



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Importance de la superoxyde dismutase et de la catalase comme défense de la cellule contre les radicaux libres

Plainchamp, Dominique

Award date:
1984

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

1984



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

Importance de la superoxyde dismutase
et de la catalase comme défense de la
cellule contre les radicaux libres.

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

PLAINCHAMP Dominique

Au terme de ce travail, je tiens à remercier le professeur J. Remacle pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir guidée tout au long de cette année.

Mes remerciements s'adressent également à mademoiselle M. Raes et monsieur V. Henin pour les nombreux conseils qu'ils m'ont procurés.

Je ne voudrais pas oublier madame A. Houbion pour sa précieuse aide technique ainsi que tous les membres du département de Biochimie Cellulaire pour la sympathique ambiance qu'ils y font régner.

Je tiens enfin à remercier mes parents qui m'ont permis de faire ces études.

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

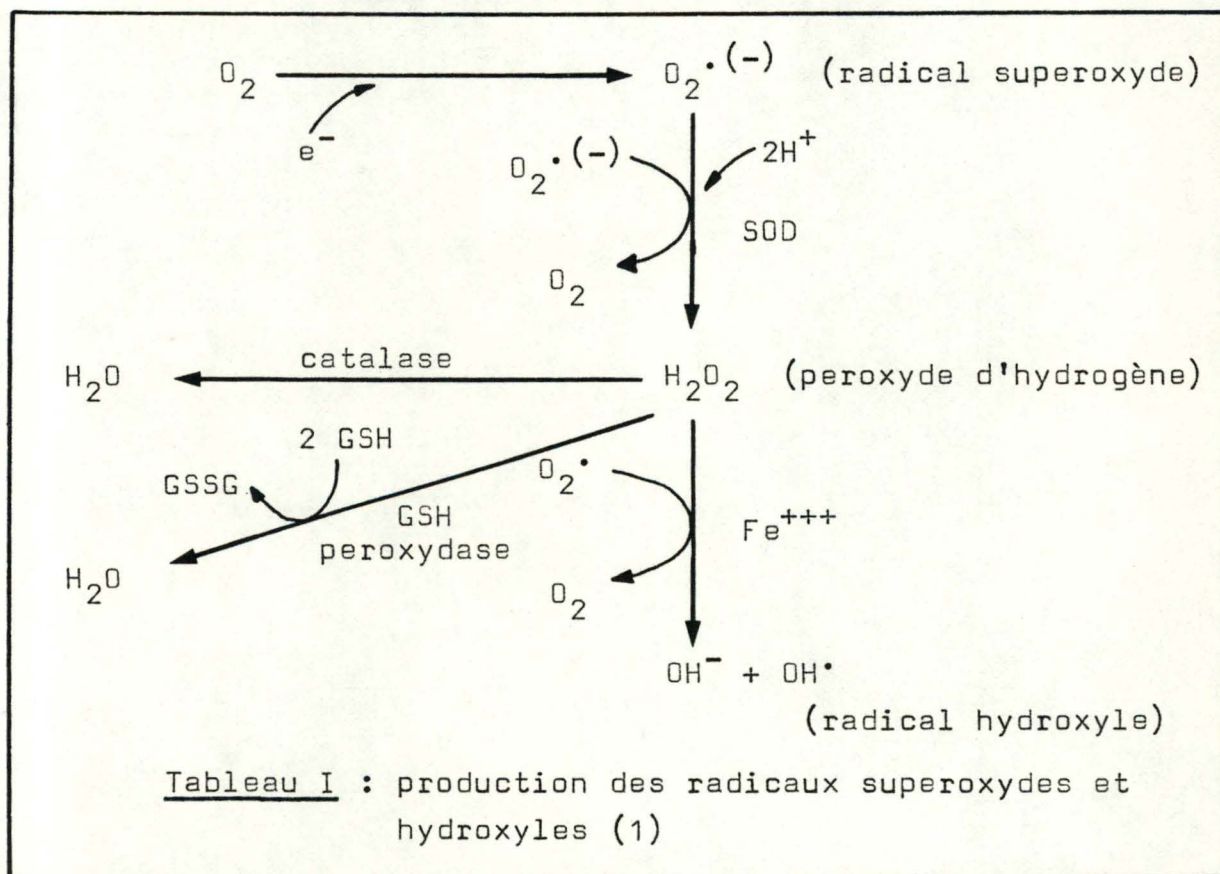
=====

	Page
1. <u>Introduction</u>	1
1.1. Les radicaux superoxydes	1
1.2. Sources des radicaux superoxydes	2
1.3. Mode d'action du paraquat	2
1.4. Toxicité de l'oxygène	4
1.5. Systèmes de défense de la cellule	6
2. <u>Matériel et méthodes</u>	11
2.1. Culture et clonage des fibroblastes WI-38	11
2.2. Technique de micro-injection	12
2.3. Solutions injectées : - catalase - SOD - catalase + SOD	12
2.4. Observations des cellules injectées	13
2.5. Pression en oxygène : - pression atmosphérique - pression de 2 atmosphères - temps d'incubation sous O ₂	13
2.6. Concentrations en paraquat	15
2.7. Dosage des protéines et comptage des cellules	15
2.8. Colorations pour microscopie optique	16
2.9. Fixation et enrobage pour microscopie électronique	17
3. <u>Résultats</u>	18
3.1. Micro-injection de tampon	18
3.2. Effets du paraquat	19
3.2.1. Paraquat 5.10 ⁻⁵ M : micro-injections : - catalase - catalase + SOD	19
3.2.2. Paraquat 10 ⁻⁴ M : micro-injection de catalase + SOD .morphologie des cellules	20
3.2.3. Analyse de la variance	21
3.3. Effet de l'oxygène	26
3.3.1. Etude de la pression en oxygène - sur boîte de culture - sur boîte de Pétri	26

1. INTRODUCTION

1.1. LES RADICAUX SUPEROXYDES

Dans de nombreuses réactions engendrées par les radicaux libres, la réaction initiale la plus commune est l'addition d'un électron libre sur une molécule d'oxygène, produisant ainsi un radical superoxyde $O_2 \cdot (-)$ (SOR) (1). La présence du radical superoxyde dans la cellule provoque alors une chaîne de réactions conduisant à la formation de nombreux intermédiaires dont les peroxydes, notamment le peroxyde d'hydrogène, et les radicaux hydroxyles (Tableau I).



Ces derniers, très toxiques pour la cellule, vont à leur tour attaquer des molécules et former ainsi d'autres radicaux libres : les molécules biologiques essentiellement attaquées par les radicaux hydroxyles

sont celles qui possèdent des groupements insaturés (protéines, DNA, lipides). Ces réactions par attaque de radicaux libres provoquent de nombreuses altérations au niveau des membranes suite à l'attaque des acides gras insaturés des phospholipides, mais les autres organites subcellulaires comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique peuvent également être atteints.

1.2. SOURCES DES RADICAUX SUPEROXYDES

La production des radicaux superoxydes a des sources multiples :

- La chaîne des transporteurs d'électrons de la mitochondrie : c'est la plus grande source de radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ dans la cellule suite à l'oxydation du coenzyme Q et le transfert de l'électron sur O_2 .
- L'activité de certains enzymes : xanthine oxydase, aldéhyde oxydase.....(1)
- Autooxydation : hydroquinones, flavines, thiols, catécholamines.....(1)
- Oxydation d'herbicides (paraquat).
- Tétrachlorure de carbone, radiations.....

