

50376
1979
54

50376
1979
54

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR 3^e CYCLE

par

Bernard BAILLEUL

ETUDE DE LA FIXATION DU O,O'-DIACETYL-4-HYDROXYAMINOQUINOLEINE -1-OXYDE SUR LE DNA A L'AIDE DES NUCLEOSIDES PURIQUES



Soutenu le 18 octobre 1979, devant la Commission d'Examen
Membres du Jury :
Président M. C. LOUCHEUX
Rapporteur M. G. BISERTE
Examineur M. J. LHOMME
Membre invité M. R. FUCHS
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. BEUFILS 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. DERCOURT 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 |
| Mle 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 | Biologie 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 |

Mlle SPIK Geneviève
M. STERBOUL François
M. TAILLIEZ Roger
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. WALLART Francis
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Biochimie
Informatique
Biologie
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Chimie
Algèbre

Ce travail a été effectué à l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille, où Monsieur le Professeur G.BISERTE a bien voulu m'accueillir. Je tiens à le remercier très vivement pour la confiance qu'il m'a témoignée et lui exprime mes sentiments dévoués et respectueux.

Madame M.H.LOUCHEUX, Maître de Recherche au CNRS, m'a proposé le sujet de cette thèse et en a suivi la progression avec le plus grand intérêt; je suis très heureux de la compter aujourd'hui parmi mes juges.

Je la remercie de tout coeur.

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. Je tiens à lui exprimer ici mes respectueux remerciements.

C'est aussi un plaisir pour moi d'avoir Monsieur le Professeur G.BISERTE comme rapporteur dans mon jury. Je tiens à l'en remercier de nouveau.

Je tiens aussi à remercier vivement Monsieur J.LHOMME, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, à la fois pour avoir accepté d'examiner ce travail et aussi pour les nombreux conseils qu'il m'a prodigués. Je tiens particulièrement à lui exprimer ma reconnaissance pour son aide constante et ses nombreux conseils qui m'ont permis mon initiation à la chimie.

Je remercie également Monsieur R.FUCHS d'avoir accepté de juger ce travail.

J'associe à mes remerciements, Monsieur B.ROQUES, Professeur à l'Université René Descartes à Paris, pour avoir permis la réalisation des études en RMN.

Les études en HPLC présentées dans ce travail ont été réalisées à l'IRCL, dans le laboratoire de Monsieur P.SAUTIERE, Maître de Recherche au CNRS. Qu'il en soit ici remercié. Je remercie aussi toute son équipe pour leur accueil chaleureux.

Je remercie également Monsieur P.RICARD pour avoir effectué les études en spectrométrie de masse.

Je ne saurais oublier les chercheurs du laboratoire de Monsieur J.LHOMME, pour leur accueil lors de la collaboration très enrichissante que nous entretenons depuis deux ans environ.

J'associe à mes remerciements tous mes camarades de laboratoire et particulièrement Mademoiselle S.GALIEGUE, pionnier du 4NQO dans notre laboratoire, pour les nombreuses discussions très intéressantes que nous avons eues ensemble.

Je remercie aussi Madame M.P.HILDEBRAND qui a bien voulu se charger avec soin de la dactylographie de cette thèse, Madame SAINLEGER qui en a réalisé l'impression, ainsi que Madame GARET pour les reproductions qui illustrent cette thèse.

C'est en partie la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique qui m'a permis, grâce à une allocation de recherche, d'effectuer ce travail.

Je la remercie.

PLAN

| | Pages |
|---|-------|
| INTRODUCTION | 1 |
| PREMIERE PARTIE : GENERALITES | |
| <i>LA CANCEROGENESE CHIMIQUE</i> | 3 |
| <i>CHAPITRE I : L'INITIATION</i> | 5 |
| 1) Métabolisme des précancérogènes. | |
| 2) Interaction des cancérogènes chimiques avec les acides nucléiques. | |
| <i>CHAPITRE II : LA REPARATION</i> | 9 |
| 1) Les réparations correctes. | 9 |
| 2) Les lésions non réparées. | 11 |
| 3) La réparation défectueuse. | 12 |
| <i>CHAPITRE III : LES FACTEURS MODIFIANT L'ACTION D'UN CANCEROGENE CHIMIQUE</i> | 17 |
| 1) Historique. | 19 |
| 2) Promoteurs. | 20 |
| 3) Hypothèse de mode d'action. | 21 |
| DEUXIEME PARTIE : LE 4NQO | 25 |
| <i>CHAPITRE I : PROPRIETES BIOLOGIQUES</i> | 26 |
| <i>CHAPITRE II : LE METABOLISME DU 4NQO</i> | 28 |
| <i>CHAPITRE III : LES LESIONS SUR LE DNA</i> | 33 |

TROISIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

36

CHAPITRE I : PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|--|----|
| 1) Les cancérogènes. | 39 |
| a) Le 4NQO. | 39 |
| b) Le 4HAQO. | 39 |
| c) Le di Ac-4HAQO. | 39 |
| d) Le di Ac-4HA [2- ³ H]QO. | 40 |
| e) Le di ³ H Ac-4HAQO. | 41 |
| 2) Préparation des solutions. | 42 |
| a) Lors de l'étude de la réactivité du di Ac-4HAQO. | 42 |
| b) Lors de l'étude de la réaction di Ac-4HAQO-DTT (Préparation de Ac-4 HAQO) | 43 |
| c) Lors de l'étude de la réactivité de l'Ac-4 HAQO. | 44 |
| 3) Méthodes de séparation. | 44 |
| 4) Méthodes spectroscopiques utilisées. | 45 |
| a) La RMN. | 45 |
| b) La spectroscopie IR. | 46 |
| c) La spectrométrie de masse. | 46 |
| 5) Utilisation d'isotopes radioactifs. | 46 |

CHAPITRE II : RESULTATS

49

| | |
|--|----|
| 1) Etude du di Ac-4HAQO. | 49 |
| a) Synthèse du di ³ H Ac-4HAQO. | 49 |
| b) Demi durée de vie du di Ac-4HAQO. | 50 |
| c) Hydrolyse du di Ac-4HA2 ³ H QO. | 51 |
| d) Hydrolyse du di ³ H Ac-4HAQO. | 53 |
| 2) Etude structurale d'un composé monoacétylé : le composé 7 (l'Ac-4HAQ.) | 54 |

| | Pages |
|---|--------|
| 3) Etude d'un autre dérivé monoacétylé : l'acétoxyaminoquinoléine-1-oxyde. | 56 |
| a) Synthèse de l'Ac-4HAQO à l'aide de la réaction di Ac-4HAQO-DTT. | 56 |
| b) Hydrolyse aqueuse de l'Ac-4HAQO. | 60 |
| 4) Fixation du cycle quinoléine sur les nucléosides puriques. | 64 |
| a) Réaction ^{14}C guanosine-di Ac-4HAQO. | 65 |
| b) Réaction 8- ^3H guanosine-di Ac-4HAQO. | 66 |
| c) Réaction ^{14}C guanosine-Ac-4HAQO. | 68 |
| d) Réaction ^{14}C adénosine-di Ac-4HAQO. | 70 |
| e) Réaction ^{14}C adénosine-Ac-4HAQO. | 71 |
| f) Réaction 2- ^3H adénosine-di Ac-4HAQO. | 71 |
| 5) Fixation du groupement acétyle sur les nucléosides puriques. | 72 |
| a) Réaction nucléosides puriques- di ^3H Ac-4HAQO. | 72 |
| b) Réaction nucléosides puriques- ^3H Ac-4HAQO. | 73 |
| 6) Comparaison <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> . | 74 |
| a) Hydrolyse et chromatographie des DNA modifiés <i>in vivo</i> . | 76 |
| b) Hydrolyse et chromatographie des DNA obtenus <i>in vitro</i> . | 77 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 79 |
| BIBLIOGRAPHIE | 81 |
| APPENDICE TECHNIQUE | 1 |

GLOSSAIRE

| | |
|---------------------|---|
| - AAF | acétylamino fluorène |
| - Ac ₂ O | anhydride acétique |
| - Ac-4HAQ | 4-acétoxyaminoquinoléine |
| - Ac-4HAQO | 4-acétoxyaminoquinoléine-1-oxyde |
| - 4AQ | 4-aminoquinoléine |
| - 4AQO | 4-aminoquinoléine-1-oxyde |
| - di Ac-4HAQO | O-O'-diacétyl-4-hydroxyaminoquinoléine-1-oxyde |
| - DMSO | diméthylsulfoxyde |
| - DNA | acide désoxyribonucléique |
| - DTT | dithiotréitol |
| - ³ H | tritium |
| - 4HAQO | 4-hydroxyaminoquinoléine-1-oxyde |
| - HPLC | chromatographie liquide haute performance |
| - IR | infra-rouge |
| - N Ac AAF | N-acétoxy acétylamino fluorène |
| - N OH AAF | N-hydroxyamino fluorène |
| - 4NQO | 4-nitroquinoléine-1-oxyde |
| - 4-O méthyl TPA | 4-O-méthyl-12-O tétradécanoylphorbol-13-acétate |
| - RMN | résonance magnétique nucléaire |
| - RNA | acide ribonucléique |
| - SCE | échange de chromatides-soeurs |
| - SV 40 | Simian virus 40 |
| - TMS | triméthylsilane |
| - TPA | 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate |
| - UV | ultra-violet |
| - X.P. | <i>Xéroderma Pigmentosum</i> |

INTRODUCTION

Le cancer pose un double problème : le premier est de savoir par quoi il est induit, et le second, comment il l'est. Le premier problème semble être partiellement résolu depuis la découverte de produits chimiques et de virus capables de transformer des cellules normales en cellules cancéreuses. Dans le cas de la cancérogénèse par une substance chimique, des concepts ont été émis qui pourraient nous permettre de comprendre comment le cancer peut être induit.

J.A. Miller et E.C. Miller ont particulièrement contribué à l'établissement de ces concepts qui sont les suivants : les cancérogènes chimiques par activation dans l'organisme sont transformés en agents très réactifs. Ces composés ainsi formés sont susceptibles de se fixer sur les macromolécules cellulaires (RNA, DNA, protéines). Enfin, il semble que la fixation d'une substance chimique sur le DNA (génome de la cellule) pourrait être responsable de la cancérisation. En effet, une lésion sur le DNA peut provoquer par mutation du génome la transformation cellulaire.

Cependant, en réalité, ce schéma n'est pas simple. Mais il est très probable qu'il soit proche de la réalité puisqu'il existe une corrélation bien démontrée entre composés mutagènes et cancérogènes.

Il semble donc nécessaire de multiplier les études concernant la structure des différentes lésions causées par un cancérogène, et de connaître la ou les lésions qui induisent les mutations. En effet, la cellule possède des enzymes capables de réparer des lésions, mais malheureusement ces systèmes ne sont pas efficaces à 100%.

Nous avons donc choisi d'étudier la cancérogénèse chimique par le 4NQO (4 nitroquinoléine-1-oxyde) qui, comme nous le verrons, représente un modèle intéressant.

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

LA CANCEROGENESE CHIMIQUE

A l'heure actuelle, il semble bien démontré que la plupart des cancers soient d'origine chimique ; en particulier, 80 à 90 % des cancers chez l'Homme seraient dûs à l'environnement (60, 56) ; et depuis l'observation par l'anglais Pott en 1775 (76), d'une fréquence anormalement élevée des tumeurs du scrotum chez les ramoneurs, la liste des cancérogènes chimiques chez l'Homme ne fait que s'allonger (voir Tableau A) (97).

Ce n'est cependant que depuis une dizaine d'années que des concepts généraux ont été élaborés, et cela grâce à l'étude complète des mécanismes d'action de certains cancérogènes chimiques. Le premier de ces concepts est le suivant : les cancérogènes chimiques sont métabolisés dans la cellule, afin d'être éliminés de l'organisme sous forme hydrosoluble. Cependant ils peuvent aussi être aiguillés vers des systèmes enzymatiques activateurs qui les transforment, au sein de la cellule, en électrophiles puissants. Ces agents électrophiles se fixent directement et de façon covalente sur les macromolécules cellulaires (DNA, RNA, protéines), en modifiant le bon fonctionnement de la cellule. Ceci est le deuxième concept de la cancérogénèse chimique. Cette étape est appelée initiation.

On distingue deux classes de cancérogènes chimiques : les agents alkylants qui ne nécessitent aucune activation dans la cellule, et les précancérogènes, appelés ainsi parce qu'ils doivent être métabolisés dans la cellule (voir Tableau B).

Le DNA semble être une des plus importantes macromolécules-cible : sa modification par un cancérogène peut en effet, être à l'origine de l'apparition d'une cellule qui prolifère anarchiquement, signe caractéristique de la cellule cancéreuse. La thèse des mutations pour l'initiation de la cancérisation est étayée par toute une série d'observations, mais en l'absence de preuve directe, elle reste une hypothèse et on ne peut éliminer la possibilité d'une cancérogénèse à l'aide de facteurs épigénétiques.

Agents chimiques

Sites de formation de la tumeur

Composé naturel

Aflatoxine

foie

Composés industriels

4-aminobiphényle

vessie

benzène

système hémopoïétique

benzidine

vessie

(4,4'-diaminobiphényle)

chlorure de vinyle

foie

disulfure de chloroéthyle

poumons, larynx

éther dichlorométhylque

poumons

2 naphtylamine

vessie

Composés d'origine médicale

chloroamphénicol

système hémopoïétique

cyclophosphamide

vessie

diethylstilbestrol

utérus, vagin

melphalan

système hémopoïétique

N,N-Bis (2 chloroethyl)-2-

naphtylamine

vessie

oxymetholone

foie

phenacetine

rein

phenytoine

tissu lymphoréticulaire
(ganglions)

Classes de composés

amiante

poumons, plèvre, péritoine

arsenic

peau, poumons, foie

cadmium

poumons, prostate

chrome

poumons, cavité nasale

nickel

poumons, cavité nasale

Mélange de composés

fumée de cigarette

poumons, appareil urinaire, pancreas

goudrons, suie

poumons, peau

huiles isopropyliques

larynx, cavité nasale

Heureusement, la cellule possède des enzymes qui peuvent réparer les lésions de son DNA. Cette réparation n'est pas forcément parfaite, et c'est la persistance ou la mauvaise réparation de ces lésions, qui, très probablement, est la cause de la modification future de la cellule. La réparation du DNA est donc l'étape finale de l'initiation. Par conséquent, de nombreuses études ont été entreprises pour connaître les différents systèmes de réparation du DNA.

Un autre problème important de la cancérisation concerne le temps de latence, qui peut être très long, entre le moment où la cellule est exposée au cancérogène, et l'apparition de la tumeur. Cette observation a permis à Berenblum en 1941 de concevoir un nouveau mécanisme de tumorigénèse qui se ferait en deux étapes (7) : l'initiation, puis la promotion. Ce serait cette deuxième étape qui transformerait la cellule initiée en cellule cancéreuse.

Comme nous le verrons, (Chapitre III, page 17), le mode d'action de la promotion, s'il est admis par un nombre de plus en plus grand de chercheurs, n'est cependant pas encore élucidé à ce jour.

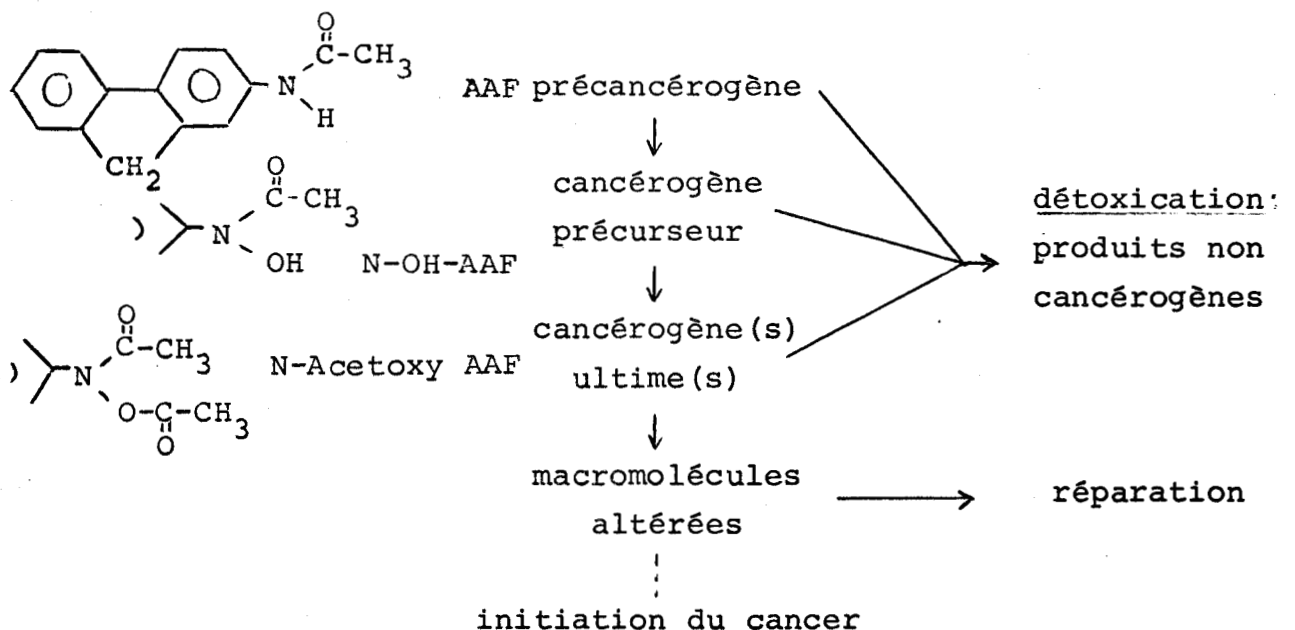
CHAPITRE I . L'INITIATION

1) Métabolisme des précancérogènes.

La notion de métabolisme des cancérogènes chimiques par les systèmes enzymatiques de la cellule est maintenant parfaitement acceptée. Cette hypothèse avait été clairement énoncée par Miller en 1970 (60).

Bien que beaucoup de substances soient reconnues comme cancérogènes, on ne connaît à l'heure actuelle, que le métabolisme d'un très petit nombre de cancérogènes, comme par exemple, l'acétylaminofluorène (AAF) (18), le benzo(a)pyrène (50), le safrole (39), l'aflatoxine (51).

Les précancérogènes sont modifiés par des systèmes enzymatiques qui les convertissent, soit en métabolites inactifs (détoxication), soit en un ou plusieurs cancérogènes ultimes. Nous ne nous étendrons pas sur ces systèmes d'activation, et rappellerons simplement, dans le schéma ci-dessous, le concept général qui illustre ces mécanismes. Nous donnerons, comme exemple, l'activation métabolique d'un cancérogène chimique qui a fait l'objet de nombreuses études, l'AAF



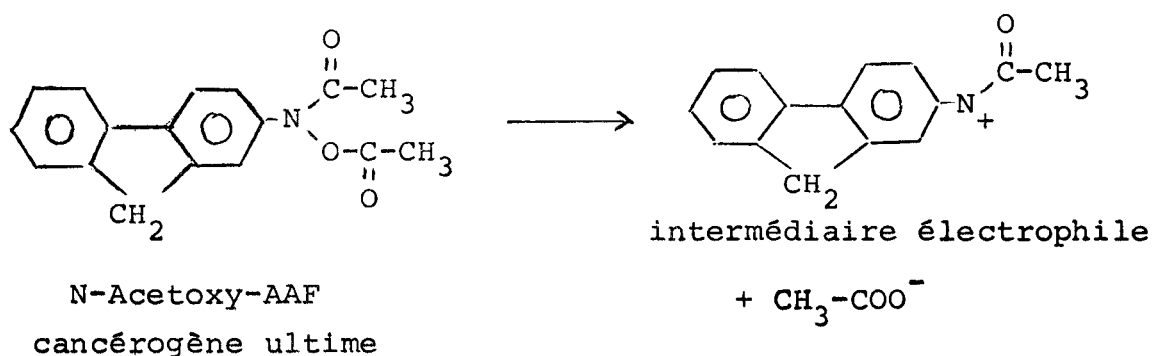
Le fait que les réactions intervenant lors de l'activation soient enzymatiques, explique la spécificité des espèces et des tissus pour un cancérigène. En effet le métabolisme, dans une espèce et un tissu donnés, dépend essentiellement de la présence des enzymes responsables de ces transformations métaboliques.

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 (59) ; donc l'AAF n'est pas cancérigène pour le Cobaye.

2) Interaction des cancérigènes chimiques avec les acides nucléiques.

Le métabolisme des précancérigènes, comme nous l'avons évoqué précédemment, libère dans la cellule les agents électrophiles puissants que sont les cancérigènes ultimes. Miller a montré que ces formes activées se fixaient directement et de manière covalente sur les acides nucléiques et les protéines (58, 60).

La formation de l'agent électrophile, dans le cas du NAAF qui est un cancérigène ultime de l'AAF, s'effectue par départ de la fonction O-CO-CH₃. (Voir schéma ci-dessous).



La nature de l'interaction cancérogène ultime-acide nucléique a été l'objet d'investigations importantes. Des études ont surtout été effectuées sur le DNA, et deux mises au point concernant ces travaux, ont été faites en 1973 par Irving (38) et en 1975 par Sarma *et al* (83).

Il ressort de leur étude que les sites de ces interactions au niveau du DNA sont principalement les quatre bases et parfois la liaison phosphodiester (83).

En ce qui concerne les agents alkylants, qui eux, ne sont pas métabolisés, les sites les plus réactifs semblent être les atomes d'azote des bases puriques en position 3 et 7.

Par contre, les cancérogènes activés réagissent en des sites différents et principalement sur le carbone en position 8 (C-8) et sur l'azote en 2 (N-2) de la guanine, ainsi que sur l'azote en 6 (N-6) de l'adénine (voir Figure 1). Les réactions s'effectuent alors avec une plus grande spécificité comme l'indique la Figure 1.

Dans ce deuxième cas, on observe généralement plus d'un produit d'addition sur le DNA pour un cancérogène donné. En effet, plusieurs cancérogènes ultimes peuvent être métabolisés, et de plus les sites d'interactions possibles sur le DNA sont nombreux (56). Par exemple, dans le cas de l'AAF, on obtient sur le DNA deux composés différents : un produit d'addition sur le C-8 de la guanine (80%) et un autre sur le N-2 de cette même base (20%) (47, 46, 57).

La nature de la perturbation induite sur le DNA, après fixation covalente du cancérogène ultime, a été très étudiée. Ces études ont montré que l'addition du cancérogène provoquait la dénaturation de la double hélice du DNA, et que l'importance de cette dénaturation variait beaucoup selon le site de fixation. Dans le cas de l'AAF par exemple, la réaction du fluorène sur le C-8 de la guanine, qui s'accompagne d'une insertion de la molécule de cancérogène entre deux paires de bases, (29), dénature fortement le DNA, alors que la fixation sur le N-2 de cette même base déstabilise peu la double hélice. Dans ce dernier cas le cancérogène est simplement couché dans le grand sillon (17).

Il est donc très important de connaître la nature de la liaison cancérogène-DNA. Cette spécificité de fixation, qui s'ajoute à celle du tissu et de l'espèce, joue un rôle important dans la modification du DNA, donc dans sa réparation, puisque, comme nous le verrons ultérieurement, la facilité de reconnaissance et de réparation de l'altération par les systèmes enzymatiques est directement reliée à cette modification.

Des études doivent donc être entreprises sur le plus grand nombre possible de cancérogènes, afin de connaître les lésions les plus dangereuses pour la cellule.

C'est dans ce but que nous nous sommes attachés à rechercher la structure de différents composés d'addition nucléosides-cancérogène ultime du 4NQO afin de déterminer l'altération qu'ils provoquent sur le DNA.

Bien que le métabolisme du cancérogène, et sa fixation sur les macromolécules cellulaires soient la première étape de la cancérisation, il semble que le devenir de ces lésions et le comportement de la cellule initiée soient les problèmes les plus importants.

C'est pourquoi nous allons expliquer maintenant les mécanismes de réparation en insistant tout particulièrement sur les systèmes produisant des erreurs.

CHAPITRE II . LA REPARATION

Tout changement dans la structure du DNA, même s'il est minime, peut être dangereux ou léthal pour la cellule.

Pour conserver l'intégrité de son génome, la cellule possède toute une série de réactions complexes, que l'on regroupe généralement sous le terme "mécanisme de réparation". Ce sont des enzymes qui reconnaissent les lésions et les réparent : ces réactions sont les processus de défense cellulaire. Cependant leur efficacité n'est pas absolue : certains mécanismes, bien qu'assimilables aux processus de réparation, seront défectueux et introduiront des erreurs dans le génome. Enfin dans certains cas, la lésion ne sera pas réparée du tout.

1) Les réparations correctes.

Photoréactivation des dimères de pyrimidine.

Un des mécanismes de réparation correcte très bien connu est la photoréactivation des dimères de pyrimidine. En effet, l'irradiation du DNA par un rayonnement ultra-violet provoque la formation de dimères ; la lésion qui y correspond est réparée, dans les bactéries et dans beaucoup de cellules eucaryotes, par une enzyme, qui elle, est activée par la lumière visible. Ce mécanisme, qui est très spécifique des dimères pyrimidiques, donne une réparation parfaitement correcte (45). L'action de cette enzyme chez l'Homme, si elle existe, est négligeable.

Excision-Réparation.

En ce qui concerne le cas des lésions induites par un cancérigène chimique, le premier processus de réparation impliqué est celui de l'excision-réparation. Nous ne décrirons ici que le mécanisme d'excision-réparation impliquant des nucléotides. (Un mécanisme d'excision par base est connu lui aussi pour réparer certaines lésions spécifiques du DNA, mais nous n'en parlerons pas ici). Ce processus de réparation est également impliqué lors de la réparation de dimères de pyrimidines, de cassures par des radiations ionisantes, et de l'alkylation du DNA.

Ce mécanisme de réparation se produit lorsque la cellule est "au repos", c'est-à-dire qu'elle ne synthétise pas de DNA, qu'elle ne le réplique pas en prévision d'une division.

Une enzyme appelée endonucléase reconnaît la déformation induite sur le DNA par la lésion. Elle excise la chaîne de DNA en amont de la déformation. Une autre enzyme l'exonucléase intervient alors : elle coupe le DNA à partir du point d'incision en éliminant la lésion. La brèche ainsi formée est comblée par de nouveaux nucléotides. Cette dernière opération exige l'intervention d'une polymérase qui fixe sur la chaîne coupée les nucléotides manquants, en les appariant à ceux présents sur la chaîne de DNA demeurée intacte. Une dernière enzyme appelée ligase, soude le brin néoformé en reconstituant le DNA parfaitement réparé.

La compréhension des phénomènes de réparation par excision chez l'Homme, a été facilitée par la découverte de Cleaver (15). Ce chercheur a montré que des cellules humaines de Xeroderma Pigmentosum (X.P.) sont incapables d'exciser les lésions induites par les rayons UV, mais peuvent éliminer celles dues aux radiations ionisantes.

D'après Cleaver (15) et Setlow *et al* (86), l'incapacité des cellules X.P. à réparer les lésions dues aux UV, proviendrait de l'absence ou du mauvais fonctionnement de l'endonucléase responsable de l'excision de ces lésions.

Regan et Setlow (79) montrèrent en 1974, en utilisant ces mêmes cellules, qu'il y a deux mécanismes d'excision bien distincts :

- un mécanisme rapide, s'effectuant par excision de 3 à 4 nucléotides, qui répare principalement les lésions dues aux radiations ionisantes et aux agents alkylants.

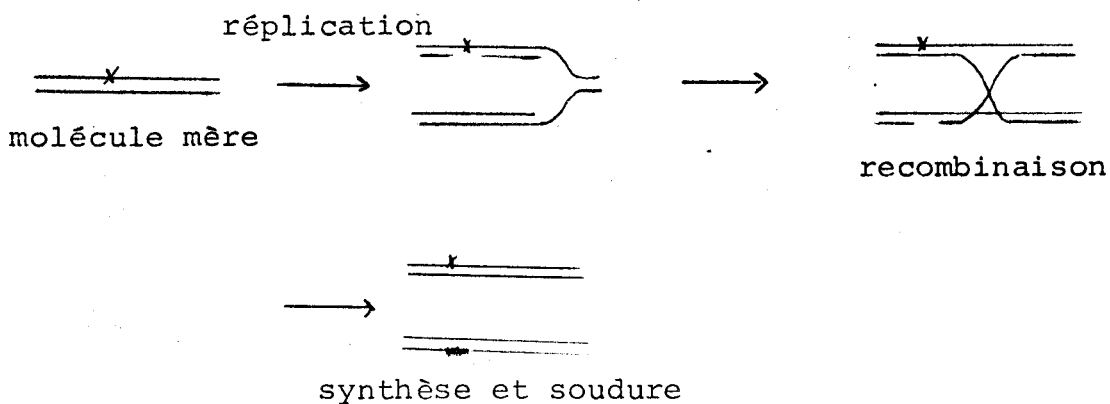
- un mécanisme lent. Le nombre de nucléotides excisés est alors de l'ordre de 100. C'est le cas de la réparation des dimères pyrimidiques et des lésions provoquées par des cancérigènes ultimes.

Réparation post-réplivative.

D'autres réparations peuvent se faire lorsque la cellule doit répliquer son DNA : ces mécanismes sont décrits sous le nom de réparation post-réplivative. Ce sont les lésions persistantes sur le DNA, qui n'ont pas été réparées par l'excision-réparation, qui induisent ces réparations.

L'explication détaillée de ces mécanismes est donnée dans différentes revues : Kondo (1975), Devoret *et al* (1975), Setlow (1978) et Marx (1978) (45, 20, 85, 52).

Ils ne sont pas totalement élucidés, mais nous avons cependant schématisé ci-dessous l'un des mécanismes, le plus connu : la réparation par recombinaison, qui d'ailleurs est le seul de ces mécanismes qui semble correct.



Cependant, la réplication peut s'effectuer sans tenir compte de la lésion ; de plus, lors de la recombinaison, d'autres erreurs génératrices de mutations peuvent se produire.

Dans le cas de la réparation par recombinaison, la réplification est correcte, mais en laissant la lésion sur le DNA. C'est pour cette raison que cette réparation post-réplivative est aussi appelée réparation par tolérance.

2) Les lésions non réparées.

Comme nous l'avons vu précédemment, la cellule possède un équipement enzymatique capable de réparer les lésions sur le DNA. Cependant un certain nombre d'entr'elles sont très mal reconnues par ces enzymes. C'est le cas par exemple des alkylations sur l'azote 7 de la guanine : le méthyl 7 guanine persiste dans la cellule et ne semble pas gêner la réplification (49).

Comme nous l'avons vu lors de la réparation par tolérance, il n'y a pas réparation de la lésion mais simplement un "bypass" pour ne pas effectuer d'erreur d'appariement en face de la lésion, lors de la réplication. Les lésions difficilement réparables persistent donc sur le DNA.

Par exemple, dans le cas de l'AAF, Fuchs (29), puis plus récemment Yamasaki *et al* (105) ont montré que la fixation de l'AAF sur le N-2 de la guanine serait la plus impliquée dans l'induction de la cancérogénèse. En effet, le produit d'addition sur le N-2 de la guanine persiste huit semaines, alors que le produit fixé sur le C-8 est éliminé en sept jours. Or nous avons noté plus haut que le composé d'addition sur le N-2 de la guanine n'induisait qu'une petite perturbation structurale sur le DNA, alors que pour le C-8 la dénaturation est importante. Il semblerait donc que dans ce cas particulier, la lésion la plus dangereuse soit celle qui induit la plus faible perturbation structurale du DNA, puisqu'elle persisterait dans le génome de la cellule.

3) La réparation défectueuse.

Les enzymes des systèmes de réparation que nous avons décrits précédemment sont des enzymes constitutives, c'est-à-dire présentes dans la cellule avant l'action du cancérogène.

En dehors de ces mécanismes de réparation du DNA qui ont pour rôle d'éliminer la plus grande partie des lésions, il existe des processus permettant à une cellule traitée par un agent cancérogène ou une irradiation, d'être capable de répliquer son DNA malgré la persistance des lésions. Ces mécanismes entrent en jeu lorsque les enzymes constitutives ne suffisent plus à assurer la réparation alors que la cellule doit cependant répliquer son DNA.

Ces phénomènes ont été bien étudiés chez les Bactéries (104), et ont été décrits sous le nom de réparation SOS (77), puis de fonctions SOS (21).

Contrairement à l'excision-réparation et à la réparation tolérante, la réparation SOS est un processus induit. Son danger provient du fait que le mécanisme réplcatif qui y correspond donne naissance à de nombreuses mutations.

Les fonctions SOS.

La mise en évidence d'une fonction induite par les dimères pyrimidiques a été décrite par Witkin en 1974 (103), lors d'une expérience qu'il a appelée : l'UV réactivation.

Elle consiste à infecter une Bactérie à l'aide d'un phage préalablement irradié aux UV. Si la Bactérie n'a pas été irradiée, le phage n'est pas libéré du fait du blocage de sa réplication. Au contraire, si la Bactérie est elle aussi irradiée, on observe une infection par le phage qui correspond à une réactivation de la réplication. Mais on constate aussi que cette réplication s'accompagne d'une mutagénicité importante. Cette expérience montre que l'on a bien induit dans la Bactérie hôte, un système mutagène associé à une meilleure capacité de répliquer le DNA endommagé.

Il fallait donc savoir si ce phénomène était induit lors de l'irradiation de la Bactérie, soit par des lésions sur le DNA, soit par des modifications des systèmes enzymatiques bactériens.

La même expérience a donc été effectuée, mais en utilisant cette fois une Bactérie qui n'est pas irradiée elle-même, mais qui est recombinaisonnée à une Bactérie dont le DNA a été lésé par UV. On observe encore une augmentation de l'infection. Ce qui nous montre que le système est induit par les lésions sur le DNA.

Il existe en réalité plusieurs fonctions induites par les lésions sur le DNA, dont l'importance se retrouve à un niveau autre que celui de la réplication; elles sont aussi en effet responsables de l'induction du phage lysogène (54) de la filamentation de la Bactérie et de la mutagénicité (103). Ces fonctions ont été appelées "fonctions SOS". De plus il est important de constater qu'elles peuvent être induites également par des cancérrogènes chimiques (60).

Actuellement, trois expériences permettent de supposer que de telles fonctions existent aussi chez les Eucaryotes.

1. D'Ambrosio et Setlow (1) ont montré qu'un traitement aux UV ou à l'AAF de fibroblastes humains *in vitro*, introduisait un système de réparation post-répllicative fonctionnant plus efficacement que le système constitutif.

2. Sarasin et Hanawalt (82) ont montré que le traitement de cellules de Singe *in vitro* par les UV et les cancérogènes chimiques, induisait un nouveau système de réparation capable d'augmenter la survie du virus SV40 pré-irradié aux UV.

3. Das Gupta et Summers (16) ont montré que l'UV-réactivation du virus Herpès Simplex était accompagnée d'une mutagénèse du virus réparé.

La possibilité d'induire un système erroné de réplication ouvre d'intéressantes perspectives pour la compréhension de la cancérogénèse chez les Mammifères, si l'on se souvient de la corrélation entre mutagénèse et cancérogénèse.

Mécanisme moléculaire.

La question principale posée par la réparation SOS est l'intrigante relation entre lésions sur le DNA et manque de fidélité de la réplication.

Le mécanisme d'action de la DNA polymérase, lors de la mutagénicité par les UV, a été proposé par Villani *et al* (100). Ils montrent tout d'abord à l'aide d'expériences effectuées *in vitro*, par les systèmes enzymatiques de réplication *E. coli*, sur le DNA irradié du phage ϕ X 174, que les photoproduits formés par le rayonnement ultra-violet, bloquent l'activité répliquative de la DNA polymérase au niveau de la lésion. Ce blocage de la réplication est associé à une conversion importante de nucléotides triphosphates en nucléotides monophosphates correspondant à l'activité de l'exonucléase 3' 5' associée à la DNA polymérase I. Cette augmentation de l'activité de l'exonucléase serait due au fait que la DNA polymérase apparierait une base incorrecte en face de la lésion ; l'exonucléase 3' 5' cliverait alors tous les nucléotides non acceptables.

