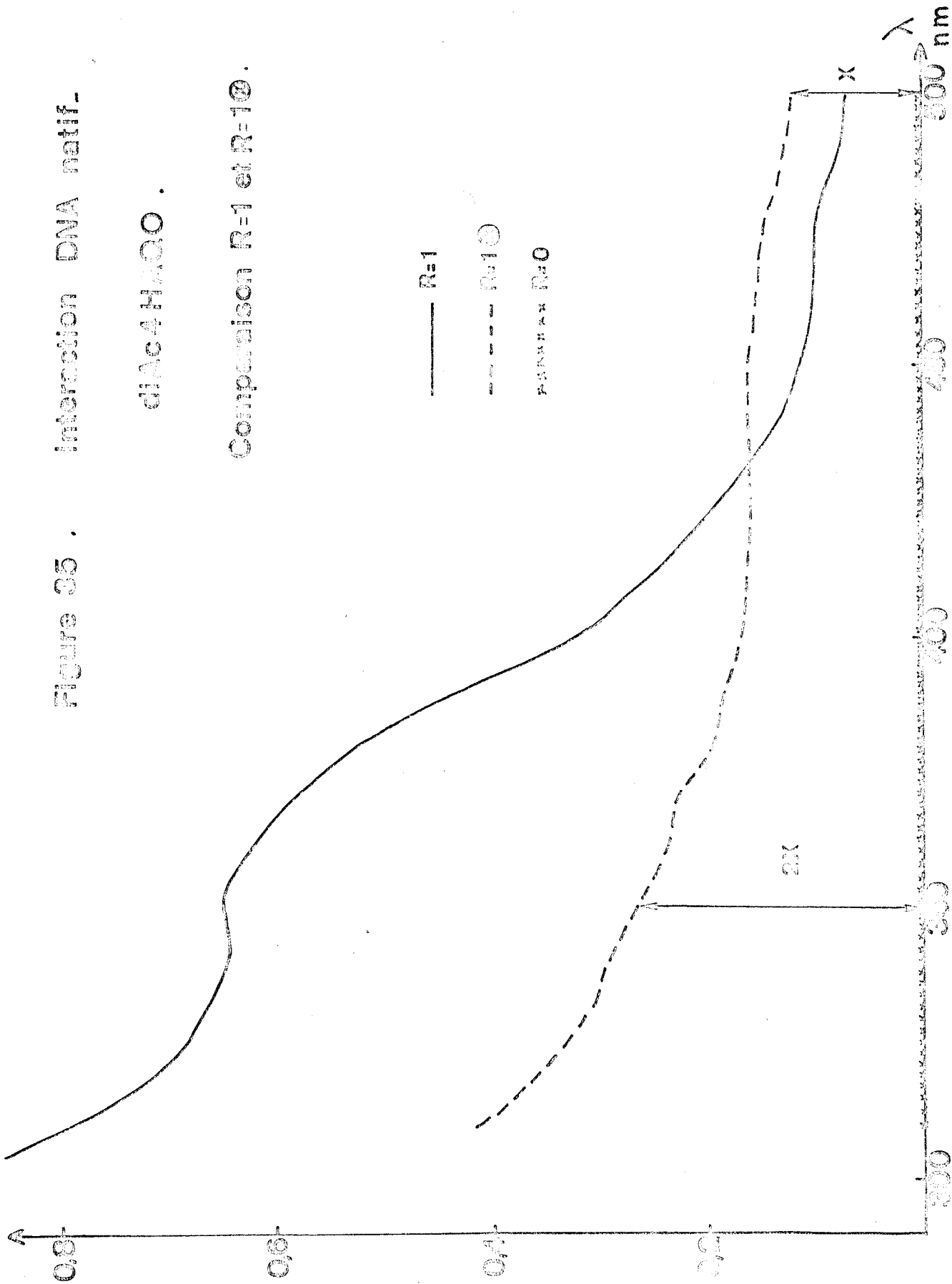


Figure 35 . Interaction DNA natif .

diAc4H₂O₀ .

Comparaison R=1 et R=100 .

D.O.₅

λ

0.0

0.6

0.8

0.9

Figure 36. Interaction DNA dénaturé -
diAc 4HAQO.
comparaison R=1 et R=10.

— R=1

- - - R=10

x x x x R=0

BUS
LILLE

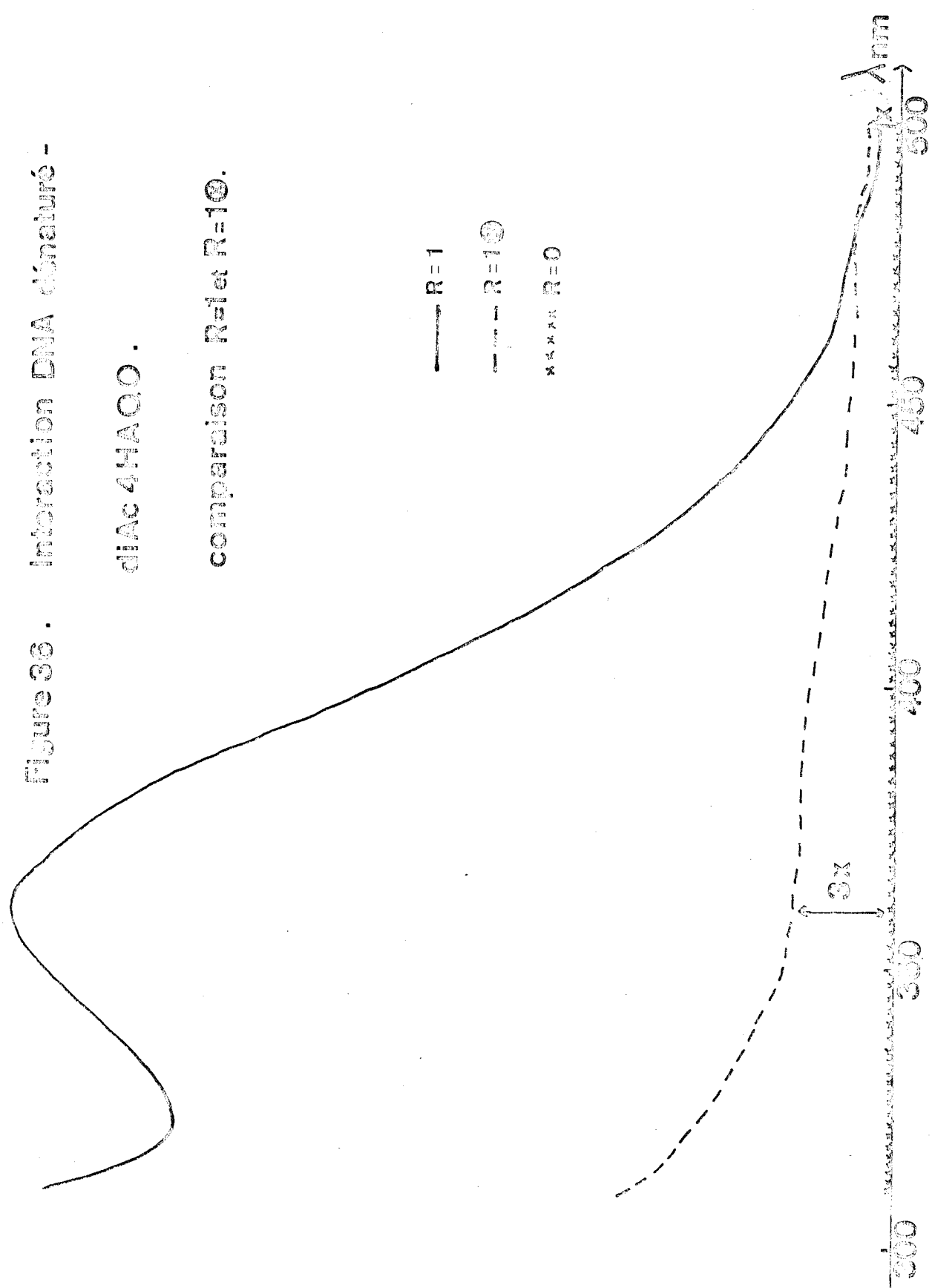
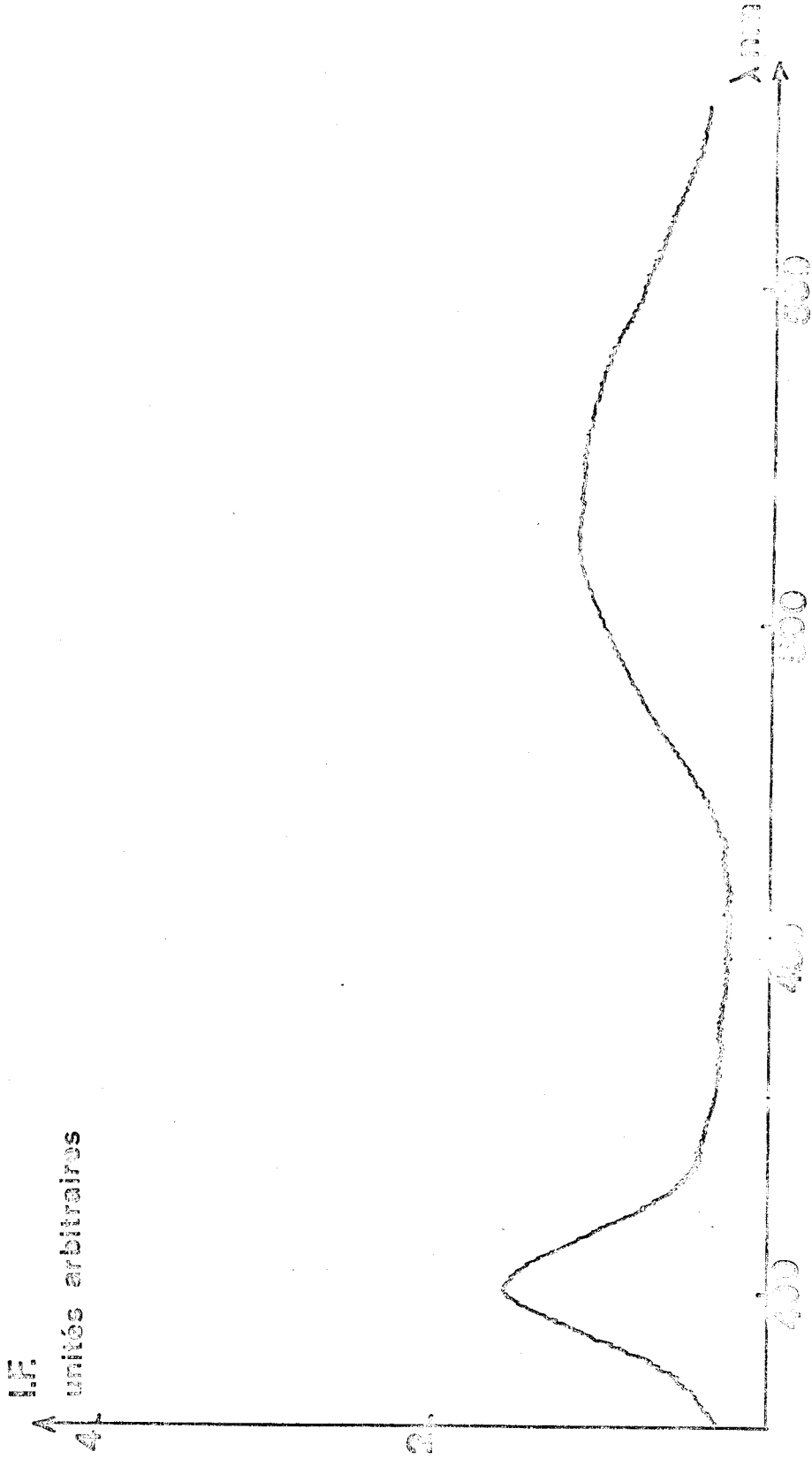


FIGURE 37. DNA R=1 (R).

Emission de fluorescence. $\lambda_{ex} = 350\text{nm}$.



La présence de ces composés peut d'ailleurs être détectée à l'oeil nu sur les précipités de DNA natif (X), qui sont très légèrement colorés.

Comme nous le détaillerons par la suite, nous avons constaté que ces produits "X" ne sont pas déstabilisants. En effet, les échantillons de DNA natif (X) ont la même température de fusion que le témoin R = 0 sans cancérogène.

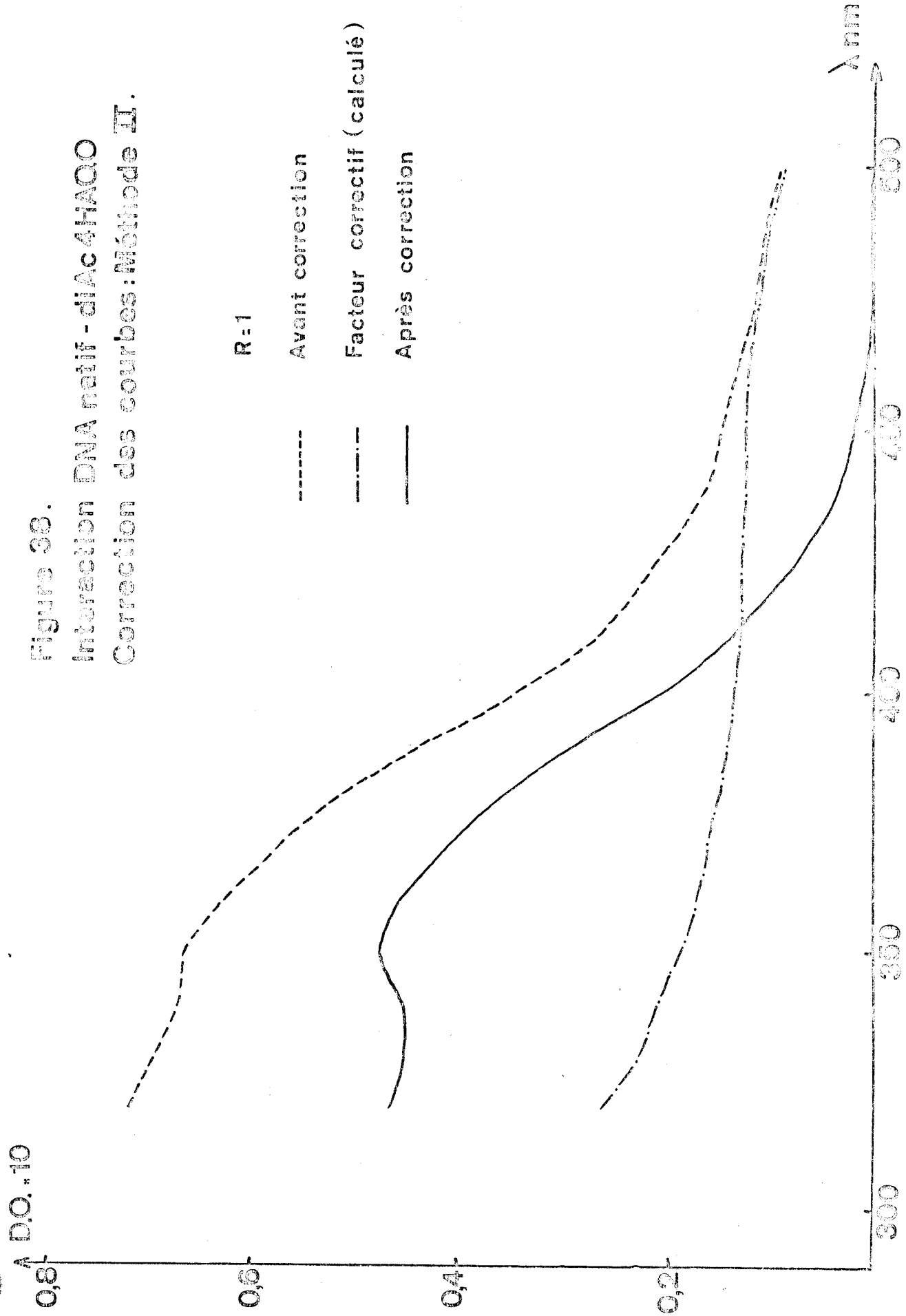
Il nous a paru tentant d'expliquer la déformation de la bande d'absorption du cancérogène par la présence sur le DNA de ces composés de dégradation. La valeur exacte de la contribution à 350 nm et à 360 nm, dans ce cas, est impossible à connaître pour un échantillon donné. Nous avons cependant essayé de l'évaluer, de la façon suivante : Dans le cas du DNA natif, nous avons constaté que la D.O. de l'échantillon R = 1 (X), à 350 nm est environ le double de celle notée à 500 nm (Fig. 35) :

$$\left. \begin{array}{l} x = D.O._{500 \text{ nm}} = 0,012 \\ D.O._{350 \text{ nm}} = 0,027 \end{array} \right\} \frac{D.O._{350}}{D.O._{500}} = 2,2 \approx 2 \rightarrow D.O._{350} \approx 2 x$$

En calculant, à partir du spectre de l'échantillon R = 1 (X), les rapports existant entre la D.O. à 500 nm (x) et la D.O. tous les 10 nm, de 490nm à 300 nm, nous avons pu évaluer approximativement, pour l'échantillon R = 1, la contribution due aux produits "X", à partir de la valeur de x pour cet échantillon. Ces calculs ont été effectués sur deux essais R = 1 (X), le résultat étant le même dans les deux cas.

La courbe corrigée obtenue est présentée dans la figure 38. Nous constatons que le maximum est nettement visible et qu'il est situé à 350 nm. D'autre part, la bande du cancérogène, après correction, prend naissance à 470 nm, en accord avec le spectre du di Ac-4HAQO, au temps limite de solvolysse.

Pour obtenir la D.O. corrigée, à 350 nm, nous soustrayons donc pour chaque échantillon de DNA natif la valeur 2 x, x étant la D.O. à 500 nm.



Nous avons réalisé une correction similaire dans le cas du DNA dénaturé, en utilisant les spectres de plusieurs échantillons R = 1 (X) et R = 2 (X). La figure 39 montre le résultat obtenu pour R = 1. Nous pouvons constater que la correction est peu importante et que le maximum de la bande, après correction, est toujours situé à 360 nm. Dans le cas du DNA dénaturé, nous avons noté sur les échantillons (X), que la D.O. à 360 nm était environ 3 fois supérieure à celle notée à 500 nm (exemple : fig. 36) :

$$\left. \begin{array}{l} y = D.O._{500 \text{ nm}} = 0,006 \\ D.O._{360 \text{ nm}} = 0,019 \end{array} \right\} \frac{D.O._{360}}{D.O._{500}} = 3,1 \approx 3 \rightarrow D.O._{360} \approx 3 y$$

La valeur de la D.O.₃₆₀ que nous employons pour calculer la concentration en cancérogène fixé [C] est donc obtenue en soustrayant, pour chaque échantillon de DNA dénaturé, la valeur 3 y, y étant la D.O. à 500 nm.