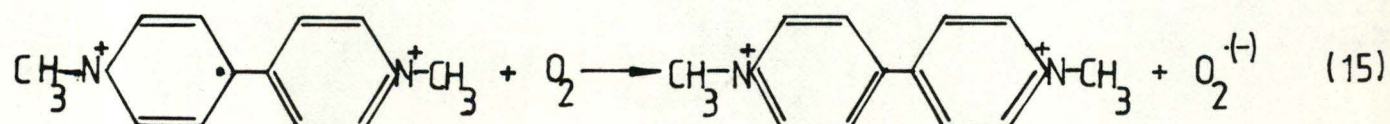
Dans ces diverses sources, nous avons sélectionné deux causes majeures de production d' O_2^{\cdot} , à savoir la présence de paraquat et les hautes pressions en O_2 .

1.3. MODE D'ACTION DU PARAQUAT

Le paraquat (1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridylum ; méthyl viologen) est un herbicide dont la toxicité se traduit par une décoloration et la dessiccation très rapide des plantes (2). Son action toxique provient de l'interaction du paraquat avec le photosystème I des

plantes, pour produire des radicaux causant la destruction de la plante (3).

Administré à des rats, le paraquat s'accumule préférentiellement dans les poumons et provoque généralement la mort du rat par étouffement (2). Chez les animaux, la réduction du paraquat est réalisée par la cytochrome c réductase et la réoxydation spontanée du paraquat provoque la formation d' O_2^{\cdot} . En effet, le paraquat peut être réduit pour former un radical libre, stable en solution aqueuse en absence d'oxygène. Cependant, l'oxygène réoxyde très rapidement ce radical en cation avec la production simultanée d'un anion superoxyde (2) :



Les causes de la toxicité du paraquat donnent lieu à plusieurs interprétations : pour Bus (4), la réduction et l'oxydation continues du paraquat avec production d' O_2^{\cdot} conduiraient à la peroxydation des lipides par l'intermédiaire de la production de radicaux hydroxyles ce qui entraînerait finalement la mort cellulaire. Pour Rose et al. (5) par contre, les mécanismes de toxicité du paraquat seraient dûs à l'oxydation du NADPH en NADP^+ lors de l'élimination des peroxydes formés. Une troisième hypothèse attribue la toxicité du paraquat à la production du radical superoxyde. Des expériences de Fischer (6) ont montré qu'une dose létale de paraquat administrée à des rats placés dans une atmosphère de 100 % d'oxygène provoquait une mort plus rapide que si les rats étaient laissés dans l'air ambiant. Cependant, les rats pré-exposés à 85 % d'oxygène pendant 7

jours sont plus résistants aux effets du paraquat comparés à des rats pré-exposés à l'air ambiant. Cette observation serait à mettre en rapport avec le fait qu'une pré-exposition des rats à 85 % d'oxygène induit la formation de SOD au niveau des poumons (7).

1.4. TOXICITE DE L'OXYGENE

A l'exception des organismes spécialement adaptés à la vie anaérobie, tous les animaux et les plantes ont besoin d'oxygène pour la production d'énergie et pour le maintien de la vie. Paradoxalement, à quelque concentration qu'il soit, l'oxygène est toxique pour la vie (8).

Bien que l'oxygène moléculaire soit abondant dans notre atmosphère, il n'en a pas toujours été ainsi (9). L'apparition des premières algues bleues et l'oxygénation de la biosphère qui en a résulté ont imposé une importante pression sur les organismes qui jusque là, avaient vécu en anaérobiose (8). L'apparition de l'oxygène a donc nécessité le développement de mécanismes pour permettre son utilisation et parallèlement le développement de systèmes de défense contre sa toxicité (9). Les expériences montrant la toxicité de l'oxygène sont nombreuses, en voici quelques exemples :

- Des fibroblastes de la 22ème génération sont soumis à différentes concentrations en oxygène : à une concentration de 10 % en O_2 , ils peuvent se cultiver jusqu'à la 68ème génération ; à 20 % en O_2 , ils arrivent à la 56ème génération. Par contre, lorsque la concentration en O_2 est de 50 %, les fibroblastes ne parviennent qu'à la 24ème génération (10).
- Certains enzymes peuvent être inactivés par l'oxy-

gène, essentiellement ceux qui comportent des groupements sulfhydryls.

- Une concentration en oxygène légèrement supérieure à celle de l'air ambiant inhibe la division et la croissance des cellules en culture.
- A 95 % d' O_2 , la croissance de cellules Hela est totalement arrêtée et les taux de synthèse du DNA, RNA et des protéines sont fortement inhibés (8).

Ces quelques exemples concernent les cellules en culture mais les concentrations élevées en oxygène affectent également bactéries, champignons, plantes et animaux.

Si la toxicité de l'oxygène n'est plus à réfuter, il s'agit de savoir maintenant quels sont les mécanismes responsables de cette toxicité. Plusieurs hypothèses, qui ne s'excluent pas nécessairement, sont proposées (11) :

- l'oxygène inactiverait certains enzymes.
- il provoquerait la formation de peroxyde d'hydrogène.
- il conduirait à la peroxydation des lipides.
- il augmenterait la formation des radicaux libres.

Dans ces réactions, l'oxygène moléculaire est réduit (12). A l'état fondamental, O_2 est paramagnétique : il possède deux électrons non appariés de spins parallèles. Une réduction divalente s'avère donc impossible. La seule réaction possible est donc la réduction de l' O_2 par l'addition d'électrons un à un. Dans ce cas, la réduction complète de l'oxygène s'effectue en quatre étapes avec formation du radical anion superoxyde ($O_2 \cdot (-)$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle ($OH \cdot$) pour aboutir à la formation de molécules d'eau (12).

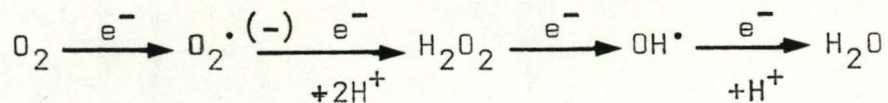


Schéma de la réduction univalente de l' O_2

1.5. SYSTEMES DE DEFENSE DE LA CELLULE

Les sources de radicaux superoxydes étant abondantes et les différents intermédiaires de la réduction de l'oxygène étant toxiques, on peut se demander comment des êtres vivants peuvent survivre dans des conditions aussi défavorables. Pour remédier à cette situation, les cellules ont développé au cours de l'évolution des systèmes de défense qui sont de deux types :

a. Systèmes de défense non enzymatiques (1) :

Dans cette catégorie, on trouve les hydroquinones ainsi que la vitamine E et la vitamine C qui ont pour rôle de capter ou d'inactiver les radicaux libres et réduire ainsi les réactions que ceux-ci provoquent comme la peroxydation des lipides par exemple.

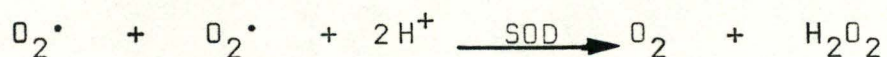
b. Systèmes de défense enzymatiques :

La production de radicaux libres et leurs effets toxiques ne pouvant être évités, une solution efficace pour les cellules était de capter enzymatiquement ces produits et de les détoxifier dès leur formation (13).

Plusieurs familles d'enzymes remplissent ce rôle, ce sont les superoxydes dismutases, les catalases et les peroxydes.

b.1. Les superoxydes dismutases (SOD) (cfr tableau I)

Elles catalysent une réaction de dismutation de deux radicaux superoxydes :



Suite à l'impact de l'oxygène et la production inévitable de radicaux superoxydes qui en résulte chez toutes les formes vivantes aérobies, on constate une répartition universelle des SOD parmi ces organismes (13). C'est cette distribution uniforme qui suggéra le rôle physiologique joué par cet enzyme (9,13,14). L'activité de la SOD est d'une remarquable constance d'un organisme à l'autre par rapport aux autres enzymes protecteurs qui varient plus largement et qui sont même parfois absents d'un organisme (comme par exemple la catalase). Ceci pourrait peut-être s'expliquer par une plus grande toxicité des radicaux superoxydes par rapport au peroxyde d'hydrogène ou par le fait qu'ils sont produits en premier lieu.