Byrnes *et al* (13) proposent un modèle simple pour expliquer la mutagénicité élevée de la réparation SOS. L'augmentation de la concentration en nucléotides monophosphates dans la cellule inhiberait l'action de l'exonucléase; non seulement la polymérase pourrait alors répliquer devant la lésion d'une manière aléatoire, mais sa fidélité de réplication sur un brin sain pourrait aussi être altérée puisque l'activité 3' 5' exonucléasique responsable de cette fidélité est inhibée.

Les découvertes de Villani (100) ont suggéré que ces mécanismes simples (que nous venons de décrire) pourraient expliquer le déclenchement de la réparation SOS. Cependant on a constaté que les fonctions SOS chez *E. coli* sont dépendants de gènes (Rec A. Lex A) (19), dont on sait qu'ils codent pour une activité protéasique. D'après Roberts (80) cette activité protéasique serait responsable du clivage du represseur du phage, ce qui provoquerait l'induction lysogénique. D'autre part il a été montré que l'antipain, qui est un inhibiteur de protéases (54), et le chloramphénicol qui est un inhibiteur de la synthèse des protéines (103), inhibent tous deux chez *E. coli* la mutagénicité et l'induction lysogénique : les fonctions SOS sont donc dépendantes de la synthèse de protéines et tout particulièrement de protéases.

Villani suggère que l'augmentation de la concentration en monophosphates pourrait être le facteur déclenchant l'expression de gènes codant pour une protéase qui cliverait ce que l'on pourrait appeler les "SOS répresseurs" et induirait, entr'autre, la réplication fautive (78).

Ces premières hypothèses des mécanismes inducteurs des fonctions SOS sont alléchantes bien que très simples. Cependant, elles ne paraissent pas suffisantes ; en effet, il est difficile d'admettre que le simple blocage de la polymérase au niveau d'une lésion puisse induire les fonctions SOS. Il parait plus probable que d'autres facteurs interviennent, pour forcer la cellule à induire un système aussi dangereux qu'une réplication hautement mutagène.

Les caractéristiques de la réparation SOS chez *E. coli* sont exprimées sur le Tableau C ci-après (98).

1. C'est un système induit ; la synthèse de protéines est nécessaire.
2. Elle est induite lorsque la synthèse du DNA est empêchée.
3. Elle est erronée.
4. Elle est dépendante de gènes Lex A Rec A.
5. Beaucoup d'agents inducteurs des fonctions SOS sont cancérogènes chez les Mammifères.
6. D'autres fonctions sont induites parallèlement comme par exemple la lysogénicité.

Tableau C : Caractéristiques de la réparation SOS.

Certains auteurs (19) proposent l'existence et la persistance de fonctions SOS chez les Bactéries. En effet, cette réparation source de mutations, faciliterait l'adaptation des Bactéries agressées par les cancérogènes, et donc la survie de l'espèce, en engendrant des mutants résistants.

Cependant chez les Eucaryotes, de telles fonctions, si elles existent, peuvent avoir un effet très néfaste pour l'organisme et jouer un rôle important dans l'induction de la cancérisation.

Depuis que l'hypothèse de l'existence de telles fonctions chez Eucaryote a été soulevée, deux points semblent très importants :

- 1) La persistance de lésions sur le DNA.
- 2) Les facteurs déclenchant la réplication de ces DNA.

Nous allons montrer dans le chapitre suivant qu'un certain nombre de substances peuvent augmenter la tumorigénicité d'un tissu, en particulier les promoteurs, qui induisent, entr'autre, les divisions cellulaires.

CHAPITRE III

LES FACTEURS MODIFIANT L'ACTION D'UN CANCEROGENE CHIMIQUE.

Le taux de transformation maligne, pour une dose de cancérogène initiateur, peut être modifié par différentes substances : les cocancérogènes, les promoteurs, les anticancérogènes et les antipromoteurs.

Dans les expériences de cocancérogénèse, le cocancérogène et le cancérogène sont administrés simultanément ou alternativement ; le résultat est une augmentation significative de la tumorigénèse, par rapport à l'action du cancérogène seul. Le cocancérogène est généralement non cancérogène, lorsqu'il est employé seul (10).

D'autres substances ayant le même pouvoir que les cocancérogènes ont été découvertes. Elles ont été appelées "promoteurs", parce que leur propriété d'augmenter la tumorigénèse par rapport à l'action du cancérogène seul, peut être observée bien après l'application du cancérogène (9).

Cette notion d'initiation par le cancérogène et de promotion par un promoteur, a suggéré l'hypothèse d'une cancérisation en deux étapes : l'initiation et la promotion. Historiquement cette notion a été proposée bien après la notion de cocancérogène (7, 81).

Les termes promoteur et cocancérogène ne doivent absolument pas être confondus. Car, par exemple un cocancérogène n'a pas d'action sur la tumorigénèse s'il est administré après le cancérogène. En effet, les protocoles d'expérimentation de substances promotrices ou cocancérogènes sont différents. Il est donc très probable que leur mode d'action (10) soit différent lui-aussi. Nous reviendrons en détail sur la notion de promoteur.

Les cocancérogènes sont constitués de composés très différents comme par exemple le catechol, le benzo(e)pyrène, le fluoranthrène, le dodécane, ce qui tendrait à prouver qu'il n'existe pas un mécanisme d'action unique (99). Bien qu'ils

n'aient pas été très étudiés jusqu'ici, on a cependant observé qu'ils semblaient modifier la perméabilité de la membrane. Ils pourraient aussi être impliqués dans le mécanisme de l'initiation par le cancérigène (99,12). Ces deux hypothèses sont donc les plus retenues, et nous donnons ci-dessous un exemple de la seconde.

Bingham *et al* (12) ont montré que le cocancérigène N-dodecane modifiait le métabolisme du benzo(a)pyrène, en favorisant la formation du 7,8 dihydrodiol benzo(a)pyrène, composé qui est le cancérigène intermédiaire de l'activation du benzo(a)pyrène en cancérigène ultime. L'effet cocancérigène du N-dodecane sur le benzo(a)pyrène consisterait donc, dans ce cas, en une augmentation de l'activation du cancérigène par rapport à la détoxification.

L'action anticancérigène a été elle aussi étudiée. En particulier il a été montré dès 1929 par Berenblum (11), que le dichloro-éthyl sulfure diminuait la tumorigénèse de la peau de Souris par les goudrons. Il faut remarquer que par la suite ce composé a été montré cancérigène chez l'Homme (56). Il pourrait paraître paradoxal qu'un cancérigène puisse avoir une action anticancérigène. Cependant le dichloro-éthyl sulfure n'est pas le seul cas ; par exemple, le 4NQO que nous étudions en tant que cancérigène a également une action anticancérigène sur la tumorigénèse de la peau de Souris par le benzo(a)pyrène (27).

En effet, il semble admis maintenant que certains cancérigènes ont un pouvoir antitumoral. Cette constatation est à rapprocher du fait que le DNA est, dans ce dernier cas également, la cible principale.

Les antipromoteurs quant à eux, ne modifient pas seuls la tumorigénèse par un cancérigène, mais inhibent l'action du promoteur uniquement. Comme nous le verrons, ce sont généralement des inhibiteurs de la synthèse des protéines. Ils peuvent agir aussi au niveau de l'activité des protéases (98).

L'étude du mécanisme d'action des promoteurs fait l'objet à l'heure actuelle de nombreuses études. En effet, puisque les promoteurs ne sont pas des cancérigènes, la connaissance exacte

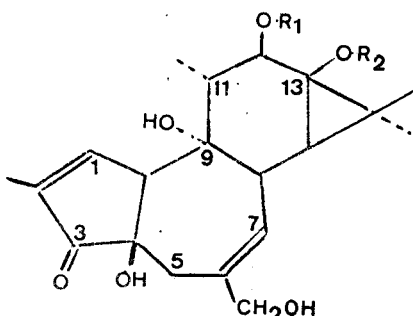
de leur mécanisme d'action pourrait permettre de comprendre pourquoi l'action initiatrice d'un cancérogène n'est pas immédiate.

Ce problème est donc intéressant à considérer puisqu'il semble être la deuxième condition nécessaire pour qu'il y ait tumorigénèse, la première étant l'étape d'initiation.

1) Historique.

La notion de promoteur a été proposée pour la première fois par Berenblum (8) en 1954. Cette hypothèse avait été suggérée pour interpréter l'expérience que nous avons schématisée sur la figure 2, et que nous rappelons ici : le badigeonnage de la peau d'une Souris par une faible dose de benzo(a)pyrène ou par l'huile de croton ne fait apparaître aucune tumeur cancéreuse. L'huile de croton a une action inflammatoire, qui disparaît lorsque l'application n'est pas reproduite et, à la dose utilisée, le benzo(a)pyrène n'est pas cancérogène. Mais si on effectue un badigeonnage simultané de ces deux substances, on voit apparaître sur la peau de la Souris de nombreuses tumeurs. Cette expérience montre que c'est l'huile de croton qui a permis la tumorigénèse de la peau de Souris exposée à une faible dose de cancérogène. Berenblum obtient le même résultat lorsque l'huile de croton est appliquée après le cancérogène, mais cette séquence cancérogène-huile de croton ne peut être inversée. Berenblum propose alors la notion d'initiation par le cancérogène et de promotion par l'huile de croton.

En 1971 un composé actif de l'huile de croton a été isolé par Hecker (33). Il s'agit du 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). (Voir formule ci-dessous).



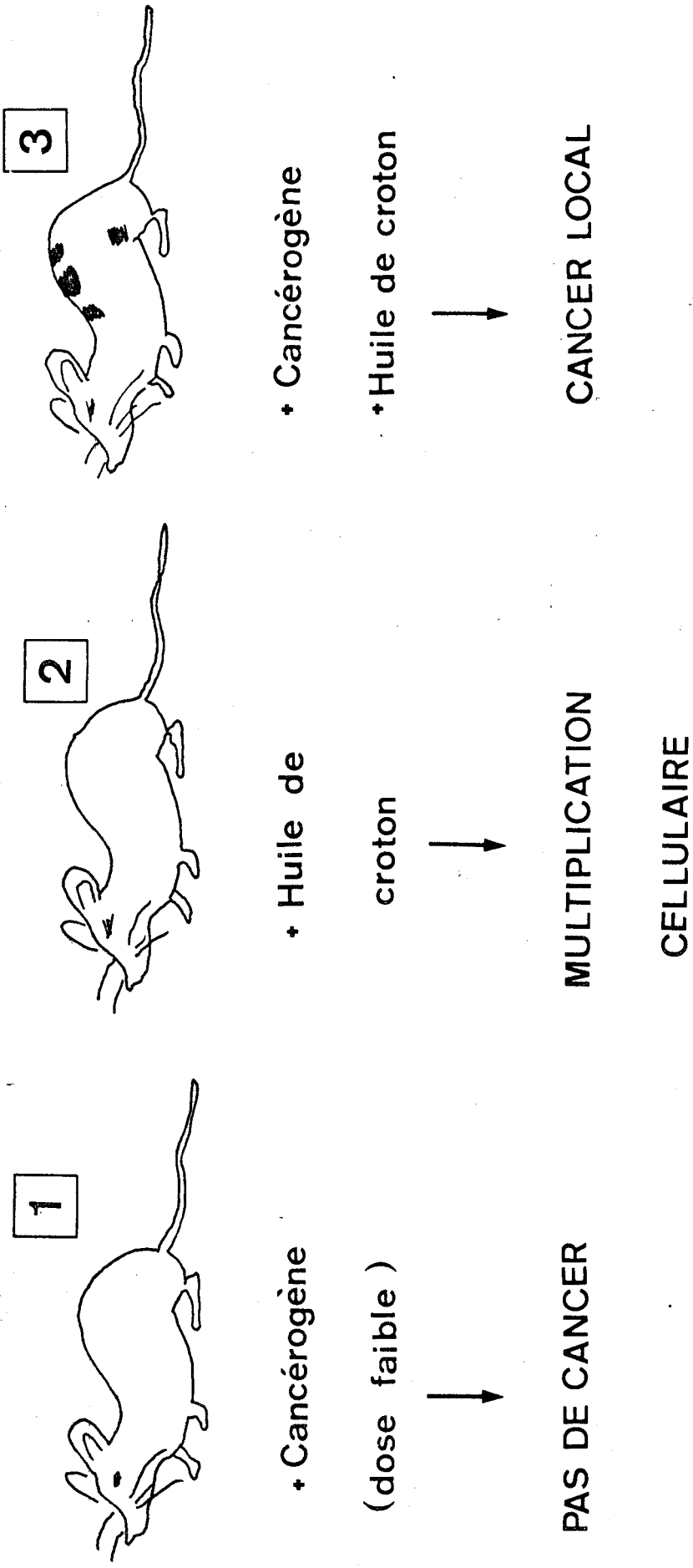


Figure 2 INITIATION ET PROMOTION DU CANCER

Enfin, il est intéressant de noter qu'un certain nombre d'observations récentes semblent montrer que le mécanisme de cancérisation chez l'Homme se fait selon les deux étapes d'initiation et de promotion (10).

2) Promoteurs.

Depuis ces expériences, on a découvert le rôle promoteur de nombreuses autres substances : certains composés phénoliques, le sodium lauryl sulfate, l'acide iodoacétique, les esters méthyliques d'acides gras, certains esters naturels ou synthétiques de phorbol, ainsi que le condensat de fumée de cigarettes (89).

Le tableau ci-dessous montre les différences entre les propriétés biologiques des initiateurs et des promoteurs (101).

| Initiateur | Promoteur |
|---|--|
| 1. Il est cancérogène en lui-même. | 1. Il n'est pas cancérogène. |
| 2. Il doit être appliqué avant l'agent promoteur. | 2. Il doit être appliqué après l'agent initiateur. |
| 3. Une dose suffit. | 3. Il nécessite une exposition prolongée. |
| 4. Son action est irréversible et additive. | 4. Son action est réversible et non additive. |
| 5. Il n'existe pas de seuil d'action apparent. | 5. Il existe probablement un seuil d'action. |
| 6. Il se fixe sur les macromolécules cellulaires. | 6. Sa fixation covalente n'est pas évidente. |
| 7. Il est mutagène. | 7. Il n'est pas mutagène. |

Tableau D : Différences entre initiateur et promoteur.

3) Hypothèse de mode d'action.

C'est la théorie génétique de la cancérisation, comme nous l'avons vu précédemment, qui est, à présent la plus souvent admise. Le génome de la cellule est modifié lors de l'étape de l'initiation mais la tumorigénèse ne se produit généralement qu'après un long temps de latence : il semblerait donc que l'étape d'initiation soit mémorisée dans la cellule. Par contre il n'en est pas de même pour l'étape de promotion, puisque le promoteur n'a aucune action s'il est administré avant l'initiateur. De plus, son action est réversible. (Voir Tableau E).

| Séquences | Tumorigénèse |
|-------------------|-------------------|
| ■ - ■ - ■ - ■ - ■ | + ■ : cancérogène |
| ■ - | - □ : initiateur |
| □ - □ - □ - □ | - |
| ■ - □ - □ - □ - □ | + |
| □ - □ - □ - □ +/■ | - |
| ■ +/□ +/□ +/□ +/□ | - |

Tableau E : Expériences de tumorigénèse de la peau de Souris par application de benzo(a)pyrène avec ou sans application de TPA utilisé comme promoteur. Différentes séquences sont effectuées en fonction du temps.

Dans les expériences décrites ci-dessus, qui sont la base de la cancérisation en deux étapes, on peut remarquer qu'une dose importante de cancérogène a une action tumorigène identique à celle d'une faible dose de cancérogène associée à un traitement par le promoteur. On peut donc aussi se demander si des doses importantes de cancérogènes n'auraient par une action promotrice.

Le fait que les promoteurs soient des inflammatoires et qu'ils possèdent la propriété d'induire la prolifération cellulaire, a favorisé de nombreuses investigations entreprises dans le but de comprendre le mécanisme de la promotion. Mais aucune conclusion n'est apparue clairement. En effet, deux composés, l'acide acétique et l'éthylpropiolate (89) qui sont de faibles promoteurs, ont une action sur le désordre du métabolisme et sur la morphologie de la cellule comparable à celle que présente le TPA, bien que ce dernier soit un promoteur puissant. Il n'y a donc pas de corrélation évidente entre l'hyperplasie et l'efficacité de la promotion (89).

Un certain nombre de travaux semblent montrer que le TPA a une action au niveau de la membrane cellulaire. En particulier il est maintenant bien établi que le TPA interagit avec un récepteur spécifique de la membrane et modifie la surface cellulaire (101,100).

D'autre part il est bien établi que le TPA pénètre dans la cellule. Enfin son action promotrice peut être inhibée par une série d'hormones stéroïdes antiinflammatoires, comme par exemple la dexaméthasone, l'hydrocortisone, la cortisone (6).

En résumé, on peut dire que les promoteurs induisent des changements dans la croissance et la morphologie de la cellule, dans les propriétés de la surface cellulaire, dans le transport du 2-deoxyglucose et augmentent la synthèse des phospholipides, l'activité des protéases et de l'ornithine decarboxylase (89).

Weinstein a proposé récemment que les modifications de la surface cellulaire induisent des facteurs de croissance qui pourraient expliquer l'action promotrice du TPA (101,100).

Par contre Troll *et al* (98) insistent sur le rôle que pourraient jouer les protéases, car en effet la réparation défectueuse (fonctions SOS), de même que l'action des promoteurs nécessitent la synthèse de protéases. Et on constate en effet que certains antipromoteurs comme l'antipain et la leupeptin ont une action inhibitrice sur l'activité des protéases. Troll suggère que l'activation des protéases par les

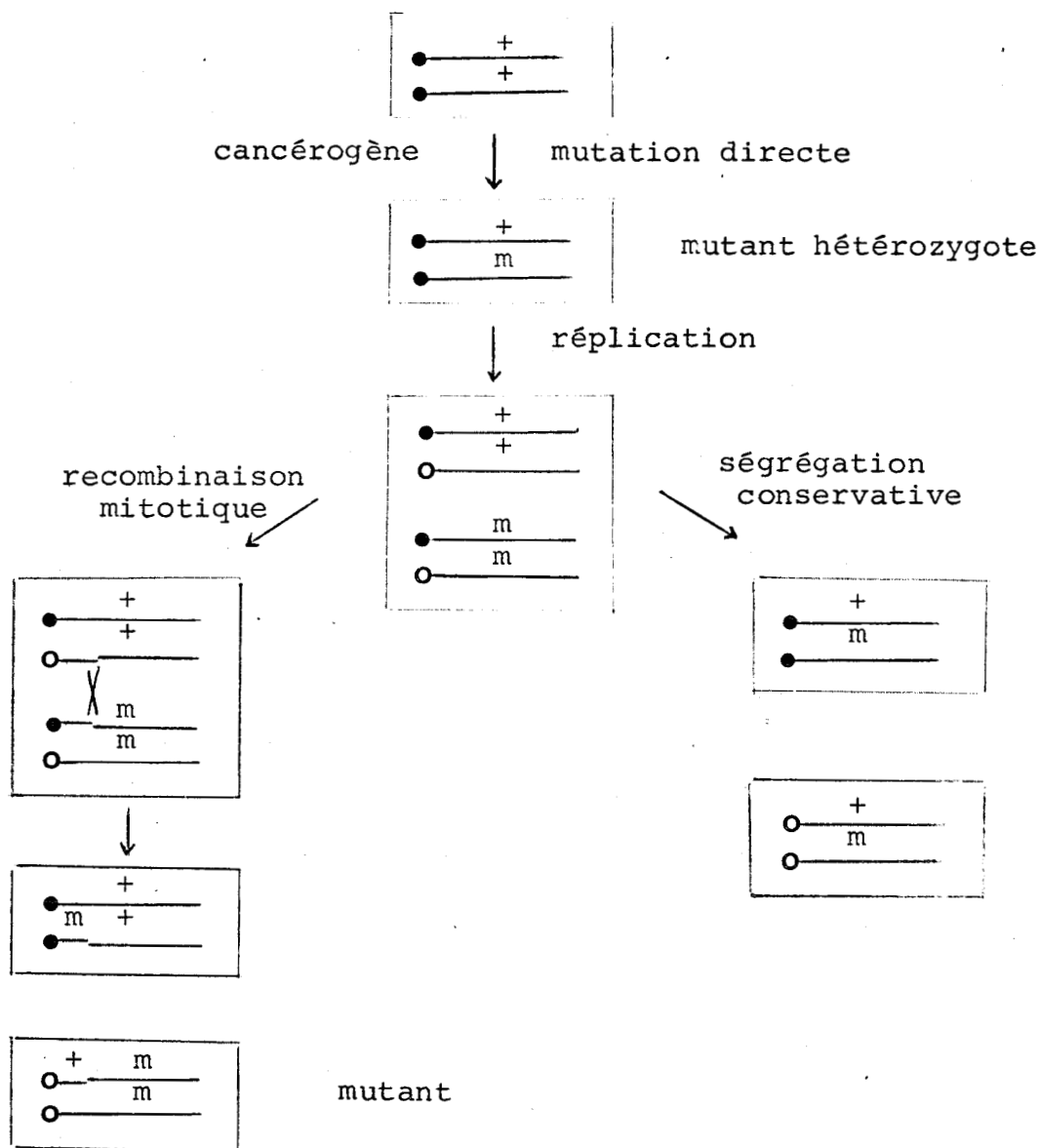
promoteurs soit le facteur décisif de la tumorigénération. Dans ce cas la réparation SOS pourrait être induite par les lésions elles-mêmes lorsque celles-ci seraient nombreuses. Par contre lorsqu'elles seraient résiduelles, la réparation SOS bien qu'encore induite, le serait cette fois par les promoteurs qui libéreraient des protéases et déclencheraient les divisions cellulaires (et particulièrement la réplication).

Cependant, la réparation SOS et l'induction des protéases, si elles ont été montrées dans le cas des Bactéries, ne sont qu'hypothétiques dans le cas des Eucaryotes. Cette hypothèse expliquerait pourtant qu'une dose de cancérigène élevée puisse avoir une action promotrice en elle-même du fait de l'induction par des lésions trop nombreuses de la réparation SOS.

Kinsella et Radman proposent un modèle bien différent (44). L'initiation par un cancérigène induirait des mutations récessives, c'est-à-dire des mutants "cancérigènes" hétérozygotes; cela expliquerait pourquoi la cellule initiée ne présente aucun pouvoir tumoral. Pour émettre leur hypothèse, Kinsella et Radman s'appuient sur deux propriétés des promoteurs mises en évidence expérimentalement : les promoteurs induisent les divisions cellulaires et favorisent l'échange de chromatides-soeurs (SCE) faisant ainsi passer la cellule de l'état hétérozygote à l'état homozygote, c'est-à-dire la transformant en cellule cancéreuse.

En particulier, ils ont montré que le TPA induisait des recombinaisons mitotiques lors de la division cellulaire. Ces réarrangements chromosomiques sont visualisés en métaphases par ce qu'ils appellent des "quadripoles", c'est-à-dire la condensation au niveau des centromères de deux chromosomes homologues. Ils observent donc des chromosomes en forme de croix sur les caryotypes. Par contre ils n'obtiennent pas de SCE lorsqu'un dérivé du TPA, non promoteur, est utilisé : le 4-O-méthyl-TPA. De plus, les antipromoteurs comme les antiinflammatoires ou les inhibiteurs de la synthèse protéique, inhibent les SCE induites par le TPA.

Les promoteurs, en induisant les SCE, augmenteraient donc, d'une manière importante, l'expression d'un phénotype mutant (voir schéma ci-dessous).



Nous venons de décrire les principales hypothèses de mode d'action des promoteurs, mais il faut bien insister sur le fait que rien pour l'instant n'est parfaitement établi. On peut cependant espérer que les recherches de plus en plus nombreuses effectuées dans ce domaine, permettront, dans quelques années, de relier initiation et promotion.

DEUXIEME PARTIE

LE 4NQQ

Bien que de nombreuses études aient été effectuées depuis la découverte du pouvoir cancérigène du 4NQO, le mode d'action de ce dernier, ainsi que les réactions moléculaires du (ou des) cancérigène (s) ultime(s) correspondant (s) ne sont pas encore élucidés.

Deux revues générales sur ce précancérigène ayant été publiées, l'une en 1971 (24), l'autre plus récemment en 1976 (66), nous ne reviendrons ici que sur les points qui nous sont apparus être les plus importants lors de l'étude de la cancérisation du 4NQO :

- le 4NQO est un modèle particulièrement intéressant pour l'étude du mécanisme de la cancérogénèse chimique, car ses propriétés biologiques sont parfaitement connues.

- par contre, à l'inverse des propriétés biologiques, le mécanisme de l'activation du cancérigène intermédiaire en cancérigène ultime, est lui, très mal connu, et ce qui est annoncé n'est pour l'instant qu'une hypothèse.

- la réparation des lésions causées par le 4NQO semble se faire suivant deux mécanismes différents.

Nous allons revenir en détail sur chacun de ces points.

CHAPITRE I : PROPRIETES BIOLOGIQUES

Le pouvoir cancérogène du 4NQO a été montré pour la première fois en 1957 par Nakahara *et al* chez la Souris (68). Un nombre impressionnant d'études ont été entreprises, et leurs résultats sont en accord avec le pouvoir hautement cancérogène du 4NQO. En particulier, il semblerait que le seul animal de laboratoire qui "résiste" au 4NQO soit le chien (24, 91).

Les organes cibles sont principalement le poumon, le pancréas et l'estomac (32, 64, 65). Nakahara *et al* (67) ont cherché à mettre en évidence une relation spécificité d'action/structure des cancérogènes dans la série quinoléine. A partir de l'étude d'un grand nombre de modèles, ils concluent que, pour être cancérogène, une quinoléine doit obligatoirement posséder la fonction N-oxyde en position 1 et le groupement nitro en position 4. Parallèlement, Kawazoe *et al* (40) montrèrent que le cycle quinoléique était nécessaire à l'action cancérogène. Cela expliquerait que le 4-nitro pyridine-1-oxyde ne soit pas cancérogène. Les conclusions de Nakahara ne semblent cependant pas tout à fait universelles puisque Mori *et al* (62, 63) ont montré que le 4 nitroquinoléine et le 2 nitroquinoléine (qui n'ont pas de fonction N-oxyde) présentaient un pouvoir cancérogène.

L'une des propriétés importantes des cancérogènes est leur pouvoir mutagène. Dans le cas du 4NQO, le pouvoir mutagène a été mis en évidence sur les champignons par Okabayashi *et al* (24) avant que ne soit montré son pouvoir cancérogène. Ce sont d'ailleurs ces mêmes auteurs qui découvrirent ensuite que les microorganismes métabolisaient le 4NQO (71). Les propriétés mutagènes du 4NQO ont aussi été mises en évidence sur de nombreuses Bactéries (75, 4, 71). Il faut faire ici une remarque importante : bien que le pouvoir mutagène chez les microorganismes soit une propriété commune à de nombreux cancérogènes, le comportement du 4NQO ne peut

être assimilé à celui des autres cancérogènes. En particulier, lors des expériences de mutagénicité par le 4NQO, il n'est pas nécessaire d'ajouter une fraction microsomiale de cellules d'Eucaryotes (dont le rôle est d'activer le précancérogène en cancérogène intermédiaire) contrairement à ce qu'il faut faire pour la grande majorité des cancérogènes. C'est ainsi par exemple que, lors de l'étude de la mutagénicité par l'AAF ou par les hydrocarbures aromatiques, l'effet mutagène ne sera observé que si, en même temps que le précancérogène, on ajoute au milieu la fraction microsomiale permettant leur activation (66). Le 4NQO semble être le seul précancérogène qui soit métabolisé par les enzymes des microorganismes. C'est d'ailleurs chez les Bactéries que la première étape d'activation métabolique a été montrée pour la première fois (voir chapitre suivant).

Toujours d'un point de vue biologique, deux autres propriétés du 4NQO semblent intéressantes à considérer, surtout si l'on se souvient de l'importance des fonctions SOS et du rôle joué par les promoteurs.

Premièrement le 4NQO permet l'induction lysogénique du phage λ chez *E. coli* (22). Or cette fonction est l'une des fonctions SOS chez les Procaryotes. De plus, Hirai *et al* montrèrent que le 4NQO peut activer la survie du virus SV 40 (Virus Simien 40) dans les cellules de Hamster (34).

Deuxièmement le 4NQO induit des aberrations chromosomiques qui ont été mises en évidence sur les Eucaryotes, comme cela a été montré en 1965 par Yoshida *et al* (106), puis par Stich *et al* (90). Yoshida *et al* classent ces aberrations en trois catégories : l'élongation des chromosomes, la cassure des chromosomes et l'échange des chromatides-soeurs. Ces propriétés pourraient être l'objet d'une discussion très longue, mais nous nous bornerons à ce que nous venons de dire. En effet leur étude ne constitue pas le but réel de ce travail.

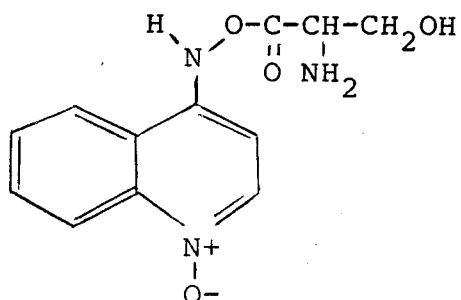
CHAPITRE II : LE METABOLISME DU 4NQO

Okabayashi et Yoshimoto ont montré en 1962 (71), à l'aide de cultures bactériennes, que le 4NQO était réduit par voie métabolique, en trois composés principaux : le 4-hydroxyaminoquinoléine-1-oxyde (4HAQO), le 4-aminoquinoléine-1-oxyde (4AQO) et le 4-aminoquinoléine (4AQ).

Shirasi (87, 88), en 1963, testant le pouvoir cancérogène de chacun de ces composés, montre que seul le composé hydroxylé (4HAQO) est cancérogène. Il émet alors l'hypothèse qu'il pourrait bien être le cancérogène précurseur, hypothèse qui est rapidement confirmée; en effet, non seulement le 4HAQO présente, du point de vue de la cancérogénèse, toutes les propriétés du 4NQO, mais de plus son pouvoir cancérogène est plus important (23, 35). La première étape de l'activation est donc bien démontrée : le 4NQO est réduit en 4HAQO (cancérogène intermédiaire); les réactions de réduction du précancérogène en 4AQO et 4AQ constitueraient donc l'étape de détoxication. Une telle hypothèse est en parfait accord avec ce que l'on observe expérimentalement : la conversion du 4NQO s'effectue principalement en 4HAQO dans les organes où les tumeurs sont généralement observées, alors que, au contraire le 4AQO et le 4AQ sont synthétisés dans les organes peu sensibles au 4NQO (87). Comme nous l'avons vu précédemment, les Bactéries possèdent les enzymes nécessaires à la première de ces transformations.

La deuxième étape d'activation n'est, pour l'instant, pas encore élucidée; la raison la plus évidente en est que cette étape libère des composés très instables, difficiles à piéger et à isoler car ils réagissent rapidement sur les composants nucléophiles de la cellule (60, 58). En effet la fixation covalente du cycle quinoléique sur les macromolécules cellulaires a fait l'objet d'études approfondies. Cette fixation a été prouvée dès 1970 par Kuroki *et al* (48) qui ont montré que le 4NQO se liait, *in vivo*, sur le DNA, le RNA et les protéines, puis par Andoh *et al* (3) qui ont étudié l'incorporation de 4NQO marqué à des cellules de Mammifères en culture.

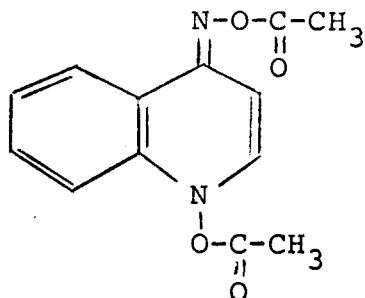
Pour expliquer la fixation covalente du 4NQO sur le DNA, Tada *et al* ont isolé une enzyme capable d'activer le 4HAQO, *in vitro* (92, 95). Cette enzyme, la séryl tRNA synthétase, transforme le 4HAQO en une forme active non identifiée, capable de se fixer sur les bases du DNA de manière covalente. Ils postulent que la forme active serait le séryl-4HAQO (voir schéma ci-dessous).



le séryl-4HAQO

Cependant, ils n'ont pas isolé ce composé.

Une autre approche concernant l'activation du 4HAQO a été effectuée en 1968 par Enomoto *et al* (26). Ils montrent qu'un dérivé diacétylé du 4HAQO : le 0,0'-diacétyl-4-hydroxyaminoquinoléine-1-oxyde, qui est un électrophile puissant, réagit *in vitro* directement sur le DNA en formant une liaison covalente (schéma ci-dessous).



le di Ac-4HAQO

Ce composé (di Ac-4HAQO) peut être synthétisé chimiquement : sa synthèse et sa structure ont été décrites par Kawazoe (41). Miller (60) suggère que ce composé pourrait représenter un cancérigène ultime. En effet, lorsque le di Ac-4HAQO est injecté à un animal, il apparaît des tumeurs au site d'injection (43, 25). Autrement dit, ce dérivé diacétylé présente toutes les propriétés des cancérigènes ultimes telles qu'elles ont été décrites par Miller (58, 60). D'autre part, cette hypothèse d'acétylation du cancérigène précurseur semble être compatible avec ce que l'on sait actuellement pour certains cancérigènes. C'est ainsi par exemple qu'il est bien connu maintenant que les formes ultimes de l'AAF sont les esters de l'OHAAF . Il faut d'ailleurs remarquer que Miller (60) avait postulé dès 1970 que le dérivé disulfate du 4HAQO pourrait être un cancérigène ultime, ceci par analogie avec le dérivé sulfate de l'AAF. Cette réaction d'estérification se ferait par l'intermédiaire d'une acétyltransférase dans le cas du dérivé diacétylé ou d'une sulfotransférase dans le cas du dérivé disulfaté, par analogie à l'AAF (5). Cependant aucune étude n'a permis, à ce jour, d'isoler ces enzymes dans le cas du 4NQO.

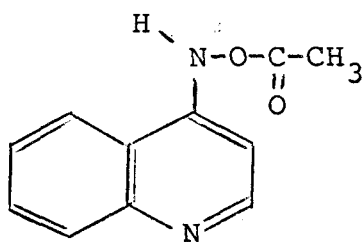
Par conséquent, et bien que le métabolisme du di Ac-4HAQO ne soit pas démontré, mais simplement postulé, nous allons montrer que ce dérivé constitue un bon modèle pour l'étude *in vitro* des lésions causées au DNA par le 4NQO.

C'est Enomoto lui-même et ses collaborateurs (26) qui les premiers montrèrent expérimentalement que le di Ac-4HAQO pouvait bien être le cancérigène ultime du 4NQO. Pour cela, ils ont mis à profit les propriétés fluorescentes des quinoléines et comparèrent les spectres de fluorescence des DNA modifiés *in vitro* après réaction du di Ac-4HAQO, avec ceux obtenus *in vivo* après exposition au 4HAQO (53, 93). Ces auteurs montrent que les spectres de fluorescence obtenus dans les deux cas sont très semblables. Cette première comparaison *in vivo-in vitro* est un argument en faveur du modèle que nous avons choisi, mais doit cependant être complété par des études plus approfondies.