Nous sommes consciente du fait que cette correction est très criticable. En effet, nous n'avons aucune preuve chimique pour étayer cette hypothèse, si ce n'est la connaissance de la grande instabilité du di Ac-4HAQO en milieu aqueux. D'autre part, cette correction ne nous permet pas de tenir compte de la contribution des produits "X" à 260 nm, dans le calcul de la concentration en DNA. Cette contribution serait probablement très faible, puisqu'il existe un facteur 100 entre les valeurs des D.O. dans les deux zones spectrales.

Quoiqu'il en soit, la correction doit être effectuée et nous avons calculé les pourcentages de cancérogène fixé sur le DNA en utilisant cette méthode.

2) Résultats du dosage.

a) Réaction sur le DNA natif.

Les résultats des calculs sont présentés dans le Tableau VII, p. 102.

↑ D.O. × 10

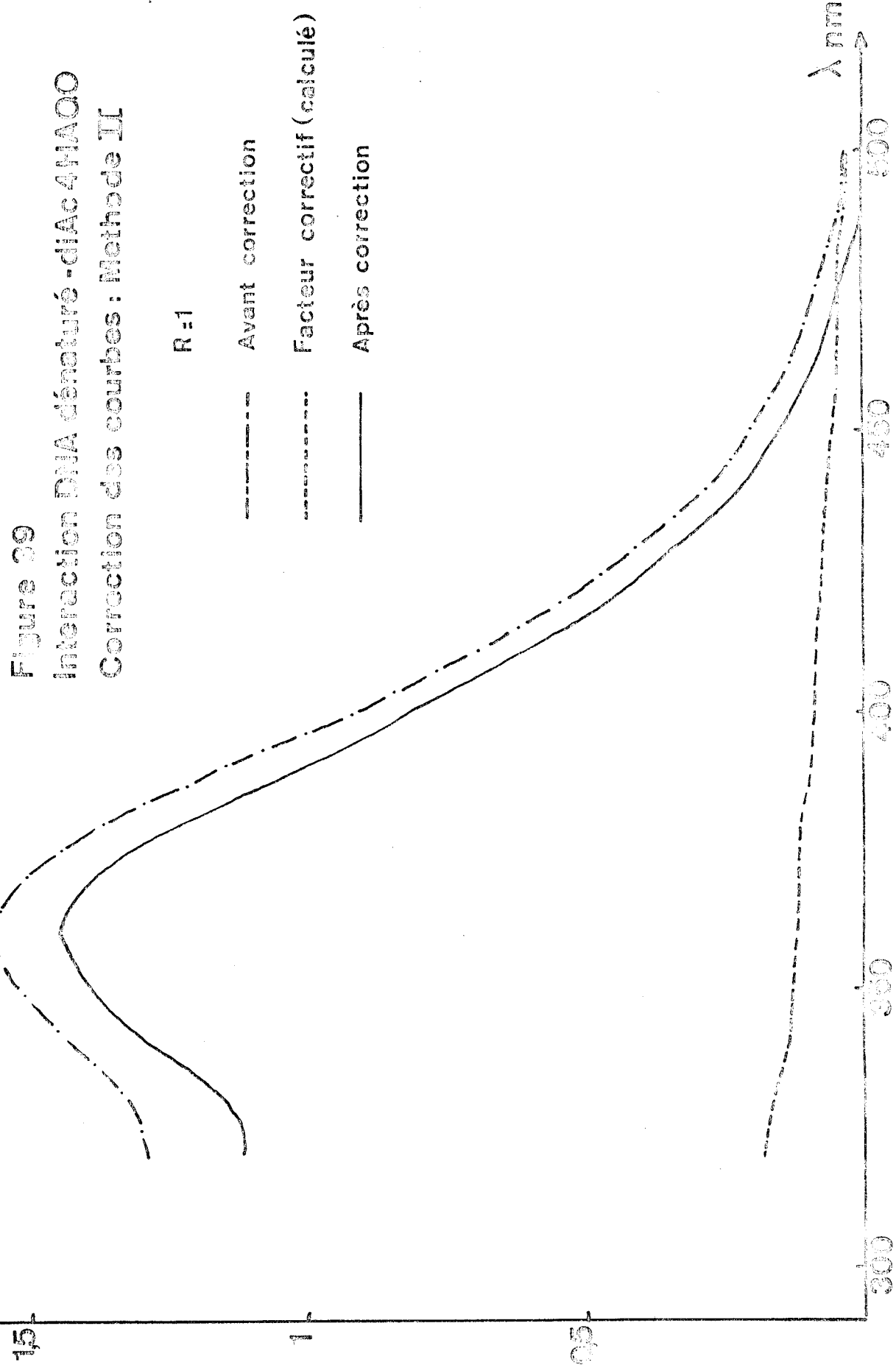


Tableau VII

R	% de fixation
0,1	0,23
0,2	0,43
0,5	0,68
0,5	0,73
0,5	0,65
1	0,93
1	0,88
1	0,80
1	0,88
1	0,89
1,5	0,90
2	0,84
2	0,87

La première constatation est que les résultats obtenus dans ce cas montrent des valeurs beaucoup plus reproductibles, pour des rapports R de départ identiques. D'autre part, ces résultats semblent assez cohérents, les pourcentages de fixation prenant des valeurs régulièrement croissantes au fur et à mesure que R augmente de 0,1 à 1. C'est ce que montre la figure 40, qui donne la courbe : % de fixation = f(R).

Pour des valeurs de R supérieures à 1, un seuil de fixation paraît être atteint. Il semble donc, dans les limites de validité de la méthode de correction, qu'il ne soit pas possible de fixer sur le DNA natif plus de 1 % de cancérigène environ, dans les conditions de préparation employées : Tampon $2 \times 10^{-3} M$, pH 7/EtOH 80/20, temps de réaction $t = 3/4$ d'heure, température $\theta = 37^{\circ}C$, concentration de DNA au départ : 0,5 mg/ml.

Nous avons tracé la courbe d'étalonnage :

$$\frac{D.O._{350}}{D.O._{260}} \times 10^3 = f(\% \text{ de fixation})$$

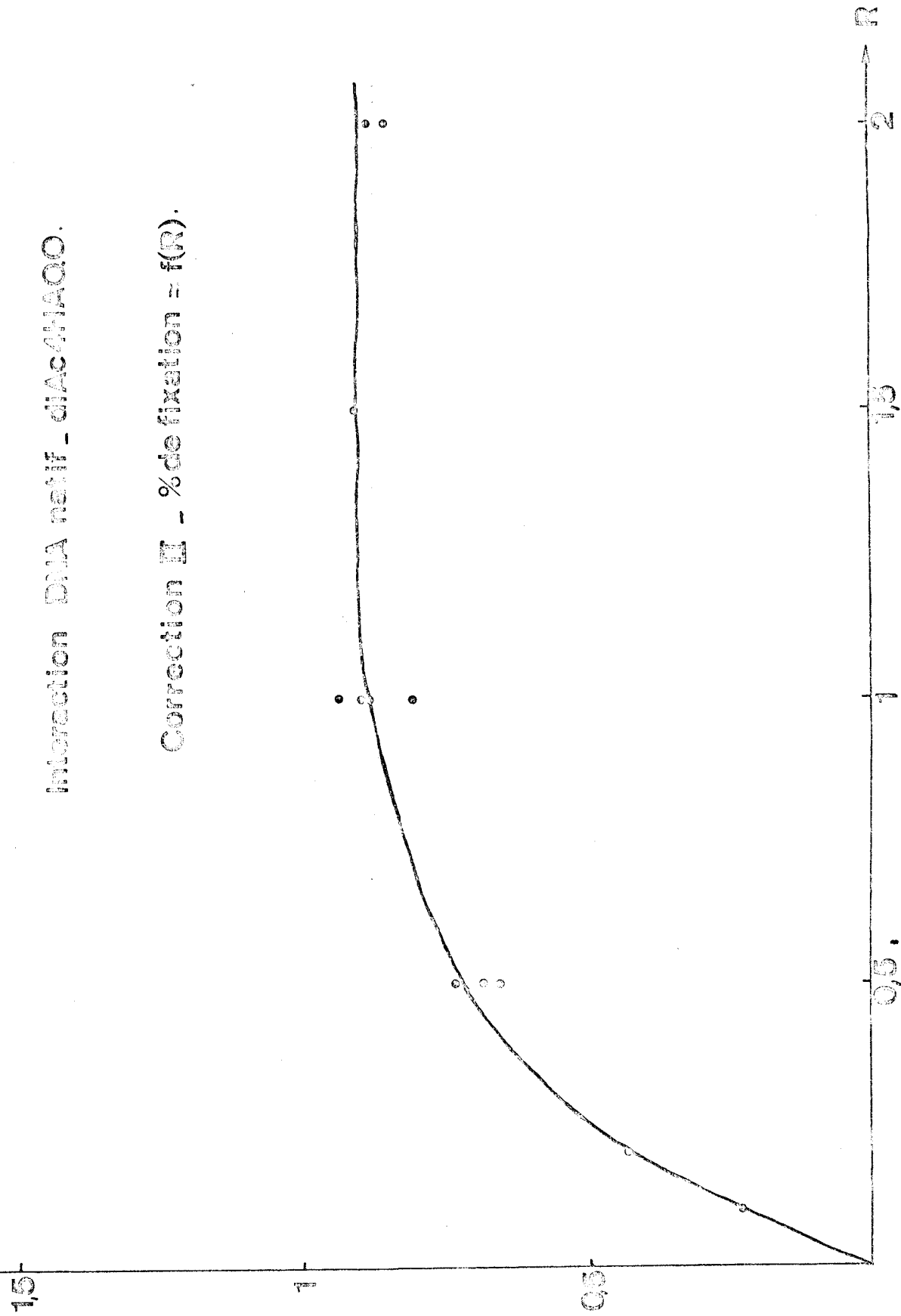
qui permet la détermination spectrophotométrique du pourcentage de fixation du cancérigène sur le DNA natif, connaissant les valeurs des D.O. à 350 nm

% de fixation

Figure 40 .

Interaction DNA natif - diAcNHAcO.

Correction II - %de fixation = f(R).



et à 260 nm. Cette courbe est présentée dans la figure 41.

Malgré l'imprécision du dosage effectué, nous pouvons tout de même constater que le taux de fixation du cancérogène sur le DNA natif est faible, la valeur maximale atteinte étant d'environ 1 %. Un si faible taux d'addition peut avoir deux origines : l'une chimique, liée à la grande réactivité du di Ac-4HAQO en milieu aqueux, l'autre stérique ; dans ce cas, certains sites réactionnels seraient situés à l'intérieur de la double hélice et par conséquent difficilement accessibles au cancérogène. La comparaison avec les résultats obtenus par réaction sur le DNA dénaturé nous donnera un premier élément de réponse, ce que nous allons voir maintenant.

b) Réaction sur le DNA dénaturé.

Dans le Tableau VIII ci-dessous, nous donnons les résultats obtenus dans ce cas :

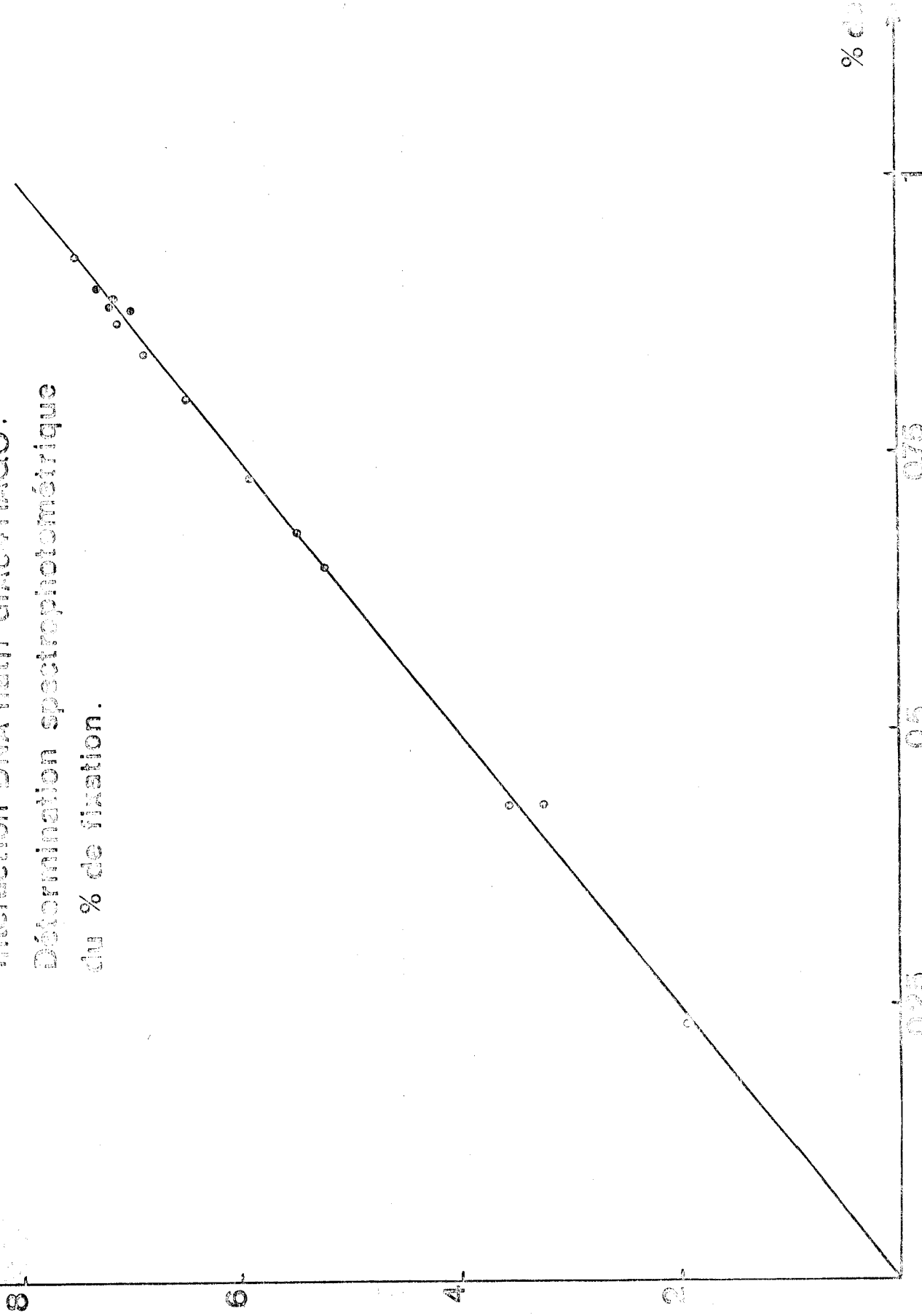
R	% de fixation
0,1	0,80
0,2	1,40
0,5	2,10
1	2,80
1	2,95
1,5	3,20
2	3,10

Comme nous l'indique le tableau, la réactivité du cancérogène sur le DNA dénaturé est supérieure à celle sur le DNA natif. Le taux de fixation est environ 3 fois plus important sur le DNA simple chaîne.

La courbe présentée sur la figure 42 nous montre qu'un seuil de fixation est atteint, de la même manière que pour le DNA natif, pour des valeurs de R supérieures à 1. La valeur

$\frac{DO_{350} \cdot 10^3}{A_{DO_{260}}}$

Figure 41.
Interaction DNA reif-diacHAcO.
Détermination spectrophotométrique
du % de fixation.



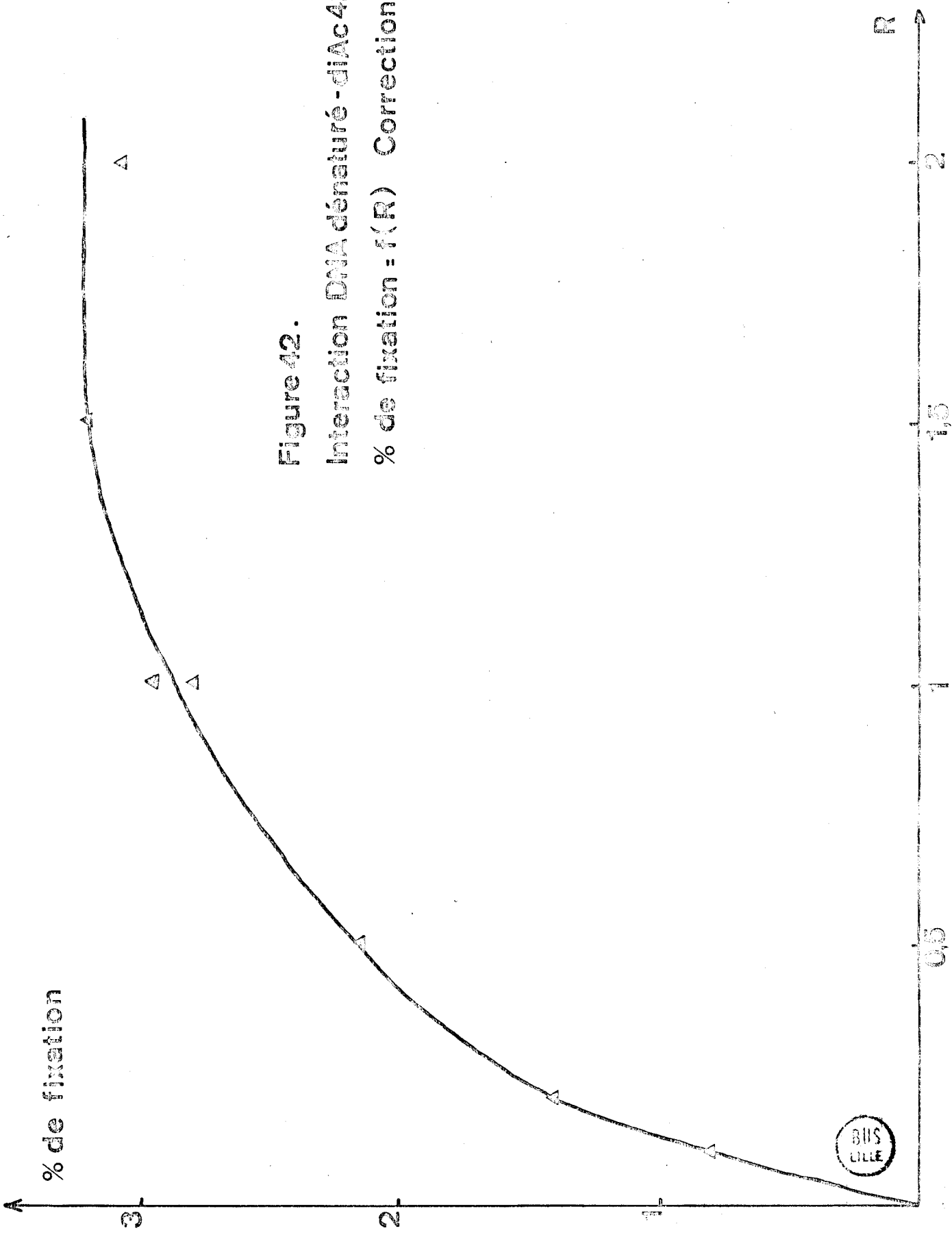


Figure 42.