Bien que la SOD soit présente dans tous les organismes aérobies, elle ne s'y trouve pas pour autant sous la même forme. En effet, il existe trois types de SOD : les SOD cuivre-zinc, les SOD manganèse et les SOD fer (12,13,14,). En règle générale, on peut dire qu'on ne trouve les SOD fer que chez les procaryotes. A part quelques exceptions, les eucaryotes contiennent à la fois les SOD cuivre-zinc et les SOD manganèse. Les premières se trouvent dans le cytoplasme et dans l'espace intermembranaire, alors que les secondes sont localisées dans les mitochondries (13).

Plusieurs expériences ont permis de démontrer l'importance de la SOD :

- des études sur micro-organismes ont montré que les espèces anaérobies ne possédaient pas de SOD contrairement aux espèces aérobies ou anaérobies

facultatifs (13,14).

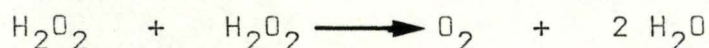
- Certaines observations ont pu être faites en utilisant des mutants thermo-sensibles d'*Eschérichia coli* qui ne peuvent pas synthétiser la SOD à haute température. A basse température, ils peuvent vivre en aérobiose ou en anaérobiose, mais à plus haute température, ils perdent leur capacité de vivre dans des conditions aérobies. L' O_2 n'étant généré qu'en anaérobiose, la SOD semble donc essentielle pour des cellules aérobies (13,14).
- Des organismes anaérobies facultatifs tels *E. coli* et *Streptococcus faecalis* voient leur taux de SOD augmenter fortement lors d'une exposition à l'oxygène. Ces taux élevés de SOD correspondent à une résistance accrue vis-à-vis des effets toxiques de fortes pressions en oxygène (9,14).
- Un mutant de l'algue verte *Chlorella* qui possède un taux élevé de SOD, est plus résistant à de fortes concentrations en oxygène que le type sauvage (11).
- Des rats exposés à 100 % d'oxygène meurent généralement après 60 à 72 heures d'exposition. S'ils sont pré-exposés à 85 % d' O_2 pendant 7 jours, ils deviennent tolérants et peuvent supporter plus longtemps une atmosphère contenant 100 % d' O_2 . Parallèlement à cette résistance accrue, on constate une augmentation de 50 % de l'activité de la SOD lors de la pré-exposition à 85 % d'oxygène. Cette augmentation de SOD expliquerait la capacité de survie de ces rats dans une atmosphère composée à 100 % d'oxygène. (7).
- Du paraquat administré à des rats provoque des altérations pulmonaires qui peuvent être légèrement diminuées grâce à la SOD (14).
- Dans des conditions d'aération constante, le paraquat provoque une augmentation de la biosynthèse de Mn-SOD chez *E. coli*, alors qu'il n'a pas

d'effet en absence d'oxygène ; il apparaît donc qu' O_2 agit directement ou indirectement sur l'augmentation du taux de synthèse de Mn-SOD chez *E. coli*. Cette augmentation du taux de SOD accroît la résistance des cellules vis-à-vis de l'effet léthal des pressions d'oxygène (9).

Ces quelques exemples montrent donc que l'importance de la SOD n'est pas à négliger dans les réactions impliquant les radicaux superoxydes, qu'ils proviennent de l'oxygène, du paraquat ou de toute autre source.

Comme nous l'avons vu dans le tableau I, le produit de la réaction catalysée par la SOD est le peroxyde d'hydrogène (1). Bien que moins toxique que le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène doit être détoxifié afin de minimiser la réaction d'Haber-Weiss produisant des radicaux hydroxyles. Cette réaction de détoxification du peroxyde d'hydrogène est prise en charge par les deux autres familles d'enzymes de défense (13):

b.2. Les catalases



Dans cette réaction, une molécule de peroxyde d'hydrogène est oxydée alors que l'autre est réduite.

b.3. Les peroxydases



Pour les peroxydases comme pour les catalases, on peut observer une réduction de la toxicité puisque le produit de ces réactions est H_2O , inoffensif pour la cellule (13).

Dans cette introduction, nous avons montré que les radicaux dérivés de l'oxygène sont produits dans la cellule et que celle-ci possède divers systèmes de défense dont les enzymes comme la superoxyde dismutase et la catalase. L'importance relative des divers systèmes de défense est actuellement l'objet de nombreuses discussions. Des questions restent encore sans réponse actuellement, comme par exemple : un seul système de défense, la SOD par exemple, peut-il suffire à protéger la cellule ?... Nous avons voulu aborder ce problème le plus directement possible en utilisant la micro-injection d'enzymes dans la cellule et en examinant un effet protecteur éventuel devant l'attaque des radicaux libres. Les sources de radicaux libres ont été obtenues d'une part en incubant les cellules en présence d'oxygène en forte concentration et à différentes pressions, et d'autre part en présence de paraquat. Après avoir soumis des fibroblastes WI-38 à des sources de radicaux libres, nous avons micro-injecté dans les cellules de la catalase et de la SOD séparément ou simultanément. De cette manière, nous avons voulu observer si ces enzymes, séparément ou conjointement, constituaient bien un système de détoxification efficace pour des fibroblastes cultivés dans ces conditions.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. CULTURE ET CLONAGE DE FIBROBLASTES WI-38.

Les micro-injections ont été réalisées sur des fibroblastes WI-38 se situant entre la 27ème et la 44ème génération. La technique de culture a été décrite par A. Houben (16).

Lors du repiquage d'une boîte de culture arrivée à confluence, on compte le nombre de fibroblastes grâce à une chambre de Neubauer ; on obtient ainsi le nombre de fibroblastes contenu par millilitre de milieu de culture. Les micro-injections s'effectuant dans les boîtes de Pétri, il est préférable de restreindre le nombre de fibroblastes afin de mieux les localiser et les identifier. Le milieu de culture contenant les fibroblastes est dilué afin d'obtenir une moyenne de 500 cellules par boîte.

Le milieu de culture dans les boîtes de Pétri contient 20 % de sérum pour favoriser le clonage. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées un jour dans une étuve à CO₂ à 37 ° C pour leur permettre de s'attacher : il est à remarquer qu'on obtient moins de 500 cellules par boîte car elles ne s'attachent pas toutes.

Avant de réaliser l'expérience, il reste à localiser les fibroblastes que nous allons observer par la suite. Au moyen d'un diamant, nous traçons des cercles sous la boîte autour d'une vingtaine de fibroblastes : dans chaque boîte, on va injecter une dizaine de fibroblastes, les autres serviront de témoin.

2.2. TECHNIQUE DE MICRO-INJECTION

Pour les micro-injections, nous avons utilisé la technique décrite dans le mémoire de V. Henin (17). Pour s'assurer de la bonne utilisation de la technique, les premières micro-injections ont été réalisées avec du tampon d'injection auquel nous avons ajouté de l'érythrosine : les fibroblastes micro-injectés avaient donc leur cytoplasme coloré en rouge.

2.3. SOLUTIONS INJECTEES

1. Catalase

L'activité de la catalase correspondant à 10^6 cellules a été estimée à 1,75 mU. Chaque cellule aurait donc $1,75 \cdot 10^{-9}$ U de catalase. Le volume de micro-injection étant au minimum de 10^{-11} ml (17), si nous voulons injecter une concentration en catalase dix fois supérieure à celle contenue dans une cellule, la solution à injecter devra donc contenir 1750 U par ml de tampon d'injection.