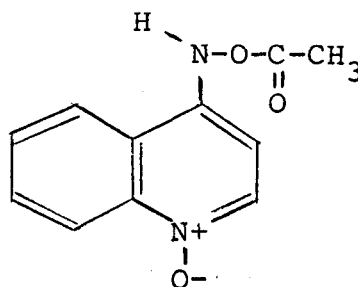
En particulier, pour pouvoir affirmer que le di Ac-4HAQO est un modèle convenable, il faut montrer que les produits d'addition obtenus *in vitro* entre le DNA et le cancérogène sont identiques à ceux obtenus *in vivo*. La parfaite connaissance de ces produits d'addition et du mécanisme réactionnel nous permettra aussi de savoir si, comme le suggère Miller (58), l'existence du composé diacétylé du 4HAQO comme cancérogène ultime est compatible avec le mécanisme de cancérogénèse faisant intervenir le séryl-4HAQO.

Nous allons montrer maintenant que l'étape d'estérification de la fonction hydroxylamine semble être obligatoire à l'activation du 4HAQO.

Premièrement Sato *et al* (84) ont montré que le dérivé acétylé du 4HAQ (voir schéma ci-dessous) induisait des sarcomes au site d'injection. Ils émettent l'hypothèse que l'existence de ce composé pourrait expliquer l'activité cancérogène du 4NQ, observée par Mori (63). Cependant ces auteurs n'excluent pas non plus la conversion *in vivo* de ce composé monoacétylé du 4HAQ, en un composé N-oxyde.



Ac-4HAQ



Ac-4HAQO

Deuxièmement, un autre point important est la description par Araki d'un composé monoacétylé, l'acétoxyaminoquinoléine-1-oxyde (Ac-4HAQO) (voir schéma ci-dessus) qui est un agent électrophile puissant, et qui réagit de manière covalente sur le poly (A). Malheureusement cette observation n'a pas été étayée par un travail expérimental sérieux. En particulier, elle n'a pas fait l'objet de publications : elle est simplement citée sous forme de "communication personnelle" aux auteurs qui ont écrit une revue sur le 4NQO en 1976 (66).

Nous avons donc choisi, dans notre laboratoire, le composé diacétylé comme modèle d'étude *in vitro*; de plus il présente l'avantage de pouvoir être synthétisé chimiquement sans trop de difficultés (41).

L'utilisation du dérivé diacétylé du 4HAQO a déjà permis à Sylvie Galiègue d'effectuer des études physicochimiques (30), études qui ne peuvent être effectuées que sur des DNA fortement modifiés. Or, ces modifications importantes ne peuvent être obtenues que grâce à un système *in vitro*.

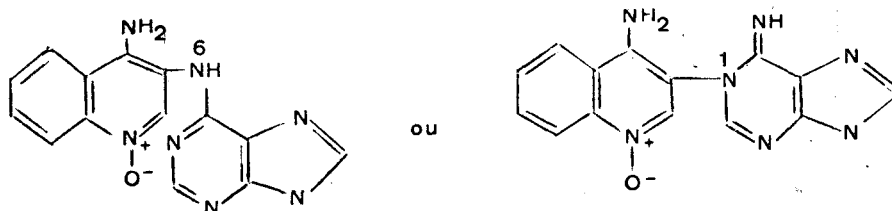
CHAPITRE III : LES LESIONS SUR LE DNA

Depuis la mise en évidence de la fixation covalente d'une forme active du 4NQO sur le DNA (48, 3), de nombreuses études ont été effectuées dans le but de connaître les sites de fixation sur les bases du DNA. (Nous ne parlerons pas ici des études *in vitro* avec le 4NQO lui-même qui ont permis de mettre en évidence une interaction non covalente 4NQO-DNA. Cette interaction est de nature ionique (74)).

Tada et Tada (94), à l'aide de cellules ascitiques cultivées en présence de 4NQO marqué, ont montré que le site de fixation était constitué principalement par les bases puriques. Ces auteurs (96) ont ensuite utilisé un système *in vitro* avec le 4HAQO, mais en présence du système enzymatique qui permet son activation sous forme de cancérigène ultime. La réaction d'un tel système soit avec le DNA, soit avec les nucléotides, conduit à la formation de composés qui, après hydrolyse acide, sont chromatographiés sur papier. Leur révélation permet de montrer l'existence de quatre produits :

- deux d'entr'eux correspondent à des composés d'addition sur la guanine : ils sont stables.
- un autre composé d'addition, stable lui aussi, correspond à l'adénine.
- un autre composé d'addition mineur sur la guanine est également identifié. Ce produit est instable et il se décompose en 4AQO lors de l'hydrolyse.

Cependant les atomes concernés sur ces bases lors de la fixation du cancérigène ne sont pas encore identifiés, sauf pour le composé d'addition formé avec l'adénine. Kawazoe *et al* (42) en ont synthétisé une quantité suffisante (par action *in vitro* sur le poly (A) du 4HAQO en présence du système enzymatique de Tada (95), puis hydrolyse du poly (A) modifié) pour en réaliser une étude spectroscopique. Cette étude leur permet de proposer les deux structures suivantes dont l'une seule est possible :



Dans le cas de la guanine, Tada *et al* (94) suggèrent que le site de fixation soit le carbone en position 8; cependant aucune étude supplémentaire de ces auteurs n'est venue confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Il semble donc que, dans ce domaine, de nombreuses études doivent encore être entreprises.

Comme nous l'avons dit précédemment, le devenir des lésions dans la cellule est un problème important. En ce qui concerne les lésions causées par le 4NQO, les mécanismes de leur réparation ont fait l'objet d'études nombreuses (90, 37, 2). De toutes ces études, un fait important est à retenir : les lésions causées par le 4NQO seraient réparées par les deux mécanismes d'excision-réparation que nous avons vus dans le chapitre I. Rappelons les faits marquants qui distinguent ces deux mécanismes : l'un d'eux implique un nombre de nucléotides important (100 nucléotides environ) alors que l'autre nécessite l'excision de 4 à 5 nucléotides.

Regan et Setlow (79) montrèrent que les lésions causées par les rayonnements UV et les précancérogènes étaient réparées par l'excision-réparation d'un nombre important de nucléotides, alors que les lésions causées par les agents alkylants et les radiations ionisantes font intervenir l'autre processus, c'est-à-dire celui mettant en jeu un petit nombre de nucléotides.

Il semble donc que le 4NQO induise des lésions de natures différentes sur le DNA (79). Ceci pourrait être un argument favorable pour étayer l'hypothèse de l'existence du dérivé diacétylé du 4HAQO, comme cancérogène ultime : les lésions réparées de la même façon que celles dues aux précancérogènes et aux UV, seraient très probablement dues à la fixation du cycle quinoléique sur le DNA; alors que les lésions réparées selon un mécanisme identique à celui des radiations ionisantes ou des agents alkylants pourraient être dues à une acétylation du DNA.

En conclusion, il semble prometteur d'étudier le di Ac-4HAQO comme modèle *in vitro* de cancérogène ultime.

TROISIEME PARTIE

TRAVAIL PERSONNEL

Le but du travail présenté ici consiste en l'étude de la structure des composés d'addition du di Ac-4HAQO sur le DNA en utilisant les nucléosides correspondants comme modèles.

Pour faire cette étude nous avons conservé les conditions de réaction (solvants, temps de réaction, température) utilisées par S.Galiègue lors de l'étude de la réactivité du di Ac-4HAQO sur le DNA. En effet, le fait de modifier d'une manière importante les conditions de réaction, aurait amené un doute quant aux résultats obtenus et aux conclusions qui en découlent.

De plus, dans une telle étude, il est nécessaire de comparer les composés d'addition obtenus *in vivo* sur le DNA après injection du 4NQO ou du 4HAQO avec ceux obtenus *in vitro* par action directe du di Ac-4HAQO aussi bien sur le DNA que sur les modèles utilisés (c'est-à-dire les bases nucléiques).

Cette démarche doit être effectuée car il nous est impossible actuellement d'élucider la structure des composés d'addition de la quinoléine sur les bases du DNA, en utilisant uniquement le DNA modifié *in vivo* : le rendement de la fixation du cancérogène est en effet beaucoup trop faible dans ce cas pour que la modification soit exploitable. La structure des composés d'addition quinoléine-nucléosides n'est donc possible que grâce à l'utilisation de modèles qui réagissent *in vitro*.

Cependant l'utilisation de quinoléines marquées a permis, dans un premier temps, de mettre en évidence les composés d'addition formés *in vivo*, et d'en déterminer certaines caractéristiques.

Etant donné la grande réactivité du di Ac-4HAQO, nous nous sommes tout d'abord intéressés à son hydrolyse lorsqu'il est dissous dans le solvant qui sera utilisé lors de la réaction sur les nucléosides. Cette étude a été faite pour deux raisons :
- premièrement afin de mettre en évidence les composés formés lors de l'hydrolyse par la méthode analytique utilisée lors de la réaction avec les nucléosides; il faudra en effet que nous puissions faire une distinction entre les composés dûs uniquement à l'hydrolyse du di Ac-4HAQO et ceux correspondants aux produits d'addition.

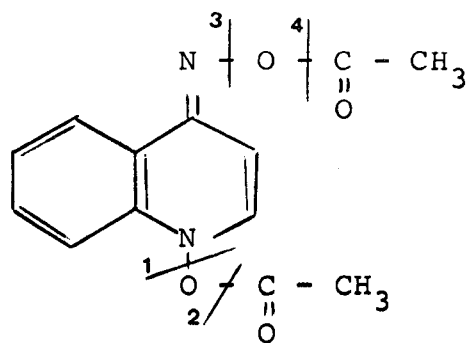
- deuxièmement afin d'essayer de comprendre par quels mécanismes les bases du DNA sont modifiées. Certes l'étude du mécanisme de réaction du di Ac-4HAQO dans l'eau est une approche différente, mais elle est cependant intéressante : on peut penser que la connaissance des processus d'hydrolyse permettrait d'identifier les entités susceptibles d'attaquer les sites nucléophiles ; leur identification fournirait une information précieuse sur la structure éventuelle du résidu quinoléine qui se fixe aux nucléosides. Dans ce sens, une collaboration est entreprise avec l'équipe du Professeur J. Lhomme.

Si l'on examine la structure du composé diacétylé, on peut penser que seules les quatre liaisons représentées sur le schéma ci-contre sont labiles. A la suite de leurs cassures des agents réactifs électrophiles se formeraient, qui seraient susceptibles de modifier le DNA en réagissant de façon covalente sur les bases.

C'est en nous inspirant des mécanismes d'action des cancérogènes ultimes de l'AAF, qui sont maintenant parfaitement connus, que nous avons adopté l'hypothèse suivante qui semble raisonnable : dans le cas de la réaction du cancérogène ultime du 4NQO sur le DNA, deux réactions différentes pourraient intervenir, à savoir la fixation de la quinoléine, et celle d'un groupement acétyle sur le DNA.

A l'heure actuelle, non seulement la nature des mécanismes éventuellement mis en jeu - ionique et/ou radicalaire - est encore inconnue, mais on a seulement mis en évidence l'addition du cycle quinoléine, addition qui est d'ailleurs parfaitement démontrée aussi bien *in vivo* que *in vitro*. En ce qui concerne une éventuelle acétylation, son identification *in vivo* paraît très difficile; pour cela seules pourront être entreprises des études *in vitro*.

C'est dans ce but que nous avons préparé du di Ac-4HAQO marqué spécifiquement sur les fonctions acétyle. Pour cela nous avons dû modifier le protocole de synthèse du di Ac-4HAQO.



di Ac-4HAQO

De plus, afin de savoir si cette acétylation provenait spécifiquement d'une des deux fonctions acétyl, nous avons cherché à synthétiser du di Ac-4HAQO sélectivement marqué au ^3H sur une seule des fonctions acétyl.

Pour essayer d'effectuer cette synthèse, nous avons cherché à hydrolyser sélectivement une fonction acétyl. L'obtention d'un composé monoacétylé nous permettrait en effet la préparation, par réacétylation avec de l'anhydride acétique marqué aux isotopes radioactifs, d'un di Ac-4HAQO marqué spécifiquement sur un seul des deux acétyl. De plus nous pourrions étudier la réactivité de ce monoacétyl vis à vis des nucléosides ou du DNA.

Malheureusement nous n'avons pu réaliser cette synthèse; mais les essais que nous avons effectués dans ce but, nous ont permis d'identifier, sans toutefois l'isoler, un dérivé monoacétylé qui, nous semble-t-il, joue un rôle important dans le mécanisme d'action du diacétyl.

L'ensemble de nos travaux personnels est présenté dans les deux chapitres suivants :

Le premier est réservé à la partie expérimentale proprement dite, alors que le second donne les résultats que nous avons obtenus.

Nous avons regroupé dans un appendice technique situé à la fin de ce mémoire, les détails des manipulations ainsi que les principes des techniques physicochimiques utilisées.

CHAPITRE I : PARTIE EXPERIMENTALE

1) Les cancérogènes.

Toutes les manipulations ont été effectuées sous une hotte puissante, avec des gants, dans une pièce aménagée pour l'utilisation d'isotopes radioactifs.

a) le 4NQO.

Le 4NQO a été acheté dans le commerce (Fluka) et utilisé tel quel. Son point de fusion est de 155°C, ce qui est en accord avec la littérature (72).

Ce composé étant sensible à la lumière, il est conservé 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, selon la méthode de Enomoto *et al* (26).

L'hydrogénation modérée se fait par l'acide ascorbique. Le mode opératoire détaillé est décrit dans l'appendice technique de ce mémoire.

Nous avons caractérisé le 4HAQO, et nos résultats sont en accord avec ceux de Okano *et al* (72, 73) :

- point de fusion : 202°C.

- spectre d'absorption : en solution dans du tampon citrate 2.10^{-3} M, pH 7, deux maxima sont observés à 256 nm et 358 nm.

Poids moléculaire du 4HAQO : 176 g.

c) le di Ac-4HAQO.

Ce composé a été synthétisé à partir du cancérogène précurseur, le 4HAQO.

Cette étape a été réalisée selon la méthode de Kawazoe et Araki (41), l'agent acétylant utilisé étant l'anhydride acétique pur. Le mode opératoire est décrit dans l'appendice technique. Le composé obtenu possède les caractéristiques énoncées par Kawazoe et Araki (41) :

- cristaux légèrement colorés (beige).
- point de fusion : 110°C.
- spectre RMN dans le chloroforme (30) identique.
- spectre IR, en pastille de KBr (voir figure dans chapitre page 55) identique.

La pureté du composé a été testée par la technique de chromatographie haute performance en phase liquide (HPLC) permettant une séparation très fine des différents composés d'un mélange suivant leur polarité.

Cette technique est décrite dans l'appendice technique de ce mémoire.

La figure 2 montre le profil de chromatographie du di Ac-4HAQO préalablement solubilisé dans l'éthanol absolu : un seul pic, détecté à 254 nm, est obtenu au temps de rétention de 16,6 min. Ce dérivé étant très réactif, il se décompose facilement à l'air en présence d'eau, et à la lumière. Il est donc conservé dans un récipient fermé, purgé à l'azote, en présence de desséchant, à l'obscurité et à -20°C.

d) le di Ac-4HA[2-³H]QO.

Nous avons aussi employé du 4NQO marqué au tritium sur le cycle quinoléine, pour effectuer la synthèse du 4HAQO, puis du di Ac-4HAQO.

Le 4 nitro [2-³H]quinoléine-1-oxyde a été acheté à la société Amersham.

Ce composé est obtenu par nitration du [2-³H]quinoléine-1-oxyde (69) qui est lui-même synthétisé à partir du 2 chloro-quinoléine-1-oxyde.

Les cancérogènes que nous allons synthétiser seront donc tritiés spécifiquement sur le carbone 2 de la quinoléine.

Les 50 mCi du produit commercial 4N [2-³H]QO ont une radioactivité spécifique de 941 mCi/mmole, correspondant à 10,1 mg, quantité trop faible pour réaliser une synthèse. Il a donc été dilué par

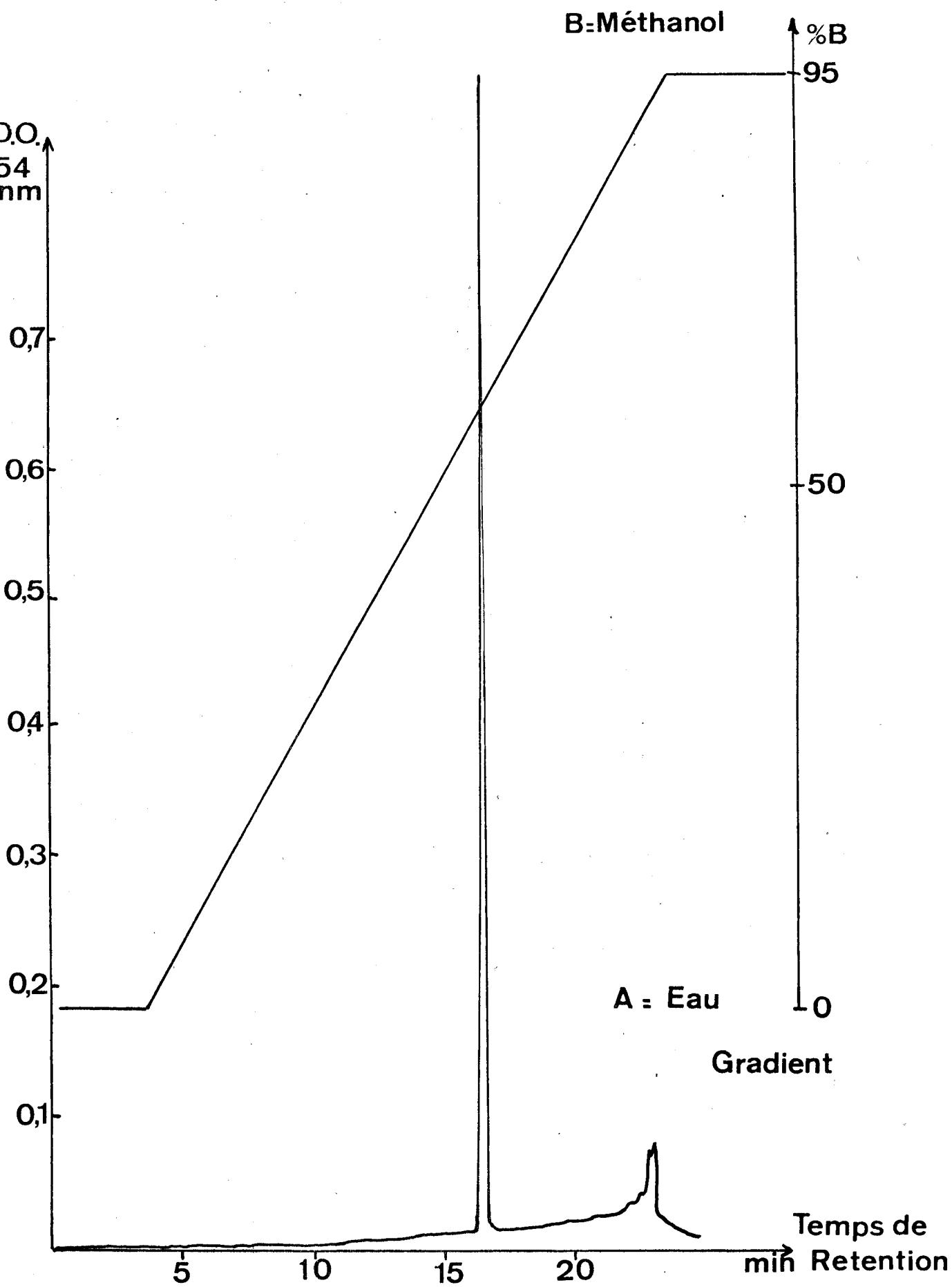


Figure 2 . Profil de chromatographie HPLC du diAc.4HAQO

du 4NQO froid, afin d'obtenir 500 mg de produit, de la façon suivante :

le 4NQO marqué commercial a été solubilisé dans 4 ml d'éthanol absolu. On prélève sur cette solution 15 aliquotes de 8 μ l (correspondant à 0,1 mCi chacune) ; après évaporation de l'éthanol par un courant d'azote, ce 4NQO marqué, de radioactivité spécifique élevée, servira aux manipulations *in vivo* qui, au laboratoire, sont effectuées par Sylvie Galiègue (30). A la solution restante de 4 N[2-³H]QO (48,5 mCi), on ajoute 490 mg de 4NQO froid et de l'éthanol absolu, jusqu'à solubilisation totale. C'est à partir de cette solution qu'est effectuée la synthèse du 4 HA [2-³H]QO selon le protocole habituel.

Le 4HAQO ainsi synthétisé a une radioactivité spécifique de 18,44 mCi/m mole.

Ce 4HAQO qui est le cancérogène intermédiaire, est lui aussi utilisé pour les manipulations *in vivo*.

La synthèse du di Ac-4HA[2-³H]QO a été effectuée à partir de petites quantités de 4HA[2-³H]QO. Les conditions de réaction sont les mêmes que lors de la synthèse du di Ac-4HAQO froid.

e) le di[³H]Ac-4HAQO.

Nous avons du modifier la synthèse décrite par Kawazoe et Araki (41) pour synthétiser le composé marqué aux isotopes radioactifs sur les groupements acétyl ; en effet, la synthèse classique de Kawazoe et Araki aurait fait perdre une quantité trop importante d'isotopes radioactifs.

Nous avons mis au point le protocole suivant :

100 mg (0,57 mmole) de 4HAQO sont placés dans un petit ballon, plongé dans un bain de glace. Après addition de 0,36 ml (3,4 mmoles) d'anhydride acétique et 0,5 ml d'acide acétique, on fait barboter de l'azote dans le mélange qui presque instantanément devient limpide, avec une légère coloration verte.

La solution est maintenue sous courant d'azote pendant 10 minutes. On verse ensuite la solution dans un bécher, contenant 80 ml d'eau glacée, sous agitation vigoureuse. Le bécher est maintenu dans un bain de glace-acétone à environ -10°C. Le précipité résultant est recueilli par filtration; il est ensuite lavé à l'eau froide et séché sous vide. Ce composé est stocké sous vide à -20°C et à l'obscurité.

Le composé obtenu possède les caractéristiques annoncées par Kawazoe et Araki (41) : coloration, point de fusion, spectres IR et RMN.

Nous avons synthétisé du di [^3H]Ac-4HAQO à partir de 100 mg de 4HAQO et 25 mCi d'anhydride acétique avec cette nouvelle synthèse. Le di ^3H Ac-4HAQO obtenu a une radioactivité spécifique de 6,72 mCi/mmole.

2) Préparation des solutions.

a) Lors de l'étude de la réactivité du di Ac-4HAQO.

Conditions de solvant

Nous nous sommes placés dans des conditions de tampon analogues à celles utilisées pour effectuer la réaction du di Ac-4HAQO sur le DNA (30), c'est-à-dire en tampon citrate $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$, pH 7. Le di Ac-4HAQO est solubilisé dans l'éthanol et l'étude de sa solvololyse est effectuée dans un mélange tampon citrate-éthanol dont les proportions respectives sont différentes d'un essai à l'autre. Mais lors de la réaction du di Ac-4HAQO sur les nucléosides, le pourcentage de l'éthanol dans le milieu réactionnel est toujours maintenu à 20%.

Conditions de concentration

Nous utilisons une solution mère de di Ac-4HAQO à 7,8 mg/ml dans de l'éthanol à 99,9% de pureté (Prolabo) afin d'éviter sa décomposition.

Le mélange réactionnel, lors de l'étude de la solvololyse du di Ac-4HAQO, est obtenu en ajoutant des volumes différents de tampon citrate $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$, pH 7, à 200 μl de la solution mère de cancérrogène (voir tableau ci-après). Les solutions sont ajustées à 1 ml à l'aide d'éthanol pur. Lors de l'étude de la réactivité du di Ac-4HAQO sur les nucléosides, l'adénosine (Ade) ou la guanosine (Gua) sont solubilisées dans le tampon citrate $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$, pH 7, de façon à obtenir une concentration molaire finale en nucléosides égale à la moitié de celle du cancérrogène : ce qui correspond à une solution de guanosine à 1,06 mg/ml et d'adénosine à 1,00 mg/ml (voir tableau ci-après).

| | Constitution des solutions | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------|
| | % Ethanol | di Ac-4HAQO 7,8 mg/ml | Tampon citrate $2 \cdot 10^{-3}$ pH7 | Solution de guanosine 1,06mg/ml | Solution d' adénosine 1,00mg/ml | Ethanol |
| Solvolyse | 20 | 200 μ l | 800 μ l | 0 | 0 | 0 |
| du | 50 | 200 μ l | 500 μ l | 0 | 0 | 300 μ l |
| i Ac-4HAQO | 67 | 200 μ l | 330 μ l | 0 | 0 | 470 μ l |
| Réaction li Ac-4HAQO Guanosine | 20 | 200 μ l | 0 | 800 μ l | 0 | 0 |
| Réaction li Ac-4HAQO Adénosine | 20 | 200 μ l | 0 | 0 | 800 μ l | 0 |

Temps de réaction

Les solutions di Ac-4HAQO-nucléoside sont incubées à l'obscurité, à 37°C. Le temps de réaction a été choisi d'après le temps de durée de vie du di Ac-4HAQO qui a été expérimentalement trouvé (par HPLC) être de 45 min dans un mélange tampon citrate-éthanol 4/1. Nous employons donc une incubation de 45 min.

b) Lors de l'étude de la réaction di Ac-4HAQO-DTT (Préparation de Ac-4HAQO).

Nous verrons dans le chapitre suivant que dans certaines conditions, le dithiotreitol (DTT) modifie le di Ac-4HAQO en un composé monoacétylé, dont la formule correspondrait à celle de l'acétoxyaminoquinoléine-1-oxyle (Ac 4HAQO) (66). Nous avons étudié cette réaction en RMN du proton (voir chapitre II page 56).

La solution d'étude a été préparée par addition de 300 μ l de diméthylsulfoxyde (DMSO) deutérié au mélange réactionnel contenant 30 mg de di Ac-4HAQO et 18 mg de DTT, c'est-à-dire dans des proportions telles que les réactifs soient présents en quantités équimolaires. La concentration élevée en cancérigène (environ 10%) permet d'obtenir des spectres en onde continue

c) Lors de l'étude de la réactivité de l'Ac-4HAQO.

Il ne nous a pas été possible d'isoler du milieu réactionnel (DMSO) le composé monoacétylé, vraisemblablement l'Ac-4HAQO, cité dans le paragraphe précédent. Nous avons donc utilisé directement le mélange réactionnel aussi bien pour l'étude de la solvolysse que pour celle de la réactivité du monoacétyl vis à vis des nucléosides puriques. La réaction DTT-di Ac-4HAQO dans le DMSO est complète 15 min après la solubilisation des composés. Donc pour effectuer la réaction de synthèse de l'Ac-4HAQO, nous employons les mêmes conditions de concentrations que celles décrites lors de l'étude RMN.

La solvolysse du monoacétyl ainsi préparé est effectuée en ajoutant à la solution réactionnelle 63 μ l de tampon citrate 2.10^{-3} M pH 7. Ce tampon est remplacé par une quantité équivalente de solution de guanosine ou d'adénosine lors de l'étude de la réactivité du monoacétyl sur les nucléophiles du DNA. La concentration finale du cancérigène et des nucléosides est analogue à celle utilisée lors de l'étude similaire avec le di Ac-4HAQO (Chapitre I paragraphe 2 page 43).

Cependant ce milieu réactionnel comporte 1,5 % de DMSO, mais pas d'éthanol qui, précédemment, servait à solubiliser le di Ac-4HAQO.

Après une agitation préalable, cette solution est incubée à 37°C pendant 45 min. Ces conditions d'incubation sont analogues à celles employées lors de la réaction avec le di Ac-4HAQO.

3) Méthodes de séparation.

Deux faits nous ont amenés à utiliser la méthode de séparation très fine et très rapide qu'est la HPLC (chromatographie liquide haute performance) : l'instabilité des composés vis à vis de la lumière et de l'oxygène, et comme nous allons le voir, la complexité des hydrolyses. Le principe de cette technique est décrit dans l'appendice technique de ce mémoire.

La solution à séparer, est injectée sur la colonne, et les composés sont élués à l'aide d'un gradient* H₂O-méthanol (débit de 2 ml/min). Un détecteur d'absorption ultra violet ($\lambda = 254$ nm

* gradient linéaire. A : H₂O B : méthanol/H₂O (95/5) en 20 min.

ou 365 nm) donne directement le profil d'élution des composés en fonction du temps.

La colonne que nous avons employée, est une colonne analytique garnie d'une phase inverse : μ Bondapack C 18. Bien que les séparations effectuées soient analytiques, il est possible d'augmenter le volume d'injection (environ 1 ml) et d'effectuer une récupération des composés chromatographiques. Nous pouvons ainsi nous servir de cette colonne en semi préparative.

La résolution et la fidélité très grandes de l'appareil utilisé (Waters ALC/GPC 244 U, 6000 A, M 660)*, nous permettent de calculer la quantité de composé injecté, car l'intensité du pic obtenu sur le profil d'élution lui est proportionnel. Nous mettrons cette propriété à profit, après étalonnage de l'appareil avec le di Ac-4HAQO, pour déterminer la quantité de di Ac-4HAQO restant lors d'une hydrolyse incomplète du cancérigène dans l' H_2O .

4) Méthodes spectroscopiques utilisées.

Nous avons employé trois techniques différentes : la résonance magnétique nucléaire du proton (RMN), la spectroscopie infra-rouge (IR) et la spectrométrie de masse.

a) La RMN.

Les mesures ont été effectuées à l'aide de deux spectromètres RMN de performances différentes.

- un spectromètre RMN à 90 MHz, le Perkin Elmer R 32, qui se trouve au laboratoire.

- un spectromètre RMN Bruker : 270 MHz. Il est situé à l'Université René Descartes à Paris dans le laboratoire de Monsieur le Professeur B.Roques.

Les spectres ont été effectués en onde continue, pour les solutions suffisamment concentrées et en Transformée de Fourier avec accumulations pour les petites quantités ou les produits se solubilisant difficilement.

* L'appareil HPLC (Waters ALC/GPC 244 U, 6000 A, M 660) est localisé à l'IRCL dans le laboratoire de M.Pierre Sautière.

b) La spectroscopie IR.

L'appareil utilisé est le spectromètre Perkin Elmer 177 G. Nous avons effectué les spectres IR au laboratoire de Chimie de synthèse de l'UER de Pharmacie de Lille (Professeur C. Lespagnol).

c) La spectrométrie de masse.

Les spectres de masse ont été effectués en injection directe sur le RIBER MAG 10-10, au centre commun de mesures de l'Université des Sciences et Techniques de Lille.

Le principe de ces trois techniques est décrit dans l'appendice technique de ce mémoire.

5) Utilisation d'isotopes radioactifs.

Toutes les manipulations des composés isotopiques radioactifs ont été effectuées dans une pièce spécialement aménagée à cet effet.

Les isotopes radioactifs que nous avons employés sont le tritium et le carbone ^{14}C .

Nous avons utilisé du 4NQO marqué au ^3H sur le carbone 2 pour effectuer la synthèse du 4 HA [2- ^3H] QO, puis celle du di Ac-4HA [2- ^3H] QO par acétylation (voir chapitre I page 40).

L'acétylation du 4HAQO froid a été aussi effectuée à l'aide d'anhydride acétique tritié sur les CH_3 , pour obtenir du di ^3H Ac-4HAQO (chapitre I page 41). L'anhydride acétique employé est acheté dans le commerce (CEA).

Les nucléosides marqués que nous avons utilisés ont été achetés à la même société (CEA) : guanosine et adénosine marquées uniformément au ^{14}C ; guanosine marquée au ^3H sur le carbone 8; adénosine marquée au ^3H sur le carbone 2.

Pour mesurer la radioactivité d'un échantillon, nous ajoutons 3 ml de liquide scintillant pour composés solubles (Aqualuma), dans une fiole contenant le composé radioactif solubilisé. La radioactivité contenue dans la fiole de comptage est mesurée sur un compteur à scintillation situé à l'IRCL (Nuclear

Chicago Isocap 300). L'appareil nous donne automatiquement le nombre de coups par min.

Le volume et la nature de la solution contenant le composé marqué peuvent abaisser le rendement de l'appareil. Ceci est connu sous le nom de quenching.

Lors de l'utilisation de la HPLC couplée à une détection en radioactivité, la chromatographie est effectuée avec un gradient H₂O-méthanol et les fractions obtenues sont de 500 µl. Nous avons donc effectué une courbe du quenching en fonction du pourcentage de méthanol de la manière suivante :

des échantillons contenant le liquide scintillant et une quantité donnée de radioactivité, dans un volume très faible sont préparés. Après avoir mesuré la radioactivité dans ces aliquotes, nous ajoutons 500 µl de solvant H₂O-méthanol dans des rapports différents (10/10, 9/1.....1/9, 0/10).

Ces échantillons préalablement agités sont à nouveau comptés. Nous traçons alors le rapport de la radioactivité initiale sur la radioactivité obtenue en fonction du pourcentage de méthanol (Figure 3). La valeur de ce rapport est supérieure à 1 et augmente pour les pourcentages de méthanol élevés. Ces résultats montrent que les 500 µl d'H₂O diminuent la radioactivité de 15 % et cette diminution devient plus importante lorsque le pourcentage de méthanol dans les 500 µl est supérieur à 70 %.

Nous nous servons de cette courbe pour calculer la radioactivité réelle des fractions obtenues en HPLC.

Calcul utilisé

Lors de la séparation de composés radioactifs en HPLC, nous pouvons doser chaque composé en mesurant l'intensité du pic correspondant en radioactivité. Nous tenons tout d'abord compte du quenching et du rendement du compteur à scintillation pour obtenir une valeur en µCi.

Le rendement du compteur est calculé à l'aide d'un témoin de radioactivité connue. La connaissance de la radioactivité spécifique du composé nous permet alors de calculer le nombre de moles du composé détecté.

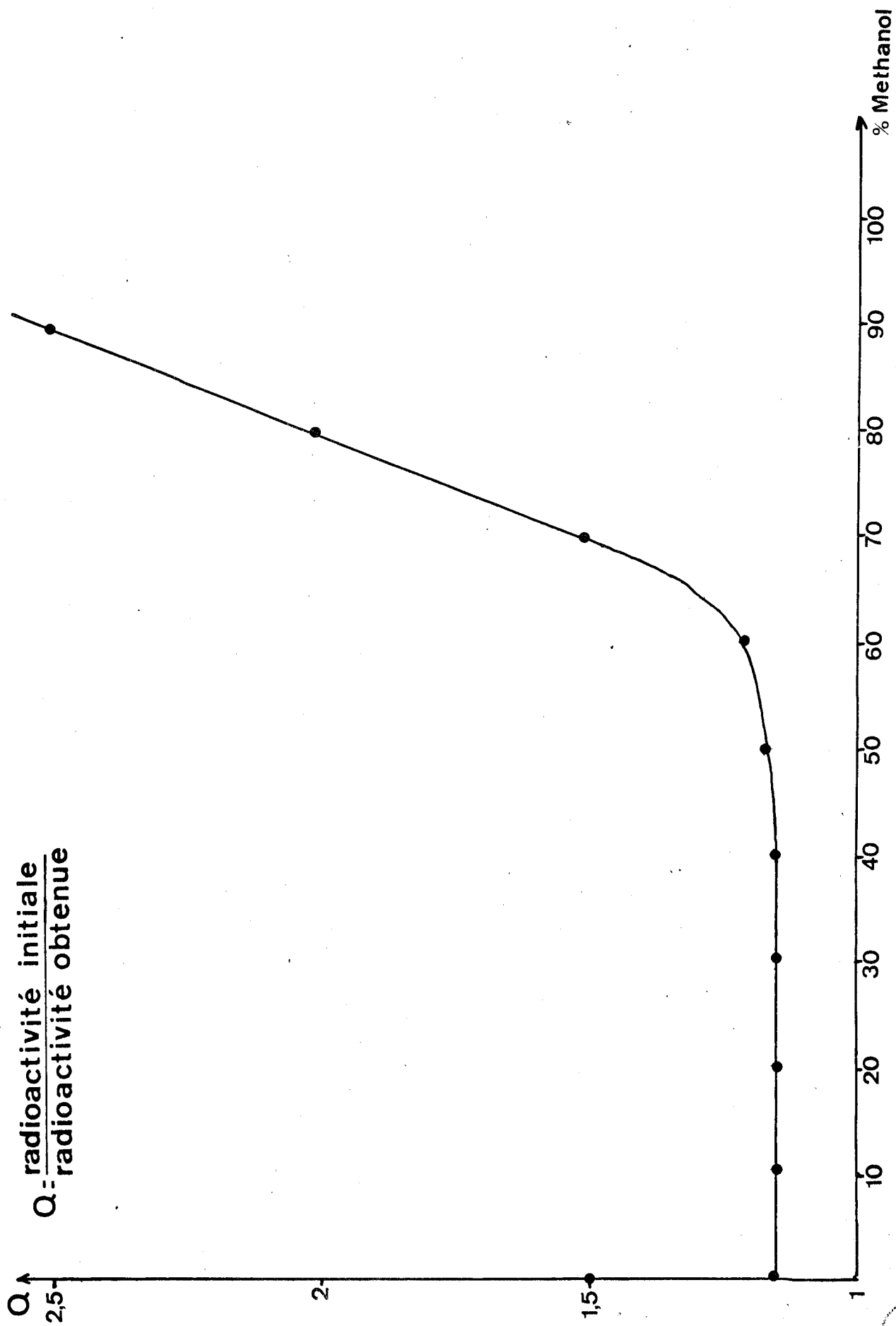


Figure 3. Courbe de quenching.