Interaction DNA dénaturé - diAc4HAQO.

% de fixation = f(R) Correction II.



maximale du taux de fixation est d'environ 3 %.

Nous avons également tracé la courbe de détermination spectrophotométrique :
$$\frac{D.O.360}{D.O.260} \times 10^3 = f \text{ (\% de fixation)}$$
. Cette courbe est donnée dans la figure 43.

3) Discussion.

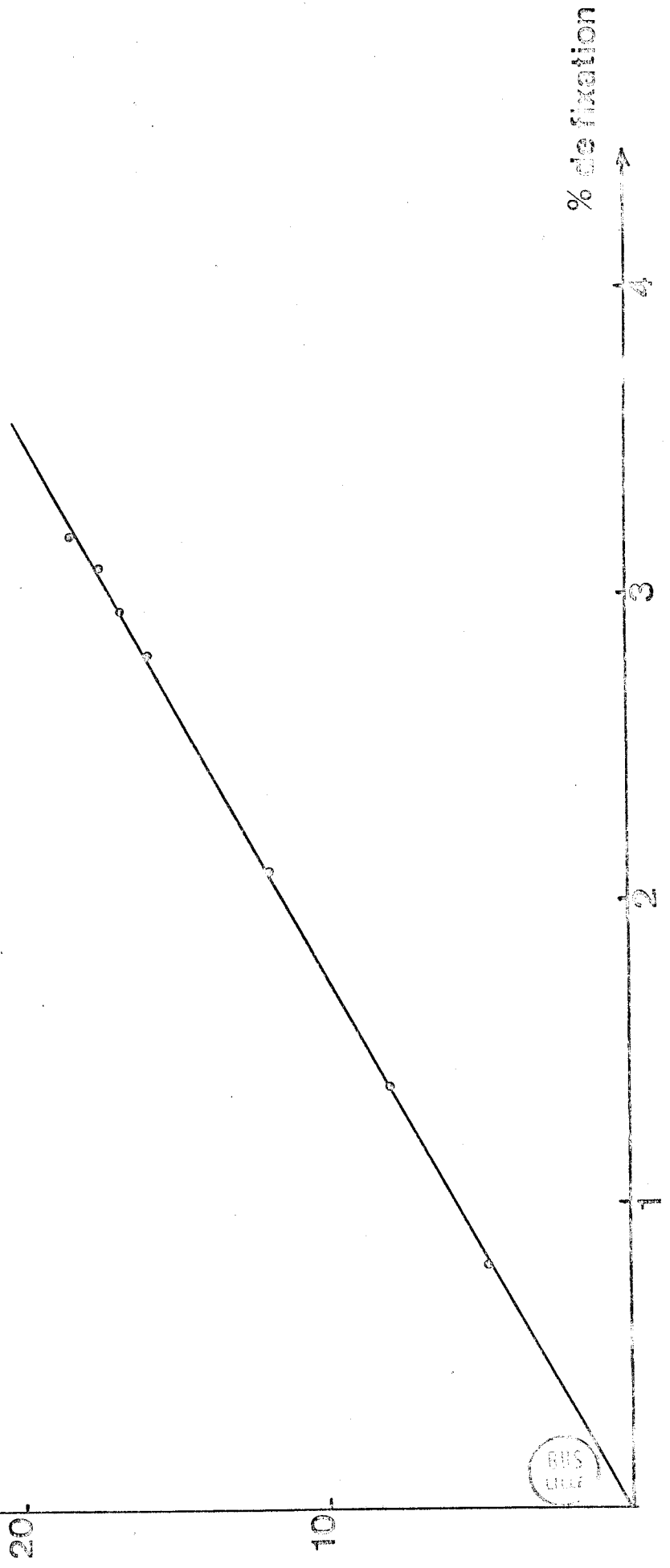
La comparaison entre les réactions sur le DNA natif et le DNA dénaturé nous a montré l'existence d'un seuil de fixation du cancérogène, dans les deux cas. Puisque dans le cas du DNA dénaturé la correction que nous effectuons est pratiquement négligeable, le seuil que nous observons également pour le DNA natif n'est donc pas un artefact dû à la méthode de dosage, c'est-à-dire à la correction. Il semble donc que dans les conditions de réaction employées, la fixation du cancérogène atteigne rapidement un taux limite, qui ne correspond probablement pas à une saturation des sites réactionnels. Au contraire, ce phénomène serait plutôt dû à la grande instabilité du di Ac-4HAQO en milieu aqueux : la réaction d'hydrolyse du cancérogène vient concurrencer la réaction de fixation sur la macromolécule.

Cette étude nous indique donc que la réactivité du di Ac-4HAQO sur le DNA dépend de sa structure secondaire.

Puisque la réaction est favorisée sur le DNA dénaturé, on peut penser que tous ou une grande partie des sites de fixation du cancérogène seraient situés à l'intérieur de la double hélice, c'est-à-dire qu'ils ne seraient accessibles par aucune des deux gorges du DNA natif. La réaction ne serait alors rendue possible, en ces sites, que par les phénomènes de "respiration", qui en provoquant l'apparition de régions transitoirement ouvertes, dégageraient ces atomes.

$\frac{D.O. 360}{D.O. 260} \cdot 10^3$

Figure 43.
Interaction DNA dénaturé-diac 4HAQO.
Détermination spectrophotométrique du
% de fixation.



Sur le DNA monocaténaire, ces sites réactionnels seraient alors totalement démasqués et l'effet stérique serait levé. Du fait de ce démasquage de certains sites, et donc de la présence sur la macromolécule d'une quantité de produits supplémentaires qui pourraient interagir de façon différente avec les bases, on peut s'expliquer le déplacement du maximum de la bande du cancérogène, de 350 nm à 360 nm.

Nous ne pouvons malheureusement pas interpréter avec beaucoup plus de précision nos résultats, les sites de fixation de ce cancérogène sur les bases étant encore mal connus.

Des auteurs japonais (164, 162) ont identifié quatre produits, après action des cancérogènes précurseurs *in vivo* : 3 composés d'addition sur la guanine et un produit sur l'adénine. Cependant, les atomes impliqués dans ces interactions n'ont pas été déterminés. Kawazoe *et al* (71) ont seulement proposé, pour le produit sur l'adénine, deux structures différentes : le cancérogène serait fixé soit sur le N-1, soit sur le 6-NH₂ de cette base. Ces atomes sont accessibles par les gorges du DNA dans la structure en double hélice. Ces sites ne sont donc pas masqués sur le DNA natif.

Ceci n'est pas en contradiction avec nos résultats, car l'adénine ne représente pas la seule cible de l'interaction sur le DNA. En effet, la guanine serait également impliquée et il n'est pas impossible de penser, à partir de résultats concernant d'autres cancérogènes, que le C-8 et le 2-NH₂ de cette base soient concernés. Le C-8, qui se trouve à l'intérieur de la double hélice, serait donc démasqué sur le DNA dénaturé, ce qui expliquerait cette augmentation de la réactivité que nous avons observée dans le cas du di Ac-4HAQO.

Nous avons enregistré les spectres de fluorescence des échantillons de DNA natif et de DNA dénaturé. Ces spectres sont présentés dans les figures 44 et 45, respectivement. Les résultats obtenus ne sont pas en contradiction avec notre hypothèse.

5 I.F.
unités arbitraires

Figure 44. Interaction DNA natif-
diAc4HAQO.

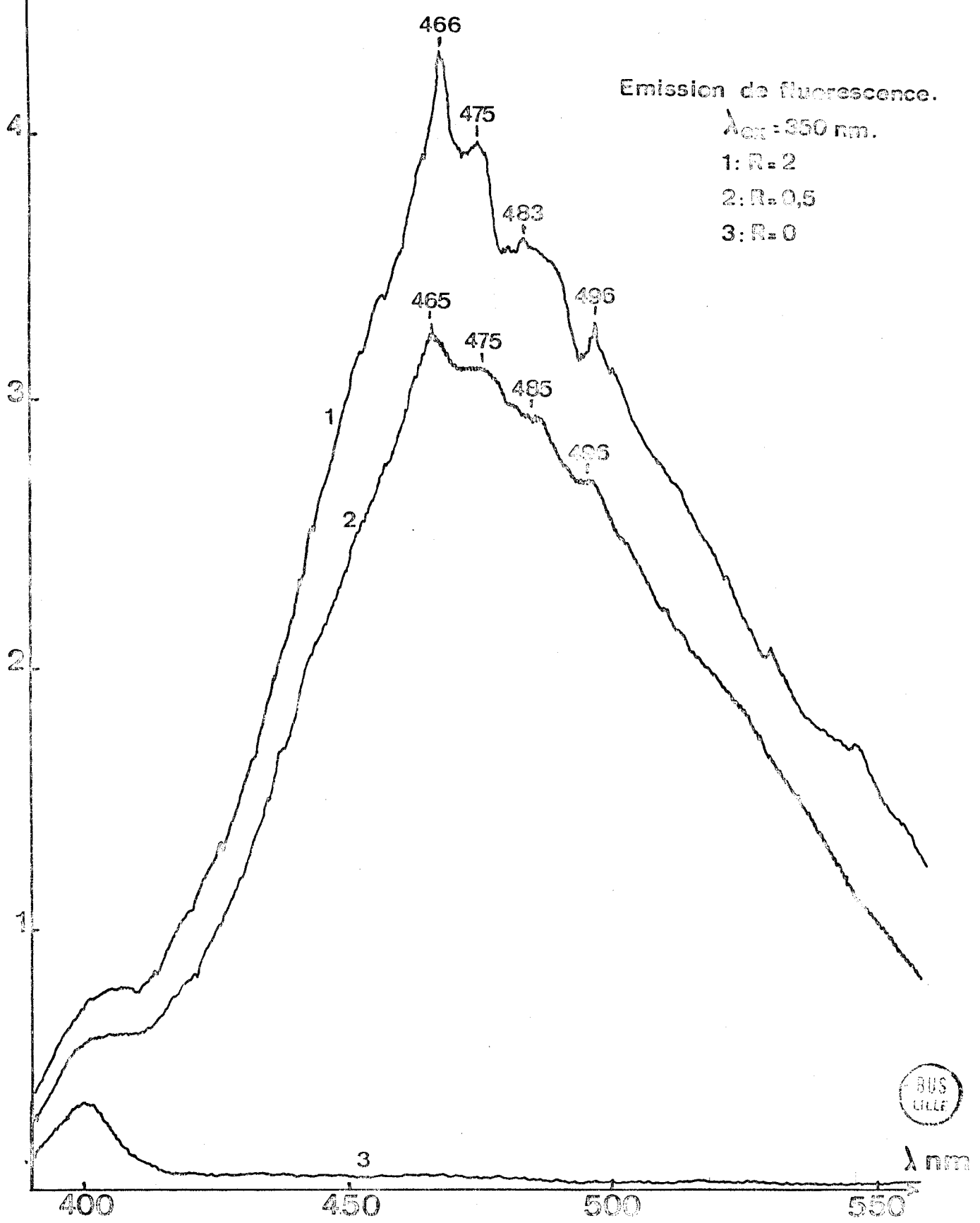


Figure 45. Interaction DNA dénaturé-diAc4HAQO.

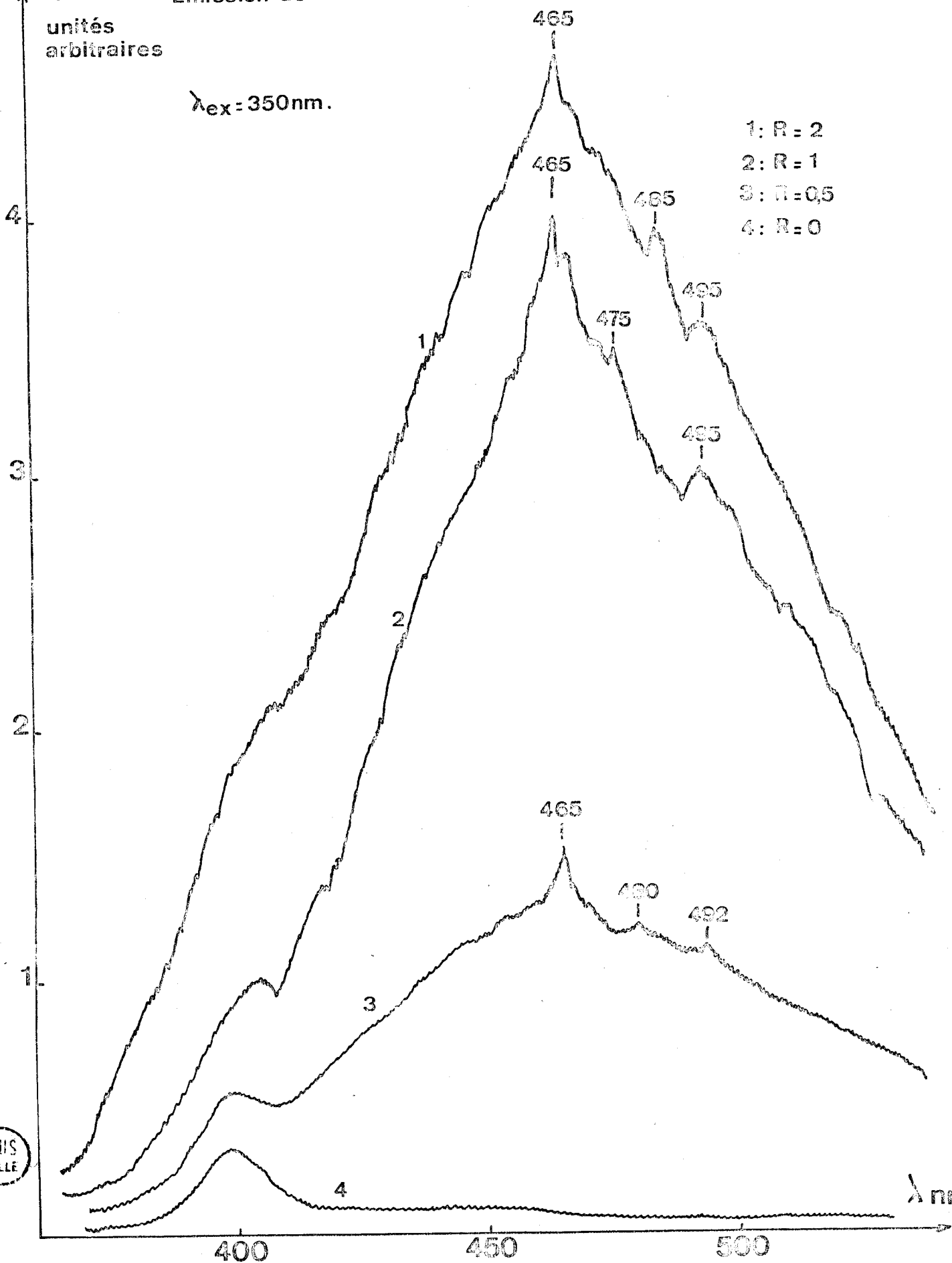
I.F.

Emission de fluorescence.

unités
arbitraires

$\lambda_{ex} = 350\text{nm.}$

- 1: R = 2
- 2: R = 1
- 3: R = 0,5
- 4: R = 0



BUS
LILLE

$\lambda \text{ nm}$

D'un point de vue purement qualitatif, et de la même manière que pour le DNA de cellules ascitiques utilisé lors de la comparaison *in vivo-in vitro*, nous observons une bande d'émission, qui, dans les deux cas, a un maximum situé à la même longueur d'onde : 465 nm.

L'étude en fonction de la structure secondaire nous a donc conduit à penser que la plus grande partie des sites réactionnels, dans l'interaction DNA-di Ac-4HAQO, seraient situés à l'intérieur de la double hélice. Afin d'étayer cette hypothèse et de déterminer si des sites externes sont également impliqués (par exemple : le 6-NH₂ et le N-2 de l'adénine (71)), et dans quelles proportions, nous avons entrepris une étude en fonction de la force ionique.

B) Etude en fonction de la force ionique
Rôle de la structure dynamique du DNA.

Les deux catégories de sites réactionnels sur le DNA (sites internes - sites externes) se différencient de cette manière :

- *Sites internes* (masqués). La réaction sur de tels sites possède les caractéristiques suivantes : faible réaction sur le DNA natif ; augmentation de la réactivité sur le DNA dénaturé (démasquage) ; forte inhibition de la réaction en absence de la structure dynamique du DNA, à force ionique élevée (respiration inhibée).

- *Sites externes* (non masqués, accessibles par les gorges du DNA). Dans ce cas, les caractéristiques sont les suivantes : réaction possible sur le DNA natif aussi bien que sur le DNA dénaturé ; aucune inhibition de la réaction en absence de la structure dynamique du DNA, à condition que la force ionique ne vienne pas inhiber la réaction chimique en elle-même.

Globalement, l'effet observé dépend du pourcentage respectif des deux sortes de sites. Par exemple, s'il existe des sites externes dans le cas du di Ac-4HAQO, nous devrions pouvoir observer, sur le DNA natif, quand la force ionique augmente, une inhibition de la réaction qui ne serait que partielle.

Nous avons donc entrepris cette étude, afin de déterminer dans quelle mesure la structure dynamique du DNA natif peut favoriser la réaction du di Ac-4HAQO sur la macromolécule.

Pour cela, nous avons augmenté la force ionique du milieu par addition du NaCl dans le tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7. L'addition de NaCl dans le milieu tend à supprimer la structure dynamique du DNA, c'est-à-dire qu'il n'existe pratiquement plus de régions transitoirement ouvertes. En d'autres termes, le phénomène de respiration est inhibé.