2. Superoxyde dismutase

Une unité de SOD est définie comme étant la quantité de SOD nécessaire pour inhiber 50 % de la production d' O_2 dans les conditions de dosage définies ci-après (12).

D'après M. Somville (12), nous aurions une activité de 0,4 U de SOD cytoplasmique pour 10^6 cellules. Chaque fibroblaste contiendrait $0,4 \cdot 10^{-6}$ U de SOD cytoplasmique. Si on veut injecter la SOD en quantité équivalente à la SOD cytoplasmique des fibroblastes, la solution injectée doit donc avoir une activité de 40000 U par ml de tampon d'injection.

3. Mélange SOD + catalase

Dans le mélange SOD + catalase, nous avons ajouté en quantité équivalente une solution contenant 3500 Unités de catalase et une solution contenant 80000 U de SOD. Après le mélange, cette solution doit donc avoir une activité de 1750 U/ml pour la catalase et de 40000 U/ml pour la SOD.

Avant la micro-injection, les différentes solutions sont centrifugées afin d'éviter que les impuretés obstruent les micropipettes lors de leur remplissage.

2.4. OBSERVATIONS DES CELLULES INJECTEES

Que les fibroblastes soient soumis à l'oxygène ou au paraquat, le résultat des micro-injections a été observé après 24 heures. En effet, des études faites sur des cellules Hela par Stacey (18), montrent que le temps nécessaire à des protéines micro-injectées pour arriver dans des vacuoles d'autophagie varie de 3 heures à 3 jours selon le cas. En ce qui concerne la catalase, son temps de passage dans les vacuoles autophagiques se situerait entre 1 et 2 jours. Si on veut estimer l'action de la catalase, il est donc nécessaire d'observer l'effet sur cellules injectées dès le premier jour et avant que la catalase ne se retrouve dans les vacuoles d'autophagie.

2.5. PRESSION EN OXYGENE

Les fibroblastes sont soumis à un mélange constitué de 95 % d'O₂ et de 5 % de CO₂, nécessaire pour éviter l'acidification du milieu. Une première série d'expériences a été réalisée à pression atmosphé-

rique, les suivantes l'ont été à une pression de deux atmosphères.

a. Pression atmosphérique :

Les boîtes de Pétri sont disposées dans un dessiccateur en verre. Après avoir effectué le vide, on introduit le mélange 95 % d'O₂ - 5 % de CO₂ et on place le dessiccateur dans une étuve à 37 ° C.

b. Pression de 2 atmosphères :

Pour des pressions supérieures à la pression atmosphérique, nous avons dû recourir à l'utilisation d'une cuve pouvant soutenir une pression élevée. Cette cuve possédait deux ouvertures au niveau du couvercle. L'oxygène est introduit par la première ouverture ; l'air s'échappe alors grâce à la seconde ouverture. Cette seconde ouverture est ensuite fermée et l'oxygène est introduit jusqu'à l'obtention de la pression désirée. La pression est contrôlée au niveau du second manomètre situé à la sortie de la bonbonne d'O₂.

c. Temps d'incubation sous oxygène :

Brosemer et Rutter (19) ont étudié l'effet de la tension en oxygène sur des cellules AH : des cellules soumises à 95 % d'O₂ peuvent reprendre une croissance normale si on les remet en atmosphère normale après 4 jours.

Cependant si ces cellules sont soumises à 95 % d'O₂ pendant 6 jours, leur croissance est inhibée même si elles sont replacées en atmosphère normale.

Pour observer un éventuel effet de la catalase et de la SOD sur des cellules, nous avons donc

attendu que ces cellules aient été incubées 4, 5 ou 6 jours sous O_2 . Après ces quelques jours sous O_2 , les cellules sont micro-injectées et l'effet des micro-injections est observé après 24 heures.

2.6. CONCENTRATIONS EN PARAQUAT

Dans les expériences concernant le paraquat, on place le milieu contenant le paraquat dans les boîtes de Pétri après avoir injecté les fibroblastes et le résultat des micro-injections est observé après 24 heures.

Plusieurs concentrations en paraquat ont été étudiées dans des boîtes de Pétri contenant un grand nombre de fibroblastes. Nous avons étudié l'effet d'une série de concentrations comprises entre $5 \cdot 10^{-6}$ M et 10^{-4} M (15) : c'est à partir de ces concentrations qu'on peut observer un certain taux de mortalité chez les fibroblastes. Pour les expériences de micro-injection, nous avons choisi des concentrations de $5 \cdot 10^{-5}$ M et 10^{-4} M. Le paraquat ne se dissolvant pas bien dans le milieu de culture, nous avons ajouté de l'éthanol pour faciliter sa dissolution. (1 ml d'éthanol pour 9 ml de milieu de culture)

2.7. DOSAGE DES PROTEINES

Le contenu d'une boîte de culture Falcon de 200 ml arrivée à confluence est réparti dans 12 petites boîtes de culture. Ces 12 boîtes contiennent donc chacune une quantité équivalente de fibroblastes. Six de ces boîtes ont été incubées en présence d'un mélange d'air et de CO_2 . Les six boîtes restantes ont reçu de l'oxygène à 95 %.

Chaque jour, le contenu en fibroblastes d'une boîte de chaque type est récupéré : après avoir enlevé le milieu de culture, la boîte est rincée deux fois avec du PBS. On ajoute ensuite 5 ml de NaOH 0,5 N pendant 15 minutes avant de détacher les cellules au moyen d'une pipette Pasteur. Les solutions contenant les cellules sont alors congelées.

Après 6 jours, les 12 tubes sont décongelés et les protéines dosées par la méthode de Folin. Nous avons ainsi comparé l'évolution de la croissance des fibroblastes soumis à une atmosphère d'oxygène par rapport à la croissance des fibroblastes soumis à l'air ambiant.

Une seconde étude a été effectuée à propos de l'évolution des fibroblastes en fonction du temps d'exposition à l'oxygène.

Pour cette expérience, nous avons tracé des cercles au moyen d'un diamant sous une boîte de Pétri contenant des fibroblastes. Cette boîte a été soumise à une pression de 1 atmosphère à une concentration de 95 % d'O₂. Chaque jour, nous avons compté le nombre de fibroblastes contenus dans les cercles afin d'observer le pouvoir de division des fibroblastes soumis à de fortes concentrations en oxygène.

2.8. COLORATIONS POUR MICROSCOPIE OPTIQUE

Les boîtes de Pétri destinées à la coloration sont lavées au PBS et ensuite fixées au Bouin pendant 45 minutes avant d'être blanchies 10 minutes à l'eau courante. La coloration donnant les meilleurs résultats est celle utilisant le bleu de Célestin, l'hémalun et l'érythrosine.

La suite des opérations est schématisée ci-dessous :

<u>Opérations :</u>	<u>Temps d'incubation :</u>
Bleu de Célestin	45 '
Eau courante	10 '
Hémalun	50 '
Eau courante	10 '
Erythrosine	45 '
Rincer	
Montage au PVPVA	

2.9. FIXATION ET ENROBAGE POUR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La méthode de fixation et d'enrobage a été décrite par M. Raes. (20)

3. RESULTATS

3.1. MICRO-INJECTION DE TAMPON

Comme nous l'avons dit, nous avons étudié le pourcentage de survie de fibroblastes cultivés pendant 24 heures dans diverses conditions de toxicité.