Nous nous servons de cette méthode, aussi bien en ^{14}C qu'en ^3H pour calculer, soit les pourcentages des différents composés formés (hydrolyse du di Ac-4HAQO), soit le pourcentage de nucléosides modifiés (Réaction Nucléoside-di Ac-4HAQO ou Ac-4HAQO). Il faut remarquer que le choix de ribonucléosides au lieu de desoxyribonucléosides pour effectuer ces études est dû au fait que seul les nucléosides radioactifs sont vendus dans le commerce.

CHAPITRE II . RESULTATS

1) Etude du di Ac-4HAQO.

a) Synthèse du di [^3H]Ac-4HAQO.

La synthèse du di Ac-4HAQO, décrite dans l'appendice technique a été proposée par Kawazoe et Araki (41). Cette synthèse utilise l'anhydride acétique qui sert à la fois d'agent acétylant et de solvant de réaction. L'utilisation de cette méthode pour la synthèse du di [^3H]Ac-4HAQO ferait donc perdre une grande quantité d'anhydride acétique (Ac_2O) ^3H , puisqu'elle utilise une quantité d' Ac_2O qui est de l'ordre de 30 fois supérieure à celle nécessaire à l'acétylation du 4HAQO.

Notons que la réaction se fait en milieu hétérogène, le 4HAQO n'est pas soluble dans Ac_2O , mais au fur et à mesure que se forme le di Ac-4HAQO, le milieu réactionnel devient limpide. Les premiers essais ont consisté à diminuer le volume d'anhydride acétique. Cette méthode nous a posé des problèmes : selon les conditions utilisées, la solubilisation en fin de réaction ne se fait pas ou la réaction conduit à la décomposition du 4HAQO (noircissement). Ces phénomènes sont probablement dus à l'utilisation d'un volume faible de liquide.

Différents essais utilisant toujours l'anhydride acétique comme agent acétylant, mais avec un autre solvant que l'anhydride acétique lui-même (pyridine, chloroforme, benzène) ont aussi été effectués; ces essais n'ont donné que des résultats négatifs ou peu intéressants : en effet, la précipitation du di Ac-4HAQO dans l'eau, lorsque la réaction est complète, est alors très difficile. Une solution au problème a cependant pu être apportée, en utilisant de l'acide acétique pour diluer l'anhydride acétique; en outre il a été possible de trouver de bonnes conditions de précipitation du di Ac-4HAQO. (en opérant à une température de -10°C environ).

BUS
LILLE

Cette modification de la synthèse du di Ac-4HAQO nous permet de marquer le di Ac-4HAQO sur les acétyle sans employer une quantité considérable de millicuries. En effet nous n'utilisons que 6 moles d'anhydride acétique pour acétyler une mole de 4HAQO.

b) Demi durée de vie du di Ac-4HAQO.

La durée de vie du di Ac-4HAQO dans un solvant H₂O/éthanol a été déterminée par Sylvie Galiègue (30) dans le cadre d'une étude de l'interaction di Ac-4HAQO-DNA.

L'emploi d'un solvant H₂O/éthanol est en effet nécessaire car le di Ac-4HAQO est insoluble dans l'eau mais soluble dans l'éthanol, alors que le DNA et ses monomères sont dissous en phase aqueuse tamponnée.

Nous avons vu que le di Ac-4HAQO pouvait être détecté en HPLC; l'utilisation de cette technique d'analyse nous a permis d'étudier la cinétique d'hydrolyse du di Ac-4HAQO dans différents solvants, en opérant de la manière suivante :

le di Ac-4HAQO est mis en solution dans le milieu réactionnel (H₂O/éthanol) à 37°C. Au bout du temps t, on prélève un échantillon de cette solution que l'on analyse en HPLC. Sur la figure 4, nous avons représenté les profils d'élution (aux temps t=0 et t=45 min) du mélange correspondant à l'hydrolyse du di Ac-4HAQO dans le solvant H₂O/éthanol 80:20.

A t=0, le di Ac-4HAQO n'est pas hydrolysé; le profil d'élution ne fait apparaître qu'un seul pic dont le temps de rétention est de 16,6 min.

A t=45 min, nous détectons 17 composés d'hydrolyse et très peu de di Ac-4HAQO restant.

L'hydrolyse du composé diacétyl est donc très complexe. On peut observer cependant que deux composés semblent majeurs : nous les appellerons composés 7 et 14

La quantité de di Ac-4HAQO restante peut, dans tous les cas, être calculée à partir de la valeur de la densité optique du pic correspondant.

Nous avons donc utilisé cette méthode pour déterminer la demi durée de vie du di Ac-4HAQO dans trois milieux réactionnels (20 %, 50 %, 67 % d'éthanol). Les valeurs des demi durées de vie sont obtenues à partir des courbes représentant la quantité

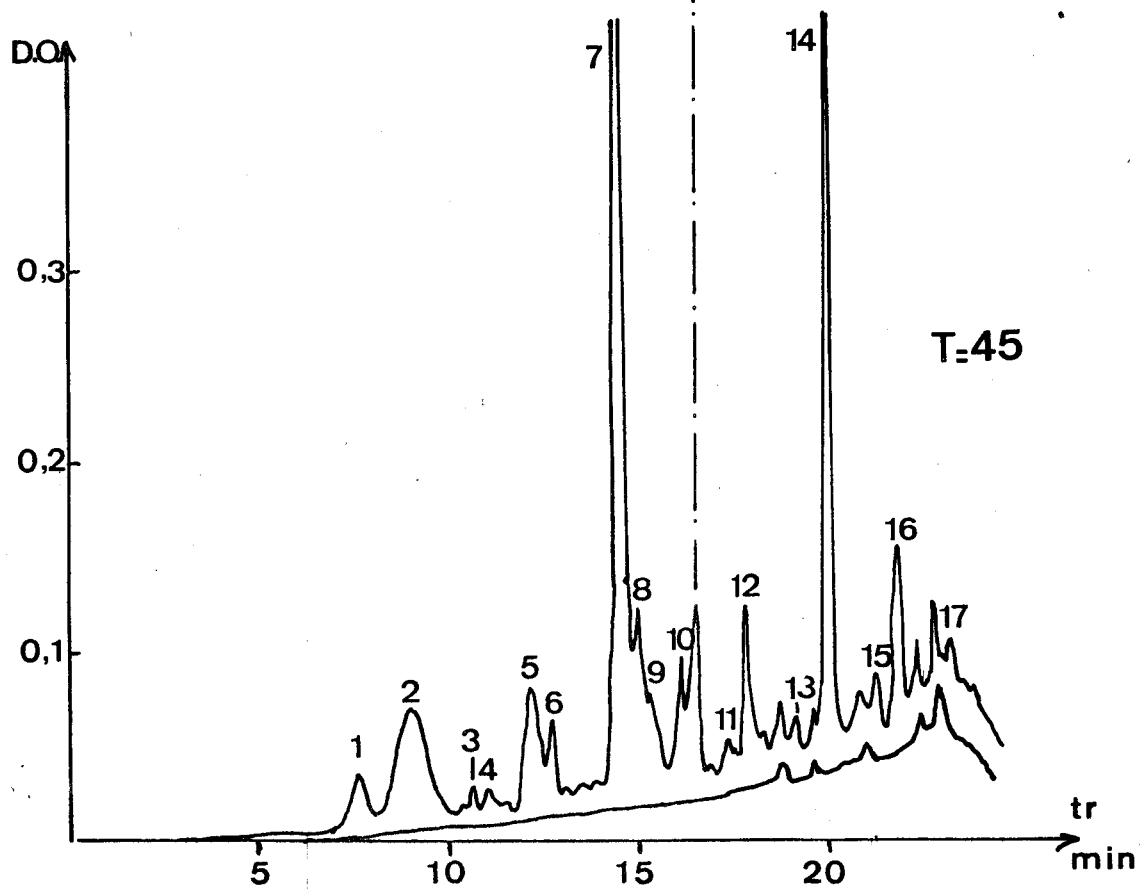
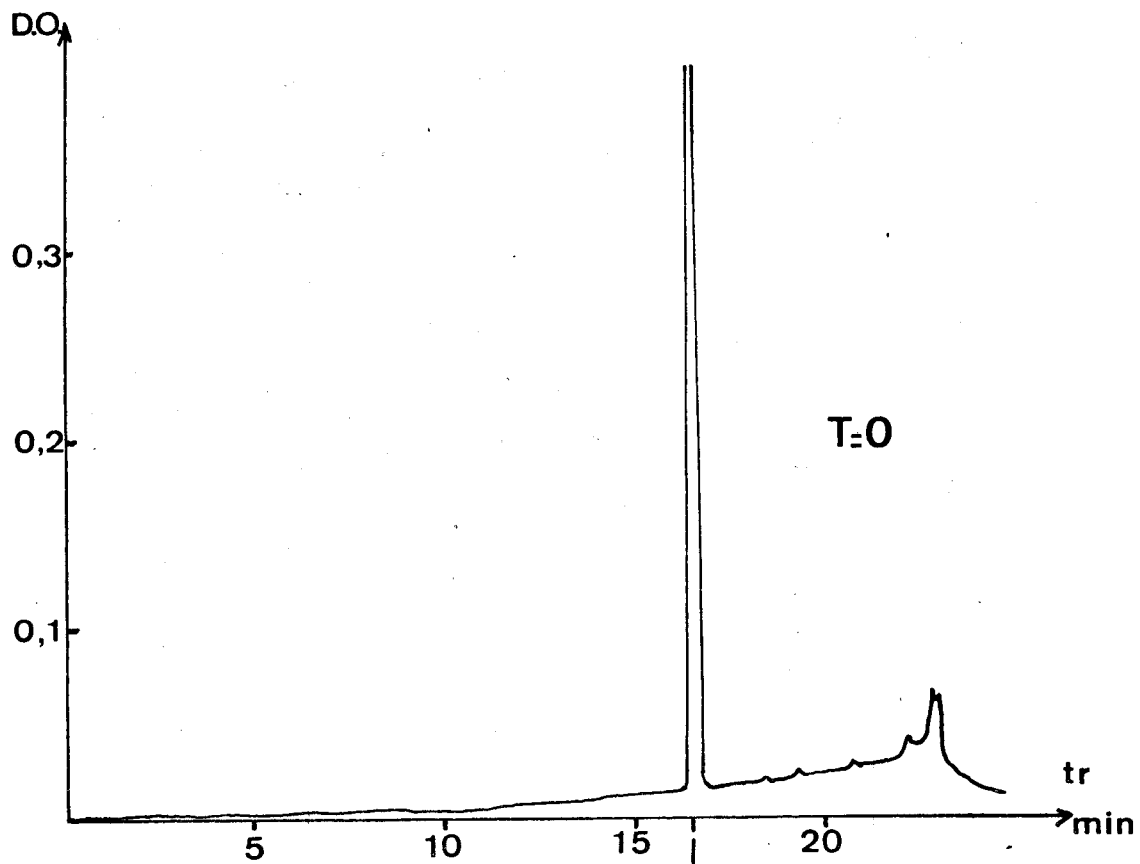


Figure 4. Cinétique d'hydrolyse du diAc-4HAQO.



de di Ac-4HAQO restant en fonction du temps.

Les valeurs obtenues sont exprimées dans le tableau ci-dessous.

| Solvant % éthanol | Demi durée de vie à 37°C | Pourcentage de cancérogène restant |
|----------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| 20% | 12 min | 50% |
| 50% | 45 min | 50% |
| 67% | 80 min | 50% |

Dans les conditions employées, les valeurs des demi durées de vie ne sont pas très précises. Cependant, nous pouvons remarquer que, comme attendu, le di Ac-4HAQO est plus stable dans le milieu réactionnel comportant davantage d'éthanol.

Afin de confirmer et de préciser les résultats analytiques d'hydrolyse du di Ac-4HAQO, nous avons également opéré sur des dérivés radioactifs :

- dans un premier temps, nous avons employé le di Ac-4HA [2-³H] QO; l'utilisation de ce composé nous permettra de calculer le pourcentage de chaque composé formé.
- ensuite, l'emploi du di [³H]Ac-4HAQO nous renseignera sur le devenir des groupements acétyle lors de l'hydrolyse du di Ac-4HAQO.

c) Hydrolyse du di Ac-4HA [2-³H] QO.

Pour déterminer avec quel rendement se forme chacun des composés au cours de l'hydrolyse, il n'est bien sûr pas possible d'utiliser la détection ultra violette, puisque nous ne connaissons pas les coefficients d'extinction molaire correspondants à 254 nm. Nous avons donc utilisé du di Ac-4HAQO marqué au ³H sur le carbone 2 du cycle quinoléine et, après son hydrolyse complète, nous l'injectons en HPLC et mesurons la radioactivité des différentes fractions; ce qui nous permet de calculer le pourcentage de chaque composé formé. Parallèlement, nous réalisons une détection UV à 254 nm. La figure 5 montre le résultat obtenu et le tableau ci-après présente les résultats des calculs.

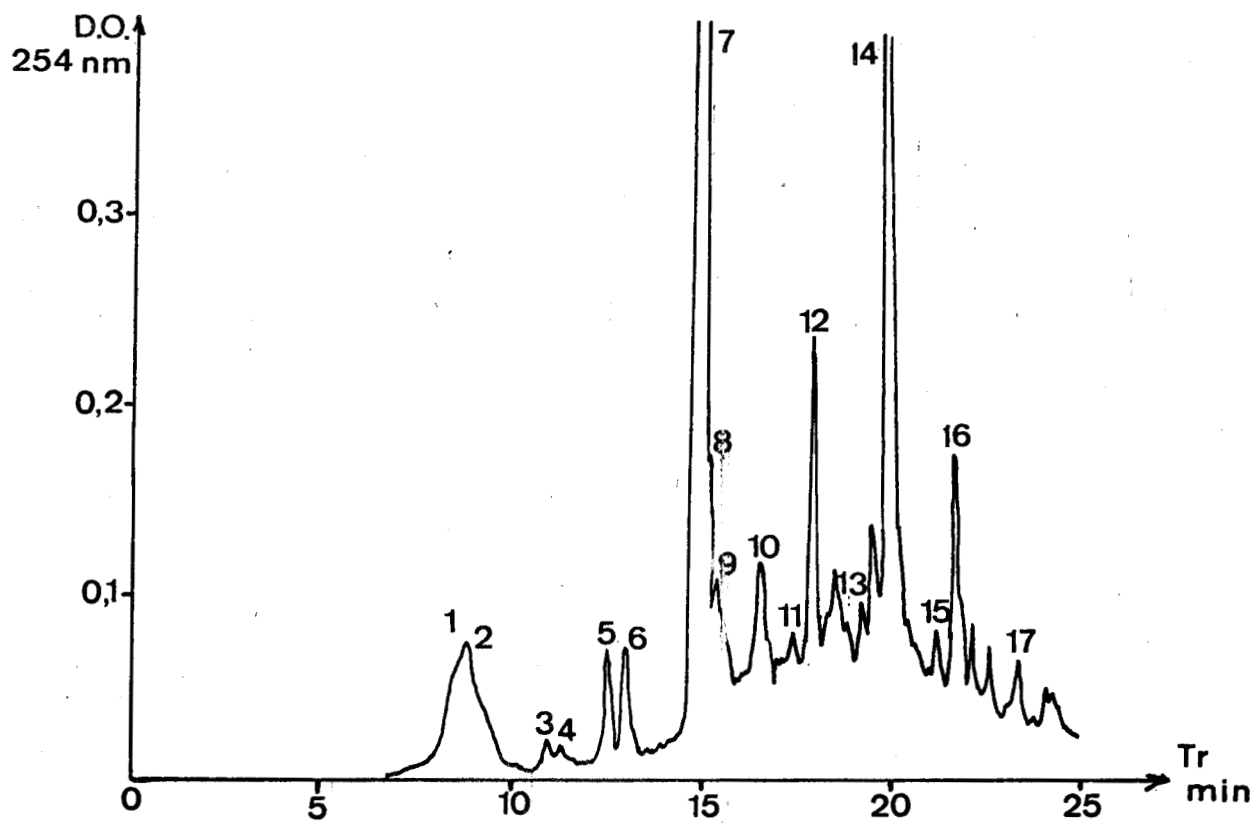
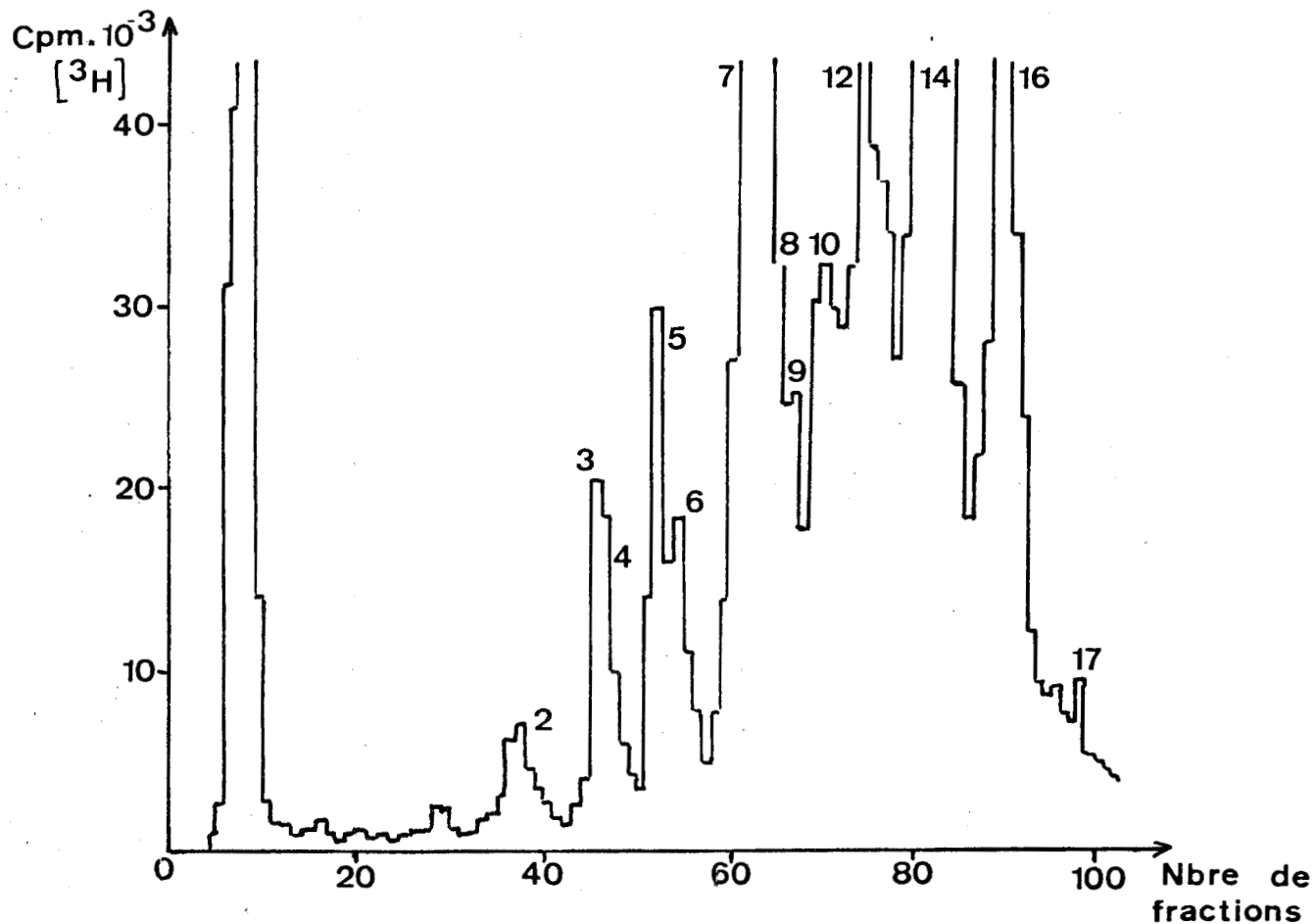


Figure 5. Hydrolyse du diAc-4HA[2- ^3H]OO.

| Temps de Rétention min | Composé | Radioactivité cpm | Pourcentage de radio- activité dans le pic Précision 10% environ |
|---------------------------|----------------|----------------------|--|
| 1,6- 2,4 | volume mort | 1067 | 21,2 |
| 8 - 9,5 | 1-2 | 35 | 0,7 |
| 11 -11,3 | 3-4 | 75 | 1,5 |
| 12,5-13 | 5-6 | 130 | 2,6 |
| 15 | 7 | 1193 | 24 |
| 15,2-15,4 | 8-9 | 90 | 2 |
| 16,6-17,2 | 10-11 | 327 | 6,5 |
| 17,9 | 12 | 347 | 6,9 |
| 18,9 | 13 | 262 | 5,2 |
| 20 | 14 | 805 | 16 |
| 21,2 | 15 | 130 | 2,6 |
| 21,7 | 16 | 478 | 9,5 |
| 22,3 | 17 | 70 | 1,4 |
| TOTAL | | 5013 | 108 |
| INJECTION | | 4650 | 100 |

A partir de ces résultats, nous pouvons faire les constatations suivantes :

1. Aux erreurs d'expérience près, la somme des valeurs de la radioactivité de chaque pic correspond à la radioactivité totale injectée.
2. Au volume mort de la colonne, 1/5 de la radioactivité est mesurée alors qu'il n'y a pas d'absorption UV et que le témoin di Ac-4HA [³H]QO à t=0 ne donne pas de marquage à ce niveau. De plus, étant données les caractéristiques de la colonne, ni le solvant d'injection, ni les composés très polaires ne sont retenus; ils sont donc élués au début du fractionnement.
3. Deux composés sont majeurs : le composé 7 (24%) et le 14 (16%). Les intensités relatives des pics correspondants en UV et en radioactivité sont comparables.

4. Enfin, il faut noter qu'en toute rigueur les valeurs de radioactivité mesurées ne correspondent pas au pourcentage de quinoléine, mais au pourcentage de radioactivité puisqu'on ne peut attribuer à des quinoléines les 20% de radioactivité au volume mort.

Ces observations confirment la validité de la méthode analytique employée. En effet les profils obtenus en UV et en radioactivité étant comparables, sont représentatifs de l'hydrolyse du composé di acétylé.

Il est important de noter l'obtention de 20% de la radioactivité au volume mort correspondant à une réaction qui met en jeu le carbone 2. En effet, il est probable que cette radioactivité n'est plus fixée sur la quinoléine. Notons entr'autre que l'intensité des pics en UV et en radioactivité correspondant à un composé fait parfois apparaître une différence importante : exemple 2.

d) Hydrolyse du di [^3H]Ac-4HAQO.

L'utilisation du di Ac-4HAQO marqué au ^3H sur les CH_3 nous permet de suivre le devenir des fonctions acétyle. La figure 6 nous montre le résultat de la séparation par HPLC des composés obtenus par solvolysse du di [^3H]Ac-4HAQO. Comme précédemment, deux détectations sont employées : l'UV et la radioactivité. Par radioactivité, on observe: un premier pic correspond au di Ac-4HAQO non hydrolysé au temps de rétention de 16,6 min, un deuxième pic au volume mort de la colonne représente l'acide acétique libéré provenant de l'hydrolyse, deux pics mineurs faibles, et enfin un dernier pic qui présente le même temps de rétention que le composé 7 (15 min) lors de l'hydrolyse du di Ac-4HA [$2\text{-}^3\text{H}$] QO (composé majeur 27%). Par conséquent ce composé est acétylé, et comporte un cycle quinoléine. Nous avons donc tenté d'en déterminer sa structure de la manière suivante.

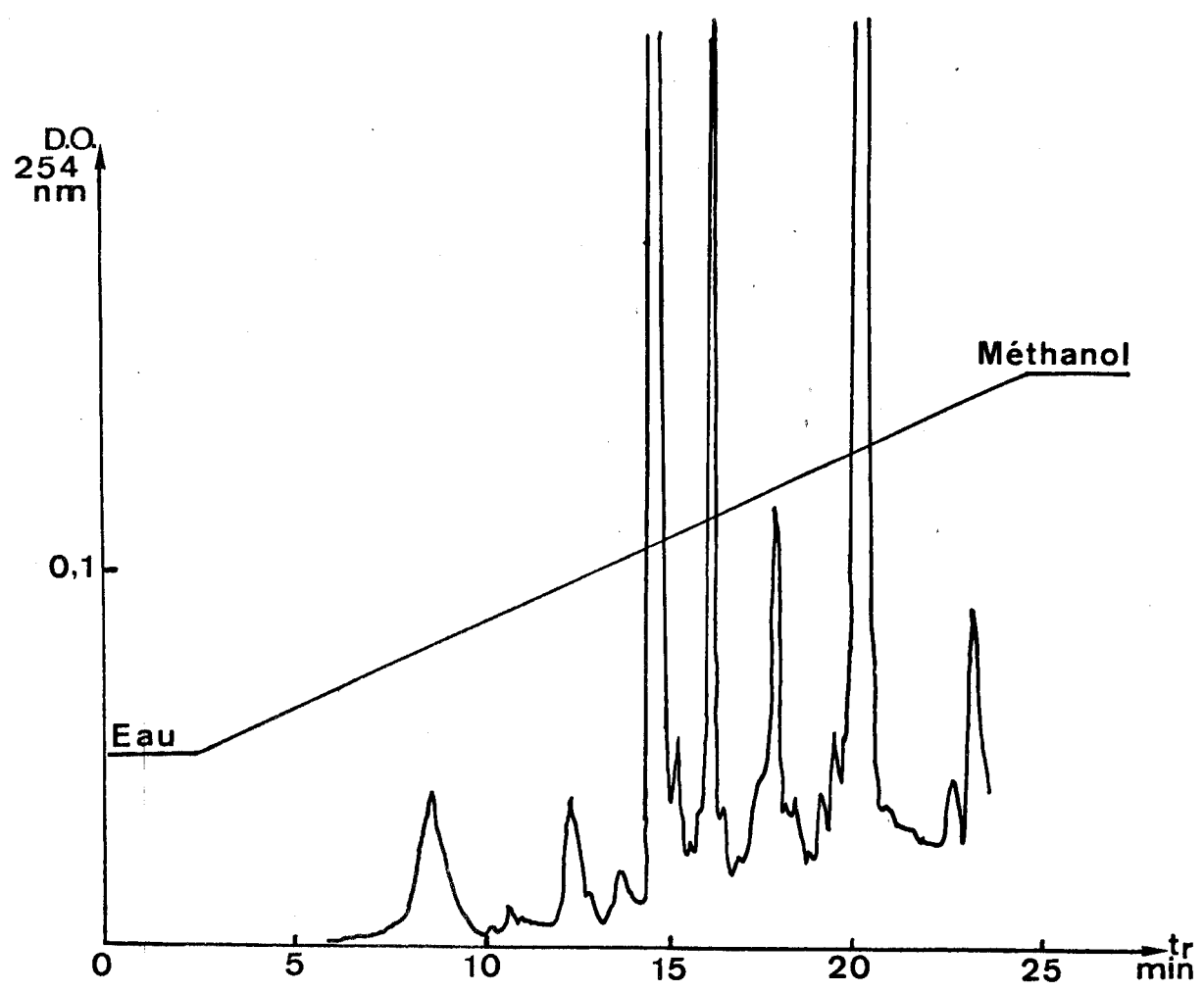
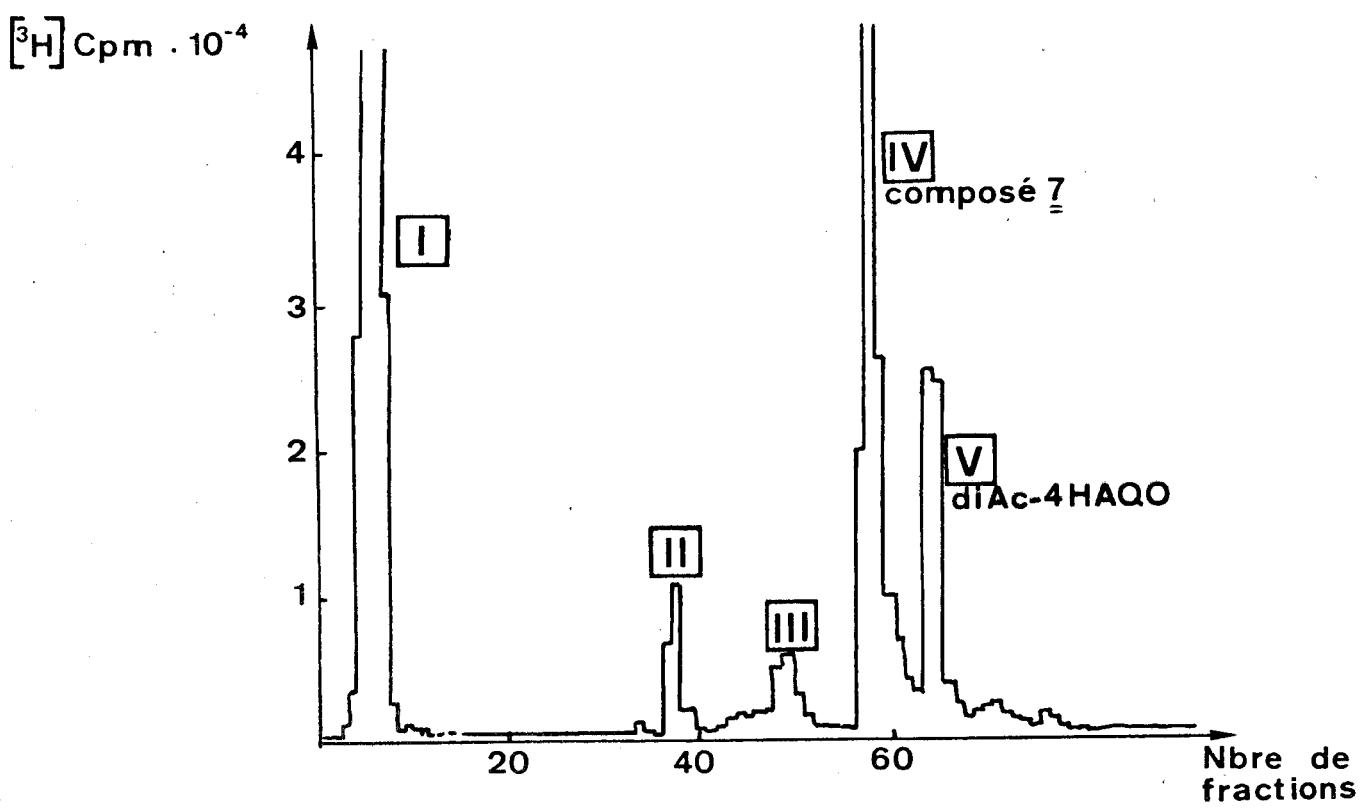


Figure 6. Hydrolyse du $\text{di}[^3\text{H}]\text{Ac-4HAQO}$.



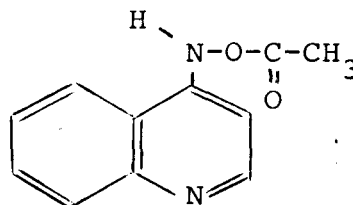
2) Etude structurale d'un composé monoacétylé : le composé 7.
(1'Ac 4HAQ)

La première étude effectuée après la séparation à l'aide de la HPLC d'environ 1 mg de 7, a été celle de sa stabilité en phase aqueuse. Une solution contenant 7 dans le tampon citrate $2.10^{-3}M$, pH 7 est maintenue à $37^{\circ}C$. On constate qu'il est très stable en phase aqueuse à pH neutre, puisque le profil de chromatographie n'est pas modifié, après 60 heures. Il ne l'est pas non plus après 20 heures à $50^{\circ}C$, ceci montre qu'aucune décomposition n'a eu lieu.

Nous avons été amené à proposer la structure représentée sur le schéma ci-dessous, pour le composé 7 sur la base des études spectroscopiques suivantes :

- RMN

A titre de référence, nous avons tout d'abord enregistré les spectres RMN des composés de la même série.



di Ac-4HAQO

La figure 7 représente le spectre du di Ac-4HAQO dans le DMSO deutérié. Ce spectre est effectué à 90 MHz. Il s'interprète comme suit : 2 singulets à 2,44 et 2,20 ppm attribués au CH_3 des deux groupements acétyle, plusieurs pics entre 6 et 8 ppm correspondant aux 6 protons du cycle quinoléine.

4HAQO

Le spectre du 4HAQO dans le DMSO deutérié est effectué à 270 MHz dans le laboratoire du Pr.B.Roques. Nous obtenons des bandes très élargies.

Mais en présence de DCl, le spectre apparaît avec une résolution très bonne (voir figure 8). On observe alors les 6 protons correspondant au cycle quinoléine.