Nous avons effectué les manipulations sur le DNA natif et également sur le DNA dénaturé, afin de savoir si l'éventuelle inhibition observée ne provenait pas de l'inhibition de la réaction chimique en elle-même, du fait de l'augmentation de la force ionique.

Les échantillons sont incubés pendant 1 h 15 (Voir chapitre I, paragraphe IV ; p. 88).

1) Les résultats obtenus.

Les spectres d'absorption des échantillons de DNA ont été enregistrés après purification. La figure 46 montre ces spectres, pour deux rapports $R = 0,5$ et $R = 1$, dans le cas du DNA natif. La figure 47 montre les spectres correspondant aux mêmes valeurs de R , pour le DNA dénaturé.

Nous pouvons constater que dans les deux cas la réaction semble inhibée, puisque la bande due au cancérogène est pratiquement inexistante. En particulier, on distingue très mal le maximum qui serait dans les deux cas situé à environ 350 nm.

Deux essais [$R = 0,5$, $R = 1$] x 2 nous ont donné des résultats identiques.

Figure 46.
 Interaction DNA natif - diAc4H¹⁰⁰.
 Tampon citrate $2 \cdot 10^{-3}M$ - $0,05M$ NaCl, pH 7.

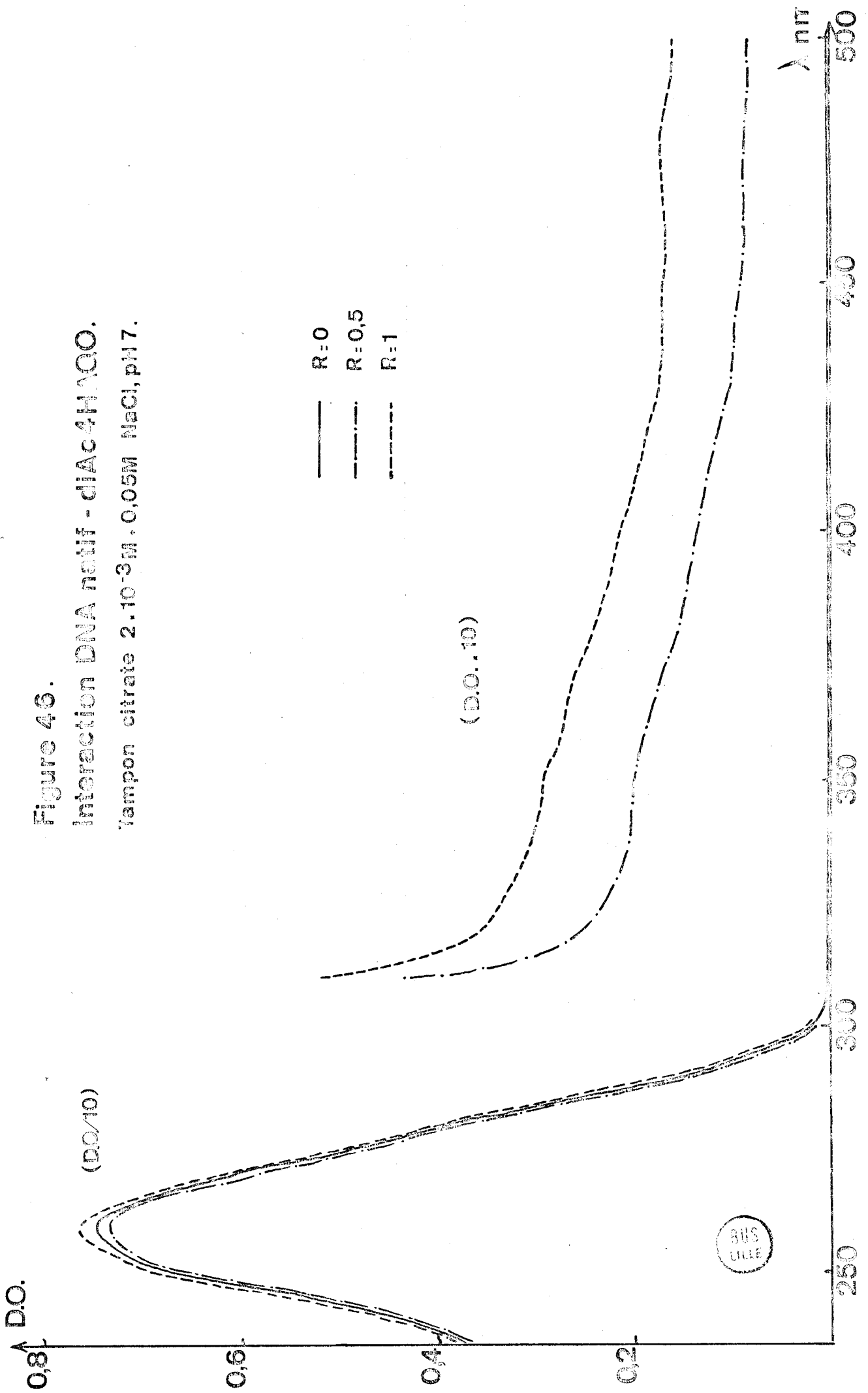




Figure 47.

Interaction DNA dénaturé - diAc4HAQO.

Tampon citrate $2 \cdot 10^{-3}M$. $0,05M$ NaCl, pH7.

Nous avons préparé deux échantillons $R = 1$ (X), en effectuant la réaction sur le DNA natif et sur le DNA dénaturé. Nous avons alors constaté que la fixation -hypothétique- des produits de dégradation "X" n'était pas inhibée par l'augmentation de la force ionique, puisque nous avons retrouvé la même allure de bande que précédemment, dans les deux cas. De plus, nous avons noté sur les spectres obtenus que les valeurs des rapports $D.O._{350}/D.O._{500}$ étaient les mêmes qu'en absence de NaCl : $\frac{D.O._{350}}{D.O._{500}} \approx 2$ x, dans le cas du DNA natif et $\frac{D.O._{350}}{D.O._{500}} \approx 3$ x dans le cas du DNA dénaturé ; x représente la valeur de la D.O. à 500 nm.

Nous avons donc effectué les calculs des pourcentages de fixation, quand cela était possible, en utilisant la méthode de correction II. La valeur du ϵ_{350} employée est celle donnée par la solvolysé en présence de NaCl : $\epsilon_{350} = 5800 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Chapitre I, fig. 24). Le Tableau IX, ci-dessous, montre les résultats obtenus :

	DNA natif				DNA dénaturé	
R	0,5	1	0,5	2	0,5	1
% de fixation	0,06 *	X	0,05 *	X	0,27	0,27

* Ces valeurs sont de l'ordre des erreurs expérimentales
 X non détectable par notre méthode de dosage.

Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus dans le tampon 2×10^{-3} M, pH 7, sans NaCl (Tableau VII, p. 102, pour le DNA natif ; Tableau VIII, p. 103, pour le DNA dénaturé), on constate que la réaction est inhibée d'un facteur 10 environ. Cependant, il semble que notre méthode de dosage ne soit pas assez sensible pour déterminer avec précision l'amplitude de cette inhibition. En particulier, dans le cas du DNA natif, il est difficile de dire si le pourcentage de cancérogène fixé est nul ou non.

Une méthode de dosage à l'aide de radioéléments nous permettra de conclure avec plus de certitude.

Cependant, le fait est que la réaction est inhibée dans les deux cas, c'est-à-dire également dans le cas du DNA dénaturé. Ceci signifierait que, dans les conditions de force ionique utilisées, la réaction chimique en elle-même ne peut se faire.

Une telle conclusion peut être tirée en appliquant la théorie des polyélectrolytes. Dans le cas du DNA, l'atmosphère de contre-ion située autour des groupements phosphates, chargés négativement, dépend de la force ionique. L'interaction électrostatique entre les ions positifs (les réactifs électrophiles formés à partir du di Ac-4HAQO) et le DNA est très réduite quand on augmente la force ionique du milieu, du fait de la compétition avec les ions positifs du tampon, l'ion Na^+ en particulier. La conséquence en est donc l'inhibition de la réaction chimique, puisque l'attraction électrostatique des deux réactifs est empêchée ; or, cette approche des sites réactionnels est nécessaire à la réaction.

Par conséquent, dans le cas du DNA natif, il est difficile de détecter un effet additionnel provenant de l'absence de la structure dynamique de la macromolécule.

Cette première approche ne nous permet donc pas de conclure, comme nous l'avions espéré, quant à l'effet de la structure dynamique du DNA sur la réaction DNA-di Ac-4HAQO. Par ailleurs, notre dosage n'est pas assez sensible quand il s'agit de détecter de très faibles pourcentages de fixation du cancérogène sur le DNA.

II. Les modifications de la structure du DNA, après fixation covalente du cancérogène.

Deux techniques différentes ont été utilisées pour cette étude, qui a été réalisée sur le DNA natif :

. La mesure des températures de fusion qui donne des renseignements sur la structure secondaire du DNA et sur sa perturbation éventuelle.

. La mesure de la biréfringence électrique qui donne des informations sur les structures secondaire et tertiaire.

A) Mesure des températures de fusion.

L'appareil de mesure qui a été mis au point au laboratoire est couplé avec un enregistreur X.Y. qui, en fin de manipulation, donne le tracé de la courbe sigmoïde $D.O. = f(T)$ et de la courbe dérivée $d(D.O.)/dT$, après avoir gardé les données en mémoire (T représente la température). Nous avons toujours utilisé les valeurs des températures de fusion, T_f , données par le tracé des courbes dérivées : la T_f est alors la valeur de la température au maximum de la courbe dérivée. Cette détermination est en effet beaucoup plus précise que celle obtenue à partir de la courbe sigmoïde $D.O. = f(T)$. Pour chaque échantillon, nous avons toujours fait deux mesures de T_f et n'avons jamais observé plus de $0,2^\circ\text{C}$ d'écart entre les températures de fusion d'une même solution de DNA.

Les mesures ont été effectuées sur deux séries d'échantillons de DNA natif, pour différents pourcentages de fixation, en milieu tampon citrate 2×10^{-3} M, pH 7. Après purification des échantillons et enregistrement des spectres d'absorption, pour le calcul des pourcentages de fixation du cancérogène, les solutions de DNA sont diluées 20 fois pour l'enregistrement des températures de fusion. La longueur d'onde du spectrophotomètre est fixée à 260 nm.

1) Choix du témoin de mesure :

Comparaison des T_f de DNA (X) et de DNA $R = 0$.

Les premières mesures que nous avons effectuées ont été les suivantes : nous avons comparé les températures de fusion des échantillons de DNA (X) ($R = 1$ (X), $R = 2$ (X)) à celle d'un DNA témoin $R = 0$, à une force ionique strictement identique. Cette manipulation a été réalisée afin de déterminer si le DNA $R = 0$ était un bon témoin pour les mesures de T_f . Les résultats des trois essais effectués sont donnés dans le Tableau X ci-dessous :

R	0	1 (X)	0	1 (X)	0	2 (X)
Tf en °C	58,6	58,4	57,6	57,5	57,35	57,4
	58,6	58,4	57,6	57,4	57,45	57,5
Tf moyenne	58,6	58,4	57,6	57,45	57,4	57,45
ΔT_f en °C	0	- 0,2	0	- 0,15	0	- 0,05

$$\Delta T_f = T_f (R \neq 0) - T_f (R = 0)$$

Etant donnée la précision des mesures ($\pm 0,2^\circ\text{C}$), ces résultats nous montrent que les produits "X" qui se fixent sur le DNA natif ne sont pas déstabilisants ; leur présence n'apportera aucune contribution dans la détermination des températures de fusion des échantillons préparés dans les conditions normales de réaction, puisque la quantité de ces produits est probablement beaucoup plus faible dans ce cas que dans celui d'un DNA (X).

Nous avons donc pris comme T_f de référence, pour chaque série d'échantillons, celle de la solution de DNA $R = 0$.

2) Résultats des mesures.

a) Première série d'échantillons.

Le Tableau XI présente les valeurs que nous avons obtenues :

R	0	0,5	1	1,5
% de fixation	0	0,73	0,88	0,90
Tf en °C	59,1 59	57,85 57,95	57,8 57,6	57,5 57,5
Tf moyenne	59,05	57,9	57,7	57,5
ΔTf en °C	0	- 1,2	- 1,4	- 1,6

b) Deuxième série d'échantillons.

Tableau XII

R	0	0,1	0,2	0,5	1	2
% de fixation	0	0,23	0,43	0,68	0,93	0,87
Tf en °C	57,45 57,5	57,2 57,3	56,8 57	56,25 56,2	55,8 55,7	55,8 55,8
Tf moyenne	57,47	57,25	56,9	56,2	55,75	55,8
ΔTf en °C	0	- 0,2	- 0,6	- 1,2	- 1,7	- 1,7



La première constatation est que, au fur et à mesure que le pourcentage de fixation du cancérogène augmente, les températures de fusion des DNA transformés diminuent, et de façon assez régulière semble-t-il. La valeur du ΔT_f défini précédemment est donc négative. Comme le montre la figure 48, pour la deuxième série de mesures, la courbe : $T_f = f(\% \text{ de fixation})$ est une droite, aux erreurs d'expérience près.

Nous avons également tracé le graphe : $-\Delta T_m = f(\% \text{ de fixation})$, en utilisant les valeurs obtenues dans les deux séries de mesures (Fig. 49). Aux erreurs d'expérience près, les points obtenus sont correctement alignés sur une droite. Nous avons calculé la pente de cette droite, qui donne la valeur de la déstabilisation ΔT_f pour un pourcentage de fixation de 1 % : $2,1^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Cette diminution de la température de fusion, ainsi reliée au pourcentage de fixation, indique que la liaison covalente du cancérogène sur le DNA introduit une perturbation dans la structure secondaire, qui se traduit par une dénaturation partielle de la double hélice.

La valeur de cette déstabilisation, qui est de $2,1^\circ\text{C}$ par pourcentage de fixation, semble relativement élevée comparativement à d'autres cancérogènes. Par exemple, dans le cas du N-Ac-AAP, la déstabilisation est de $1,2^\circ\text{C}$ par pourcentage de phénanthrylation ; en ce qui concerne le N-Ac-AAF, cette valeur est de $1,1^\circ\text{C}$ par pourcentage de fluorénylation (83). Ceci suggère que la déstabilisation obtenue dans le cas du di Ac-4HAQO est assez importante.

L'observation sur les DNA transformés d'une perturbation structurale de cette ampleur peut amener à penser que le cancérogène serait fixé, pour une bonne partie, en des sites internes. La fixation sur ces atomes provoquerait alors une rupture des liaisons hydrogène sur un assez grand nombre de paires de bases avoisinantes, ce qui aboutirait à la formation d'ouvertures locales de la double hélice, dans les zones de fixation du cancérogène. Cette hypothèse est en accord avec le résultat de l'étude en fonction de la structure secondaire (Paragraphe I, A, p. 104) qui a suggéré que le noyau quinoléique se fixerait en grande partie sur des atomes situés à l'intérieur de la double hélice. Nous ne pouvons malheureusement pas

$\Delta T_f = C$

Figure 48.

$T_f = f(\% \text{ de fixation})$.