Cependant, parmi les cellules injectées, un certain nombre disparaît non pas suite à l'attaque par des radicaux libres mais par suite de problèmes lors de la détection des cellules ou de l'injection elle-même.

Pour évaluer le pourcentage des cellules qui meurent suite à la technique d'injection, nous avons injecté du tampon seul à des fibroblastes maintenus dans des conditions de culture normales (Tableau II).

	Cellules injectées		Cellules non injectées	
	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour
	10	7	10	9
	10	5	10	8
	10	7	10	7
	10	6	10	8
	—	—	—	—
Total	40	25	40	32
Moyenne		6,25		8,00
Variance		0,68		0,50

Tableau II : Taux de survie de fibroblastes injectés avec du tampon dans des conditions normales de culture.

D'après le tableau II, nous pouvons donc constater que la technique de micro-injection est responsable de $\pm 17,5 \%$ de la mortalité des cellules injectées. Le taux de mortalité des cellules non injectées peut sembler élevé ($\pm 20 \%$) mais est probablement dû aux déplacements des fibroblastes : nous ne pouvons donc plus tous les détecter après 24 heures.

3.2. EFFETS DU PARAQUAT

3.2.1. _

Les cellules ont été cultivées pendant 24 heures dans un milieu de culture contenant du paraquat à une concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Avant d'être soumise au paraquat, les cellules ont été injectées soit avec de la catalase (voir Tableau III) soit avec de la catalase et de la SOD (voir Tableau IV).

	Cellules injectées		Cellules non injectées	
	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour
	10	4	10	6
	10	8	10	4
	10	5	10	5
	10	5	10	8
	10	3	10	6
	10	5	10	7
	10	3	10	7
	10	2	10	6
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
Total	80	35	80	49
Moyenne		4,78		6,13
Variance		2,98		1,36

Tableau III : Injection de catalase dans des fibroblastes soumis au paraquat $5 \cdot 10^{-5}$ M.

	Cellules injectées		Cellules non injectées	
	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour
	10	4	10	4
	10	2	10	4
	10	4	10	5
	10	5	10	10
	10	3	10	8
	10	4	10	9
	10	2	10	7
	10	6	10	9
	10	5	10	6
	10	7	10	7
	10	7	10	3
	10	6	10	4
	10	4	10	9
	10	4	10	8
	10	5	10	9
	10	5	10	3
	10	6	10	10
	10	7	10	6
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
Total	180	86	180	121
Moyenne		4,78		6,72
Variance		2,28		5,53

Tableau IV : Injection de catalase + SOD dans les fibroblastes soumis au paraquat 5.10^{-5} M.

En ce qui concerne les cellules non injectées (voir Tableaux III et IV), nous pouvons observer que leur taux de survie ne semble pas différer qu'elles aient été injectées avec de la catalase (43,7 %) ou avec de la catalase et de la SOD (47,8 %).

3.2.2. _

Après avoir étudié l'effet du paraquat 5.10^{-5} M, nous avons voulu augmenter les taux de mortalité des fibroblastes pour comparer les effets éventuels des enzymes de défense. Pour cela nous avons porté la concentration du paraquat à 10^{-4} M.

Dans le tableau V, nous pouvons observer les résultats obtenus suite à l'injection de catalase + SOD.

	Cellules injectées		Cellules non injectées	
	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour
	10	4	10	5
	10	6	10	6
	10	3	10	6
	10	5	10	5
Total	<u>40</u>	<u>18</u>	<u>40</u>	<u>22</u>
Moyenne		4,50		5,50
Variance		1,25		0,25

Tableau V : Injection de catalase + SOD dans des fibroblastes soumis au paraquat 10^{-4} M.

Comparés aux résultats observés pour le paraquat $5 \cdot 10^{-5}$ M, nous pouvons observer une augmentation des taux de mortalité pour les fibroblastes soumis au paraquat 10^{-4} M sans pour autant constater une amélioration pour les fibroblastes injectés avec la catalase et la SOD.

Après avoir été colorés (voir matériel et méthodes), ces fibroblastes ont été observés à plus fort grossissement (voir fig 1) et en microscopie électronique (voir fig 2 et 2 bis).

3.2.3. Analyse de la variance

En considérant les différentes données obtenues, nous avons établi des comparaisons de moyennes grâce à un test d'Anova I pour une concentration en paraquat de $5 \cdot 10^{-5}$ M (voir Tableau VI) et pour une concentration

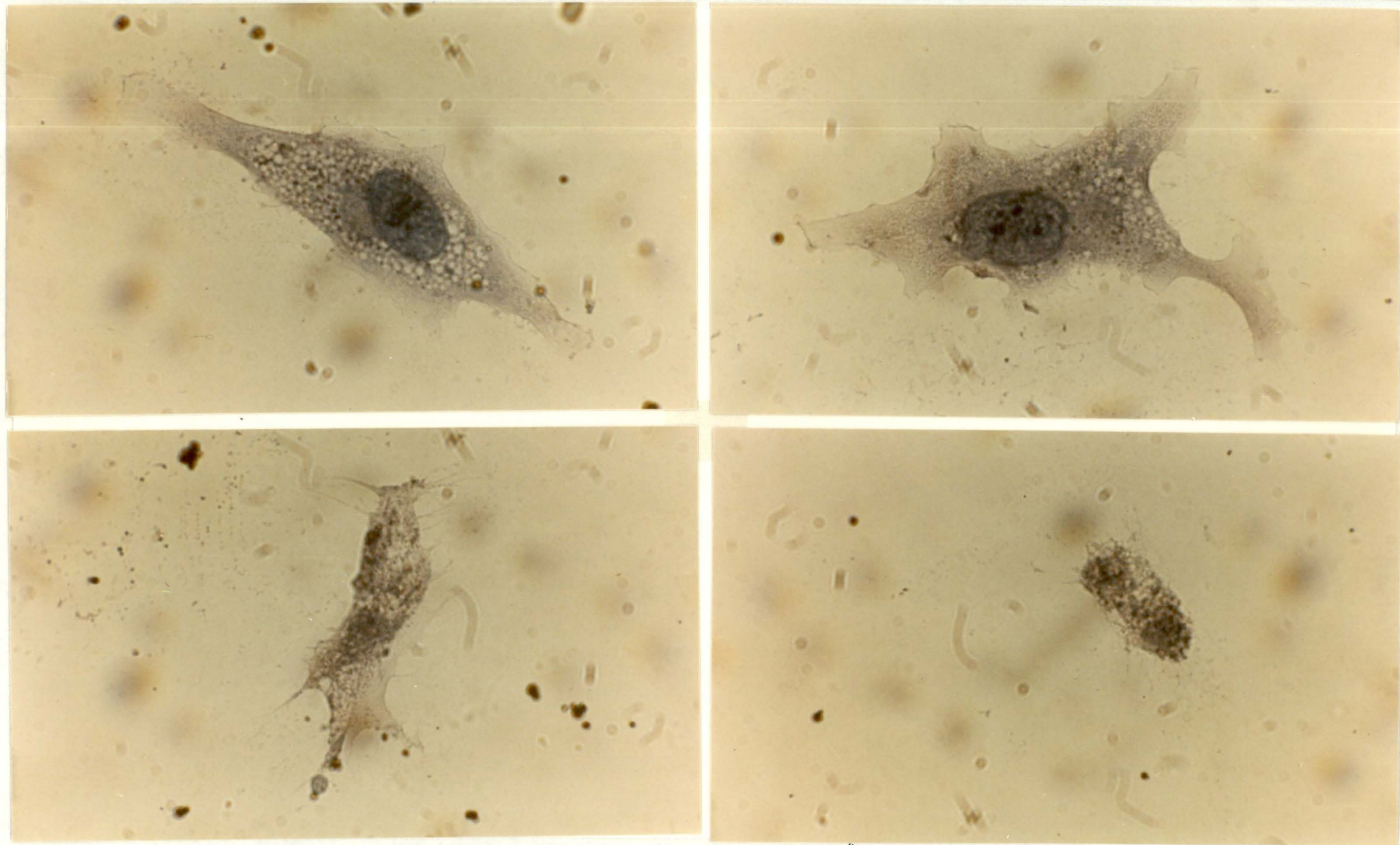


Fig 1 : Cellules incubées en présence de paraquat 10^{-4} N. Dans la première colonne, nous pouvons observer deux cellules injectées avec catalase + 500. dans la seconde colonne, nous voyons deux cellules non injectées. Dans les deux cas, nous pouvons remarquer une variation de comportement des cellules par rapport au paraquat. Certaines dégèrent plus vite que d'autres. Le début de la dégénérescence se marque par une vacuolisation croissante du cytoplasme (gross. : x 3200).