Composé 7

Le spectre du composé 7 est effectué dans le DMSO deutérié à 270 MHz. Il s'interprète comme suit : 1 singulet à 2,10 ppm

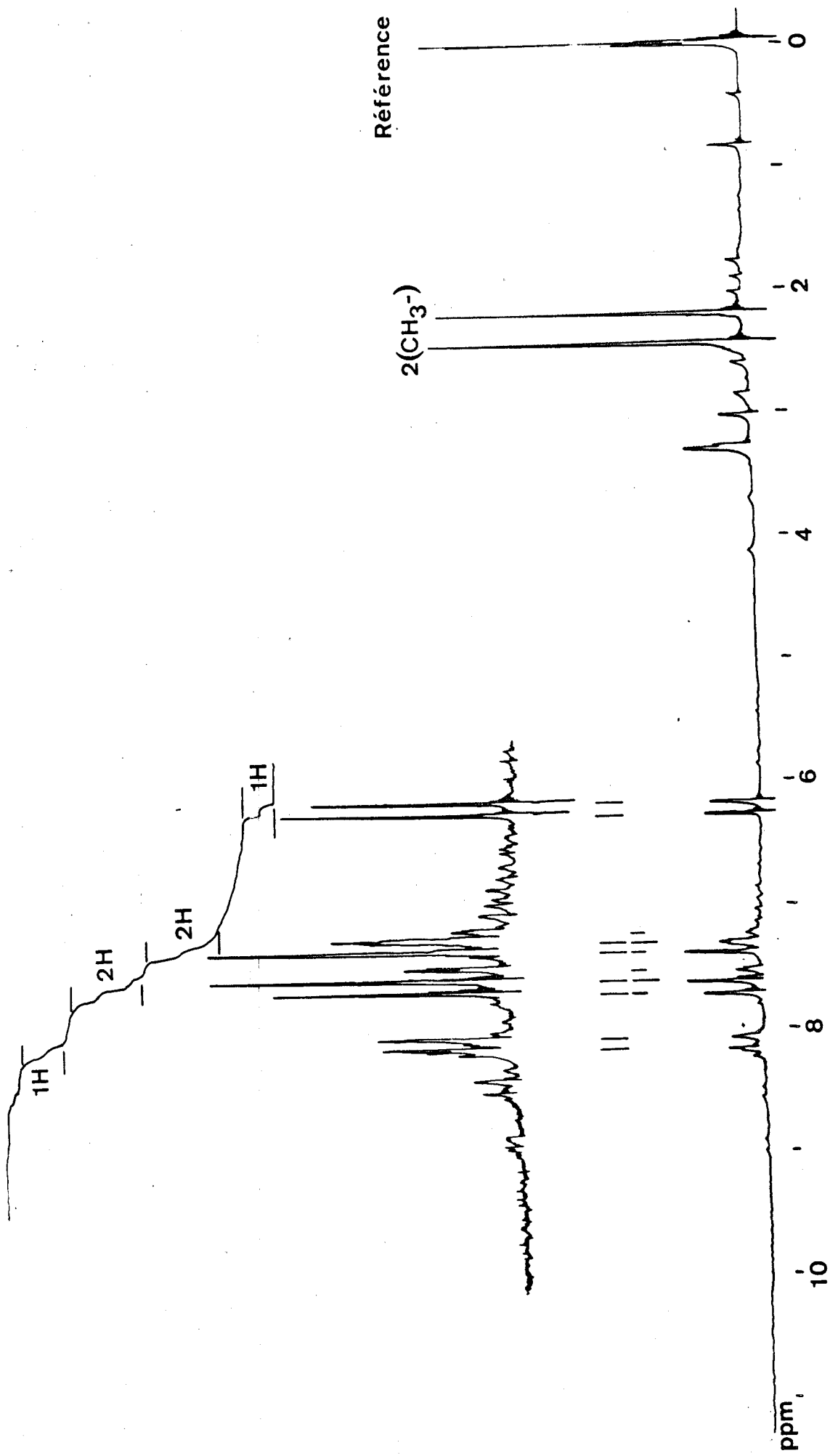


Figure 7. Spectre RMN(90MHz) du diAc-4HAQO; solvant : DMSO .



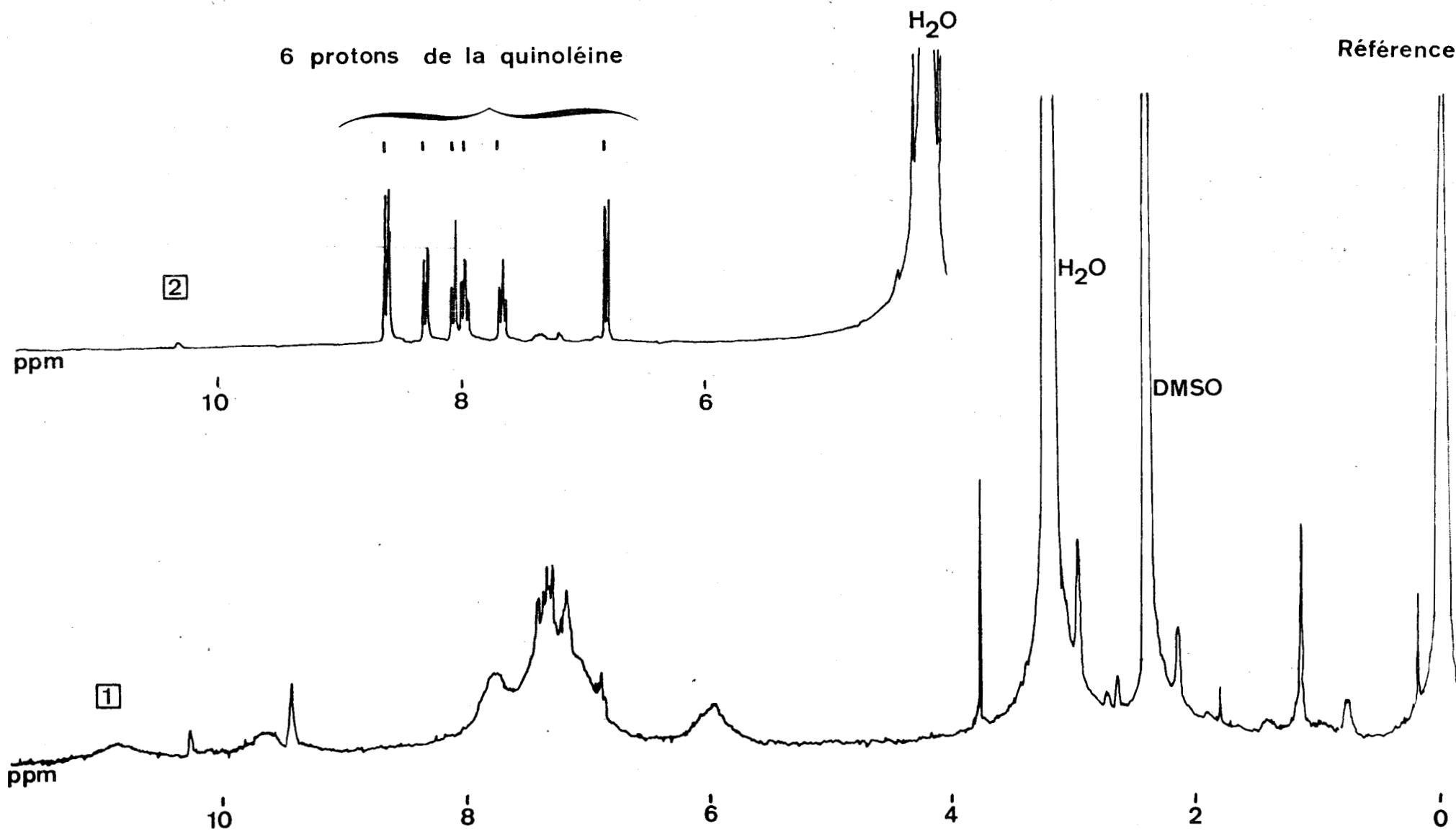


Figure 8. Spectres RMN(270MHz) du 4HAQO

- 1 solvant : DMSO
- 2 solvant : DMSO - DCI



attribué au CH_3 de l'acétoxy, plusieurs pics entre 6 et 8 ppm correspondant aux 6 protons de la quinoléine et un pic à 11 ppm dû au proton N-H. (Figure 9).

- spectrométrie de masse

Nous avons comparé le spectre de masse de 7 à ceux du di Ac-4HAQO et du 4HAQO. (Figure 10).

Ces spectres de référence ont été effectués dans le laboratoire du Professeur J.Lhomme par M.Demenynck et M.F.Lhomme.

Pour 7, le pic le plus élevé est à 202, il est très probable qu'il corresponde au pic moléculaire; en effet dans les produits de la série on détecte un pic M^+ : 260 pour le di Ac-4HAQO et 176 pour le 4HAQO. On observe les pics M-42 (CO-CH_2), M-58 (O-CO-CH_2) sur le spectre de masse de 7. Ces pics sont donc l'indice de la présence d'une fonction $\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}\text{C}-\text{CH}_3$ dans la molécule

(voir spectre du di Ac-4HAQO).

Par ailleurs, on n'observe pas de pic M-16; or M-16 est l'indice de la présence d'une fonction N-oxyde dans une molécule (voir spectre du 4HAQO).

-IR

Nous avons comparé les spectres IR du di Ac-4HAQO et du composé 7, qui ont tous les deux été effectués en pastilles de KBr sur le même appareil (voir figure 11).

Le spectre IR du di Ac-4HAQO fait apparaître deux bandes à 1805 cm^{-1} et 1750 cm^{-1} attribuées par un certain nombre d'auteurs (41, 84) aux vibrations des acétoxy, respectivement en position 1 et 4 de la quinoléine. Quant à la vibration de l'acétoxy du composé 7, elle est observée à 1720 cm^{-1} .

La synthèse de ce composé a été mentionnée par Sato *et al* (84). Ils obtiennent ce composé par plusieurs méthodes et notamment par réduction du composé diacétylé (di Ac-4HAQO). Ils indiquent deux structures tautomères du composé Ac-4HAQO, en observant cependant en IR une bande correspondant à l'acétoxy à 1745 cm^{-1} . (voir schéma ci-après).

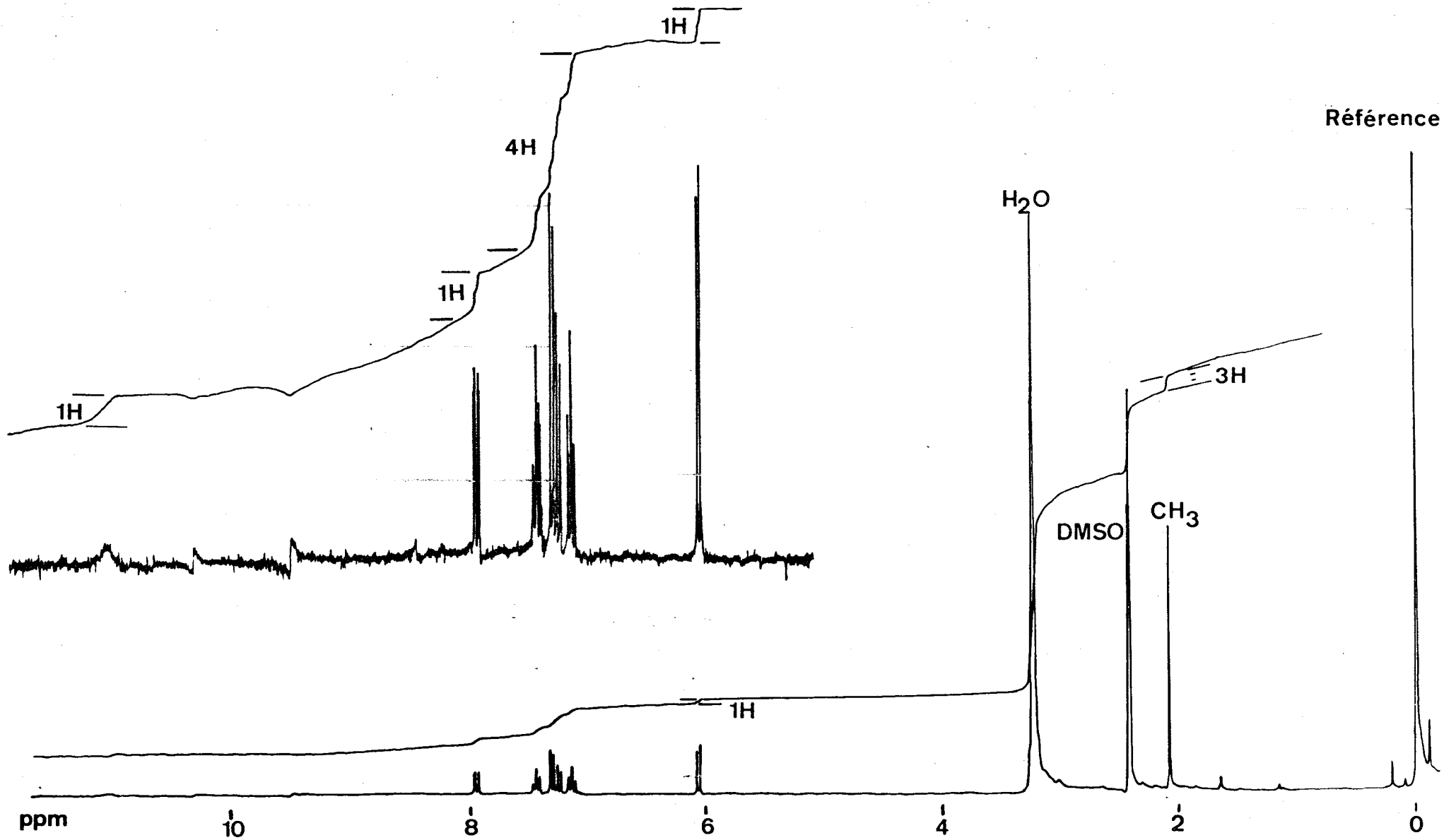
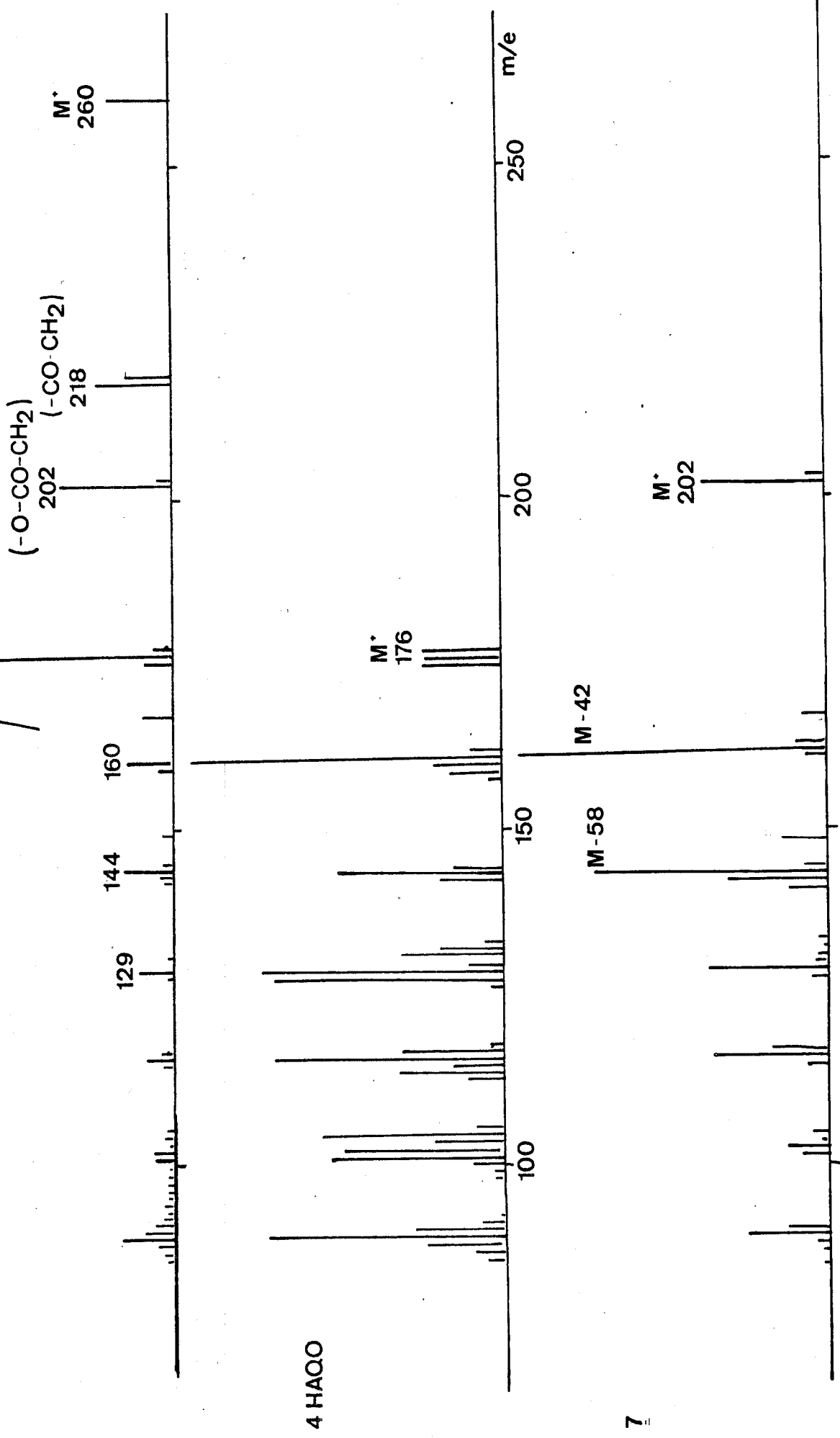


Figure 9. Spectre RMN(270MHz)du composé 7; solvant : DMSO.

diAc.4HAQO



4 HAQO

7



Figure 10. Spectre de masse

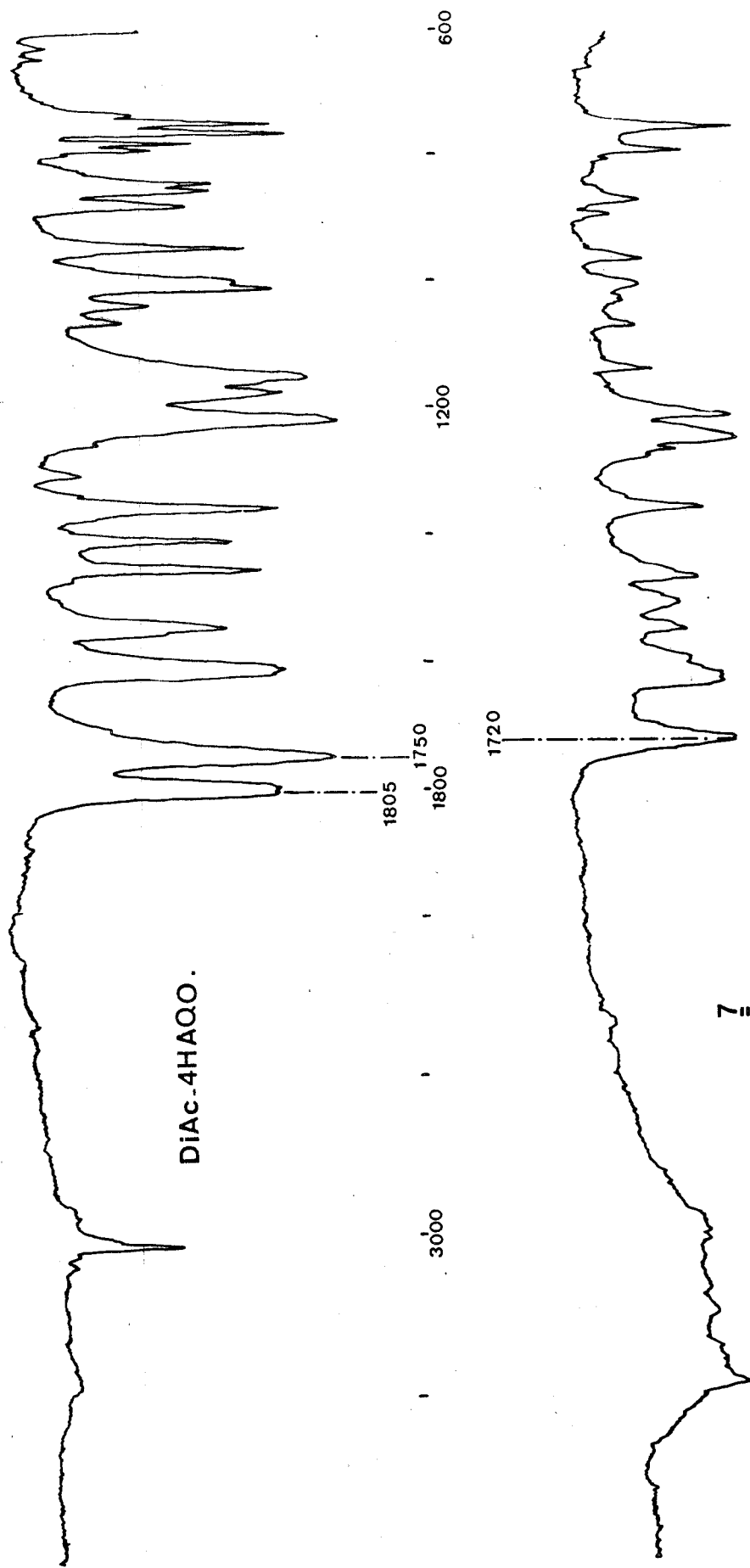
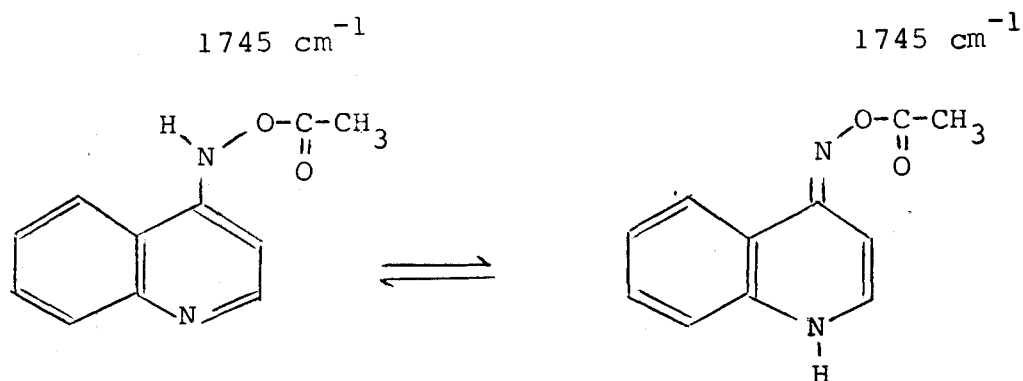


Figure 11. Spectre IR du diAc-4HAQO et de 7.





Le résultat IR qu'ils ont obtenu, est différent de ce que nous avons observé. Malheureusement ils ne donnent aucune caractéristique complémentaire de ce produit, et en particulier pas de spectre RMN.

Il nous faut donc poursuivre l'étude de ce produit afin de lever l'ambiguïté. Si cette structure s'avère exacte, de toute façon ce composé ne nous permettra pas de préparer un composé bifonctionnalisé (c'est-à-dire le di Ac-4HAQO). En effet ce composé ne comporte plus de fonction N-oxyde, et l'acétylation par l'anhydride acétique du Ac-4AQ nous donnerait une fonction acétyle et non acétoxy sur l'azote 1.

3) Etude d'un autre dérivé monoacétylé : l'acétoxyaminoquinoléine-1-oxyde.

a) Synthèse de l'Ac-4HAQO à l'aide de la réaction di Ac-4HAQO-DTT.

Dans une revue générale, Araki *et al* ont mentionné l'obtention d'un composé monoacétylé : l'acétoxyaminoquinoléine-1-oxyde, obtenu par l'action du dithiotreitol (DTT) sur le di Ac-4HAQO en solution dans le DMSO. Ils ont décrit ce composé comme étant très instable et pouvant réagir sur le poly A; mais aucune preuve expérimentale ne vient étayer ces conclusions qui n'ont été citées que sous forme de "communication personnelle" (66) Depuis cette date, à notre connaissance, aucune publication n'est parue relative à la méthode de synthèse et à la réactivité de ce composé .

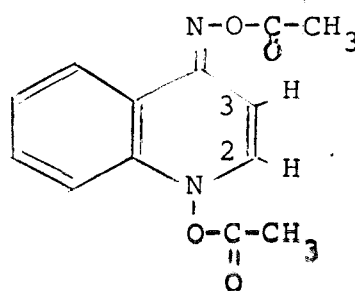
La synthèse de ce composé monoacétylé aurait le double avantage de permettre d'étudier sa réactivité sur le DNA, et d'offrir une possibilité de préparer un di Ac-4HAQO marqué spécifiquement sur une fonction acétyle par réacétylation à l'aide d'anhydride acétique marqué. Nous avons donc tenté de mettre au point la préparation de ce dérivé monoacétylé. Pour cela nous avons étudié le mélange di Ac-4HAQO-DTT en concentration équimolaire dans le DMSO, par la RMN du proton en onde continue. Le mode opératoire est décrit chapitre I.

Les spectres correspondants sont montrés sur la figure 12. Celui enregistré au temps $t=0$ est analogue à la somme des spectres du di Ac-4HAQO et du DTT dans le DMSO : les deux singulets à 2,38 et 2,16 ppm correspondent aux deux groupes CH_3 du di Ac-4HAQO et les protons de la quinoléine sont observés entre 6 et 8 ppm. Les pics correspondant au DTT sont les suivants (DTT : $\text{HS-CH}_2\text{-CHOH-CHOH-CH}_2\text{-S-H}$) : S-H à 2,10 ppm, CH_2 à 2,6 ppm, CH à 3,5 ppm, OH à 4,75 ppm.

Le spectre de la solution gardée à 30°C évolue très vite en fonction du temps. Le singulet à 2,38 ppm disparaît progressivement et dans le même temps un autre pic apparaît à 2,29 ppm. Cette modification est simultanée au déplacement à plus haut champ du doublet à 6,12 ppm dû au proton en position 3 du cycle quinoléine du di Ac-4HAQO (voir schéma).

(Le proton 3 est couplé au proton 2 (situé à 7,57 ppm) en donnant un système AB).

La disparition du doublet à 6,12 ppm et l'apparition d'un doublet à 6,03 ppm montrent d'une façon non ambiguë que le composé di Ac-4HAQO est modifié pour donner un seul composé.



Enfin, lors de la réaction, un des pics correspondant aux CH_3 n'est pas modifié, celui à 2,16 ppm; il est donc très vraisemblable qu'une des fonctions acétyle n'est pas modifiée. L'autre pic acétyle qui primitivement était situé à 2,38 ppm disparaît au profit d'un pic à 2,29 ppm, qui ne correspond pas à de l'acide acétique, comme nous l'avons prouvé en rajoutant au milieu une goutte d'acide acétique (dont le CH_3 a un déplacement chimique de 1,9 ppm). On pourrait se demander si cette

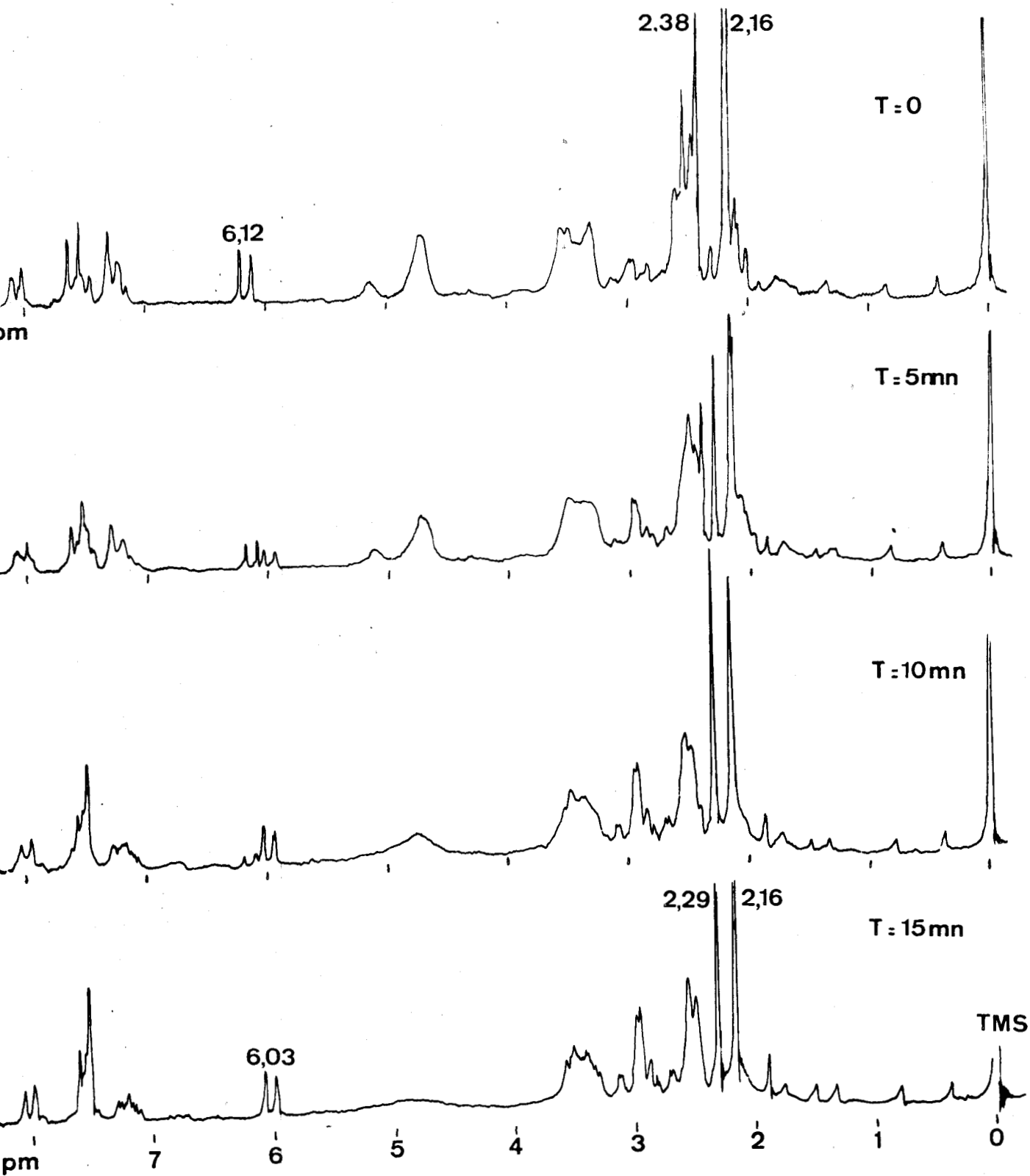
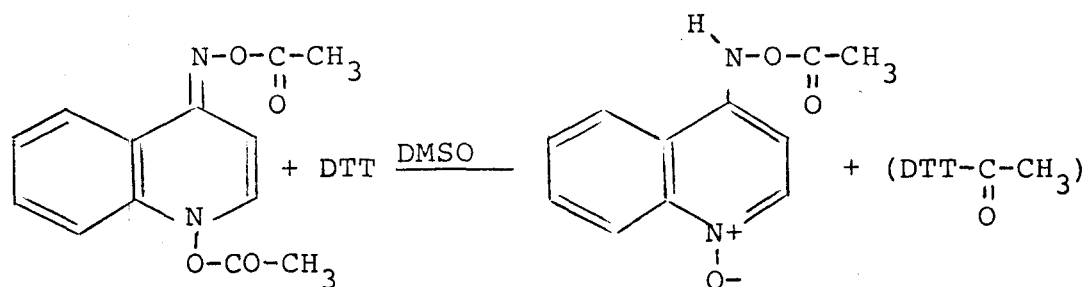


Figure 12. Spectres RMN du mélange diAc-4HAQO/DTT dans le DMSO en fonction du temps.

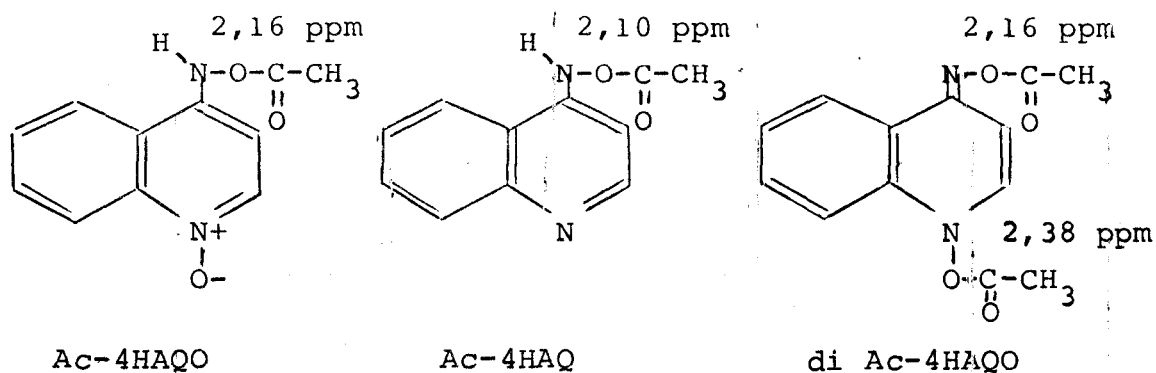
fonction acétyle ne resterait pas fixée à nouveau sur la molécule de cancérogène mais en une autre position. Cette hypothèse ne peut être retenue car une telle addition s'accompagnerait de la disparition d'un proton du cycle quinoléine, ce qui n'est pas observé. Il nous semble donc très probable que le groupement acétyle soit transféré sur le DTT, d'autant plus que le nouveau pic observé à 2,29 ppm pourrait être attribué au groupe CH_3 d'une fonction ester de l'acide thioacétique qui donne un singulet à 2,3 ppm (55). De plus, l'on peut remarquer que le massif correspondant aux protons de la fonction S-H du DTT, diminue d'intensité pendant la réaction, diminution qui est tout à fait en accord avec le transfert du groupement acétyle sur l'atome de soufre du DTT ($-\text{SH} \rightarrow -\text{S}-\text{COCH}_3$).

Nous avons aussi étudié en RMN la stabilité de ce composé en ajoutant une quantité très faible d'eau deutériée, lorsque la réaction avec le DTT est terminée. Nous avons observé une modification très rapide du spectre : le pic à 2,16 ppm, qui n'était pas modifié lors de la réaction, disparaît rapidement et il apparaît simultanément un singulet à 1,9 ppm que nous avons caractérisé comme étant le CH_3 de l'acide acétique; les pics correspondant aux protons de la quinoléine forment alors des massifs plus complexes. Nous pouvons conclure que le composé formé s'est hydrolysé en libérant de l'acide acétique et différents composés de dégradation. Cependant le pic à 2,29 ppm n'est pas modifié. Ceci est donc un argument supplémentaire pour attribuer ce singulet au CH_3 d'un ester de l'acide thioacétique. Ces résultats sont en accord avec l'instabilité vis à vis de l'eau du composé formé décrit par Araki *et al*, et renforcent l'hypothèse des transferts du groupement acétyle sur le dithiotreitol. Ce résultat est aussi en accord avec les essais de séparation du milieu réactionnel en HPLC (page 61) : nous avons obtenu deux composés acétylés que nous ne pouvons attribuer qu'au DTT mono et diacétylé. Bien que nous devrions nous attendre à une réaction de type réduction par le DTT, qui est un réducteur fréquemment utilisé en biologie, nous observons très probablement la réaction décrite ci-après : c'est-à-dire la formation du composé acétoxy-4-aminoquinoléine-1-oxyde (Ac-4HAQO).



L'ensemble de nos résultats est tout à fait en accord avec les propositions d' Araki *et al* et notamment en ce qui concerne la structure du composé formé.

Nous avons représenté sur le schéma ci-dessous la structure du composé formé ainsi que celles du composé 7 et du di Ac-4HAQO.



Il semble intéressant de comparer les glissements chimiques des CH₃ des deux composés monoacétylés entr'eux, ainsi qu'avec ceux du di Ac-4HAQO. Ces valeurs sont représentées sur le schéma ci-dessus. Elles semblent être en accord avec la structure des composés.

Il faut remarquer que la seule différence de structure entre les deux composés monoacétylés serait simplement due à la fonction N-oxyde. Ce serait donc uniquement l'absence ou la présence de ce groupement qui expliquerait que leur réactivité vis à vis de l'eau soit très différente : en effet le Ac 4HAQ

est très stable dans l'eau, alors que le Ac-4HAQO, au contraire, s'y décompose rapidement.

Il est bien évident que, pour compléter cette étude, il aurait fallu isoler ce composé (Ac-4HAQO). Son extraction aurait permis, premièrement d'affirmer sa structure, et deuxièmement d'effectuer des essais d'acétylation. Cependant le fait que le DMSO soit très difficile à éliminer nous a empêché de récupérer le composé. De plus, la grande instabilité de ce dérivé monoacétylé nous a gêné; tous les systèmes d'extraction plus ou moins complexes que nous avons essayés favorisent une rapide décomposition.

Cependant nous allons voir, page 68, que l'utilisation de la solution contenant le Ac-4HAQO permet des études intéressantes.

b) Hydrolyse aqueuse de ce composé.