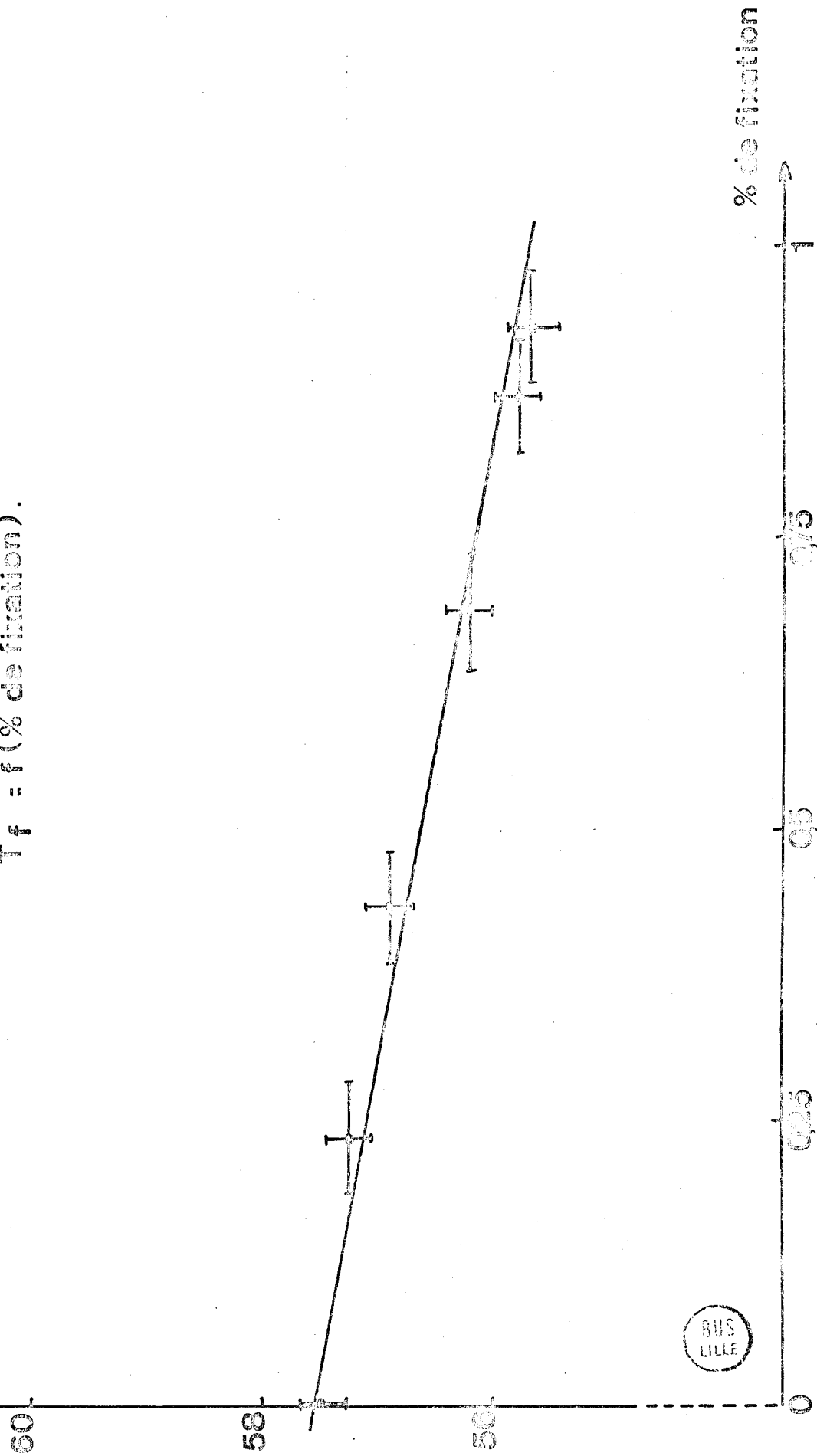
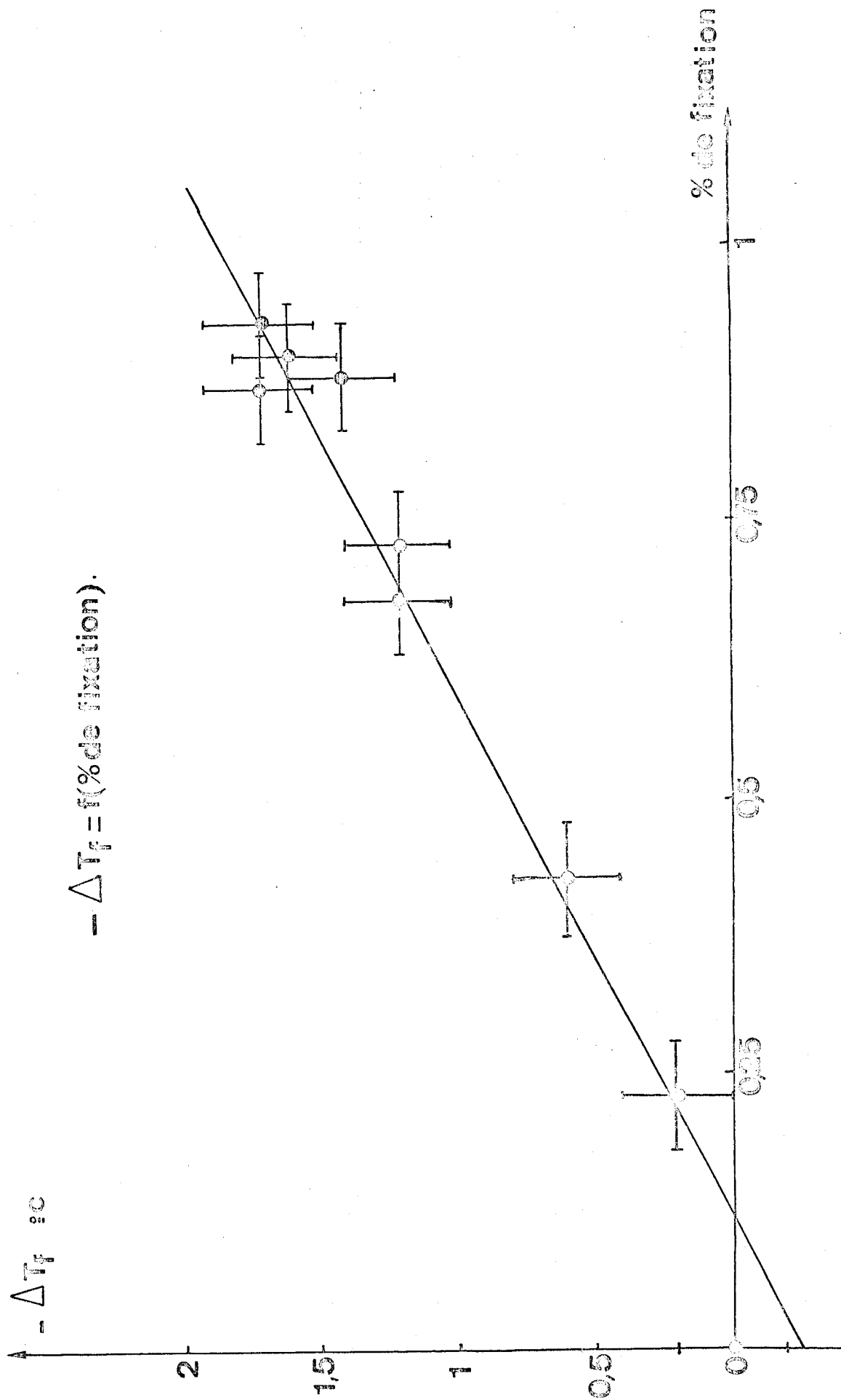


Figure 49.



conclure avec plus de précision puisque seuls les sites de fixation sur l'adénine sont connus, les atomes concernés sur la guanine restant indéterminés. Par comparaison avec d'autres cancérogènes, comme l'AAF, on peut penser que la fixation du noyau quinoléique sur le C-8 de la guanine pourrait être en accord avec notre hypothèse.

Par ailleurs, il faut noter que cette déstabilisation de la structure du DNA pourrait être due également à une réaction d'acétylation de la macromolécule, dont l'effet s'additionnerait à celui causé par la fixation du noyau quinoléique ; ceci expliquerait l'ampleur de l'effet global observé. Nous avons évoqué, dans le chapitre III de la partie "Généralités" (p. 57), la possibilité de l'intervention d'une acétylation dans l'interaction DNA-di Ac-4HAQO *in vitro* ; ce problème sera l'objet d'une discussion dans le paragraphe III de ce chapitre (p. 117).

La mise en évidence d'une acétylation devrait alors être suivie d'autres investigations, afin de déterminer les contributions respectives des deux phénomènes (fixation du noyau quinoléique - acétylation) dans la déstabilisation de la structure du DNA.

3) Mesure des T_f sur les échantillons de DNA préparés en présence de NaCl.

Afin de vérifier l'inhibition de la réaction observée dans le cas des échantillons de DNA natif préparés dans le tampon enrichi en NaCl, nous avons mesuré les températures de fusion de ces échantillons.

Lorsque l'on augmente la force ionique, on stabilise la structure en double hélice du DNA, ce qui se traduit par une augmentation de la température de fusion. C'est ainsi que le témoin R = 0 sans cancérogène a une température de fusion d'environ 76°C dans le tampon citrate 2×10^{-3} M + 0,05 M NaCl, pH 7.

Le Tableau XIII ci-dessous donne les résultats de nos mesures :

R	0	0,5	1	0	0,5	2
% de fixation	0	0,06	X	0	0,05	X
Tf en °C	76,3	76,5	76,3	76,3	76,2	76,3
	76,4	76,5	76,3	76,2	76,2	76,2
Tf moyenne	76,35	76,5	76,3	76,25	76,2	76,25
ΔTf en °C	0	+ 0,15	- 0,05	0	- 0,05	0

X = fixation de cancérogène nulle ou trop faible pour être détectée (Voir Tableau IX, p. 108).

Nous pouvons constater que, aux erreurs d'expérience près, les échantillons de DNA, après réaction avec le cancérogène, ont la même température de fusion que le DNA témoin R = 0. Ceci montre bien l'inhibition de la réaction de fixation du noyau quinoléique, puisque nous venons de voir que cette liaison du cancérogène sur la macromolécule avait un effet déstabilisant.

B) Mesure de la biréfringence électrique.

Les premières mesures ont été effectuées par le Docteur C. Houssier, à Liège, sur un échantillon de DNA transformé (% de fixation : 0,2) et sur un DNA témoin R = 0 qui a servi de référence.

Après purification, la force ionique des échantillons est ajustée par dialyse dans un tampon citrate 10^{-3} M, pH 7 et les mesures sont effectuées sur des solutions diluées 10 fois avec ce même tampon.

Les résultats obtenus sont donnés dans la figure 50 qui représente la variation de la biréfringence spécifique : $\left(\frac{\Delta n}{D \cdot 0,260} \right)$, en fonction de l'intensité E du champ électrique appliqué aux bornes de la cellule de Kerr. On peut constater que, même à ce faible taux de fixation de 0,2 %, la biréfringence spécifique du DNA transformé est environ 10 à 15 % plus faible que celle du DNA témoin. Cette chute de la biréfringence indique une perturbation assez importante de la structure du DNA, perturbation qui peut avoir deux origines :

. une dénaturation partielle de la double hélice qui correspond à un désempilement des bases ;

. l'apparition de cassures sur un seul brin le long de la chaîne aux endroits de fixation du cancérogène, ce qui entraînerait une augmentation du plissement de la chaîne (modification de la structure tertiaire).

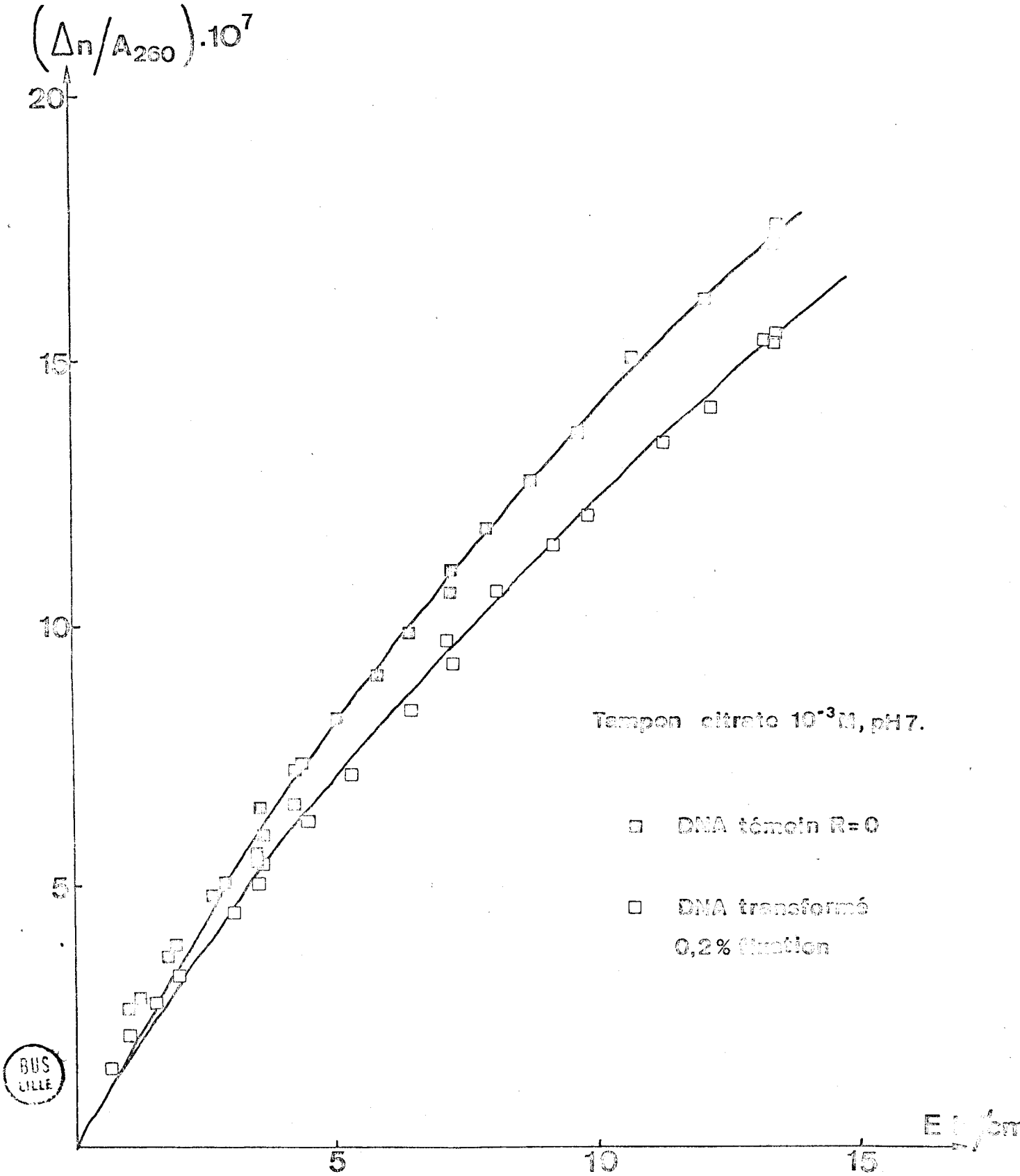
Ces deux phénomènes ne sont d'ailleurs pas indépendants l'un de l'autre.

L'étude sur les températures de fusion nous a montré que le désempilement des bases se produisait à coup sûr. Par contre, la mise en évidence d'une augmentation du plissement de la chaîne est plus délicate, mais ceci est tout à fait envisageable puisque l'on sait que la perturbation de la structure secondaire d'une macromolécule implique le plus souvent une modification de sa structure tertiaire. La présence sur le DNA de zones de dénaturation pourrait donc entraîner une augmentation de la flexibilité de la chaîne : la macromolécule se trouverait alors plus repliée sur elle-même, ce qui expliquerait la chute de la biréfringence que nous observons.

En résumé, ce premier essai a montré, en accord avec les résultats des mesures de températures de fusion, que la structure du DNA semble fortement affectée par la fixation du cancérogène. Comme nous l'avons souligné pour les effets observés grâce aux mesures de la Tf, il se peut qu'un phénomène d'acétylation du DNA ait également une part de responsabilité dans la chute importante de la biréfringence.

Figure 50 .

$$\frac{\Delta n}{A_{260}} = f(E).$$

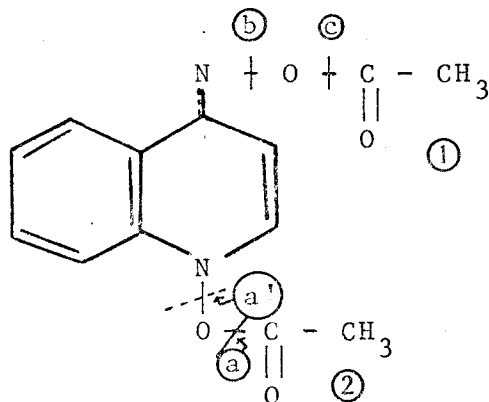


Ces mesures ne constituent cependant qu'une première approche et l'étude de la biréfringence électrique est à compléter. D'autre part, la mesure du dichroïsme électrique dans la bande du cancérogène, à 350 nm, devrait nous permettre de déterminer l'orientation du chromophore quinoléique dans la macromolécule de DNA. Actuellement, l'appareil de mesure situé dans le laboratoire de M. Cl. Houssier n'est pas assez sensible pour détecter les très faibles effets dichroïques qui correspondent à une fixation du cancérogène de 0,1 % à 1 % (du fait de la très faible valeur de la D.O. dans la bande du cancérogène). Une amélioration de la sensibilité de détection de l'appareillage est actuellement en cours à Liège et ceci nous permettra, quand la mise au point en sera terminée, d'effectuer les mesures de dichroïsme électrique sur nos échantillons.

III. Discussion sur le mécanisme chimique impliqué dans l'interaction DNA-di Ac-4HAQO. Intervention éventuelle d'une réaction d'acétylation.

Actuellement, les mécanismes chimiques impliqués dans la réaction DNA-di Ac-4HAQO sont encore mal connus. L'étude du comportement chimique du di Ac-4HAQO en milieu aqueux, effectuée au laboratoire par Bernard Bailleul, en collaboration avec Monsieur le Professeur J. Lhomme, devrait permettre une meilleure compréhension des phénomènes. D'autre part, comme nous l'avons souligné précédemment, l'intervention d'une réaction d'acétylation du DNA peut être envisagée dans le cas du di Ac-4HAQO (Paragraphe II de ce chapitre, p. 114 ; chapitre III de la partie "Généralités"). La solution du problème, à savoir : "existe-t-il oui ou non une acétylation du DNA ?", aiderait à la compréhension du mécanisme impliqué dans l'interaction DNA-di Ac-4HAQO. Nous avons donc entrepris d'essayer de résoudre cette question et ceci fera partie de nos investigations futures. Pour effectuer une telle étude, il sera nécessaire d'utiliser un produit marqué sur les fonctions acétyle.

Le schéma ci-dessous montre différentes possibilités de réaction du di Ac-4HAQO en milieu aqueux, dans l'hypothèse d'un mécanisme ionique (un mécanisme radicalaire n'est cependant pas à rejeter) :



- On peut imaginer que les deux fonctions acétyle du di Ac-4HAQO n'aient pas la même réactivité chimique et il semble alors possible de penser que la fonction ② est plus sensible à l'hydrolyse que le groupement ①.

- D'autre part, la structure du résidu quinoléique qui se fixe de façon covalente sur le DNA est inconnue jusqu'ici ; en particulier, ce composé fixé pourrait être soit un dérivé monoacétylé, soit un cycle quinoléique qui ne porterait aucune fonction acétyle.

Un premier test a donc été réalisé de la façon suivante : nous avons fait réagir sur le DNA du di Ac-4HAQO marqué au carbone 14, sur les deux fonctions acétyle (préparé au laboratoire par Bernard Bailleul) et nous avons retrouvé, après purification, une radioactivité résiduelle sur le DNA. Ceci nous a suggéré la présence sur la macromolécule de groupements acétyle après interaction avec le di Ac-4HAQO. D'autres essais similaires sont à effectuer et un tel résultat, s'il est reproductible, peut être interprété de trois façons différentes :

. La présence de ces groupements acétyle proviendrait uniquement de l'acétylation directe du DNA, à partir d'un ion carbonium $\begin{matrix} + \\ \text{C} - \text{CH}_3 \\ || \\ \text{O} \end{matrix}$ (coupure a, ou coupure c),

ou les deux à la fois). Dans ce cas, on considère que le noyau quinoléique fixé sur la macromolécule ne porte plus de fonction acétyle.

. Les résidus acétyle détectés correspondraient

uniquement à la présence sur le DNA du cycle quinoléique mono-acétylé (fonction acétylé ①). Dans ce cas, la réaction d'acétylation directe du DNA n'a pas lieu (coupure (a') ou alors coupure (a) donnant de l'acide acétique). Dans cette hypothèse, les coupures (b) et (c) n'auraient pas lieu.

. Les deux mécanismes précédemment cités pourraient intervenir simultanément : il y aurait alors fixation d'un dérivé quinoléique monoacétylé et acétylation directe du DNA de par la fonction acétylé ② seule.

Afin d'essayer de déterminer si oui ou non il existe une acétylation du DNA, nous envisageons d'effectuer différentes manipulations en utilisant un produit marqué au carbone 14 sur les fonctions acétylé de la manière suivante :

1 - Tout d'abord, réaction sur le DNA de di Ac-4HAQO marqué sur les deux fonctions acétylé, afin de renouveler le premier test que nous avons effectué (p. 118) et d'évaluer le pourcentage global d'acétylation sur le DNA.