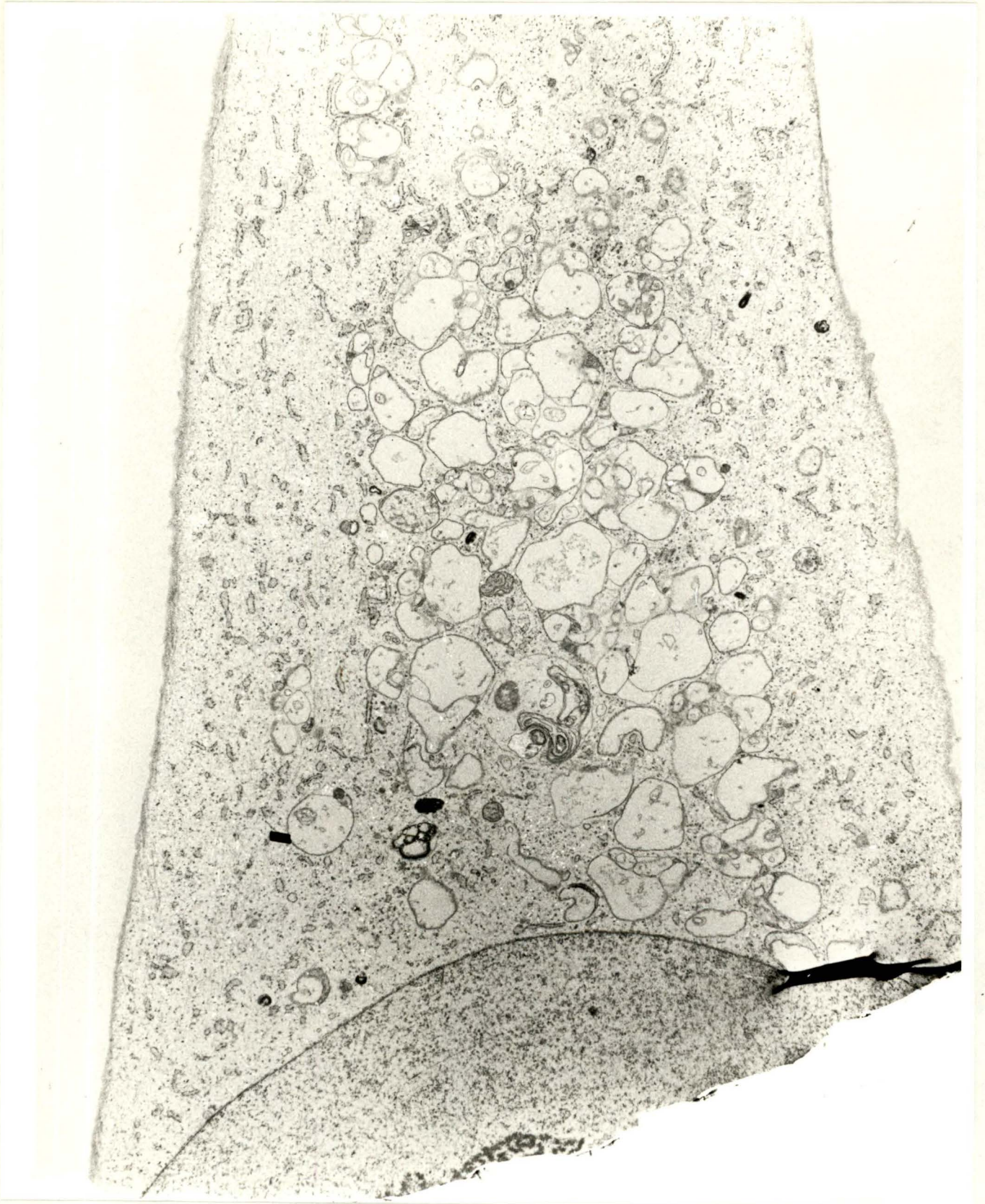


Fig 2 : Fibroblaste incubé dans du paraquat 10^{-4} M (gross. : x 6250). Cette cellule est en voie de dégénérescence, ce qui se traduit par une forte vacuolisation du cytoplasme. Les vacuoles autophagiques sont essentiellement présentes au centre du cytoplasme et il ne semble pas que le noyau soit déjà altéré. Les seuls organites cellulaires encore visibles sont le RER en périphérie de la cellule et quelques mitochondries en dégénérescence.