Nous avons tout d'abord étudié le composé en chromatographie HPLC. Nous avons re-préparé le composé monoacétylé dans les conditions employées pour l'étude RMN. Nous considérons que la réaction est terminée 15 min après la solubilisation dans le DMSO du di Ac-4HAQO et du DTT. La chromatographie d'1 μ l de cette solution dans les mêmes conditions de séparation que le di Ac-4HAQO ne nous a pas donné un seul pic, mais plusieurs pics différents du di Ac-4HAQO et des produits majeurs d'hydrolyse du di Ac-4HAQO (Figure 13). Ce résultat est donc en faveur de la grande instabilité du composé dans l'eau puisque le solvant de chromatographie est de l'eau lors de l'injection. Nous n'avons donc pas pu étudier la cinétique de solvolysse de l'Ac-4HAQO, afin de calculer la demi durée de vie de ce composé dans l'eau. Mais nous pouvons affirmer que la vitesse d'hydrolyse par l'eau de ce monoacétylé est beaucoup plus élevée que celle du di Ac-4HAQO.

Monoacétylé marqué sur le cycle quinoléine

Nous avons également remarqué qu'en effectuant la solvolysse préalable dans l'eau du Ac-4HAQO préparé à partir du di Ac-4HA[3 H]QO, le profil de chromatographie en radioactivité fait apparaître 20% de la radioactivité au volume mort de la colonne. Ce résultat est analogue à celui obtenu lors de l'hydrolyse du di Ac-4HA[3 H]QO.

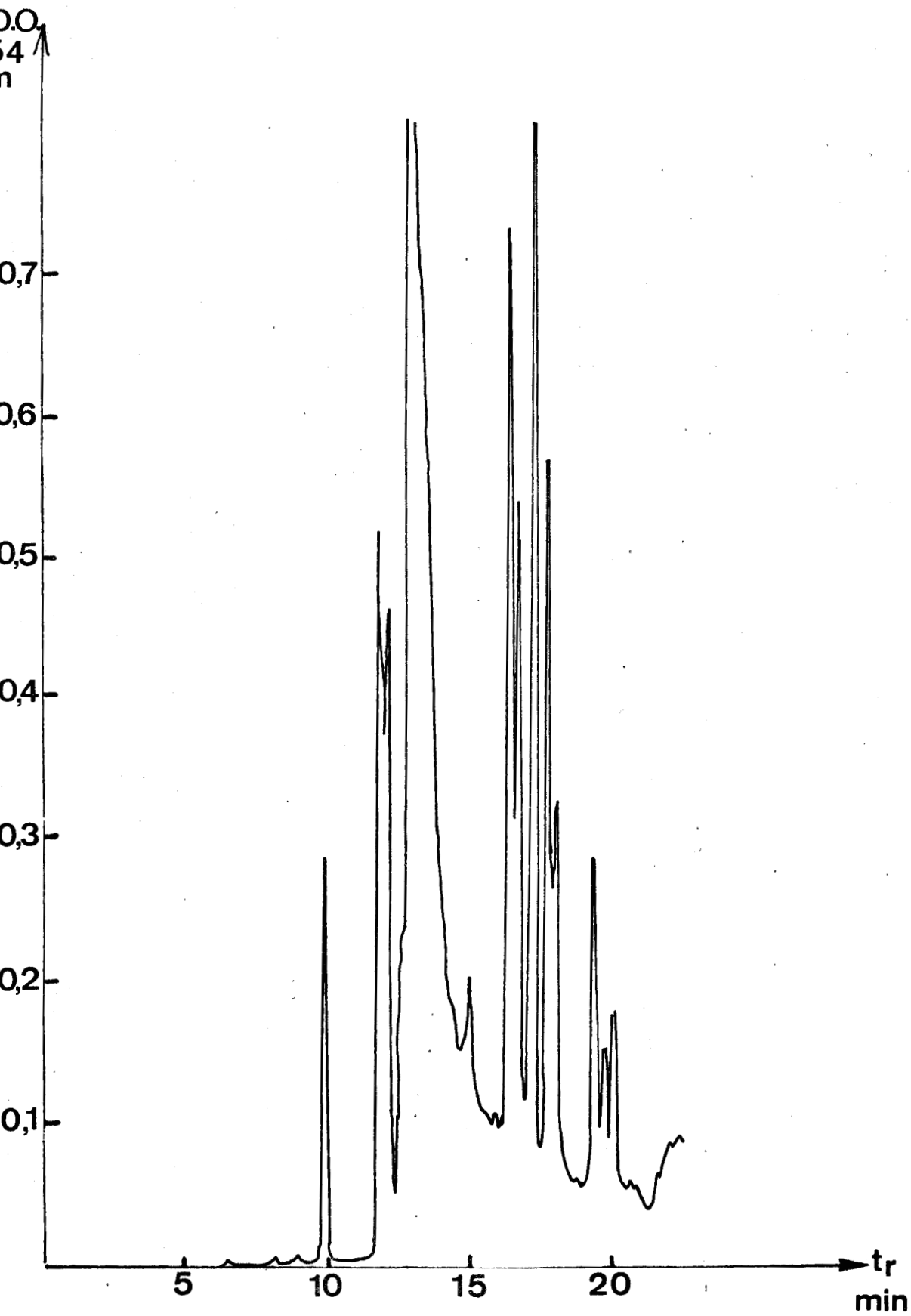


Figure 13. Profil de chromatographie HPLC du Ac-4HAQO.



Monoacétyle marqué sur le groupement acétyle

D'autre part des études en chromatographie HPLC ont été faites pour connaître le devenir de l'acétyle de l'acétoxyaminoquinoléine-1-oxyde, en utilisant le di Ac-4HAQO marqué sur les groupements acétyle.

Le profil de chromatographie en radioactivité de la solution de monoacétyle préalablement hydrolysé par l'eau fait apparaître en radioactivité un pic au volume mort de la colonne (50% de la radioactivité) correspondant à l'acide acétique libéré par hydrolyse du Ac-4HAQO, puis deux pics dont l'intensité correspond aux 50% restants. Nous avons attribué ces deux pics au DTT mono et diacétylé (l'un des pics ne correspond pas à une absorption importante en UV à 254 nm, l'autre pic est situé dans la zone d'absorption des composés quinoléine). Cette étude confirme donc le transfert d'une fonction acétyle sur le DTT, comme nous l'avions suggéré précédemment.

En conclusion, ces études nous montrent que le composé formé par action du DTT sur le di Ac-4HAQO s'hydrolyse très rapidement dans l'eau, en libérant de l'acide acétique. Il est dommage que l'on n'ait pas réussi à extraire ce composé du milieu réactionnel ; en effet, il semble qu'il serait intéressant d'étudier sa réactivité sur les nucléophiles du DNA. Nous avons donc pensé effectuer une approche de cette étude en utilisant ce composé sans l'isoler du milieu réactionnel (voir paragraphe 4, pages 68 et 71).

Conclusion.

De ces différentes études, dont l'un des buts était une approche mécanistique pour comprendre la réactivité du di Ac-4HAQO, il semble ressortir un certain nombre de points :

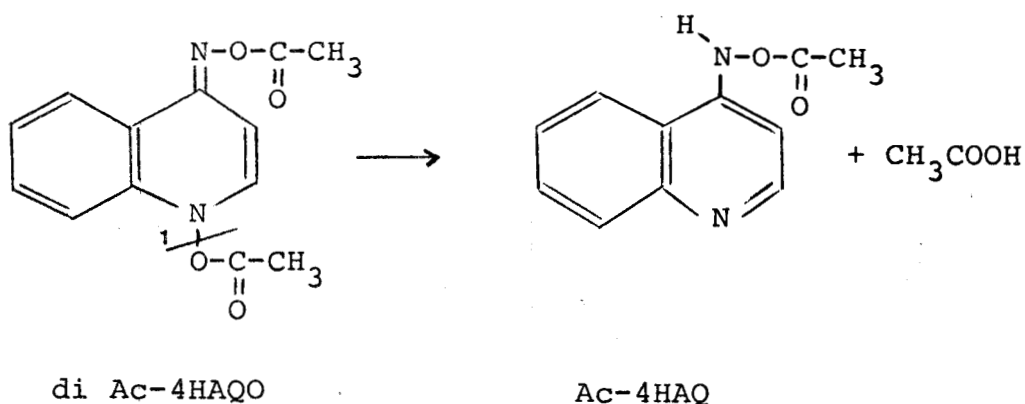
- la complexité de l'hydrolyse du di Ac-4HAQO
- l'instabilité d'un composé monoacétylé (Ac-4HAQO) qui comme nous le verrons dans le paragraphe suivant semble être un intermédiaire possible lors de la fixation du cycle quinoléine sur les nucléosides

- la stabilité du composé monoacétylé 7
- un mécanisme d'hydrolyse faisant intervenir le carbone 2

Nous nous proposons donc d'écrire un certain nombre de réactions qui pourraient nous servir d'hypothèse de départ pour la démonstration future du mécanisme d'action du di Ac-4HAQO sur les nucléosides.

Ces hypothèses, qui pour l'instant sont en accord avec les résultats obtenus, sont les suivantes :

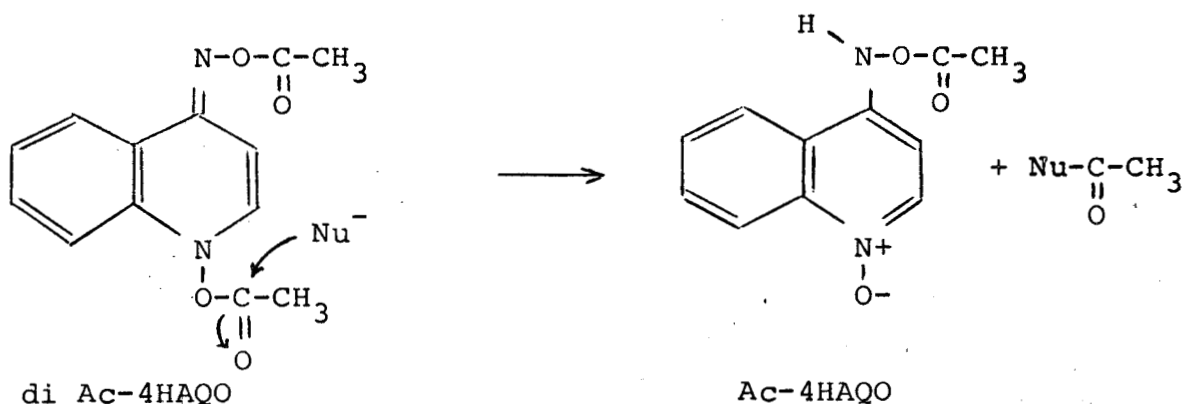
1. La cassure de la liaison N-O de la fonction acétate d'hydroxylamine (cassure 1) s'effectuerait en libérant de l'acide acétique et le composé 7. Ce mécanisme ne semble pas impliqué dans la fixation du cycle quinoléine ou de l'acétyle sur les nucléophiles ; en effet, ce mécanisme ne conduit pas à la fixation du nucléophile sur la quinoléine ou sur le groupement acétyle.



2. La rupture de la liaison O-C de la même fonction pourrait s'effectuer par attaque nucléophile sur le carbone de la liaison O-C-CH₃. Dans un tel mécanisme l'agent nucléophile

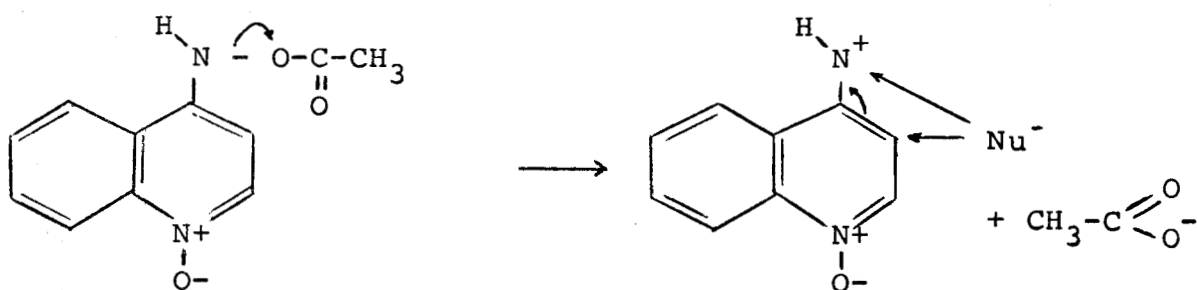
est acétylé. C'est ce qui se produit par attaque du soufre du DTT (voir page 56), de l'oxygène dans le cas de l'H₂O (libération d'acide acétique).

Des résultats, qui vont dans le même sens, ont d'ailleurs été observés par M. Demenynck et M. F. Lhomme : elles ont obtenu une réaction comparable de transfert d'acétyle sur des amines primaires.



Nu^- = nucléophile = S du DTT, O de H_2O , N d'une amine primaire, site nucléophile des bases nucléiques etc...

3. L'acétoxyaminoquinoléine-1-oxyle ainsi formé est susceptible par départ d'une fonction acétate, de créer un électrophile capable de se fixer sur les sites nucléophiles de la macromolécule de DNA (voir schéma ci-dessous), selon un mécanisme comparable à celui décrit pour l'AAF.



Toujours par analogie à l'AAF, il faut remarquer que l'agent électrophile libéré peut être attaqué soit sur l'azote, soit sur le carbone 3 (voir schéma ci-dessus). Ceci pourrait expliquer la fixation du cycle quinoléine sur les bases du DNA au niveau du carbone 3. En effet, Kawazoe *et al* (42) ont montré que le 4HAQO se fixe à l'aide du système enzymatique de Tada *et al* (95) sur le poly (A), et que l'adénine est liée sur le carbone 3 de la quinoléine (voir formule page 34). Ces mécanismes bien qu'hypothétiques semblent cependant intéressants. Ils peuvent donc nous servir d'hypo-

thèses de travail pour comprendre la fixation du cycle quinoléine sur le DNA ainsi qu'une acétylation éventuelle.

4) Fixation du cycle quinoléine sur les nucléosides puriques.

Les études précédentes nous ont montré à l'aide de la HPLC, la complexité de l'hydrolyse du di Ac-4HAQO. Nous allons étudier dans ce chapitre la réaction entre le di Ac-4HAQO et les nucléosides puriques puisque Ikegami *et al* (36) ont montré que les bases puriques étaient le site privilégié de fixation du cancérigène ultime du 4NQO.

Nous avons tout d'abord utilisé la guanosine comme agent nucléophile. Dans la séparation par HPLC, les produits d'addition guanosine-di Ac-4HAQO devraient être élués après la guanosine (TR = 7,2) et avant la majorité des composés formés lors de l'hydrolyse du di Ac-4HAQO qui ont des temps de rétention supérieurs à 13 min. Nous avons donc comparé les profils obtenus par la détection UV à 254 nm dans la zone comprise entre 7 et 13 min après réaction du di Ac-4HAQO sur la guanosine, avec ceux obtenus après hydrolyse du di Ac-4HAQO seul, pris comme témoin. Nous avons constaté, que par rapport au témoin, il n'apparaît pratiquement aucun pic supplémentaire. Ce qui laisse supposer que la réaction sur la guanosine s'effectue avec un rendement très faible. Par conséquent, afin de pouvoir mettre en évidence le faible taux de l'addition éventuelle du di Ac-4HAQO sur la guanosine, nous avons utilisé parallèlement à la détection UV, une détection en radioactivité en employant le nucléoside marqué, soit uniformément au ^{14}C , soit de façon spécifique sur l'hydrogène du C-8 ($8\text{-}^3\text{H Gua}$). Cette méthode est très pratique et nous permet de détecter la guanosine, qu'elle soit modifiée ou non, alors qu'en UV à 254 nm les quinoléines et les bases absorbent toutes les deux. Des essais similaires ont été réalisés sur l'adénosine, la base étant dans ce cas, ou uniformément marquée au ^{14}C , ou spécifiquement marquée au ^3H sur le C-2. Enfin cette même méthode de détection par la radioactivité a également été utilisée pour suivre la réaction de l'Ac-4HAQO sur les nucléosides puriques.

a) réaction ^{14}C guanosine-di Ac-4HAQO.

Après incubation du mélange réactionnel (^{14}C) guanosine-di Ac-4HAQO pendant 45 min à 37°C , la solution est injectée en HPLC. Au cours de la séparation, des fractions de 500 μl sont recueillies et la radioactivité de chacune de ces aliquotes est mesurée.

La figure 14 montre les profils correspondant à la double détection (UV, radioactivité) de cette réaction. On constate qu'à côté du pic de radioactivité important correspondant à la guanosine, trois pics, appelés GI, GII et GIII sont observés; ils peuvent être attribués à des composés d'addition guanosine-di Ac-4HAQO puisqu'ils sont détectés en radioactivité (seule la molécule de guanosine est marquée aux isotopes) et qu'ils sont élués différemment de la guanosine. On constate que GI, GII et GIII sont élués dans notre système de chromatographie entre la guanosine et le composé 7. Ces trois pics correspondent à un taux de guanosine modifiée très faible : 1,2% de la radioactivité de la guanosine injectée.

Sur la figure 15 nous avons représenté la cinétique de formation de ces composés en fonction du temps d'incubation, en prenant la guanosine seule comme témoin. Cette étude cinétique a été effectuée à 37°C , mais dans un milieu contenant 30% d'éthanol afin de diminuer la vitesse de réaction.

Nous remarquons l'accroissement progressif du pic GIII en fonction du temps; en particulier, pour $t=1\text{h}30$, tout le di Ac-4HAQO étant hydrolysé, l'intensité du pic GIII est maximum. Ceci confirme que le composé GIII provient bien de l'action du di Ac-4HAQO sur la guanosine. Par contre en ce qui concerne GI et GII, l'interprétation est moins évidente. En effet, si on examine le profil d'éluion de la guanosine témoin, on observe aux temps de rétention de GI et GII un signal dont l'intensité est trop grande pour n'être que du bruit de fond. En particulier, en ce qui concerne GI, l'intensité du pic observé à partir du mélange réactionnel est du même ordre de grandeur que celui observé sur le témoin. Par contre le composé GII est nettement plus important dans le mélange réactionnel.

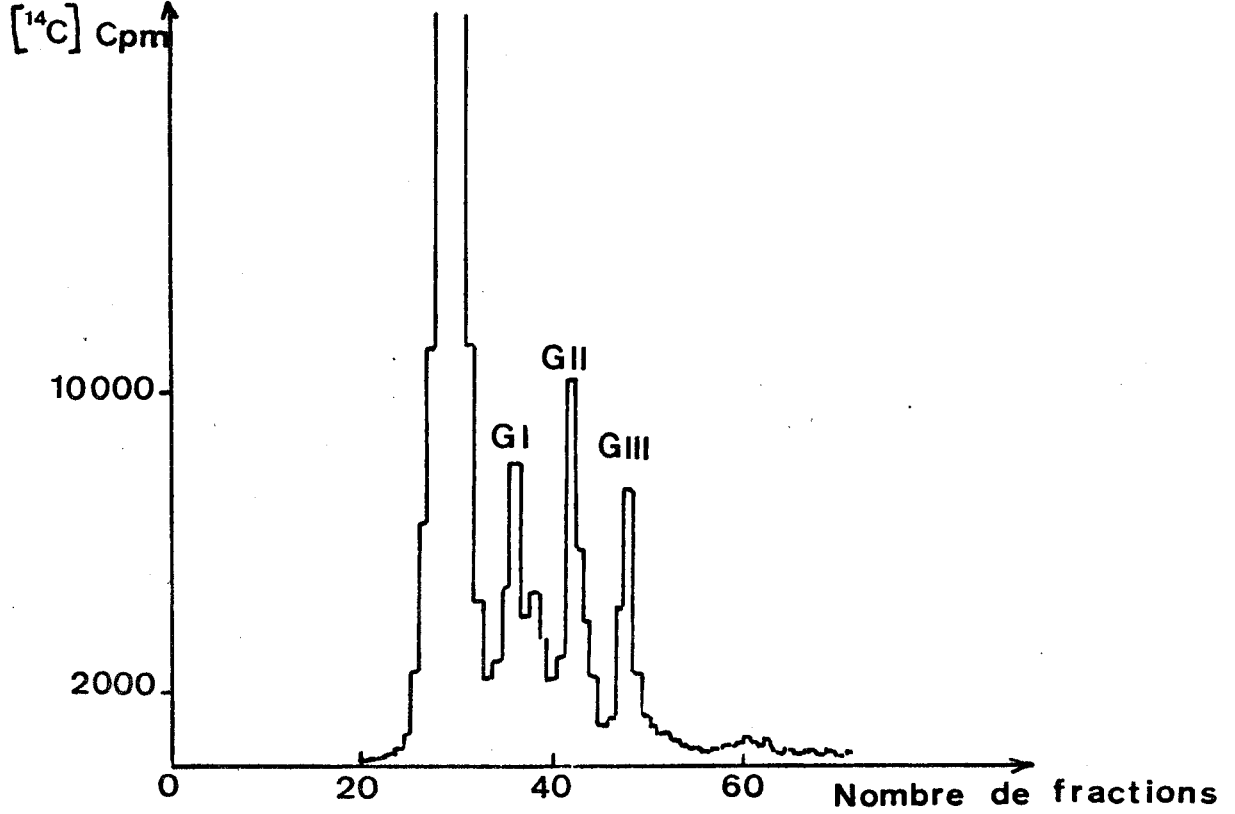
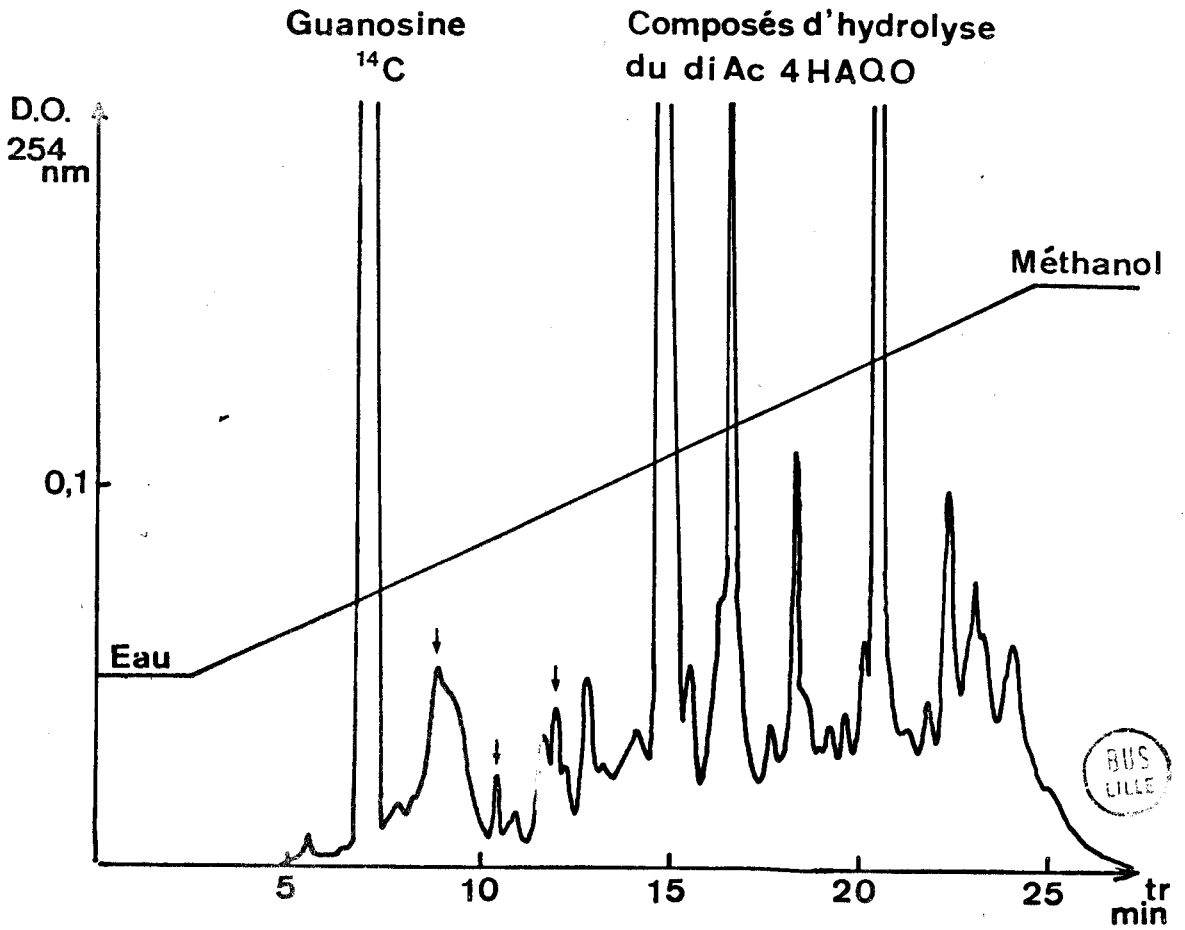


Figure 14
 Reaction ^{14}C Guanosine-di Ac 4 HAQO
 Chromatographie HPLC



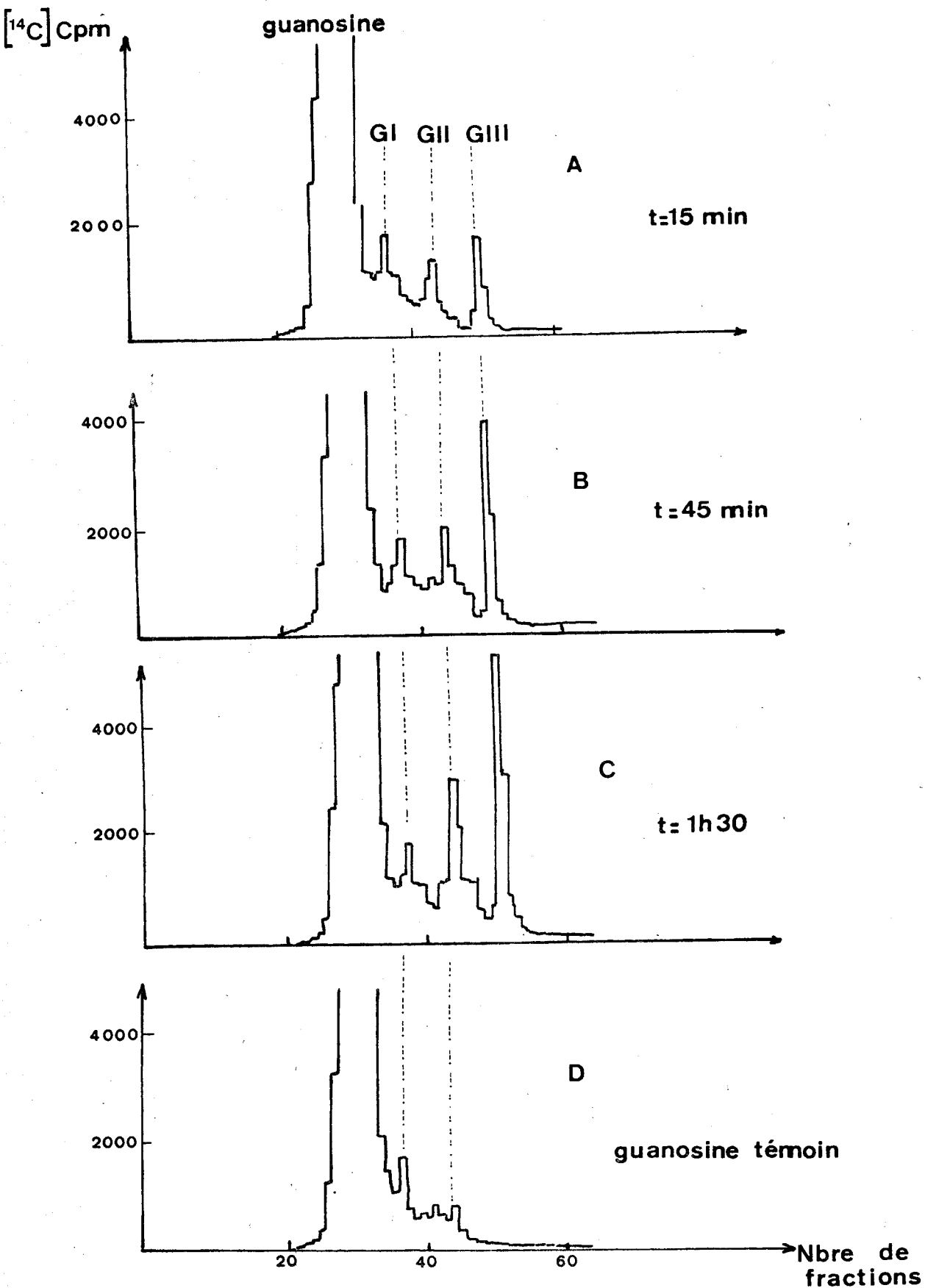


Figure 15.

A,B,C: Réaction ^{14}C guanosine diAc-4HAQO.

D: Témoin guanosine.



La reproduction de ces essais n'a pas levé l'ambiguïté en ce qui concerne GI ; seule l'utilisation de la guanosine ^{14}C purifiée permettrait peut-être de savoir si ce pic peut être vraiment attribué à la réaction du di Ac-4HAQO sur la guanosine. Nous avons calculé en utilisant la courbe de quenching (page 47), le pourcentage exact de guanosine modifiée pour chacun des pics ; le résultat est exprimé sur le tableau ci-dessous. Nous avons également représenté les résultats obtenus avec le témoin ; c'est-à-dire la guanosine seule incubée dans le solvant de réaction.

| | Guanosine-di Ac-4HAQO | Guanosine (témoin) |
|-------|-----------------------|--------------------|
| GI | 0,18 \pm 0,02 % | 0,09 \pm 0,02 % |
| GII | 0,42 \pm 0,02 % | 0,06 \pm 0,02 % |
| GIII | 0,64 \pm 0,02 % | 0,00 \pm 0,02 % |
| Total | 1,24 \pm 0,06 % | 0,15 \pm 0,06 % |

Les temps de rétention pour ces trois composés dans le système de chromatographie sont respectivement 8,9 ; 10,4 et 12,1 min. On voit donc que le rendement de fixation du cycle quinoléine sur la guanosine est très faible, puisqu'on obtient environ 1 % de fixation, c'est-à-dire qu'une guanosine sur cent est modifiée.

b) réaction $[8\text{-}^3\text{H}]$ guanosine-di Ac-4HAQO.

Des auteurs ont proposé que la fixation covalente du 4NQO s'effectuait sur le carbone 8 de la guanosine (94). L'emploi de guanosine marquée spécifiquement au tritium sur le carbone 8 nous permettrait de savoir si le di Ac-4HAQO s'y fixe effectivement.

Nous avons donc réalisé la réaction $8\text{-}[^3\text{H}]$ guanosine-di Ac-4HAQO dans les mêmes conditions de réaction qu'avec la guanosine ^{14}C .

Dans ce cas, le pic GIII ne correspond qu'à un rendement en radioactivité de 0,09 % par rapport à la guanosine. Or, lors de la réaction avec la guanosine ^{14}C , le rendement du composé GIII était de 0,64 %. La différence observée s'explique donc par le départ de l'hydrogène du carbone-8. La fixation du cycle quinoléine sur ce site libère l'hydrogène et le composé d'addition guanosine-di Ac-4HAQO correspondant à GIII n'est donc plus marqué au tritium. Nous avons représenté sur le tableau ci-dessous les valeurs de rendement de fixation obtenues en calculant avec la radioactivité ^3H , puis en les comparant avec celles obtenues avec la guanosine ^{14}C .

| Réaction | Guanosine ^{14}C -di Ac-4HAQO | Guanosine ^3H -di Ac-4HAQO |
|----------|--|-------------------------------------|
| GI | 0,18 (100) | 0,16 (88) |
| GII | 0,42 (100) | 0,26 (62) |
| GIII | 0,64 (100) | 0,09 (13) 0,10 (15) 0,04 (6) |

Nous considérons que le rendement obtenu lors du calcul avec la guanosine ^{14}C est égal à 100 pour chaque composé. Nous calculons ainsi le pourcentage de radioactivité résiduelle de chaque composé d'addition.

Avant d'affirmer avec certitude que l'addition se fait bien sur le C-8 pour le composé GIII, il faut remarquer que la fixation du cancérogène en un site autre que le C-8 pourrait destabiliser la guanosine et faciliter l'échange de l'hydrogène du carbone 8. Cette dernière hypothèse paraît cependant peu probable pour GIII, car le calcul du marquage obtenu par rapport à la réaction avec la guanosine ^{14}C correspond à une perte de radioactivité de 90 % et de plus le marquage de la guanosine ^3H sur le carbone 8 est de 95 % par rapport au marquage sur les autres carbones. Il est donc très probable que la quinoléine se fixe sur le carbone 8 pour donner un composé d'addition correspondant au pic GIII. Une réponse certaine sera donnée quand il aura été possible d'isoler une quantité suffisante de ce composé

d'addition pour en faire une étude RMN. En ce qui concerne les pics GI et GII, ils sont observés tous deux par la détection en radioactivité (^3H). Ils ne correspondent donc pas à des composés d'addition faisant intervenir l'hydrogène du C-8.

c) réaction ^{14}C guanosine-Ac-4HAQO.

Nous avons vu précédemment que le monoacétyle (Ac-4HAQO) n'a pas été isolé, mais que sa formation avait été mise en évidence dans un milieu réactionnel de Ac-4HAQO + DTT dans le DMSO. Les réactions de l'Ac-4HAQO sur la guanosine ont été réalisées en additionnant à la solution de guanosine (tampon citrate 2.10^{-3}M , pH 7) le milieu réactionnel contenant le composé monoacétylé: les conditions de réaction sont décrites dans la partie expérimentale de ce mémoire.

L'analyse en HPLC du milieu réactionnel obtenu est effectuée dans les conditions habituelles : détection UV et mesure de la radioactivité des fractions obtenues. La figure 16 nous montre les deux profils d'élution correspondants. Le profil UV n'est naturellement pas identique à celui qui avait été obtenu pour la réaction avec le di Ac-4HAQO; en effet, nous hydrolysons dans ce cas le monoacétyle. Par contre le profil en radioactivité montre les mêmes pics GI, GII et GIII obtenus lors de la réaction avec le di Ac-4HAQO (mêmes temps de rétention). Cependant en calculant les pourcentages de fixation pour chacun de ces trois composés, on constate que le composé GIII est formé avec un rendement de 10,4 %, c'est-à-dire en quantité nettement supérieure au cas précédent. Pour les composés GI et GII, les quantités formées sont du même ordre de grandeur.

Nous avons représenté sur le tableau ci-après les rendements de la réaction des composés obtenus avec le monoacétyle et ceux obtenus avec le di Ac-4HAQO ainsi que le témoin.