2 - Réaction sur le DNA d'un produit marqué spécifiquement sur la fonction acétylé ①. Dans ce cas, l'obtention après purification d'une radioactivité résiduelle nulle indiquerait que le cycle quinoléique fixé sur le DNA n'est pas acétylé. Par contre, la présence de groupements acétylé résiduels pourrait provenir, soit de la fixation d'un dérivé quinoléique monoacétylé, soit d'une acétylation directe du DNA. Afin de lever cette ambiguïté, une deuxième réaction DNA-di Ac-4HAQO devrait être effectuée, en utilisant un produit marqué de façon mixte : marquage au tritium, sur ce cycle quinoléique, et marquage spécifique au carbone 14, sur la fonction acétylé ①. Après réaction d'un tel composé sur le DNA, la radioactivité résiduelle en tritium donnerait le pourcentage de fixation du cycle quinoléique ; si la radioactivité comptée en carbone 14 donnait un taux d'acétylation correspondant à la quantité de dérivé quinoléique précédemment déterminée, ceci signifierait que le composé fixé sur le DNA est un dérivé monoacétylé. Dans le cas contraire, ceci indiquerait que le DNA a été acétylé à partir de la fonction acétylé ① du di Ac-4HAQO (voir schéma, p. 118; coupure (c)).

3 - Réaction sur le DNA d'un dérivé diacétylé marqué spécifiquement au carbone 14 sur la fonction acétyle ②. L'obtention, après purification, d'un marquage résiduel, signifierait qu'une acétylation du DNA a eu lieu, la fonction acétyle ② étant impliquée (voir schéma p. 118, coupure ①).

La mise au point de ces manipulations nécessitera un important travail de préparation des produits marqués. Bernard Bailleul et moi-même comptons réaliser ce travail en collaboration avec le laboratoire du Professeur Jean Lhomme. Dans tous les cas envisagés, si la réaction d'acétylation est mise en évidence, le dosage du taux d'acétylation pourra être fait puisque nous emploierons des produits marqués.

C O N C L U S I O N E T P E R S P E C T I V E S

Dans ce travail nous avons montré que le di Ac-4HAQO, qui représenterait une forme ultime du 4NQO, réagissait sur le DNA de façon directe, la liaison formée étant covalente.

L'étude de la réactivité du di Ac-4HAQO dans différentes conditions nous suggère l'intervention de sites de fixation internes, masqués.

L'étude physico-chimique des DNA transformés nous permet de penser que la fixation du cancérogène perturbe assez fortement la structure de la macromolécule.

La comparaison *in vivo-in vitro* que nous avons entreprise nous a donné des premiers résultats, en spectroscopie de fluorescence, qui semblent prometteurs. Cependant, afin de savoir si le di Ac-4HAQO représente réellement un métabolite ultime du 4NQO, ou s'il peut être accepté comme modèle synthétique *in vitro* d'une forme ultime *in vivo*, il faudra compléter ce travail, en identifiant les produits d'addition base-cancérogène, à l'aide de la chromatographie liquide haute pression. Cette étude nécessitera l'emploi de cancérogènes marqués sur le cycle quinoléique, ce qui nous permettra d'ailleurs, dans les deux cas, de doser avec précision le cancérogène fixé sur le DNA.

Dans un proche avenir, en ce qui concerne l'interaction DNA-di Ac-4HAQO *in vitro*, nous nous fixons les objectifs suivants :

1 - L'emploi de di Ac-4HAQO marqué sur le cycle quinoléique. Cela nous permettra d'effectuer un dosage beaucoup plus précis du cancérogène fixé, ce qui améliorera les résultats des études physico-chimiques déjà entreprises.

2 - Des mesures systématiques de biréfringence et de dichroïsme électriques, sur les échantillons de DNA transformé. Cette étude viendra compléter les résultats des déterminations des températures de fusion. En particulier, le dichroïsme électrique nous renseignera sur l'orientation du cycle quinoléique au sein de la double hélice. Ces manipulations seront effectuées en collaboration avec M. C. Houssier, à Liège.

3 - La mise en évidence -si elle existe- d'une réaction d'acétylation sur le DNA. Cette recherche sera entreprise en utilisant du di Ac-4HAQO marqué au carbone 14 sur les groupements acétyle. Il sera alors possible de déterminer la contribution relative de chacune des deux réactions -acétylation et fixation du noyau quinoléique- dans la perturbation de la structure du DNA. L'étude de la réaction d'acétylation, en fonction de la structure secondaire de la macromolécule, permettra d'obtenir des renseignements sur l'accessibilité des sites d'acétylation.

La mise en évidence sur le DNA d'une réaction d'acétylation *in vitro*, à partir du di Ac-4HAQO, conduira à la recherche de cette acétylation *in vivo*. En effet, l'existence d'une telle réaction dans les deux cas serait en faveur de l'hypothèse de la formation du dérivé diacétylé *in vivo*. De plus, ceci pourrait peut-être permettre d'expliquer l'existence des deux processus de réparation démontrés dans le cas du 4NQO (l'un "U.V. like"; l'autre "X.R. like").

Une meilleure connaissance du comportement chimique du di Ac-4HAQO et la détermination des sites de fixation du cancérogène sur les bases puriques aideraient à la compréhension du mode d'interaction DNA-di Ac-4HAQO. Des travaux sont effectués en ce sens au laboratoire, par Bernard Bailleul en collaboration avec l'équipe du Professeur J. Lhomme. L'élucidation de ces deux questions nous fournira de précieux renseignements, qui nous permettront alors de proposer un modèle d'interaction DNA-di Ac-4HAQO.

BIBLIOGRAPHIE

1. AHMED F.E. & SETLOW R.B. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1548-1552.
2. AMACHER D.E., ELLIOTT J.A. & LIEBERMAN M.W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1553-1557.
3. D'AMBROSIO S.M. & SETLOW R.B. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2396-2400.
4. ANDERSON R.A., ENOMOTO M., MILLER E.C. & MILLER J.A. (1964) *Cancer Res.*, 24, 128-140.
5. ANDOH T. & IDE T. (1972) *Cancer Res.*, 32, 1230-1235.
6. ANDOH T., IDE T., SAITO M. & KAWAZOE Y. (1975) *Cancer Res.*, 35, 521-527.
7. ANDOH T., KATO K., TAKAOKA T. & KATSUTA H. (1971) *Int. J. Cancer*, 7, 455-467.
8. ARAKI M., KAWAZOE Y. & NAGATA C. (1969) *Chem. Pharm. Bull. Tokyo*, 17, 1344-1351.
9. BAL J., KAJTANIAK E.M. & PIENIAZEK N.J. (1977) *Mutation Res.* 56, 153-156.
10. BARTSCH H., DWORKIN C., MILLER E.C. & MILLER J.A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 304, 42-55.
11. BORGES A., DARVEY H., CASTAGNOLI N., CROCKER T.T., RASMUSSEN R.E. & WANG I.Y. (1973) *J. Med. Chem.*, 16, 502-506.
12. BUTLIN H.T. (1892) *Brit. Med. J.*, 2, 1-6
13. CHANG C.T., MILLER S.J. & WETMUR J.G. (1974) *Biochemistry*, 13, 2142-2148.

14. CLEAVER J.E. (1968) *Nature*, 218, 652-656.
15. CLEAVER J.E. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63, 428-435
16. CLEAVER J.E. (1973) *Cancer Res.* 33, 362-369.
17. CONNEY A.H. & KUNTZMAN R. (1971) in *Concepts in Chemical Pharmacology*, Part 2 (B.B. Brodie & J.R. Gillette, eds. Springer-Verlag, New-York, pp. 401-421
18. COX R. & IRVING C.C. (1975) *Cancer Res.* 35, 1858-1860.
19. CRADDOCK V.M. & HENDERSON A.R. (1978) *Cancer Res.*, 38, 2135-2143.
20. CRAMER J.W., MILLER J.A. & MILLER E.C. (1960) *J. Biol. Chem* 235, 885-888.
21. DAUNE M.P. & FUCHS R.P.P. (1977) in *Mécanismes d'altération et de réparation du DNA, relations avec la mutagenèse et la cancérogénèse chimique*, Editions du CNRS, Paris, pp. 83-102.
22. De BAUN J.R., MILLER E.C. & MILLER J.A. (1967) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 8, 45.
23. De BAUN J.R., MILLER E.C. & MILLER J.A. (1970) *Cancer Res*, 30, 577-595.
24. DENDA A., INUI S. & KONISHI Y. (1977) *Chem. Biol. Interact.*, 19, 225-239.
25. DEVORET R. (1977) *Proc. 7th Int. Congress of Photobiology*, Plenum Press, London.
26. DEVORET R., BLANCO M., GEORGE J. & RADMAN H. (1975) in *Molecular Mechanisms for Repair of DNA* (P.C. Hanawalt & R.B. Setlow, eds.), Plenum Press, New-York, pp. 155-171
27. ENDO H., ISHIZAWA M. & KAMIYA T. (1963) *Nature*, 198, 195-199

28. ENDO H. & KUME F. (1963) *Gann*, 54, 443-453.
29. ENDO H. & KUME F. (1965) *Gann*, 56, 261-265.
30. ENDO H., ONO T. & SUGIMURA T. (1971) *Recent Results in Cancer Res.*, 34, 1-99.
31. ENOMOTO M., MILLER E.C. & MILLER J.A. (1971) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 136, 1206-1210.
32. ENOMOTO M., SATO K., MILLER E.C. & MILLER J.A. (1968) *Life Sciences*, 7, Part II, 1025-1032.
33. EPSTEIN S.M., BENEDETTI E.L., SHINOZUKA H., BARTUS B. & FARBER E. (1969/1970) *Chem. Biol. Interact.*, 1, 113.
34. FUCHS R.P.P. & DAUNE M.P. (1971) *FEBS-Lett.*, 14, 206-208.
35. FUCHS R.P.P. & DAUNE M.P. (1972) *Biochemistry*, 11, 2659-2666.
36. FUCHS R.P.P. & DAUNE M.P. (1973) *FEBS-Lett.*, 34, 295-298.
37. FUCHS R.P.P., LEFEVRE J.F., POUYET J. & DAUNE M.P. (1976) *Biochemistry*, 15, 3347-3351.
38. FUJIWARA Y. (1975) *Cancer Res.*, 35, 2780-2789.
39. GELBOIN H.V. (1969) *Cancer Res.*, 29, 1272-1276.
40. GOTH R. & RAJEWSKY M.F. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 639-643.
41. GROU R.G., ESSIGMAN J.M., REINHOLD V.N. & WOGAN G.N. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1745-1749.
42. HARVAN D.J., HASS J.R. & LIEBERMAN M.W. (1977) *Chem. Biol. Interact.*, 17, 203-210.
43. HAYASHI Y. & HASEGAWA T. (1971) *Gann*, 62, 329-330.
44. HEIDELBERGER C. (1964) *J. Cellular Comp. Physiol.*, 64, Suppl. 1, 129-148.

45. HIRAI K., DEFENDI V. & DIAMOND L. (1974) *Cancer Res.* 34, 3497-3500.
46. HISAMATSU T., MORI K. & OKAMOTO K. (1965) *Gann*, 56, 77-79.
47. HORIKAWA M., NIKAIDO O., TANAKA T., NAGATA H. & SUGAHARA T. (1970) *Exptl. Cell Res.* 59, 147-152.
48. HOSHINO H., FUKUOKA F., OKABE K. & SUGIMURA T. (1966) *Gann*, 57, 71-74.
49. HOZUMI M. (1969) *Gann*, 60, 83-90.
50. HOZUMI M. (1969) *Gann*, 60, 161-165.
51. HUBERMAN E., SACHS L., YANG S.K. & GELBOIN H.V. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 607-611.
52. IKEGAMI S., NEMOTO N., SATO S. & SUGIMURA T. (1969/1970) *Chem. Biol. Interact.*, 1, 321-330.
53. IKENAGA M., ICHIKAWA-RYO H. & KONDO S. (1975) *J. Mol. Biol.*, 92, 341-354.
54. IKENAGA M. & KAKUNAGA T. (1977) *Cancer Res.*, 37, 3672-3678.
55. IKENAGA M., TAKEBE H. & ISHII Y. (1977) *Mutation Res.*, 43, 415-427.
56. IQBAL Z.M., MAJDAN M. & EPSTEIN S.S. (1976) *Cancer Res.*, 36, 1108-1113.
57. IRVING C.C. (1973) *Methods in Cancer Res.*, 7, 189-243.
58. IRVING C.C., VEAZEY R.A. & HILL J.T. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 179, 189-198.
59. IRVING C.C., WISEMAN R. Jr. & HILL J.T. (1967) *Cancer Res.*, 27, 2309-2317.

60. ISHIZAWA M. & ENDO H. (1967) *Biochem. Pharmacol.*, 16, 637-64
61. ISHIZAWA M. & ENDO H. (1970) *Mutation Res.*, 9, 134-137.
62. IVANOVIC V., GEACINTOV N.E., YAMASAKI H. & WEINSTEIN I.B. (1978) *Biochemistry*, 17, 1597-1603.
63. JANIAUD P., DELAFORGE M., LEVI P., MAUME B.F. & PADIEU P. (1977) in *Mécanismes d'altération et de réparation du DNA, relations avec la mutagénèse et la cancérogénèse chimique*, Editions du CNRS, Paris, pp. 431-470.
64. KAKUNAGA T. (1974) *Int. J. Cancer*, 14, 736-742.
65. KAKUNAGA T. (1975) *Nature*, 258, 248-250.
66. KAPULER A.M. & MICHELSON A.M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 232, 436-450.
67. KATO R., TAKAHASHI A., NGAMWATANA W. & OMORI Y. (1970) *Gann*, 61, 415-424.
68. KAWAZOE Y. (1971) *Gann*, 62, 325-327.
69. KAWAZOE Y. & ARAKI M. (1967) *Gann*, 58, 485-487.
70. KAWAZOE Y. & ARAKI M. (1971) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 19, 1278-1280.
71. KAWAZOE Y., ARAKI M., HUANG G.F., OKAMOTO T., TADA Mit. & TADA Mar. (1975) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 23, 3041-3043.
72. KAWAZOE Y., ARAKI M. & NAKAHARA W. (1969) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 17, 544-549.
73. KAWAZOE Y., TACHIBANA M., AOKI K. & NAKAHARA W. (1967) *Biochem. Pharmacol.*, 16, 631-636.
74. KAWAZOE Y., TAMURA M. & ARAKI M. (1970) *Gann*, 61, 593-596.

75. KAWAZOE Y., UEHARA N., ARAKI M. & TAMURA M. (1969) *Gann*, 60, 617-626.
76. KONDO S. (1975) *Adv. in Biophys.*, 7, 91-162.
77. KONISHI Y., POPP J.A. & SHINOZUKA H. (1974) *J. Natl. Cancer Inst.*, 52, 917-920.
78. KOROBKIN M. & WILLIAMS E.H. (1968) *Yale J. Biol. Med.*, 41, 69-78.
79. KRIEK E. (1969/1970) *Chem. Biol. Interact.*, 1, 3-17.
80. KRIEK E. (1972) *Cancer Res.*, 32, 2042-2048.
81. KRIEK E., MILLER J.A., JUHL U. & MILLER E.C. (1967) *Biochemistry*, 6, 177-182.
82. KUROKI T., KANAMARU R. & SATO H. (1970) *Gann*, 61, 373-382.
83. LANG M.C.E., FUCHS R.P.P. & DAUNE M.P. (1977) *Cancer Res.*, 37, 3887-3891.
84. LAWLEY P.D. & ORR D.J. (1970) *Chem. Biol. Interact.*, 2, 154
85. LEFEVRE J.F., FUCHS R.P.P. & DAUNE M.P. (1978) *Biochemistry*, 17, 2561-2567.
86. LE PECQ J.B. (1978) *Pour la Science*, 11, 12-21.
87. LEVIN W., WOOD A.W., CHANG R.L., SLAGA T.J., YAGI, H., JERINA D.M. & CONNEY A.H. (1977) *Cancer Res.*, 37, 2721-2726
88. LIEBERMAN M.W. & DIPPLE A. (1972) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 13, 40.
89. LOEB L.A., SPRINGGATE C.F. & BATTULA N. (1974) *Cancer Res.*, 34, 2311-2321.
90. LYTLE C.D., COPPEY J. & TAYLOR W.D. (1978) *Nature*, 272, 60

91. MAINIGI K.D. & SOROF S. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2293-2296.
92. MALKIN M.F. & ZAHALSKY A.C. (1966) *Science*, 154, 1665-1667.
93. MARX J.L. (1978) *Science*, 200, 518-521.
94. MATSUSHIMA T., KOBUNA I. & SUGIMURA T. (1967) *Nature*, 216, 508.
95. MILLER E.C. (1978) *Cancer Res.*, 38, 1479-1496.
96. MILLER E.C., JUHL U. & MILLER J.A. (1966) *Science*, 153, 1125-1127.
97. MILLER E.C., LOTLIKAR P.D., MILLER J.A., BUTLER B.W., IRVING C.C. & HILL J.T. (1968) *Mol. Pharmacol.*, 4, 147-154.
98. MILLER E.C. & MILLER J.A. (1947) *Cancer Res.*, 7, 468-480.
99. MILLER E.C. & MILLER J.A. (1966) *Pharmacol. Rev.*, 18, 805-838
100. MILLER E.C. & MILLER J.A. (1974) in *The Molecular Biology of Cancer* (H. Busch, ed.) Academic Press, New York, pp. 377-402.
101. MILLER E.C., MILLER J.A. & ENOMOTO M. (1964) *Cancer Res.*, 24, 2018-2032.
102. MILLER J.A. (1970) *Cancer Res.*, 30, 559-576.
103. MILLER J.A. & MILLER E.C. (1976) *Federation Proc.*, 35, 1316-1321.
104. MORI K., KONDO M. & SUZUKI S. (1966) *Gann*, 57, 559-561.
105. MORI K. & OHTA A. (1967) *Gann*, 58, 551-554.
106. MORI K. & YASUNO A. (1961) *Gann*, 52, 149-153.