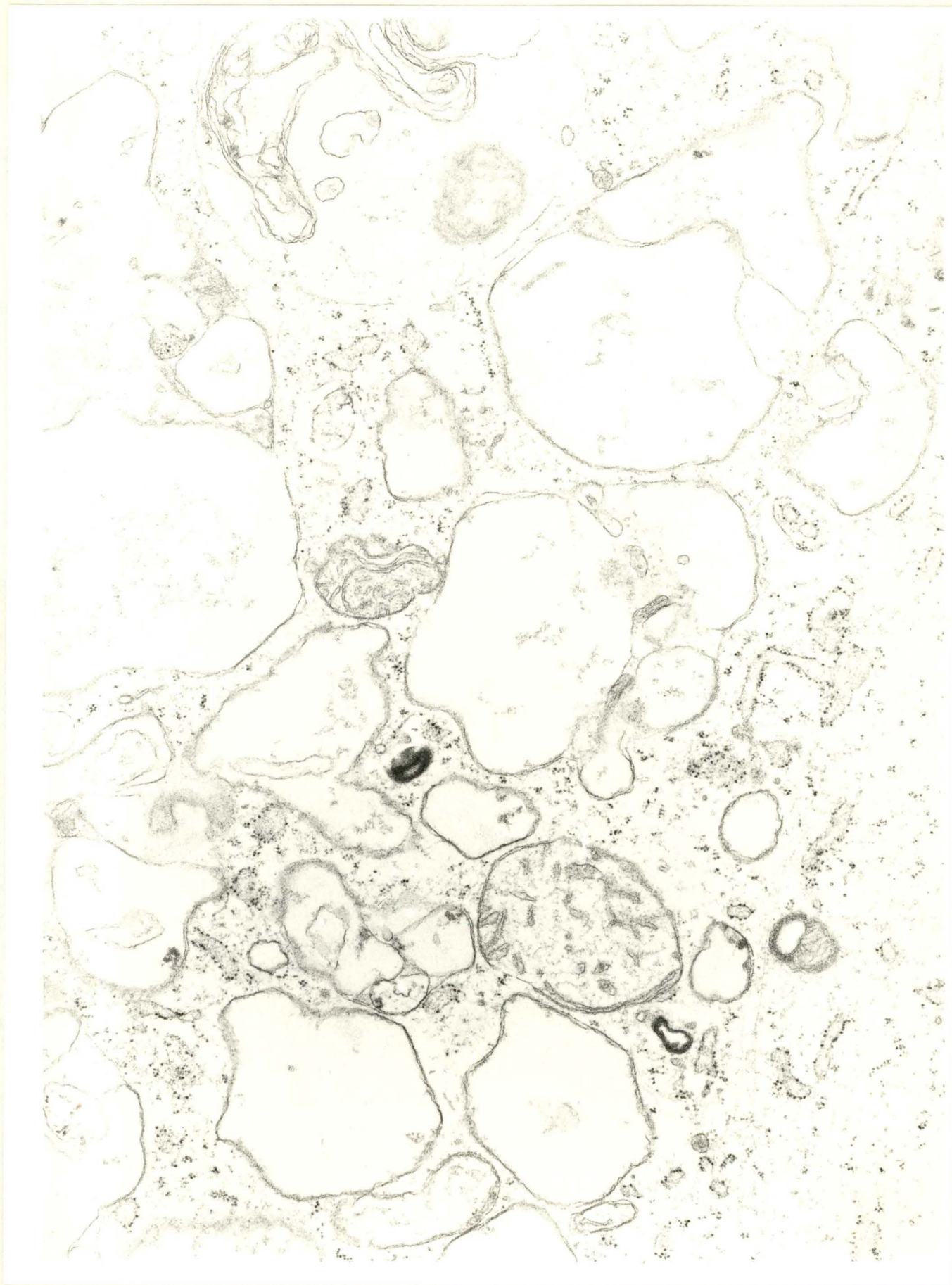


Fig 2 bis : Détail de la figure 2 représentant les vacuoles autophagiques contenues dans le cytoplasme (gross. : x 22750).

en paraquat de 10^{-4} M (voir tableau VII).

Source de variations	SCE	dl	CM	F _{obs}
Totale	155,88	37		
Factorielle	30,78	3	10,26	2,79 (NS)
Résiduelle	125,10	34	3,68	

Tableau VI : Analyse de la variance à un critère de classification fixe pour des populations soumises au paraquat $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Dans le tableau VI, nous avons établi le test pour les différents groupes de cellules ayant été soumis au paraquat $5 \cdot 10^{-5}$ M, c'est-à-dire une série de cellules non injectées, une série de cellules injectées avec de la catalase et une série de cellules injectées avec catalase et SOD ; ces différents groupes ont également été comparés avec un groupe de cellules ayant été injectées à blanc c'est-à-dire avec du tampon. De cette manière, nous avons voulu comparer les moyennes de ces différents groupes. Ce test nous amène à un non-rejet de l'hypothèse nulle c'est-à-dire que les moyennes des différentes populations considérées ne sont pas significativement différentes.

Source de variations	SCE	dl	CM	F _{obs}
Totale	13,07	11		
Factorielle	6,17	2	3,08	4,00 (NS)
Résiduelle	6,90	9	0,77	

Tableau VII : Analyse de la variance à un critère de classification fixe pour des populations soumises au paraquat 10^{-4} M.

Le tableau VII représente le test ANOVA pour le paraquat 10^{-4} M : trois populations ont été considérées :

les cellules non injectées, les cellules injectées avec de la catalase et de la SOD et les cellules injectées avec du tampon. Ici aussi, nous arrivons à un non rejet de l'hypothèse nulle.

3.3. EFFETS DE L'OXYGENE

3.3.1. Etude de la pression en oxygène

- Etude sur boîte de culture

Dans cette expérience, nous avons suivi l'évolution des cellules en dosant la quantité de protéines dans des boîtes Falcon incubées en présence d'une atmosphère contenant 95 % d'oxygène et dans des boîtes contenant de l'air. (Voir matériel et méthodes) (Fig.3).

Comme nous pouvons le voir dans la figure 3, la quantité de protéines augmente de façon croissante pour les cellules incubées à l'air. Par contre, pour les cellules incubées en présence d'oxygène, on observe une légère diminution de la quantité de protéines en fonction du temps d'incubation.

- Etude sur boîte de Pétri

Dans cette expérience, nous avons suivi l'évolution de 70 cellules répertoriées dans les boîtes de Pétri et maintenues sous atmosphère à 95 % en oxygène pendant 7 jours. (Fig.4) Nous pouvons constater une augmentation du nombre de cellules après un jour d'exposition à l'O₂. Ensuite, le nombre de cellules diminue régulièrement en fonction du temps d'exposition à l'O₂.

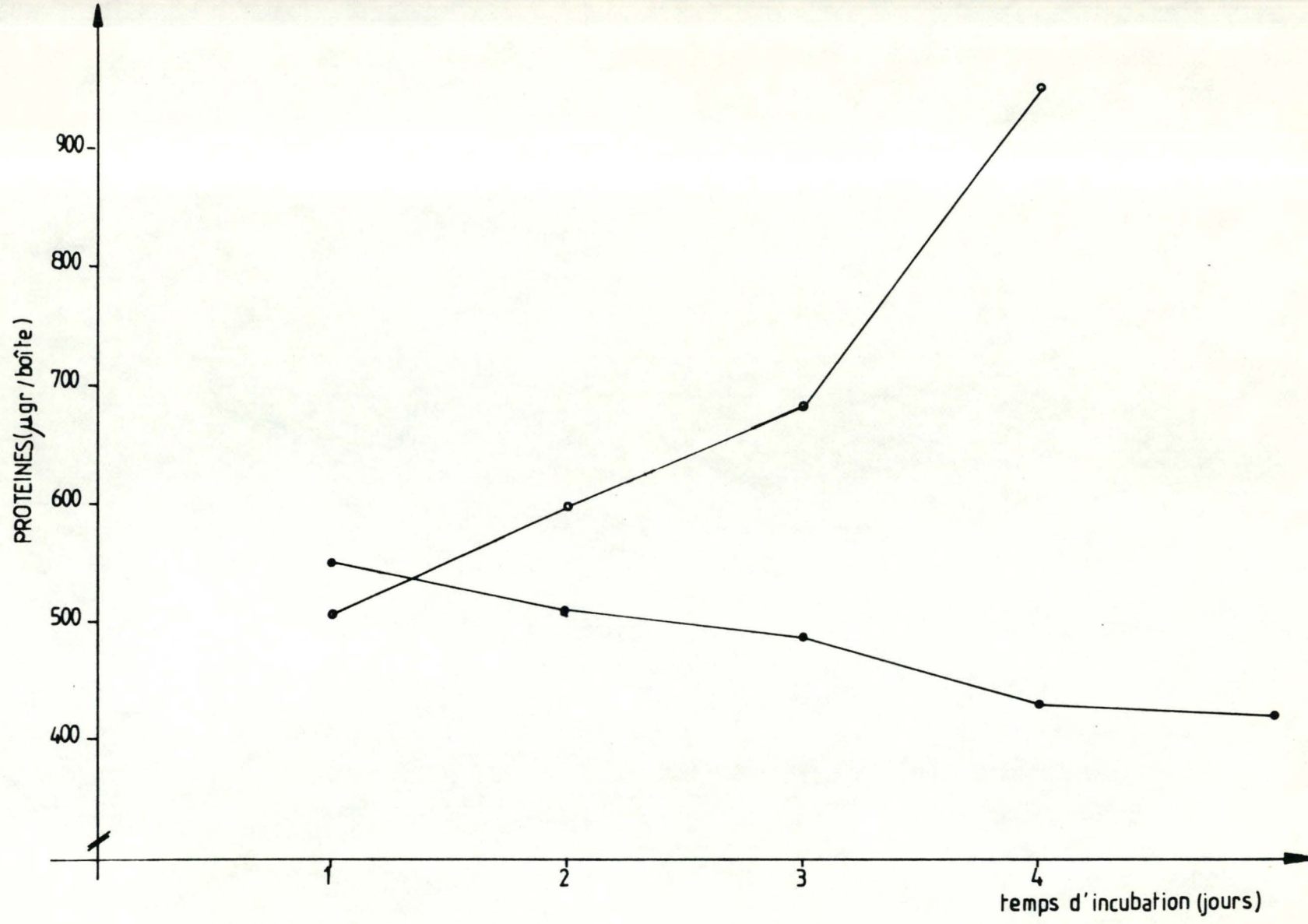


Fig 3 : Evolution de la quantité de protéines dans les boîtes de culture en fonction du temps d'incubation : ● Cellules incubées sous oxygène à pression atmosphérique
○ Cellules incubées à l'air à pression atmosphérique.