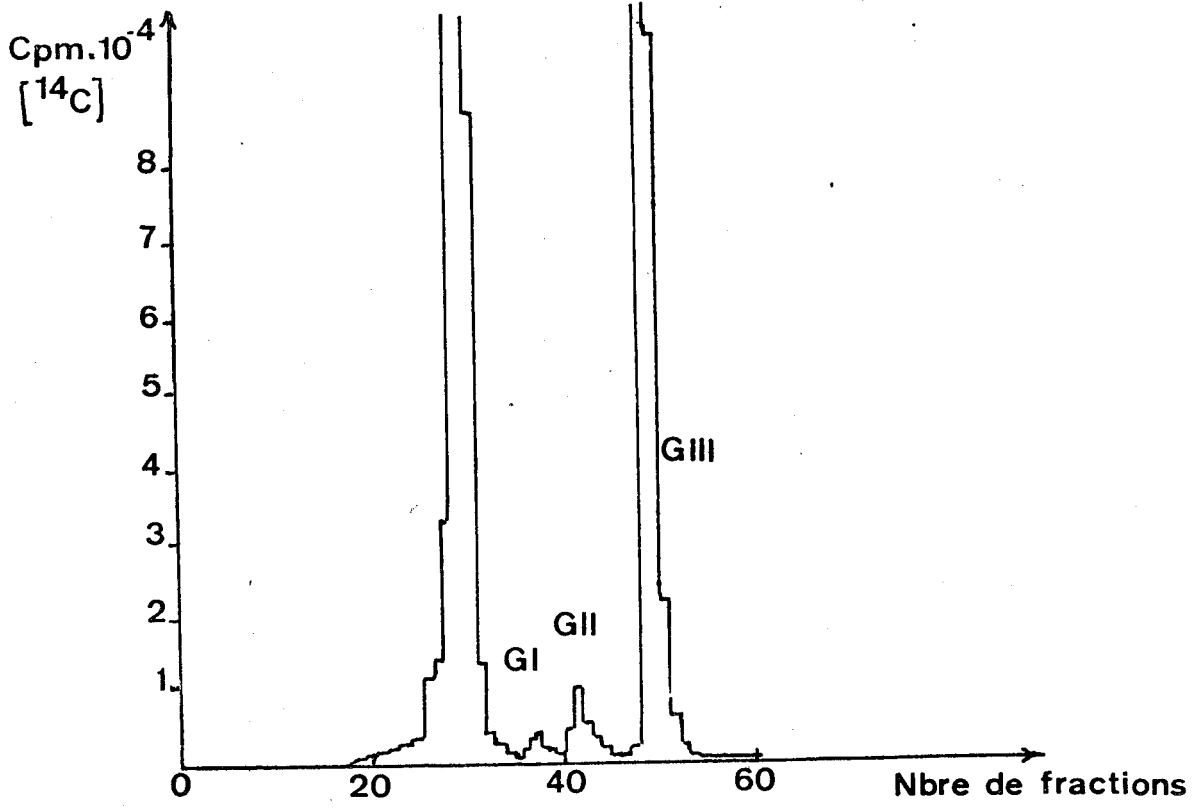
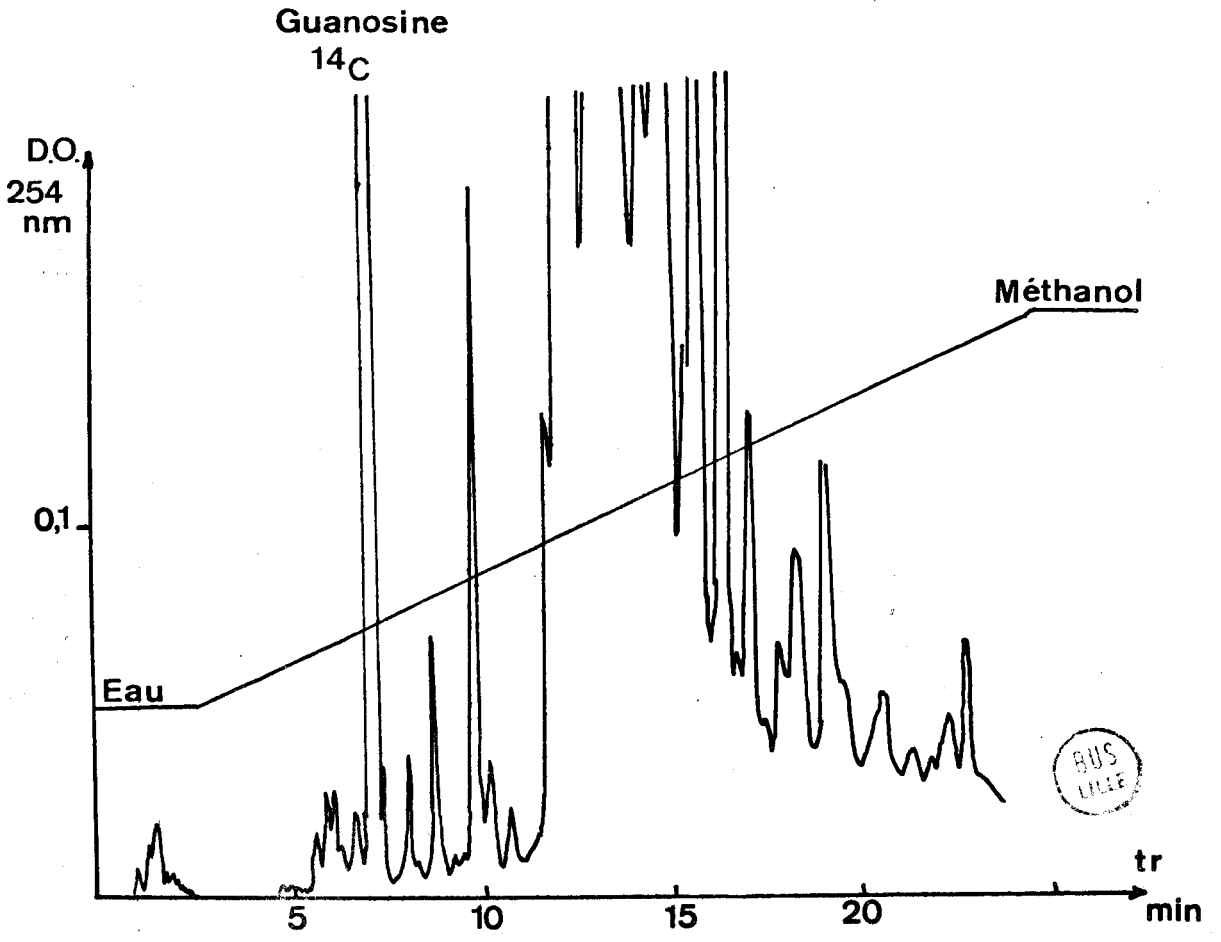


Figure 16 Réaction ^{14}C Guanosine - Ac-4HAQO



| Réaction | ^{14}C guanosine -Ac-4HAQO | ^{14}C guanosine (témoin) | ^{14}C guanosine -di Ac-4HAQO |
|----------|--|---------------------------------------|---|
| GI | 0,20 % | 0,09 % | 0,18 % |
| GII | 0,70 % | 0,06 % | 0,42 % |
| GIII | 10,4 % | 0,00 % | 0,64 % |
| Total | 11,3 % | 0,15 % | 1,24 % |

Pour essayer de comprendre comment peut s'effectuer la réaction entre l'Ac-4HAQO et la guanosine, il est intéressant de se souvenir (voir page 58) que le dérivé monoacétylé est extrêmement réactif vis à vis de l'eau.

Le fait que nous obtenions lors de sa réaction avec la guanosine, les mêmes composés d'addition que lors de la réaction avec le di Ac-4HAQO, nous a suggéré que l'Ac-4HAQO pourrait être un intermédiaire formé lors de l'hydrolyse du di Ac-4HAQO. Mais le rendement plus important de fixation sur la guanosine par Ac-4HAQO (dans le cas de GIII) nous montre que ce monoacétylé n'est pas formé avec un rendement de 100 % lors de l'hydrolyse du di Ac-4HAQO. En effet, le composé Ac-4HAQ (composé 7) est aussi formé par hydrolyse du composé diacétylé, et il est très improbable qu'il passe par l'intermédiaire de l'Ac-4HAQO. Le composé di Ac-4HAQO dans l'eau donnerait donc le Ac-4HAQO avec un rendement faible ; ce dernier produit s'hydrolyserait à son tour donnant un composé capable de se fixer de manière covalente sur les nucléophiles présents. Ces constatations sont en accord avec les réactions que nous avons décrites précédemment (voir page 63).

Ces résultats nous montrent l'intérêt que présente l'étude de ce composé monoacétylé ; de plus, d'un point de vue pratique, le fait que le composé GIII se forme avec un bon rendement par action du Ac-4HAQO sur la guanosine, va nous permettre de le préparer en quantité suffisante pour réaliser son étude à l'aide de techniques physicochimiques (RMN, spectroscopie de masse), et d'élucider ainsi parfaitement sa structure.

d) Réaction ^{14}C adénosine-di Ac-4HAQO.

Afin de démontrer la fixation covalente du di Ac-4HAQO sur l'adénine, nous avons effectué sur l'adénosine la même étude en HPLC que celle réalisée avec la guanosine en employant un nucléoside sur lequel la base est marquée uniformément au ^{14}C . Les profils obtenus par la double détection UV et radioactivité, sont représentés sur la figure 17. Sur le profil d'élution en radioactivité, on peut voir deux pics, que nous appellerons AI et AII, et qui sont observés après le pic correspondant à l'adénosine non modifiée ; les composés d'hydrolyse du di Ac-4HAQO qui sont élués en fin de chromatographie, sont détectés en UV, mais ne sont pas observés en radioactivité. Le rendement total de la réaction, qui correspond au nombre de moles de nucléosides modifiés pour 100 moles de nucléosides, (ayant réagi avec 200 moles de di Ac-4HAQO) est extrêmement faible puisqu'il est d'environ 0,7 %.

Le rendement pour chaque composé d'addition est représenté sur le tableau ci-dessous où nous avons aussi fait figurer ce qui correspond au bruit de fond du témoin (^{14}C adénosine seule).

| Réaction | ^{14}C adénosine-di Ac-4HAQO | ^{14}C adénosine(témoin) |
|----------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| AI | 0,33 % | < 0,1 % |
| AII | 0,37 % | < 0,01 % |
| Total | 0,70 % | 0,1 % |

Le di Ac-4HAQO se fixe donc sur l'adénosine pour former deux composés AI et AII; les temps de rétention pour ces deux composés dans le système de chromatographie sont respectivement de 11 et 12,4 min.

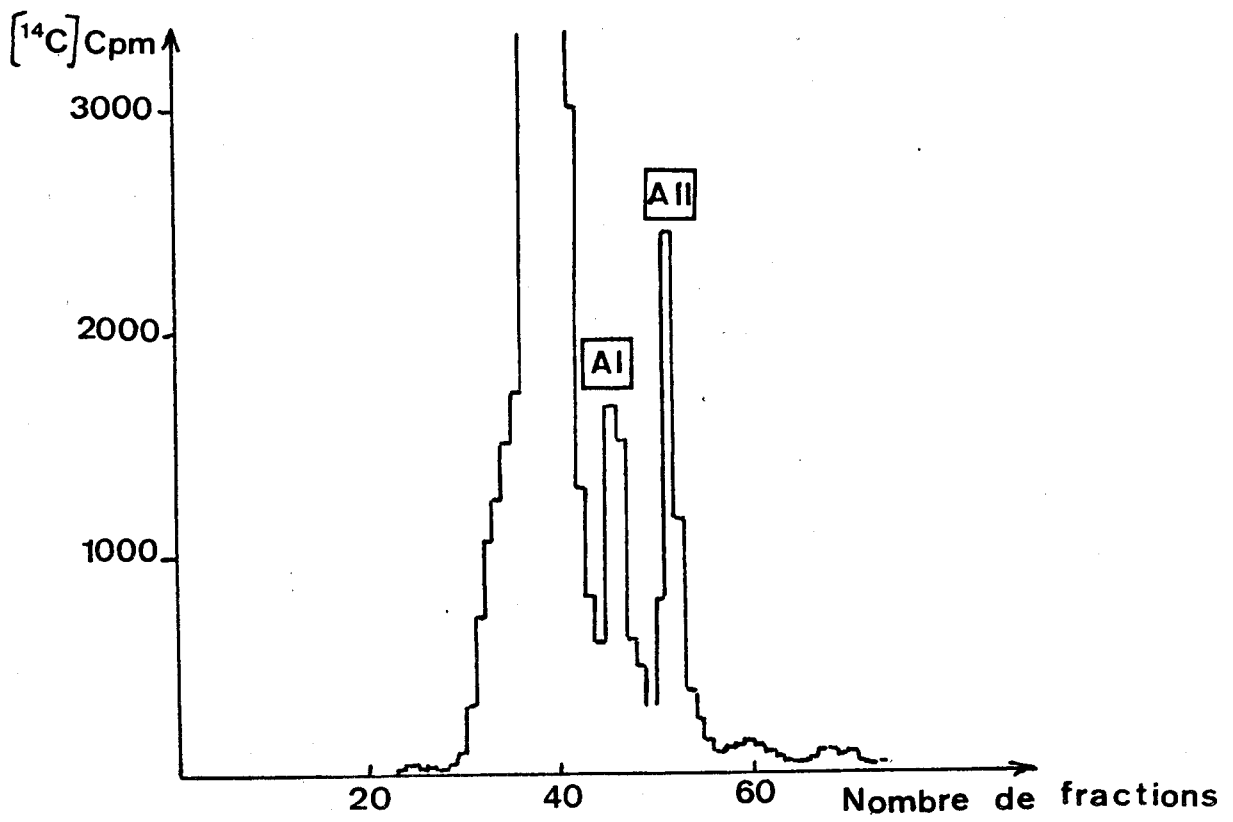
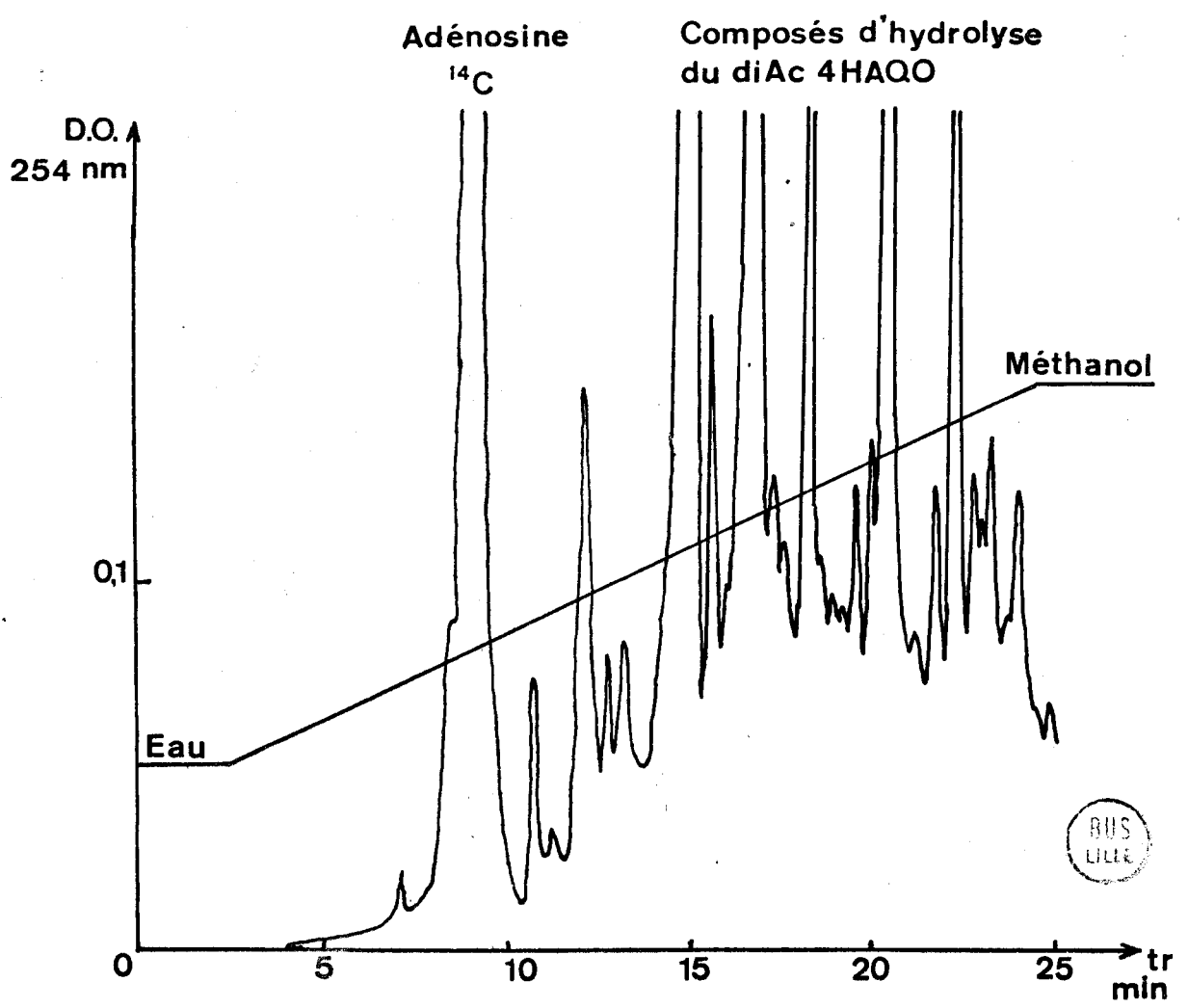


Figure 17
 Reaction $[^{14}\text{C}]$ Adénosine-di Ac 4HAQO
 Chromatographie HPLC.



e) Réaction ^{14}C adénosine-Ac-4HAQO.

Nous avons étudié la réaction acétoxyaminoquinoléine-1-oxyde sur l'adénosine. Les conditions de concentration sont analogues à celles employées lors de l'étude de la réaction adénosine-di Ac-4HAQO.

Nous retrouvons sur le profil en radioactivité les composés d'addition AI et AII obtenus lors de la réaction di Ac-4HAQO-adénosine. Nous avons calculé les rendements des réactions pour les deux composés AI et AII et les avons indiqués sur le tableau ci-dessous; et nous y rappelons également les résultats obtenus avec le di Ac-4HAQO.

| Réaction | ^{14}C adénosine di Ac-4HAQO | ^{14}C adéncsine (témoin) | ^{14}C adénosine Ac AQO |
|----------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| AI | 0,33 % | < 0,1 % | 0,15 % |
| AII | 0,37 % | < 0,01 % | 0,51 % |

Nous remarquons que le composé AII est formé avec un rendement de 0,51 %, donc supérieur à celui obtenu lors de la réaction avec le di Ac-4HAQO ; le composé monoacétylé se fixe donc plus facilement sur l'adénosine et sur la guanosine que le di Ac-4HAQO pour donner respectivement les composés AII et GIII. Par contre le rendement de la réaction pour le composé AI est plus faible avec le monoacétyle. Ceci suggère que différents mécanismes interviennent dans la fixation du cycle quinoléine sur les bases puriques.

f) Réaction di Ac-4HAQO-[2- ^3H] adénosine

Bien que le carbone 2 de l'adénine ne soit ni un site d'alkylation, ni un site de fixation d'un cancérrogène (83), nous avons effectué la réaction du di Ac-4HAQO sur la [2- ^3H] adénosine. En utilisant les mêmes conditions que celles employées lors de la réaction ^{14}C adénosine-di Ac-4HAQO, les résultats de cette étude ont permis de constater la validité de la technique.

Après une réaction de 45 min à 37°C, la séparation du mélange réactionnel, en HPLC, a permis de détecter en radioactivité les pics AI et AII, et de calculer le pourcentage d'adénosine modifiée. Les résultats sont donnés sur le tableau ci-dessous où nous avons aussi représenté les pourcentages de réaction obtenus lors de la réaction avec l'adénosine ^{14}C .

| Réaction | ^{14}C adénosine di Ac-4HAQO | ^{14}C adénosine (témoin) | $[2\text{-}^3\text{H}]$ adénosine di Ac-4HAQO |
|----------|---------------------------------------|------------------------------------|---|
| AI | 0,33 (100) | < 0,1 | 0,35 (106) |
| AII | 0,37 (100) | < 0,01 | 0,28 (77) |

Les composés AI et AII lors de la réaction avec l'adénosine $[2\text{-}^3\text{H}]$ représentent respectivement 0,35 et 0,28 %. Ces résultats nous permettent d'affirmer que, pour AI, le proton 2 de l'adénine n'est pas modifié lors de la fixation du di Ac-4HAQO sur l'adénosine. Par contre, pour AII, un léger échange est observé qui cependant ne peut correspondre à la fixation du di Ac-4HAQO sur le carbone 2. Ces résultats sont donc en accord avec la littérature (84) qui exclut la possibilité de fixation d'un cancérigène sur le carbone 2 de l'adénine. Afin de connaître la structure des composés d'addition, il nous faudra donc les préparer en quantité suffisante.

5) Fixation du groupement acétyle sur les nucléosides puriques.

a) Réaction nucléosides puriques-di $[^3\text{H}]$ Ac-4HAQO

Lors de la solvolysse aqueuse du di $[^3\text{H}]$ Ac-4HAQO (chapitre II paragraphe 1 page 53), le profil d'élution en radioactivité faisait apparaître 5 pics (Figure 6). Nous avons donc effectué la réaction di $[^3\text{H}]$ Ac-4HAQO-guanosine et comparé les profils d'élution en radioactivité du témoin et de la réaction. Nous avons représenté sur la figure 18, en haut le résultat du témoin du di $[^3\text{H}]$ Ac-4HAQO hydrolysé, et en bas, les résultats obtenus en UV et en radioactivité lors de la réaction di $[^3\text{H}]$ Ac-4HAQO-guanosine. On peut observer l'apparition d'un nouveau

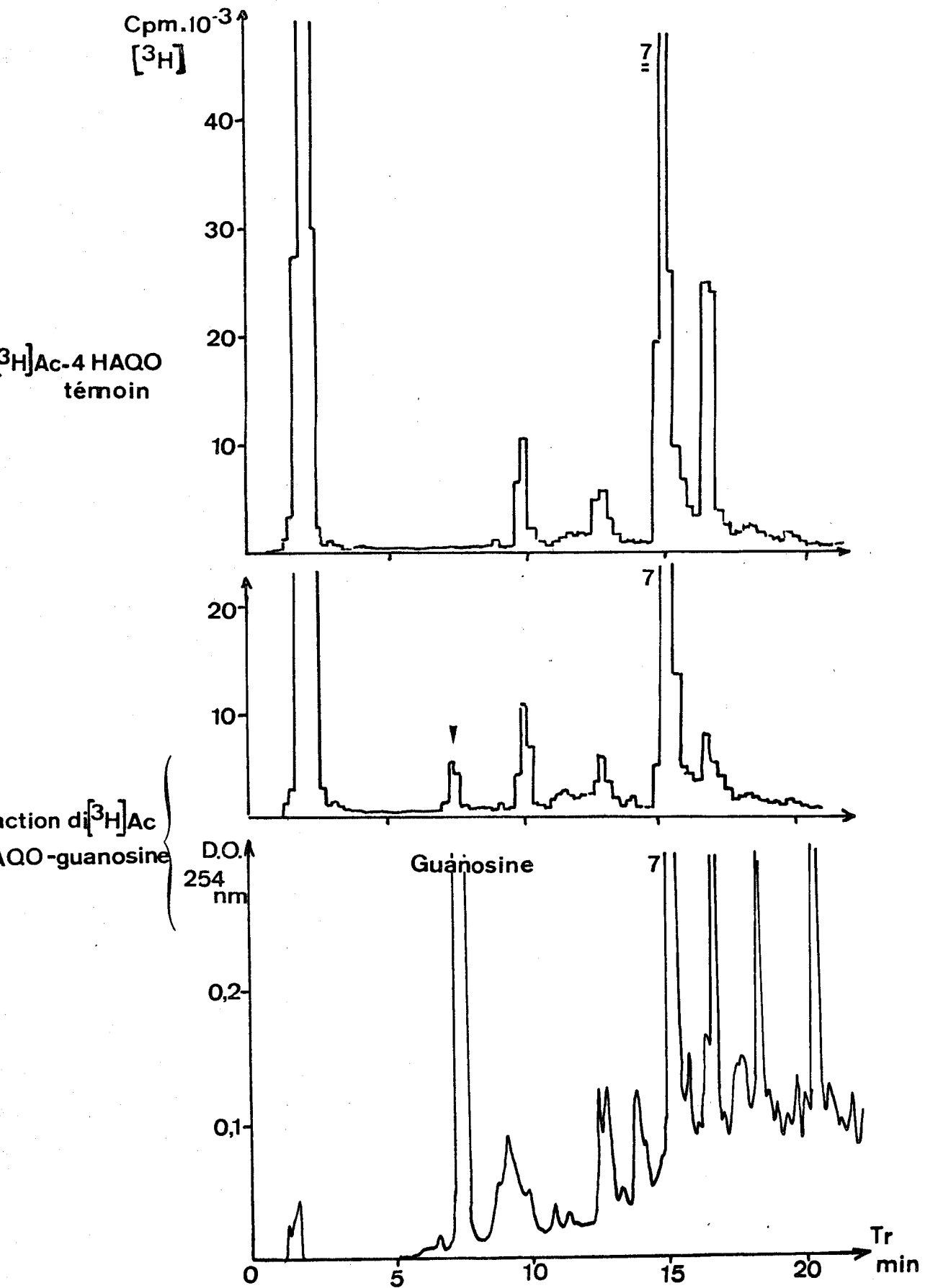


Figure 18. Etude de l'acétylation de la guanosine par le diAc-4HAQO.

pic en radioactivité dont le temps de rétention correspond à celui de la guanosine : nous attribuons donc ce pic à de la guanosine acétylée.

Grâce à la radioactivité spécifique du composé monoacétylé, nous avons pu calculer le pourcentage de guanosine modifiée correspondant à cette acétylation : elle est faible, puisqu'elle ne s'élève qu'à environ 1%.

Nous avons aussi effectué la réaction adénosine- di[³H]Ac-4HAQO dans les mêmes conditions, et comparé les profils d'élution du témoin et de la réaction. Aucun pic nouveau n'apparaît. Mais étant donné que dans notre système de chromatographie l'adénosine est éluée au même temps de rétention que le deuxième pic obtenu en radioactivité lors de l'analyse du témoin di[³H]Ac-4HAQO seul, nous ne pouvons donc pas dire s'il y a ou non acétylation de l'adénosine. Il faudrait, pour résoudre ce problème, employer un autre système de chromatographie qui séparerait les composés non plus en fonction de leur polarité, mais en fonction, par exemple de leur masse moléculaire.

En résumé, ces résultats suggèrent, mais sans le démontrer formellement, que le di Ac-4HAQO est susceptible d'acétyler les nucléosides puriques.

b) Réaction nucléosides puriques-[³H]-Ac-4HAQO

Afin de détecter une éventuelle acétylation des nucléosides puriques par l'Ac-4HAQO, nous avons préparé ce composé marqué au tritium sur l'acétyle, en faisant réagir le DTT sur le di [³H]Ac-4HAQO dans le DMSO. La réaction nucléosides-[³H]Ac-4HAQO a ensuite été effectuée dans les conditions identiques à celles décrites lors de l'étude de la fixation du cycle quinoléine sur les nucléosides (voir c) page 68) et avons utilisé la méthode d'analyse employée précédemment. C'est-à-dire que nous comparons les profils d'élution HPLC en radioactivité des milieux réactionnels nucléosides-[³H]Ac-4HAQO avec le témoin obtenu en faisant réagir le monoacétyle seul dans le solvant de réaction.

Le résultat de cette comparaison est le suivant : aucun pic n'apparaît en radioactivité au temps de rétention correspondant aux nucléosides. En effet les profils d'élution en radioactivité des réactions (adénosine ou guanosine) et celui du témoin sont identiques.

Il semble donc que l'Ac-4HAQO n'acétyle pas les nucléosides. Cependant nous avons détecté une acétylation de la guanosine par le di Ac-4HAQO. Nous pouvons donc penser qu'il est très probable que la fonction susceptible d'acétyle les nucléosides soit la fonction acétate d'hydroxylamine en position 1 de la quinoléine, puisque le composé monoacétylé ne comporte plus cette fonction.

Cependant pour montrer que l'acétylation par le di Ac-4HAQO n'est possible que par la fonction acétate d'hydroxylamine en position 1, il nous faudrait faire réagir sur les nucléosides le di Ac-4HAQO dont seule l'autre fonction est marquée aux isotopes radioactifs.

En résumé, il semble que l'étude comparative de la réactivité du di Ac-4HAQO et de l'Ac-4HAQO soit très intéressante. En effet, les résultats obtenus, bien que préliminaires (en particulier, il faudra démontrer d'une manière non ambiguë la structure du composé monoacétylé après l'avoir extrait du milieu réactionnel) ont suggéré les hypothèses de mécanisme que nous proposons page 62 .

6) La comparaison *in vivo-in vitro*.

Afin de montrer que le di Ac-4HAQO constitue un bon modèle d'étude *in vitro* pour déterminer le site de fixation du ou des cancérogènes ultimes du 4NQO sur les bases du DNA, nous avons entrepris la comparaison des produits d'addition du DNA modifié soit *in vitro* par réaction avec le di Ac-4HAQO, soit *in vivo* après injection de 4HAQO ou de 4NQO à des animaux.

Ce travail a été effectué en collaboration avec Sylvie Galiègue qui, dans notre laboratoire, a étudié l'interaction du di Ac-4HAQO avec le DNA.

Elle a d'ailleurs effectué une première comparaison "*in vivo*-*in vitro*", mettant à profit le fait que les composés quino-
léine sont fluorescents, en comparant les spectres de fluo-
rescence des DNA modifiés *in vitro* et *in vivo* (30). La similitude
des spectres est un argument en faveur de la validité du modèle
in vitro, bien que la preuve formelle ne puisse être faite que
si les produits d'addition base-cancérogène sont identiques *in*
vivo et *in vitro*. Nous avons donc entrepris d'identifier, à
l'aide de la HPLC, les différents composés d'addition obtenus
en hydrolysant les DNA modifiés.

Le mode opératoire de préparation des DNA modifiés *in vitro*
par le di Ac-4HAQO, ainsi que le protocole d'extraction des
DNA obtenus *in vivo* à partir de cellules ascitiques traitées
par le 4NQO ou le 4HAQO, sont décrits dans la thèse de Sylvie
Galiègue (30).

Nous avons utilisé comme système d'hydrolyse, la dépurination
acide des DNA, qui a d'ailleurs été utilisée par Ikegami *et*
al (36) : HCl pH 1,6, 20 h à 37°C. Cette hydrolyse libère les
bases puriques du DNA. Malgré certaines restrictions que nous
verrons ci-dessous, nous avons dans un premier temps employé
ce système d'hydrolyse car il est facile à mettre en oeuvre
et permet de tester les possibilités de la HPLC vis à vis de
l'étude de DNA aussi peu modifiés que ceux obtenus *in vivo*
(1 base modifiée pour 10^4 paires de bases) (31). Ensuite nous
mettrons au point les systèmes enzymatiques d'hydrolyse. De
plus, afin de mettre toutes les chances de notre côté, nous
avons utilisé aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, des cancérogènes
marqués aux isotopes radioactifs, afin de détecter en HPLC
les bases puriques modifiées par le cancérogène de deux
manières différentes (UV à 365 nm et radioactivité) sans être
génés par les bases non modifiées. En effet, Sylvie Galiègue
a montré que les DNA modifiés par le di Ac-4HAQO, absorbent
à 365 nm (30), alors que le DNA témoin n'absorbe pas dans
cette zone. Le travail, présenté ici, constitue donc l'approche
qu'il était nécessaire de faire pour montrer qu'il était pos-
sible de détecter les différents composés d'addition, en uti-
lisant la HPLC couplée à l'emploi de cancérogènes marqués.

a) Hydrolyse et chromatographie des DNA modifiés *in vivo*.

Le DNA que nous avons hydrolysé a été extrait de cellules ascitiques traitées au 4HAQO marqué au tritium. Ce DNA est préparé par Sylvie Galiègue (30).

Le pourcentage de fixation étant très faible *in vivo*, nous avons hydrolysé une quantité importante de DNA (environ 5 mg). La solution obtenue après dépurination est d'abord concentrée et amenée à pH 7, puis injectée en HPLC. Les conditions de chromatographie employées (colonne, solvant, débit) sont celles utilisées lors de la séparation des différents composés de solvolysé du di Ac-4HAQO. Nous employons simultanément deux détections, l'absorption à 365 nm et la radioactivité. La figure 19 montre le résultat obtenu.

Le profil en radioactivité fait apparaître six pics (1 à 6) dont les intensités ne sont cependant pas très grandes.

En comparant les deux profils, on peut faire correspondre chacun des pics obtenus en radioactivité à ceux observés en absorption à 365 nm. Cependant il faut noter que la sensibilité de la détection en absorption est très grande. En particulier, le pic le plus important correspond à une DO d'environ 2.10^{-3} . La similitude des profils est un argument pour montrer que ces pics correspondent bien à des composés quinoléine puisque seuls les composés cancérigènes sont marqués et absorbent à 365 nm.

On peut donc détecter les différents composés formés par hydrolyse des DNA obtenus *in vivo*. Cependant il faudra améliorer la séparation chromatographique de façon à avoir une bonne reproductibilité des mesures et une meilleure séparation des composés.