107. MORITA T. & MIFUCHI I. (1974) *Gann*, 65, 27-32.
108. NAGAO M. & SUGIMURA T. (1976) *Adv. in Cancer Res.*, 23, 132-169.
109. NAGATA C., KATAOKA N., IMAMURA A., KAWAZOE Y. & CHIHARA G. (1966) *Gann*, 57, 323-335.
110. NAGATA C., KODAMA M., TAGASHIRA Y. & IMAMURA A. (1966) *Biopolymers*, 4, 409-427.
111. NAKAHARA W., FUKUOKA F. & SAKAI S. (1958) *Gann*, 49, 33-41.
112. NAKAHARA W., FUKUOKA F. & SUGIMURA T. (1957) *Gann*, 48, 129-137.
113. NAMBA M., NISHITANI K. & KIMOTO T. (1977) *Japan J. Exp. Med.* 47, 263-269.
114. NELSON J.H., GRUNBERGER D., CANTOR C.R. & WEINSTEIN I.B. (1971) *J. Mol. Biol.*, 62, 331.
115. NOMURA T. (1976) *Nature*, 260, 547-549.
116. OKABAYASHI T. (1962) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 10, 1127.
117. OKABAYASHI T., IDE M., YOSHIMOTO A. & OTSUBO M. (1965) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 13, 610-611.
118. OKABAYASHI T. & YOSHIMOTO A. (1962) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 10, 1221-1226.
119. OKANO T., GOTO M., MATSUMOTO H. & TAKADATE A. (1972) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 20, 2551-2560.
120. OKANO T., MAENOSONO J., KANO T. & ONODA I. (1973) *Gann*, 64, 227-236.
121. OKANO T., NIITSUMA A., TAKADATE A. & UEKAMA K. (1969) *Gann*, 60, 97-106.

122. OKANO T. & SATO Y. (1972) *Gann*, 63, 713-724.
123. OKANO T., TAKADATE A. & KANO T. (1969) *Gann*, 60, 557-568.
124. OKANO T., TAKENAKA S. & SATO Y. (1969) *Gann*, 60, 307-317.
125. OKANO T. & UEKAMA K. (1967) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*,
15, 1812-1815.
126. ONG T., MATTER B.E. & De SERRES F.J. (1975) *Cancer Res.*,
35, 291-295.
127. OUTZEN H.C. & PREHN R.T. (1973) *Cancer Res.*, 33, 408-410.
128. PAUL J.S. & MONTGOMERY P.O'.B. (1970) *Mol. Pharmacol.*, 6,
315-322.
129. PAUL J.S., MONTGOMERY P.O'.B. & LOUIS J.B. (1971) *Cancer
Res.*, 31, 413-419.
130. PETZOLD G.L. & SWENBERG J.A. (1978) *Cancer Res.*, 38, 1589-
1594.
131. PHILLIPS J.M. (1972) *Int. J. Cancer*, 9, 39-47.
132. POTT P. (1963) *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 10, 7-13
1ère parution : London, 1775.
133. PRAKASH L., STEWART J.W. & SHERMAN F. (1974) *J. Mol. Biol.*
85, 51-65.
134. PULLMAN B. & PULLMAN A. (1952) in *Les théories électroniques
de la chimie organique*, Masson & Cie, Paris, pp. 609-644
135. RADMAN M. (1977) *Colloques Int. Centre Natl. Rech. Scient.*,
256, 293-306.
136. REGAN J.D. & SETLOW R.B. (1974) *Cancer Res.* 34, 3318-3325.
137. SAKAI S., MINODA K., SAITO G., AKAGI S. & FUKUOKA F. (1955)
Gann, 46, 605-615

138. SARASIN A.R. & HANAWALT P.C. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 346-350.
139. SARMA D.S.R., RAJALAKSHMI S. & FARBER E. (1975) in *Cancer : A Comprehensive Treatise* (F.F. Becker, ed.) Plenum Press, New York, 1, 235-287.
140. SCRIBNER J.D., MILLER J.A. & MILLER E.C. (1970) *Cancer Res.* 30, 1570-1579.
141. SCRIBNER J.D. & NAIMY N.K. (1973) *Cancer Res.*, 33, 1159-116
142. SCRIBNER J.D. & NAIMY N.K. (1975) *Cancer Res.*, 35, 1416-142
143. SETLOW R.B. (1978) *Nature*, 271, 713-717.
144. SETLOW R.B., REGAN J.D., GERMAN J. & CARRIER W.L. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 64, 1035-1041.
145. SHIRASU Y. (1963) *Gann*, 54, 487-495.
146. SHIRASU Y. & OHTA A. (1963) *Gann*, 54, 221-223.
147. SIMS P., GROVER P.L., SWAISLAND A., PAL K. & HEWER A. (1974) *Nature*, 252, 326-328.
148. SO B.T. & WYNDER E.L. (1972) *J. Natl. Cancer Inst.* 48, 1733-1738.
149. SPJUT H.J. (1972) *Dis. Colon Rectum* 15, 94-99.
150. STICH H.F. & SAN R.H.C. (1970) *Mutation Res.*, 10, 389-404.
151. STICH H.F. & SAN R.H.C. (1971) *Mutation Res.*, 13, 279-282.
152. STICH H.F., SAN R.H.C. & KAWAZOE Y. (1971) *Nature*, 229, 416-419.
153. STICH H.F., SAN R.H.C. & KAWAZOE Y. (1973) *Mutation Res.*, 17, 127-137.

154. SUGIMURA T., OKABE K. & ENDO H. (1965) *Gann*, 56, 489-501.
155. SUGIMURA T., OKABE K. & NAGAO M. (1966) *Cancer Res.*, 26, 1717-1721.
156. SUGIMURA T., OTAKE H. & MATSUSHIMA T. (1968) *Nature*, 218, 392.
157. SUZUKI K. (1978) *Gann*, 69, 229-235.
158. SUZUKI S. (1968) *Gann*, 59, 163-165.
159. TADA, Mar & TADA Mit (1974) *Gann*, 65, 281-284.
160. TADA Mar, TADA Mit & TAKAHASHI T. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 469-477.
161. TADA Mit & TADA Mar (1971) *Chem. Biol. Interact.* 3, 225-229.
162. TADA Mit & TADA Mar (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 1025-1032.
163. TADA Mit & TADA Mar (1975) *Nature*, 255, 510-512.
164. TADA Mit & TADA Mar (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 454, 558-566.
165. TAKEBE H., FURUYAMA J.I., MIKI Y. & KONDO S. (1972) *Mutation Res.*, 15, 98-100.
166. TANOOKA H. & TAKAHASHI A. (1972) 5, 351-360.
167. WALKER I.G. & SRIDHAR R. (1976) *Chem. Biol. Interact.*, 12, 229-239.
168. WEISBURGER E.K. & WEISBURGER J.H. (1958) *Adv. Cancer Res.*, 5, 331-431.
169. WEISBURGER J.H., HADIDIAN Z., FREDERICKSON J.N. & WEISBURGER E.K. (1967) in *Bladder Cancer : A Symposium* (W.B. Deichmann and K.F. Lampe, eds.), Aesculapius, Birmingham, pp. 45-47.

APPENDICE TECHNIQUE

SYNTHESE CHIMIQUE

I. Le 4HAQO. Méthode de Enomoto *et al* (32)

Mode opératoire.

4g de 4NQO sont dissous dans 250ml d'éthanol, dans un flacon de 500ml équipé d'un agitateur magnétique. On ajoute ensuite, sous agitation, 20g d'acide ascorbique, et 60ml d'ammoniaque concentré. Le flacon est alors fermé, et on maintient une forte agitation pendant 15 minutes.

Les cristaux jaunes de 4HAQO ainsi formés sont lavés plusieurs fois avec une solution aqueuse d'acide ascorbique, puis à l'eau. Le produit est récupéré par centrifugation, et séché sous vide, à l'obscurité, en présence de P_2O_5 .

II. Le di Ac-4HAQO. Méthodes de Kawazoe et Araki (69) et Enomoto *et al* (32).

Mode opératoire.

On dissout 150mg de 4HAQO dans 3ml d'anhydride acétique, dans un ballon placé dans un bain de glace; un barbotage d'azote est installé en permanence dans le ballon. Le composé, tout d'abord en suspension, est dissous au bout de 45 minutes. Après avoir centrifugé la solution, on la verse dans 80ml d'eau glacée, sous agitation vigoureuse. Le précipité résultant est recueilli par filtration, lavé à l'eau, et séché sous vide sur P_2O_5 , à l'obscurité.

La recristallisation est effectuée selon la méthode de Enomoto *et al* (32) : le di Ac-4HAQO est dissous dans un volume minimum d'acétone; un grand volume d'éther éthylique anhydre est ajouté, et la cristallisation a lieu à $-12^{\circ}C$, en bain de glace/acétone. Les cristaux sont essorés, puis séchés sous vide.

EXTRACTION ET PURIFICATION DU DNA

Méthode de "MARMUR*" modifiée.

I. Solutions employées :

- . EDTA salin : 0,15 M NaCl + 0,1 M EDTA, pH 8.
L'EDTA et le pH élevé inhibent l'activité DNasique.
- . Sodium Lauryl sulfate ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{26}\text{SO}_4$) : solution à 10%.
Le détergent anionique lyse la plupart des cellules, inhibe les enzymes et dénature quelques protéines.
- . Lysosyme, cristallin.
Lyse les cellules résistant au S.D.S.
- . Perchlorate de sodium : 5 M.
La forte concentration en NaClO_4 facilite la dissociation des acides nucléiques et des protéines.
- . Chloroforme-alcool isoamylique, 24:1 (v/v).
Sert à la déprotéinisation. Le chloroforme provoque une dénaturation en surface des protéines. L'alcool isoamylique diminue la quantité de mousse, facilite la séparation et maintient la stabilité des différentes couches centrifugées.
- . Alcool éthylique, 99%.
Précipite les acides nucléiques après déprotéinisation.
- . Citrate salin (SSC) : 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate trisodique, pH 7,0 \pm 0,2.
Maintient la force ionique du DNA dissous et complexe les ions divalents.
- . Citrate salin dilué (0,1 x SSC) : 0,015 M NaCl + 0,0015 M citrate trisodique.
Le DNA se dissout plus vite dans les solutions salines diluées, mais jamais dans l'eau pure.
- . Citrate salin concentré (10xSSC) : 1,5 M NaCl + 0,15 M citrate trisodique. Solution mère.

* MARMUR, J. J.Mol.Biol. (1961), 3, 208-218.

- . RNase, 0,2% : 2 mg/ml dans 0,15 M NaCl, pH 5.
La solution est chauffée à 80°C pendant 10 minutes pour inactiver la DNase
- . Acétate-EDTA : 3 M acétate de sodium + 0,001 M EDTA, pH 7.
Donne l'environnement ionique nécessaire pour l'étape à l'isopropanol.
- . Isopropanol.
Précipite sélectivement le DNA. Le RNA reste en solution.

II. Protocole expérimental.

- obtention des noyaux : les cellules ou le tissu sont homogénéisés dans 10 volumes d'acide citrique 0,025 M, pendant 2 minutes.
L'homogénat est filtré et centrifugé à 2000 tours/mn pendant 5 minutes.
Le culot de noyaux est lavé plusieurs fois à l'acide citrique.
- les noyaux sont neutralisés par du Tris HCl 0,5 M, pH 7,5, et suspendus dans 10 volumes d'EDTA salin.
On ajoute alors le SDS 10% → 2% final.
- agitation pendant une heure.
- on ajoute le NaClO_4 5 M → 1 M final.
- déprotéinisation : par le chloroforme-alcool isoamylique, 24:1
On recouvre 30 minutes en agitant. Le mélange est ensuite centrifugé 5 minutes à 5000 tours/mn.
La phase aqueuse, qui contient le DNA, est récupérée, et redéprotéinisée plusieurs fois.
- le DNA est précipité par deux volumes d'éthanol ajoutés à la phase aqueuse finale. Les fibres sont enroulées sur baguette de verre. Le DNA est essoré et dissous dans le SSC.
- on ajoute la RNase : 50 µg/ml. On incube à 37°C pendant 30 mn.
- on ajoute de la pronase : 50 µg/ml. On incube à 37°C pendant 2 heures.
- on déprotéinise plusieurs fois.
- le DNA est précipité par 2 volumes d'éthanol, puis dissous dans 0,1 x SSC + 1/9 volume d'acétate-EDTA.

- on ajoute, sur agitateur vibrant, 0,5 volume d'isopropanol, et le DNA est enroulé
- on lave le DNA avec de l'éthanol à 70 %, puis à 90 %.
- le DNA est dissous dans du tampon, et conservé à - 20°C.

TECHNIQUES ANALYTIQUES

I. La spectroscopie d'absorption.

1) Théorie.

Si on envoie sur un échantillon de matière une lumière de fréquence convenable, il y a absorption de l'onde. L'absorption par une molécule d'une radiation lumineuse correspond, à l'échelle moléculaire, à une transition énergétique. L'énergie est reliée à la fréquence de l'onde absorbée par la relation d'Einstein :

$$\underbrace{E_f - E_i}_{\Delta E} = h \nu_0$$

ΔE : différence d'énergie

h : constante de Planck

ν_0 : fréquence de l'onde absorbée.

Dans le cas des transitions électroniques, les énergies échangées sont élevées, et le domaine spectral concerné se situe dans la région visible-ultra-violet (faibles longueurs d'onde). Par contre la région infra-rouge du spectre (grandes longueurs d'onde) correspond à de faibles énergies échangées : ce sont les mouvements de rotation-vibration, pendant lesquels la molécule reste toujours dans le même état électronique.

La variation d'intensité lumineuse due à l'absorption répond à l'équation :

$$I = I_0 e^{-2,3 \epsilon c l}$$

I_0 : intensité de la lumière incidente.

I : intensité de la lumière transmise.

ϵ : coefficient d'extinction molaire en $\text{mole}^{-1} \times \text{l} \times \text{cm}^{-1}$

c : concentration en mole/l.

l : longueur du trajet optique en cm.

Dans ces conditions, l'absorbance est définie par la loi de Beer-Lambert :

$$D.O. = \epsilon lc$$

D.O. : densité optique ou absorbance.

Le coefficient d'extinction molaire ϵ est caractéristique, à une longueur d'onde donnée, d'un composé donné, dans une conformation donnée.

Par exemple, le coefficient d'extinction molaire du DNA de thymus de Veau à l'état natif, à 260 nm, est caractéristique d'un DNA double hélice :

$$\epsilon_{260} = 6600 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1} \text{ de P. l.}$$

La concentration du DNA est toujours exprimée en mole de Phosphore/l.

Du point de vue expérimental, on mesure la densité optique en fonction de la longueur d'onde. On obtient alors un spectre d'absorption, qui est constitué d'une succession de bandes correspondant aux différentes transitions énergétiques.

2) Application à l'étude de l'interaction DNA-cancérogène.

En appliquant la loi de Beer-Lambert, il est possible de doser un composé dans une conformation donnée, si l'on connaît la valeur de son ϵ à une longueur d'onde donnée. Dans le cas de l'interaction DNA-cancérogène, la spectroscopie d'absorption permet d'obtenir des renseignements sur les modifications structurales éventuelles du DNA et du cancérogène, par observation de variations des ϵ correspondants. La variation de la position des maxima d'absorption est également le signe de la perturbation.

a) au niveau du DNA.

Le spectre d'absorption du DNA présente une bande à 260 nm. La fixation du cancérogène sur ce DNA peut entraîner des modifications dans la conformation et la stabilité de la macromolécule. Une ouverture partielle de la double hélice se manifeste en spectroscopie d'absorption par deux effets liés :

- une hyperchromicité à 260 nm.

- une variation notable de la température de fusion, en fonction du pourcentage de cancérogène fixé.

L'interprétation de tels faits nécessite quelques rappels :

. L'hyperchromicité caractérise l'augmentation du ϵ d'un composé sans qu'il y ait variation de sa concentration. Dans le cas du DNA, le passage de l'état double hélice à l'état simple chaîne s'accompagne d'une augmentation notable de la D.O. à 260 nm. C'est ce qui se produit quand on chauffe un DNA jusqu'à environ 90°C. Il y a séparation des deux chaînes, par rupture des liaisons hydrogène, ce qui se traduit par une hyperchromicité. On dit qu'il y a eu dénaturation thermique du DNA.

. Température de fusion (Voir figure 51).

Si l'on trace la courbe $D.O._{260} = f(T)$, on observe un point d'inflexion qui correspond à la température de fusion T_f du DNA. La valeur de T_f est caractéristique d'un DNA donné, puisqu'elle est fonction du pourcentage en bases (G-C) qu'il contient.

La température de fusion d'un DNA donné dépend également de la force ionique du milieu, c'est-à-dire de l'état dynamique de la macromolécule.

On conçoit qu'une désorganisation partielle de la double hélice entraîne des modifications dans sa courbe de fusion, c'est-à-dire une température T_f différente de celle d'un DNA qui au départ est natif.

La détermination précise des températures de fusion a nécessité l'emploi d'un microcalculateur pour le contrôle de la température, et le traitement numérique des mesures. Cette technique a pour avantage d'optimiser la précision et de faciliter la détermination de la température de fusion. Celle-ci correspond au maximum de la courbe $\frac{d(D.O.)}{dT} = f(T)$ tracée par le calculateur*.

b) au niveau du cancérogène.

Les perturbations apportées dans son spectre d'absorption peuvent être attribuées à l'influence du champ interne de la double hélice. Cet effet sera d'autant plus important que le cancérogène sera introduit profondément à l'intérieur de la macromolécule. La petite molécule à l'état fixé subit alors cet

* La description détaillée du principe de l'appareillage est donnée dans le Mémoire présenté par Gérard Lecocq pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies (option Electromagnétisme et systèmes micro-onde) (1977).