En effet, l'efficacité de la chromatographie n'est pas maximale, puisque l'on injecte directement dans la colonne une faible quantité de bases modifiées en présence d'une quantité importante de bases non modifiées. Il faudrait donc, pour améliorer la séparation, fractionner préalablement l'hydrolysate obtenu; c'est-à-dire éliminer de l'hydrolysate une partie des bases non modifiées. Ceci doit pouvoir être réalisé grâce à une séparation sur colonne. Une telle opération nous permettrait de plus, d'hydrolyser,

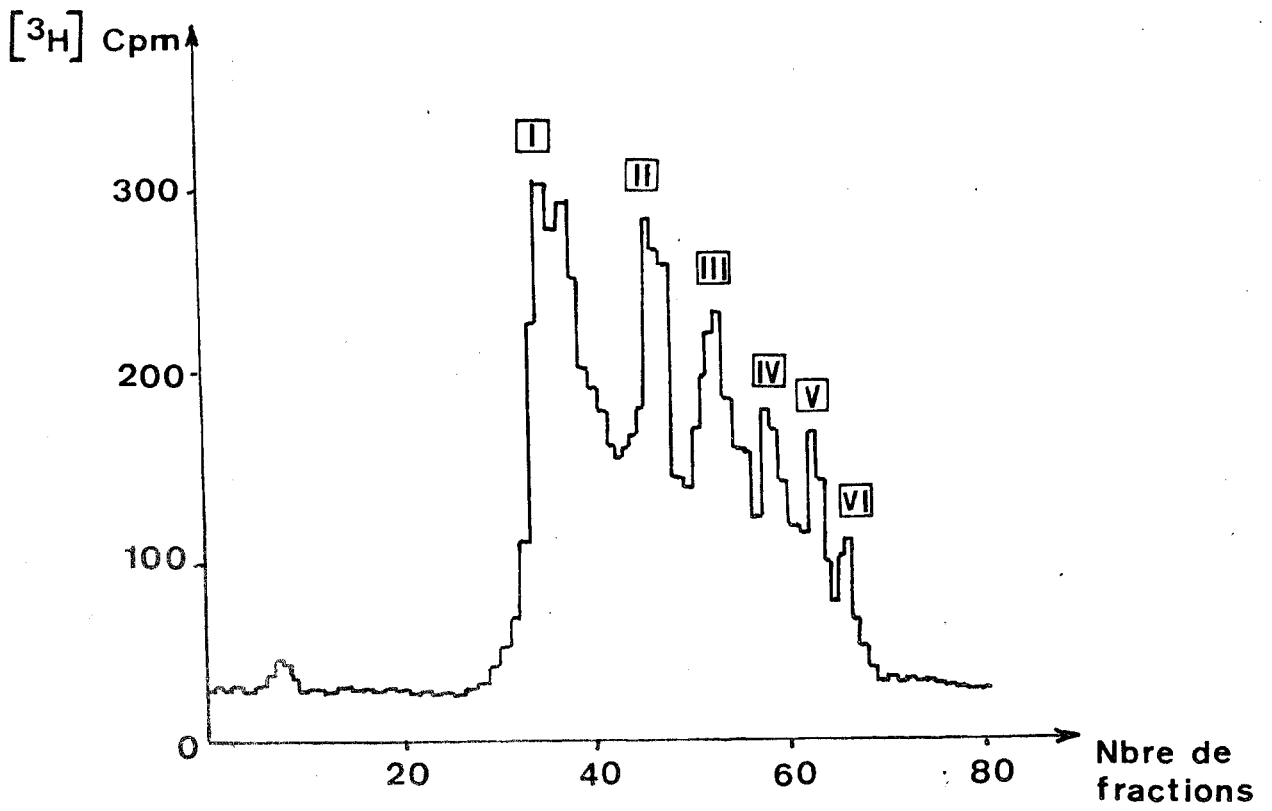
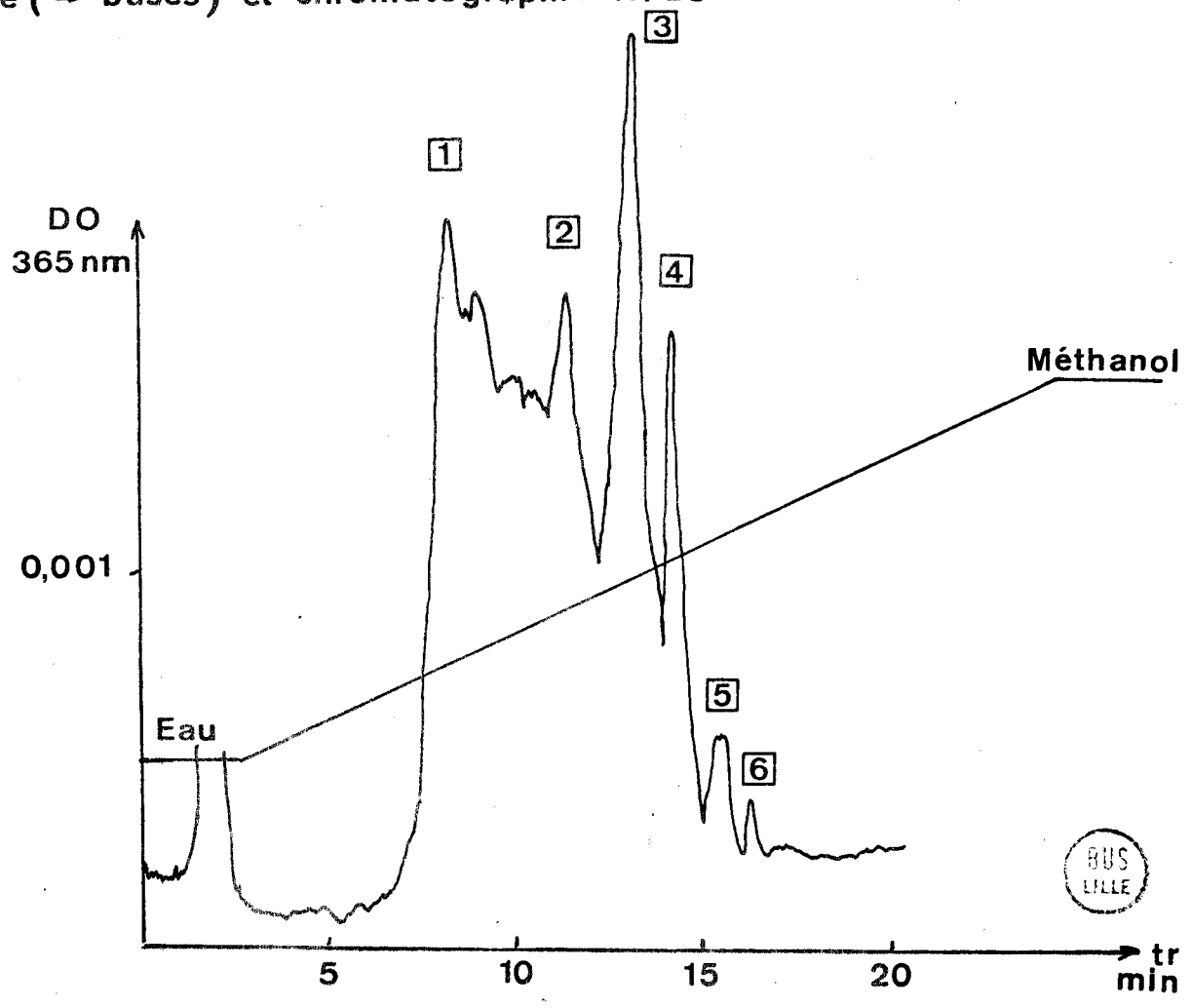


Figure 19

DNA extrait de cellules traitées au 4HA[2-³H]QO

Hydrolyse (→ bases) et chromatographie HPLC



puis d'injecter des quantités plus grandes de DNA modifié, donc de pouvoir plus facilement détecter les composés d'addition sur les bases.

b) Hydrolyse et chromatographie des DNA obtenus *in vitro*.

Le DNA que nous hydrolysons est dans ce cas modifié par le di Ac-4HA 2-³H QO. Le taux de fixation du cancérogène sur ce DNA est d'environ 1%, c'est-à-dire 1 base modifiée pour 100 bases de DNA (30). Ce résultat a été calculé à partir de la radioactivité des DNA modifiés parfaitement purifiés, c'est-à-dire en ayant eu bien soin d'éliminer les quinoléines non fixées de façon covalente sur le DNA (ces quinoléines pouvaient provenir de la solvolysse du di Ac-4HAQO) (30).

Nous injectons en HPLC environ 100 µl de la solution obtenue par dépurination du DNA. La figure 20 nous montre les deux profils obtenus en détection UV (à 365 nm) et en radioactivité. Dans ce cas, on remarque également une similitude des deux profils, ce qui signifie que l'on détecte bien le cycle quino- léine par ces deux méthodes. En effet, on observe 4 pics principaux sur le profil en radioactivité, que l'on retrouve aussi sur le profil à 365 nm.

Cette première approche nous montre que l'on arrive à détecter et à séparer, en HPLC, les composés provenant de l'hydrolyse des DNA, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Cependant avant de pouvoir faire la comparaison des temps de rétention des composés obtenus *in vivo* et *in vitro* (et ceci est le but de cette étude), un certain nombre de problèmes restent à résoudre :

1. Comme nous l'avons cité précédemment, il faudra améliorer le protocole utilisé lors de la chromatographie afin d'obtenir un système très reproductible et une meilleure séparation. Ce problème peut vraisemblablement être résolu en éliminant préalablement les bases non modifiées.
2. Le fait de pouvoir faire la détection aussi bien à 365 nm qu'en radioactivité ne nous prouve pas que les pics repérés correspondent effectivement à des produits d'addition. Autrement dit, l'hydrolyse acide que nous utilisons est susceptible d'hydrolyser la liaison cancérogène-base et de

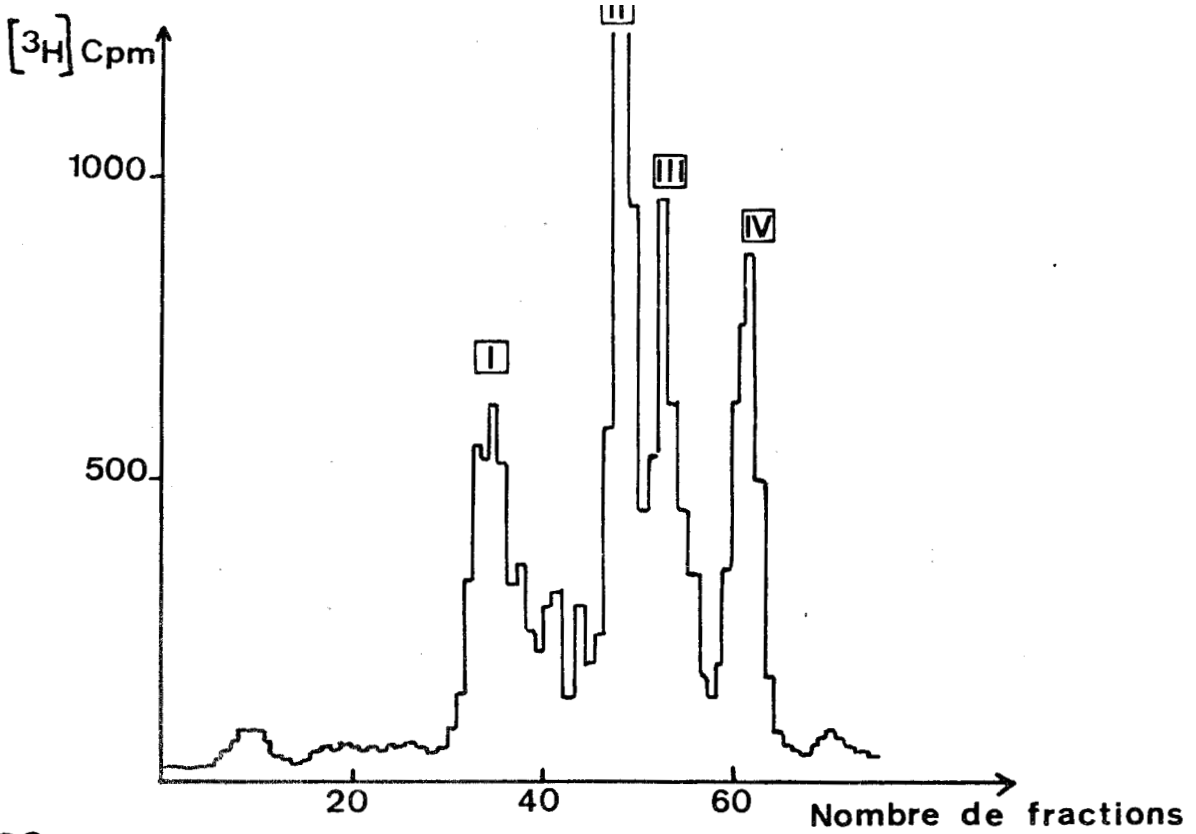
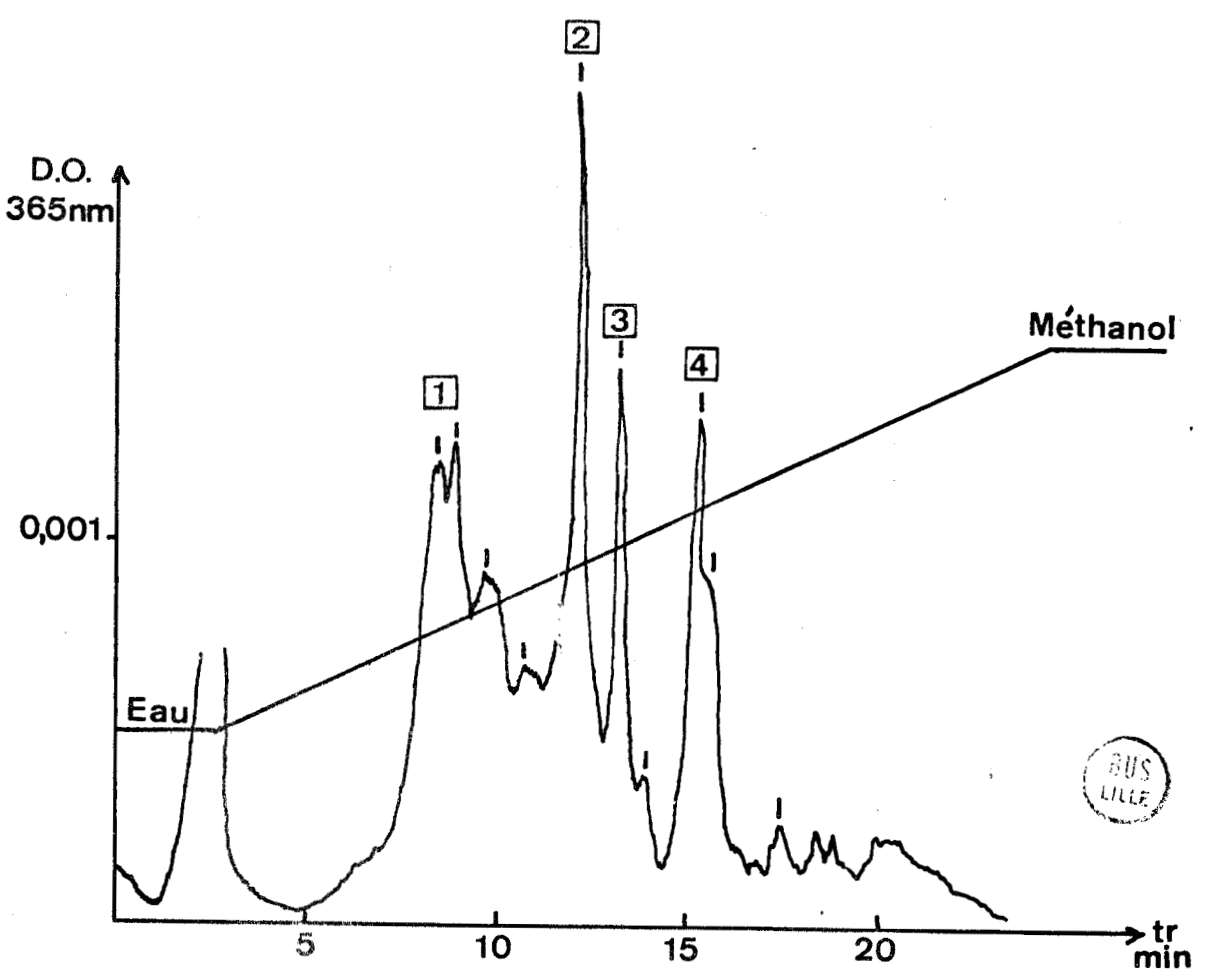


Figure 20
 Réaction DNA natif-di Ac4HA[2- ^3H] QO
 taux de fixation: 1%.

Hydrolyse (\rightarrow bases) et chromatographie HPLC.



libérer le cancérogène seul. Il faudra donc, soit employer un autre système d'hydrolyse, soit séparer des composés quinoléines obtenus par hydrolyse des DNA, avec un autre système de séparation, qui nous renseignera sur les propriétés des pics détectés. L'utilisation de l'hydrolyse enzymatique ou d'une colonne de tamisage moléculaire, pourrait nous permettre de résoudre ce problème.

3. La comparaison des composés d'addition obtenus sur les DNA, avec ceux obtenus à l'aide des monomères, n'est pour l'instant pas possible. En effet, les modèles monomères sont sous forme de nucléosides, alors qu'à partir du DNA, la dépurination nous donne les bases.

En conclusion, cette étude ne nous permet pas, considérant les différents problèmes que nous venons d'évoquer, de donner des résultats concluants. Cependant les premiers résultats obtenus semblent prometteurs.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons montré que le di Ac-4HAQO et l'Ac-4HAQO réagissaient *in vitro* sur les nucléosides puriques. Si la fixation du cycle quinoléine sur les nucléosides, dans le cas du di Ac-4HAQO passe, comme nous l'avons suggéré, par l'intermédiaire du monoacétyl (Ac-4HAQO), il semblerait plus correct de dire : c'est le dérivé monoacétylé Ac-4HAQO qui constitue le cancérogène ultime du 4NQO et non le dérivé di-acétylé di Ac-4HAQO.

Cette hypothèse est à rapprocher de celle émise par Tada *et al* (92, 95) concernant la mono estérification de la fonction hydroxylamine du 4HAQO. Cependant elle ne permet pas de comprendre comment pourrait se produire une acétylation *in vivo*. Bien que cette acétylation n'ait pu être mise en évidence, son existence permettrait d'expliquer pourquoi les lésions causées par le 4NQO sont séparées selon les deux mécanismes de réparation par excision (79).

Malheureusement, on imagine mal, quelle méthode pourrait être utilisée pour montrer une acétylation *in vivo*.

Ceci revient à dire que nous possédons deux composés modèles de cancérogène ultime pouvant être étudiés *in vitro* :

- le premier, le di Ac-4HAQO, réagit sur les nucléosides puriques (en donnant à la fois des composés d'addition avec le cycle quinoléine et une réaction d'acétylation).
- le second, l'Ac-4HAQO, modifie les nucléosides puriques par fixation du cycle quinoléine en donnant des produits d'addition identiques à ceux obtenus avec le di Ac-4HAQO, mais avec des rendements différents; cependant il ne semble pas être capable d'acétyler les nucléosides.

Il serait intéressant d'étudier parallèlement ces deux composés dans le but de comparer leur réactivité. Ce qui implique la connaissance de la structure exacte du composé monoacétylé, ainsi que la mise au point d'une méthode de synthèse permettant de l'obtenir purifié.

Ceci constitue un travail de chimie important, qui ne peut être entrepris que par des chercheurs compétents en chimie organique. C'est dans cet esprit que nous avons mis sur pieds une collaboration avec le laboratoire de Monsieur le Professeur J.Lhomme.

Dans ce travail, nous avons également montré que le composé d'addition GIII obtenu aussi bien avec le di Ac-4HAQO qu'avec l'Ac-4HAQO, provenait de la fixation du cycle quino-
léine sur le carbone 8 de la guanine.

De plus, l'utilisation de la HPLC et des composés radio-actifs, nous a permis de visualiser les perturbations molé-
culaires des DNA modifiés aussi bien par le 4HAQO *in vivo* que par le di Ac-4HAQO *in vitro*. Il semble donc important de continuer ce travail (en collaboration avec Sylvie Galiègue), afin de montrer que les principales modifications observées *in vitro* sur les bases du DNA, par les deux modèles de cancérogènes ultimes, sont identiques à celles obtenues *in vivo*.

Les taux de fixation sur les DNA modifiés *in vivo* étant très faible (1 base modifiée sur 20 000), l'identification des composés d'addition est particulièrement délicate. Nous rappellerons donc ici les solutions envisagées pour résoudre ce problème :

- l'utilisation de systèmes enzymatiques d'hydrolyse.
- l'utilisation d'une pré-séparation des hydrolysats.
- la mise au point d'un autre système de chromatographie HPLC (le tamis moléculaire par exemple).
- la synthèse de molécules modèles correspondant aux composés d'addition.

Il est important de noter qu'après avoir identifié les différents composés d'addition provenant de l'hydrolyse des DNA modifiés *in vivo*, il nous serait possible à l'aide de la HPLC et en utilisant des réactifs marqués de suivre la persistance d'une lésion sur le DNA au cours du temps, donc d'étudier la réparation. Cette recherche pourrait être entreprise dès que sera connue la structure des différents composés d'addition. C'est pour cette raison, que parallèlement à cette comparaison *in vivo-in vitro*, l'étude des différents composés d'addition que nous avons identifiés sera poursuivie.

Enfin il sera nécessaire également d'étudier la fixation possible de la quino-
léine sur les bases pyrimidiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. D'AMBROSIO S.M. & SETLOW R.B. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2396-2400.
2. ANDOH T. & IDE T. (1972) *Cancer Res.*, 32, 1230-1235.
3. ANDOH T., KATO K., TAKAOKA T. & KATSUTA H. (1971) *Int. J. Cancer*, 7, 455-467.
4. BAL J., KAJTANIAK E.M. & PIENIAZEK N.J. (1977) *Mutation Res.* 56, 153-156.
5. BARTSCH H., DWORKIN C., MILLER E.C. & MILLER J.A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 304, 42-55.
6. BELMANN S. & TROLL W. (1972) *Cancer Res.*, 32, 450-454.
7. BERENBLUM I. (1941) *Cancer Res.*, 1, 44-48.
8. BERENBLUM I. (1954) *Adv. Cancer Res.*, 2, 129-175.
9. BERENBLUM I. (1957) *An. Med. Pevugia*, 48, 822-828.
10. BERENBLUM I. (1978) in *Carcinogenesis. Mechanisms of tumor Promotion and cocarcinogenesis*. 2 (T.J.Slaga, A. Sivak & R.K. Boutwell) Raven Press, New-York. pp. 1-10.
11. BERENBLUM I. (1929) *J. Path. Bact.* 32, 425-434.
12. BINGHAM E., WARSHAWSKY D & NIEMEIER R.W. in *Carcinogenesis. Mechanisms of tumor Promotion and cocarcinogenesis*. 2 (T.J.Slaga, A. Sivak & R.K. Boutwell) Raven Press, New-York. pp 509-516.
13. BYRNES J.J., DOWNEY K.M., QUE B.G., LEE M.Y.W., BLACK V.L. & SO A.G. (1977) *Biochemistry*, 16, 3740-3746.

14. CLEAVER J.E. (1968) *Nature*, 218, 652-656.
15. CLEAVER J.E. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 63, 428-435.
16. Das Gupta U.B. & SUMMERS W.C. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75, 2378-
17. DAUNE M.P. & FUCHS R.P.P. (1977) in *Mécanismes d'altération et de réparation du DNA, relations avec la mutagénèse et la cancérogénèse chimique*, Editions du CNRS, Paris, pp. 83-102.
18. De BAUN J.R., MILLER E.C. & MILLER J.A. (1970) *Cancer Res.*, 30, 577-595.
19. DEVORET R. (1978) *Biochimie* 60, 1135-1140.
20. 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.
21. DEVORET R., GOZE A., MOULE Y. & SARASIN A. in *Mécanismes d'altération et de réparation du DNA. Colloques internationaux du CNRS. n°256*, 283.
22. ENDO H., ISHIZAWA M. & KAMIYA T. (1963) *Nature*, 198, 195-196.
23. ENDO H. & KUME F. (1963) *Gann*, 54, 443-453.
24. ENDO H., ONO T. & SUGIMURA T. (1971) *Recent Results in Cancer Res.*, 34, 1-99.
25. ENOMOTO M., MILLER E.C. & MILLER J.A. (1971) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 136, 1206-1210.
26. ENOMOTO M., SATO K., MILLER E.C. & MILLER J.A. (1968) *Life Sciences*, 7, Part II, 1025-1032.

27. FALK H.L. (1971) *Prog. Exp. Tumor. Res.*, 14, 105-137.
28. FISHER P.B., FLAMM M., SCHACHTER T. & WEINSTEIN I.B. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 86, 1063-1068.
29. FUCHS R.P.P., LEFEVRE J.F., POUYET J. & DAUNE M.P. (1976) *Biochemistry*, 15, 3347-3351.
30. GALIEGUE S. Thèse de 3ème cycle. Lille 1978.
31. GALIEGUE S., BAILLEUL B. & LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. soumis à B.B.R.C.
32. HAYASHI Y. & HASEGAWA T. (1971) *Gann*, 62, 329-330.
33. HECKER E. (1971) in *Methods in Cancer Research*, 6 (H.Busch) Academic Press, New-York, London. pp. 439-484.
34. HIRAI K., DEFENDI V. & DIAMOND L. (1974) *Cancer Res.*, 34, 3497-3500.
35. HOZUMI M. (1969) *Gann.*, 60, 161-165.
36. IKEGAMI S., NEMOTO N., SATO S. & SUGIMURA T. (1969-1970) *Chem. Biol. Interact.*, 1, 321-330.
37. IQBAL Z.M., MAJDAN M. & EPSTEIN S.S. (1976) *Cancer Res.*, 36, 1108-1113.
38. IRVING C.C. (1973) *Methods in Cancer Res.*, 7, 189-243.
39. 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.
40. KAWAZOE Y. (1971) *Gann*, 62, 325-327.
41. KAWAZOE Y. & ARAKI M. (1967) *Gann*, 58, 485-487.

42. KAWAZOE Y., ARAKI M., HUANG G.F., OKAMOTO T., TADA Mit. & TADA MAR. (1975) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 23, 3041-3043.
43. KAWAZOE Y., ARAKI M. & NAKAHARA W. (1969) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 17, 544-549.
44. KINSELLA A.R. & RADMAN M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75, 6149-6153.
45. KONDO S. (1975) *Adv. in Biophys.*, 7, 91-162.
46. KRIEK E. (1972) *Cancer Res.*, 32, 2042-2048.
47. KRIEK E., MILLER J.A., JUHL U. & MILLER E.C. (1967) *Biochemistry*, 6, 177-182.
48. KUROKI T., KANAMARU R. & SATO H. (1970) *Gann*, 61, 373-382.
49. LAVAL.J. (1978) *Biochimie*, 60, 1123-1134.
50. LEVIN W., WOOD A.W., CHANG R.L., SLAGA T.J., YAGI H., JERINA D.M. & CONNEY A.H. (1977) *Cancer Res.*, 37, 2721-2725.
51. LIN J.K., MILLER J.A. & MILLER E.C. (1977) *Cancer Res.*, 37, 4430-4438.
52. MARX J.L. (1978) *Science*, 200, 518-521.
53. MATSUSHIMA T., KOBUNA I. & SUGIMURA T. (1967) *Nature*, 216, 508.
54. MEYN M.S., ROSSMAN T. & TROLL W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 1152-1156.
55. MIDDAUGH R.L. & DRAGO R.S. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2575
56. MILLER E.C. (1978) *Cancer Res.*, 38, 1479-1496.

57. MILLER E.C., JUHL U. & MILLER J.A. (1966) *Science*, 153, 1125-1127.
58. MILLER E.C. & MILLER J.A. (1974) in *The molecular Biology of Cancer* (H. Busch, ed.) Academic Press, New-York, pp. 377-402.
59. MILLER E.C., MILLER J.A. & ENOMOTO M. (1964) *Cancer Res.*, 24, 2018-2032.
60. MILLER J.A. (1970) *Cancer Res.*, 30, 559-576.
61. MOREAU P., BARLONE A. & DEVORET R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 73, 3700-3704.
62. MORI K., KONDO M., TAMURA M., ICHIMURA H. & OHTA A. (1969) *Gann*, 60, 609.
63. MORI K., KONDO M., TAMURA M., ICHIMURA H. & OHTA A. (1969) *Gann*, 60, 663.
64. MORI K. & OHTA A. (1967) *Gann*, 58, 551-554.
65. MORI K. & YASUNO A. (1961) *Gann*, 52, 149-153.
66. NAGAO M. & SUGIMURA T. (1976) *Adv. in Cancer Res.*, 23, 132-169.
67. NAKAHARA W., FUKUOKA F. & SAKAI S. (1958) *Gann*, 49, 33-41.
68. NAKAHARA W., FUKUOKA F. & SUGIMURA T. (1957) *Gann*, 48, 129-137.
69. OCHIAI E. (1953) *J. Org. Chem.* 18, 534-551.
70. OKABAYASHI T., IDE M., YOSHIMOTO A. & OTSUBO M. (1965) *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 13, 610-611.

71. OKABAYASHI T. & YOSHIMOTO A. (1962) *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, 10, 1221-1226.
72. OKANO T., GOTO M., MATSUMOTO H. & TAKADATE A. (1972) *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, 20, 2551-2560.
73. OKANO T., MAENOSONO J., KANO T. & ONODA I. (1973) *Gann*, 64, 227-236.
74. OKANO T., TAKENAKA S. & SATO Y. (1969) *Gann*, 60, 307-317.
75. ONG T., MATTER B.E. & De SERRES F.J. (1975) *Cancer Res.*, 35, 291-295.
76. POTT P. (1963) *Natl. Cancer Inst. Monograph.*, 10, 7-13.
1 ère parution : London 1775.
77. RADMAN M. (1975) in "*Molecular Mechanisms for Repair of DNA*" (P.C.Hanawalt R.B. Setlow, eds), Plenum Press, New-York, pp. 355-367.
78. RADMAN M., VILLANI G., BOILEUX S., KINSELLA A.R., GLICKMAN B.W. & SPARADI S. (1978) *Gold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 43,
79. REGAN J.D. & STELOW R.B. (1974) *Cancer Res.*, 34, 3318-3325.
80. ROBERTS J.M. & ROBERTS C.W. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72, 147-151.
81. SALL R.D., SHEAR M.J., PEITER J. & PERRAULT A. (1940) *J. Natl. Cancer Inst.*, 1, 45-55.
82. SARASIN A. & HANAWALT P.C. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75, 346.
83. 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.

84. SATO K., SAITO T. & ENOMOTO M. (1970) *Japan J. Exp. Med.* 40, 475-478.
85. SETLOW R.B. (1978) *Nature*, 271, 713-717.
86. SETLOW R.B., REGAN J.D., GERMAN J. & CARRIER W.L. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 64, 1034-1041.
87. SHIRASU Y. (1963) *Gann*, 54, 487-495.
88. SHIRASU Y. & OHTA A. (1963) *Gann*, 54, 221-223.
89. SLAGA T.J., FISCHER S.M., VIAJE A., BERRY D.L., BRACKEN W.M., Le CLERC S. & MILLER D.R. (1978) in *Carcinogenesis. Mechanisms of tumor Promotion and cocarcinogenesis. 2* (T.J.Slaga, A.Sivak R.K.Boutwell) Raven Press, New-York. pp 173-195.
90. STICH H.F. & SAN R.H.C. (1970) *Mutation Res.*, 10, 389-404.
91. SUZUKI K. (1978) *Gann*, 69, 229-235.
92. TADA Mar. & TADA Mit. (1974) *Gann*, 65, 281-284.
93. TADA Mar., TADA Mit. & TAKAHASHI T. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 469-477.
94. TADA Mit. & TADA Mar. (1971) *Chem. Biol. Interact.*, 3, 225-229.
95. TADA Mit. & TADA Mar. (1975) *Nature*, 255, 510-512.
96. TADA Mit & TADA Mar (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 454, 558-566.
97. TOMATIS L., AGTHE C., BARTSCH H., HUFF J., MONTESANO R., SARACCI R., WALKER E. & WILBOURN J. (1978) *Cancer Res.*, 38, 877-855.

98. TROLL W., MEYN S. & ROSSMANN T.G. (1978) in *Carcinogenesis. Mechanisms of Tumor Promotion and cocarcinogenesis. 2* (T.J.Slaga, A.Sivak R.K.Boutwell) Raven Press, New-York, pp.301-312.
99. VAN DUUREN B.L., WITZ G. & GOLDSCHMIDT B.M. (1978) in *Carcinogenesis. Mechanisms of Tumor Promotion and Cocarcinogenesis. 2*, (T.J.Slaga, A.Sivak R.K. Boutwell) Raven Press, New-York, pp. 491-507.
100. VILLANI G., BOITEUX S. & RADMAN M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75, 3035.
101. WEINSTEIN B., WIGLER M., FISHER P.B., SISSKIN E. & PIETROPAOLO C. (1978) in *Carcinogenesis. Mechanisms of Tumor Promotion and cocarcinogenesis. 2*, (T.J. Slaga, A.Sivak R.K.Boutwell) Raven Press, New-York, pp. 313-333.
102. WEISBURGER E.K. & WEISBURGER J.H. (1958) *Adv. Cancer Res.*, 5, 331-431.
103. WITKIN E.M. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 71, 1930-1934.
104. WITKIN E.M. (1976) *Bacteriol. Rev.*, 40, 869-907.
105. YAMASAKI H., PULKRABEK P., MARSH H.H., III, WEISBURGER J.M. & WEISBURGER E.K. (1970) *Biochem. Pharmacol.*, 19, 173-188.
106. YOSHIDA T.H., KURITA Y. & MORIWAKI K. (1965) *Gann*, 56, 523-528.

APPENDICE TECHNIQUE

SYNTHESE CHIMIQUE

I. Le 4HAQO. Méthode de Enomoto *et al* (26)

1g de 4NQO (5,2 mmoles) est dissous dans 250ml d'éthanol, dans un flacon de 500ml équipé d'un agitateur magnétique. On ajoute ensuite, sous agitation, 50g d'acide ascorbique et 15ml 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 . Le rendement de cette réaction est d'environ 80%.

II. Le di Ac-4HAQO. Méthode de Kawazoe et Araki (41)

On dissout 100mg de 4HAQO (0,57 mmole) dans 2ml d'anhydride acétique (19 mmoles) 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 min. Après avoir centrifugé la solution, on la verse dans 50ml 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. Le rendement de cette réaction est d'environ 60%.

METHODE ANALYTIQUE

La chromatographie liquide haute pression (HPLC)

Les méthodes de séparation ont toujours constitué l'un des outils les plus utilisés de la chimie analytique.

Dans ce domaine, un pas important a été fait lors de la mise au point de système de chromatographie à grande vitesse d'élu-tion (encore appelée "chromatographie sous pression"); en effet il a permis de remédier à la lenteur des séparations.

On peut classer les méthodes chromatographiques de trois manières différentes :

- a) selon la nature des phases
 - la chromatographie liquide-liquide (CLL)
 - la chromatographie liquide-solide (CLS)
- b) selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la sépara-tion : absorption, partage, échange d'ions et exclusion.
- c) selon la technologie de la mise en oeuvre (chromatogra- phique sur colonne ou de surface).

L'intérêt de la technique rapide qu'est la chromatographie en phase liquide (CPL) est qu'elle ne présente pas de limitations puisqu'elle ne nécessite pas, comme la chromatographie phase gazeuse (CPG), la volatilité de l'échantillon et sa stabilité thermique. En effet, dans le cas du di Ac-4HAQO il semble que seule la CPL soit appropriée.

En CPL il existe des interactions du soluté avec la phase stationnaire (le support) et avec la phase mobile (le solvant) d'où de nombreuses possibilités pour les séparations difficiles.

La méthode de séparation, que nous avons employée, est la chromatographie liquide-liquide (CLL) sur colonne.

Théorie de la CLL.

Dans le cas de la CLL, la phase stationnaire est un liquide qui imprègne le support, ou est greffé par une liaison chimique covalente sur ce support.

La séparation est fondée sur le partage des solutés entre cette phase et la phase mobile, elle-même liquide. Deux systèmes peuvent être employés, une phase stationnaire polaire, associée à une phase mobile non polaire, et inversement.

Dans notre cas, nous avons choisi une phase stationnaire non polaire, greffée sur la surface du support: la micro-Bondapak C18 (Waters), elle est constituée par la liaison chimique d'un groupement C_{18} ($(CH_2)_{17}-CH_3$) sur un support de silice. La phase mobile est un mélange de solvants (H_2O /méthanol) qui nous permet d'obtenir une efficacité maximale. Cette technique de mélange de solvants, est très employée en CLL; en effet, elle permet en utilisant un gradient, d'éluer rapidement de la colonne un mélange de composés de natures chimiques très différentes. Ceci permet de réduire de beaucoup le temps d'analyse.

Du point de vue expérimental, l'appareil est complètement automatisé : un programmeur effectue le gradient H_2O -méthanol avec un débit constant. Cette automatisation permet de reproduire parfaitement les chromatographies. Le temps de rétention, c'est-à-dire le temps écoulé entre le maximum du pic d'un composé et l'injection est donc très précis. Cette valeur, pour des conditions identiques de chromatographie, caractérise donc un composé.

TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

La Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN, comme son nom l'indique, représente l'absorption d'une radiation électromagnétique par un noyau. La fréquence de résonance (en Hz) d'un noyau est fonction de l'atome considéré et de son environnement.

On définit le glissement chimique δ (en ppm) d'un atome par la relation :

$$\delta = (\nu_s - \nu_r) \times (\nu_r)^{-1} \times 10^6$$

ν_s = fréquence de résonance du noyau étudié (en Hz)

ν_r = fréquence de résonance de la référence (en Hz)

δ = glissement chimique du noyau considéré (en ppm).

Les principes de la RMN sont parfaitement décrits dans l'ouvrage de A. Abragam*.

Nous avons utilisé la RMN du proton pour analyser différents composés.

Il faut noter, dans ce cas que l'on observe des couplages entre protons : en effet le fait d'appliquer un champ magnétique à un atome appartenant à une molécule perturbera automatiquement les autres atomes de cette molécule. Les constantes de couplage sont caractéristiques de l'environnement atomique.

Le nombre de protons détectés, la valeur des glissements chimiques, les couplages sont des données précieuses obtenues grâce au spectre RMN, qui nous renseignent sur la structure de la molécule étudiée.

La spectroscopie infra-rouge (IR).

L'IR est un phénomène d'absorption lumineuse (dans l'infra-rouge) correspondant aux mouvements de vibration interne d'une molécule dans laquelle les longueurs et les angles

* A. Abragam. The principles of Nuclear Magnetism (1961)
Clarendon, Oxford.

des liaisons varient par rapport à leur valeur à l'équilibre. L'absorption d'énergie correspondant aux différentes bandes observées sont caractéristiques des fonctions d'une molécule. La théorie générale et l'appareillage employés sont parfaitement décrits dans l'ouvrage de E.G.Brame Jr et J.G.Grasselli.*



* Edward G. Brame, Jr and Jeanette G. Grasselli. Infrared and Raman spectroscopy (1977) New York and Basel.