BUS
LILLE

D.O. 200nm

$\frac{d(p.o.)}{dT}$

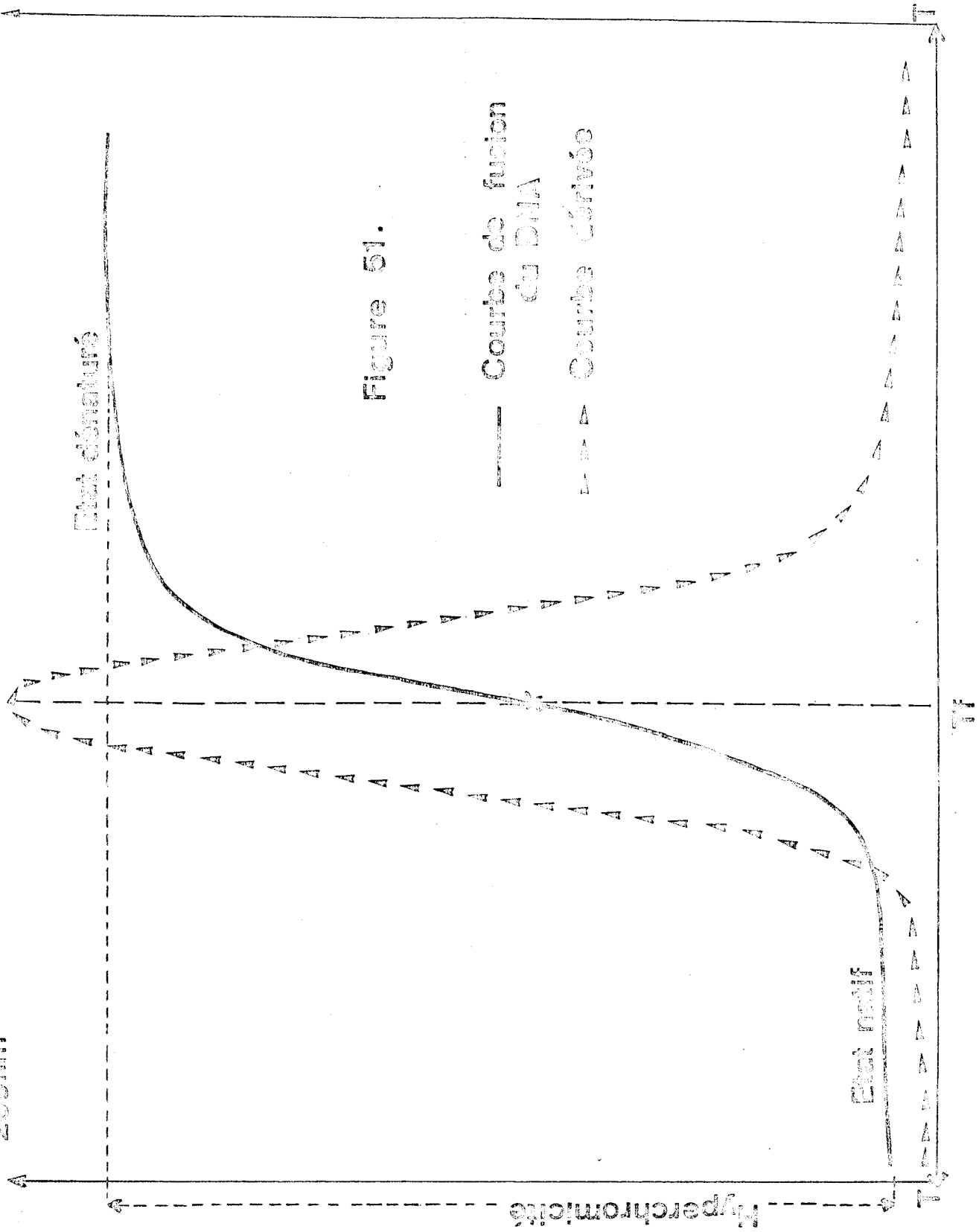
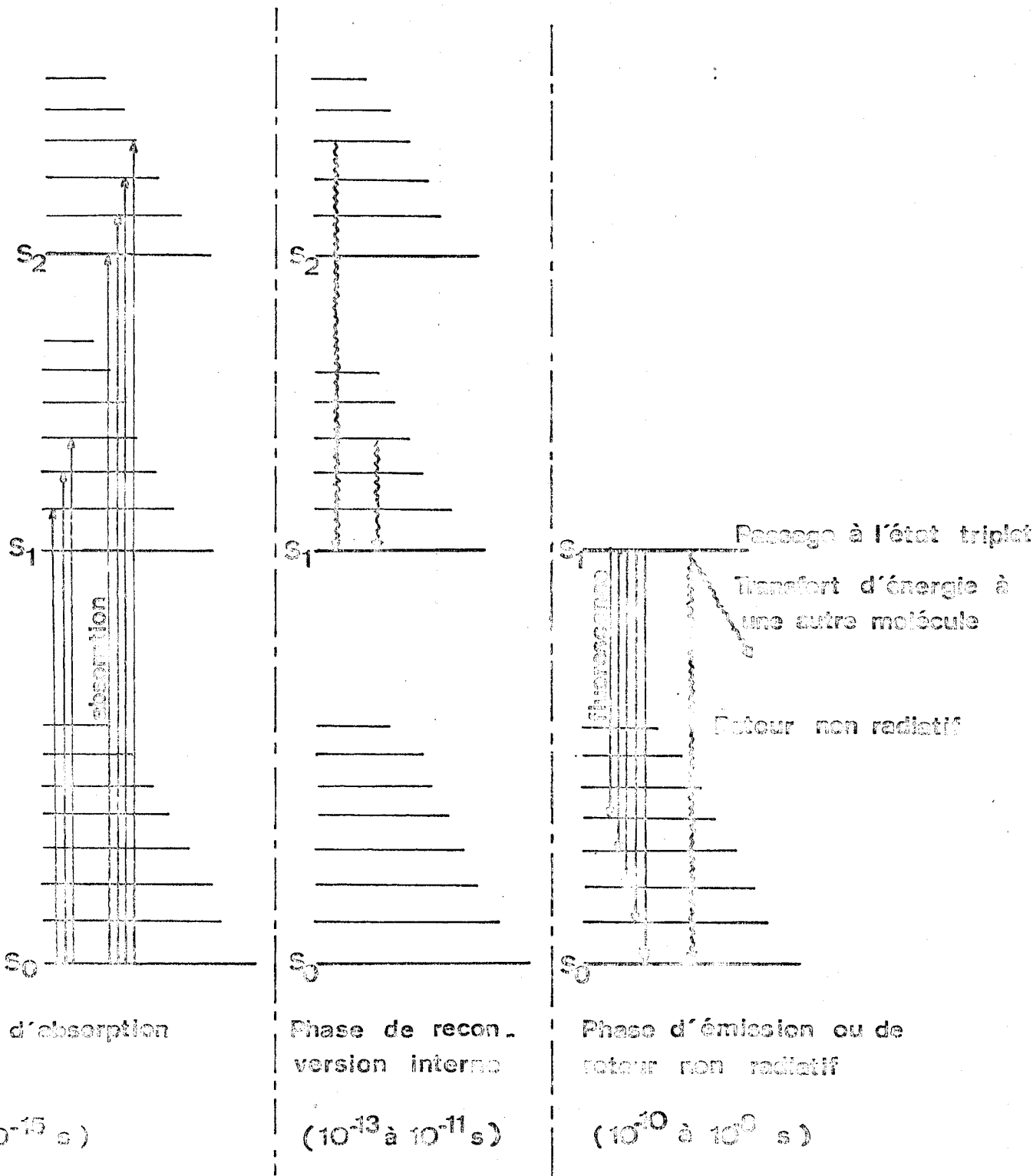


Figure 51.

— Courbe de fusion
du D11A
- - - Courbe dérivée



SCHEMA DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE.

Figure 52



environnement électronique, ce qui explique qu'elle puisse donner un spectre d'absorption différent.

On conçoit donc que le ϵ du cancérogène à l'état fixé doit être différent du ϵ du cancérogène à l'état libre.

II. La fluorescence.

1) Théorie.

La fluorescence est un phénomène de photoluminescence mettant en jeu des changements dans la distribution électronique au sein d'une molécule.

Si l'on considère les énergies associées aux différents états électroniques d'une molécule, on peut construire un diagramme des niveaux énergétiques (Voir Figure 52). Le niveau d'énergie le plus faible correspond à l'état fondamental de la molécule, les autres sont relatifs aux états excités.

Parmi ceux-ci on distingue deux catégories : les états singulet et les états triplet.

Les états singulet diffèrent des états triplet par le fait qu'il peuvent être atteints directement par absorption d'une radiation lumineuse. C'est au niveau des états singulet que s'exprime le phénomène de fluorescence.

Il y a tout d'abord une phase d'absorption de la lumière et selon la longueur d'onde envisagée, la molécule se trouve dans l'un des états excités singulet. En réalité, la molécule ne peut rester dans un état excité élevé et des processus de reconversion d'énergie intramoléculaires la ramènent au plus bas niveau vibrationnel du premier état excité singulet. La molécule possède alors une stabilité suffisante pour y demeurer, suivant les conditions de 10^{-10} à 10^{-8} secondes.

Le retour au plus bas niveau énergétique de l'état fondamental peut se faire de trois façons parmi lesquelles la fluorescence : émission d'une radiation lumineuse ramenant la molécule à l'un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental, suivie d'une reconversion interne conduisant au plus bas niveau vibrationnel.

Le phénomène de fluorescence est concurrencé par deux autres possibilités de retour à l'état fondamental (Voir Figure 52) :

- Reconversion d'énergie soit au sein de la molécule, soit avec les autres molécules du milieu, sous forme d'énergie de rotation ou de vibration. Ce sont les transitions non radiatives.
- Transfert de l'énergie à une autre molécule, qui passe alors, à son tour, dans un état électronique excité.

La durée de vie du premier état excité est donc une grandeur importante car c'est durant cet intervalle de temps que doivent agir ces deux phénomènes physiques modifiant l'émission de fluorescence.

Un produit fluorescent est également caractérisé par son rendement quantique de fluorescence ϕ .

$$\phi = \frac{\text{nombre de photons émis par fluorescence}}{\text{nombre de photons absorbés}}$$

2) Spectres obtenus.

D'après le diagramme des niveaux d'énergie, on voit que le spectre d'émission de fluorescence se situe toujours dans un domaine de fréquences inférieures à celui du spectre d'absorption.

On distingue deux sortes de spectres :

- le spectre d'émission de fluorescence : c'est la variation de l'intensité émise à une longueur d'onde excitatrice donnée, en fonction de la longueur d'onde.
- le spectre d'excitation de fluorescence : c'est la variation de l'intensité d'émission à une longueur d'onde émettrice fixée, en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

III. L'anisotropie optique : le dichroïsme et la biréfringence linéaires.

1) Aspect général.

Les phénomènes de dichroïsme et de biréfringence linéaires s'observent en milieu anisotrope : on applique une force au milieu, ce qui oriente arbitrairement les macromolécules.

La force d'orientation peut être :

. soit un champ électrique : on parle alors de dichroïsme et de biréfringence électriques.

. soit un flux d'écoulement : c'est le phénomène de dichroïsme et de biréfringence d'écoulement.

L'échantillon est éclairé en lumière polarisée; l'orientation des chromophores par rapport à la direction de la force appliquée est alors à l'origine du dichroïsme linéaire, et de la biréfringence qui en découle. Ce dernier phénomène est connu également sous le nom d'effet Kerr.

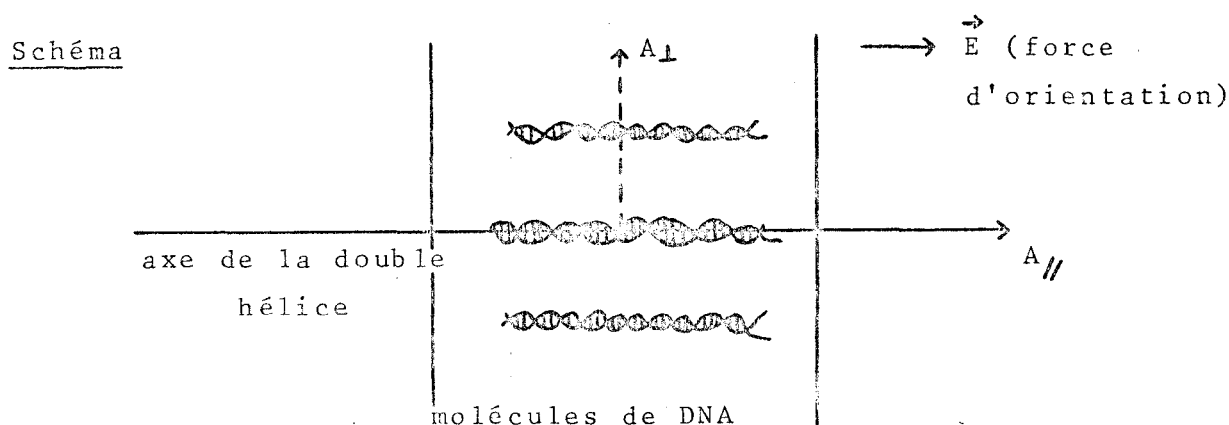
La théorie générale, et l'appareillage employé sont parfaitement décrits dans l'ouvrage de E. Frédéricq et C. Houssier^{*}, dans le cas d'une force appliquée électrique.

2) Cas d'une force d'orientation électrique : application à l'interaction ligand-macromolécule.

a) Le dichroïsme électrique.

Si la macromolécule est allongée, elle s'oriente le plus souvent suivant son grand axe, et dans une direction parallèle à celle du champ électrique \vec{E} .

La lumière polarisée est envoyée sur la cellule de Kerr, et l'absorption de l'onde, dans les directions parallèle et perpendiculaire, est d'autant plus élevée que la direction du moment de transition concerné est parallèle à celle du champ électrique \vec{E}' de la lumière incidente.



* FREDERICQ, E. and HOUSIER, C. Electric Dichroism and Electric Birefringence (1973) Clarendon, Oxford.

Dans le cas du DNA, représenté sur ce schéma, les moments de transition concernés sont ceux des transitions π , situés dans le plan des bases; ces plans sont perpendiculaires à l'axe de la double hélice.

Schématiquement, l'absorption de la lumière sera donc maximale dans la direction perpendiculaire à la force électrique \vec{E} , et nulle dans la direction parallèle à cette même force :

$$A_{\perp} > A_{//}$$

A_{\perp} : absorbance dans la direction perpendiculaire.

$A_{//}$: absorbance dans la direction parallèle.

On obtient donc un dichroïsme négatif :

$$\Delta A = A_{//} - A_{\perp} < 0$$

Pour une même intensité du champ électrique \vec{E} , la valeur du dichroïsme d'un DNA ayant réagi avec un cancérogène, par comparaison à celle d'un DNA témoin, peut donner des renseignements sur l'altération éventuelle de la macromolécule.

D'autre part, si la chaîne est totalement orientée, il existe une relation entre le dichroïsme, l'absorbance et l'angle α que fait le moment de transition concerné avec l'axe d'orientation, c'est-à-dire l'axe de la double hélice, dans le cas du DNA :

$$\left(\frac{\Delta A_S}{A} \right)_{\lambda} = \frac{3}{2} \cdot (3 \cos^2 \alpha - 1) \quad (1)$$

ΔA_S : dichroïsme électrique à saturation (orientation totale).

A : absorbance.

λ : longueur d'onde à laquelle on observe le phénomène.

α : angle défini précédemment, mesuré en degrés.

En pratique, on utilise le dichroïsme réduit, l'orientation des macromolécules n'étant jamais parfaite :

$$\left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{\lambda} = \phi \cdot \frac{\Delta A_S}{A}, \quad 0 < \phi < 1 \quad (2)$$

ϕ : fonction d'orientation.

La relation (1) se transforme alors de la façon suivante :

$\left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{\lambda} = \frac{3}{2} (3 \cos^2 \alpha - 1) \cdot \phi \quad (3)$ <p>dichroïsme réduit</p>	(3)
---	-----

Dans le cas d'un cancéroène fixé au DNA, si l'on envoie sur l'échantillon orienté une lumière de longueur d'onde convenable, on pourra déterminer α , connaissant les valeurs des ΔA données par l'appareil, et celle de l'absorbance fournie par le spectre d'absorption.

On effectue en réalité la mesure de la façon suivante :

. une première série de mesures dans la bande du DNA, à 260 nm, donne des valeurs de $\left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{260\text{nm}}$; il y correspond un

angle α_1 .

. une deuxième série de mesures, dans la zone d'absorption du cancéroène, fournit le $\left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{\lambda \text{ cancéroène}}$; il y correspond

un angle α_2 .

La valeur de α_2 est alors obtenue en faisant le rapport de deux équations :

$$\left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{260\text{nm}} = \frac{3}{2} \phi \cdot (3 \cos^2 \alpha_1 - 1) \quad (4)$$

$$\left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{\lambda \text{ cancéroène}} = \frac{3}{2} \phi \cdot (3 \cos^2 \alpha_2 - 1) \quad (5)$$

Statistiquement $\alpha_1 \approx 90$ degrés, ce qui donne l'équation suivante :

$$\frac{(\Delta A/A)_{\text{cancérogène}}}{(\Delta A/A)_{\text{bases}}} = (1 - 3 \cos^2 \alpha_2) \quad (6)$$

La mesure de α_2 donne donc la position du moment de transition du cancérogène par rapport à l'axe de la double hélice. Connaissant l'orientation de cette transition dans la petite molécule, on peut ainsi déterminer la position du cancérogène dans la macromolécule.

On utilise en pratique du DNA soniqué, de façon à pouvoir assimiler la macromolécule à un batonnet rigide.

b) La biréfringence électrique.

Si l'absorption de la lumière est différente suivant la direction de polarisation, les indices de réfraction sont donc différents, les vitesses de propagation de la lumière n'étant pas les mêmes. C'est le phénomène de biréfringence, ou double réfraction, ou effet Kerr :

$$\Delta n = n_{//} - n_{\perp}$$

Δn : biréfringence.

$n_{//}$: indice de réfraction dans la direction parallèle.

n_{\perp} : indice de réfraction dans la direction perpendiculaire.

De la même manière que pour le dichroïsme, on utilise la biréfringence réduite :

$$\Delta n_{\text{réduit}} = \phi \cdot \Delta n_S, \quad 0 < \phi < 1$$

Δn_S : biréfringence à saturation.

ϕ : fonction d'orientation.

La mesure de la biréfringence donne des renseignements sur la structure globale de la macromolécule.

L'intérêt d'une telle mesure est que les effets observés en biréfringence sont plus accentués que ceux obtenus en dichroïsme. La valeur du Δn donne donc une idée plus précise de la perturbation structurale éventuelle du DNA.

La mesure sur le DNA est effectuée dans la région visible, à 550 nm. La biréfringence obtenue est négative, l'effet des bandes du DNA à 260 nm se répercutant encore à cette longueur d'onde.

En pratique, on calcule les valeurs de $\frac{\Delta n}{A_{260}}$, pour différentes valeurs de l'intensité du champ électrique E, et on trace la courbe :

$$\left(\frac{\Delta n}{A} \right)_{550 \text{ nm}} = f(E) \quad (7)$$

Δn : biréfringence réduite donnée par l'appareil.

A : absorbance. à 260 nm.

E : mesurée en kV/cm.

La comparaison de la courbe obtenue pour un DNA natif témoin, avec celle donnée par un DNA modifié par un cancérogène, indique l'ampleur de la perturbation induite dans la double hélice, par la fixation de la petite molécule.