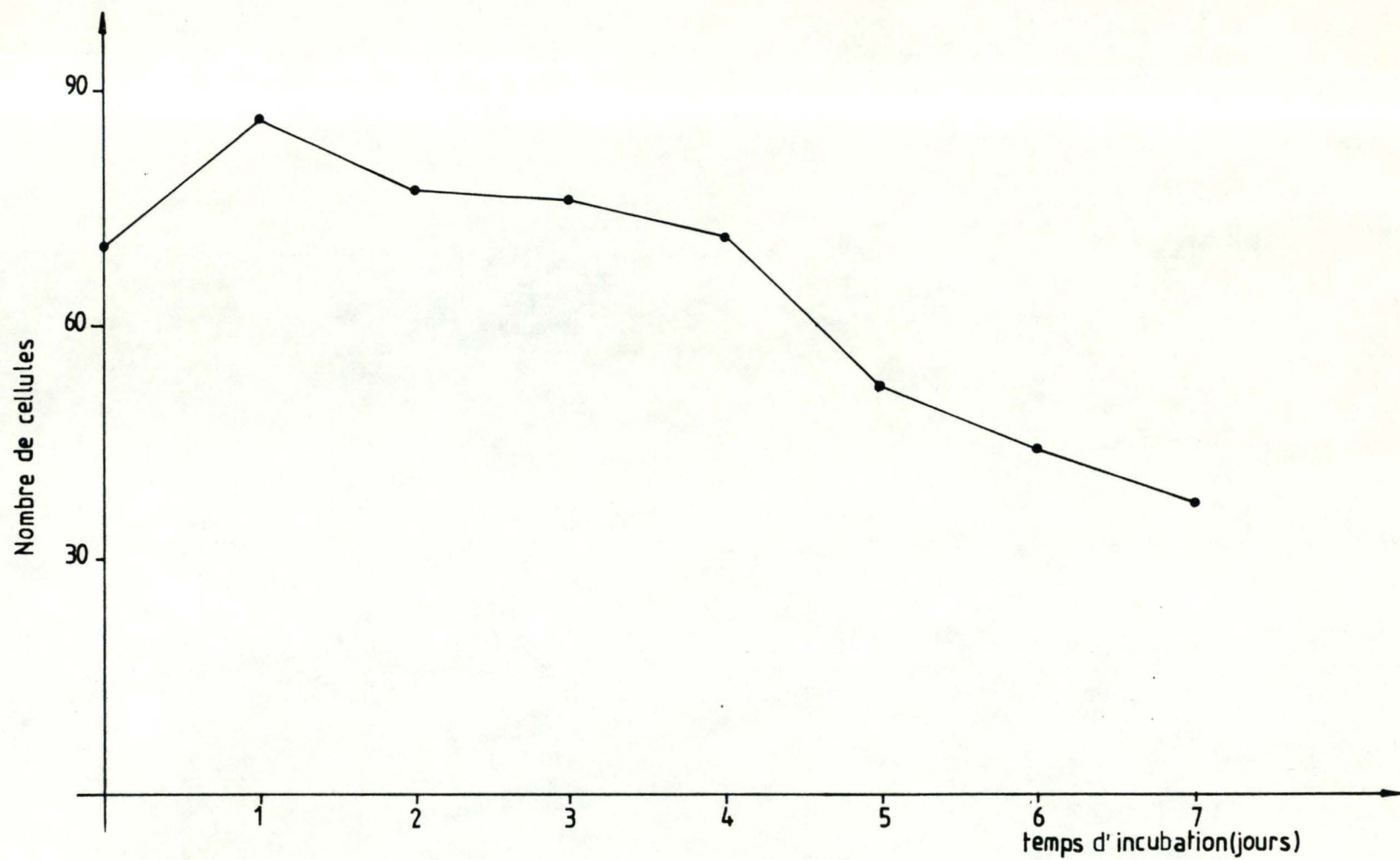


Fig 4 : Evolution du nombre de fibroblastes dans une boîte de Pétri en fonction du temps d'incubation à l'oxygène à pression atmosphérique.

3.3.2. Etude de la toxicité de l'O₂ à pression atmosphérique

- Evolution morphologique des fibroblastes

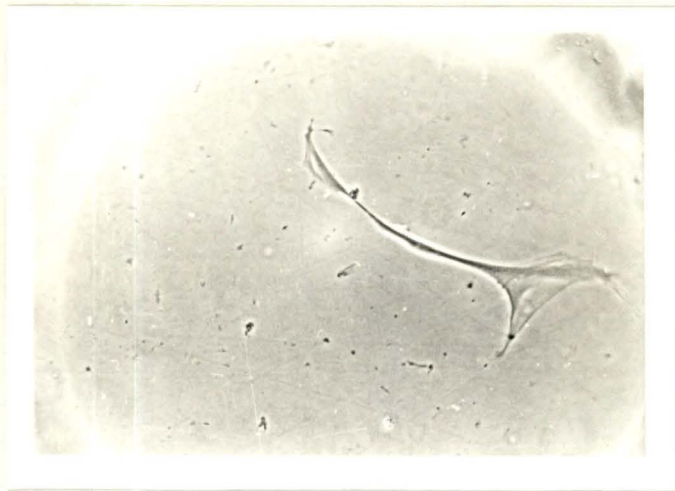
Des fibroblastes cultivés dans une atmosphère contenant 95 % d'oxygène ont été observés pendant plusieurs jours de manière à déterminer l'effet de l'oxygène sur leur évolution morphologique. (Voir figures 5,6)

La figure 5 représente l'évolution d'un fibroblaste soumis à l'oxygène à pression atmosphérique du 4ème jour au 9ème jour d'incubation. Du 4ème au 8ème jour, cette cellule montre des caractères fibroblastiques habituels, avec un étalement important du cytoplasme. A partir du 9ème jour, nous pouvons constater la disparition de l'étalement du cytoplasme avec une évolution probable vers la dégénérescence.

La cellule représentée à la figure 6 a été observée du 4ème au 9ème jour d'incubation. Nous pouvons également constater un étalement de la cellule au départ. L'évolution vers la dégénérescence est beaucoup moins apparente : après 9 jours sous O₂, rien ne permet d'affirmer une dégénérescence. Nous pouvons constater que l'évolution des fibroblastes est très variable et très lente.

- Résultats quantitatifs sur les micro-injections de cellules maintenues en présence d'1 atm. d'O₂ (95 %)

Comme nous l'avons signalé précédemment, les micro-injections ont été réalisées après 4,5,6 ou 7 jours d'incubation sous oxygène, étant donné que l'effet de l'O₂ ne s'exprime qu'après un certain temps. Nous avons donc injecté de la catalase et de la SOD après différents temps d'incubation. Les résultats quantitatifs sont repris dans le tableau VIII.



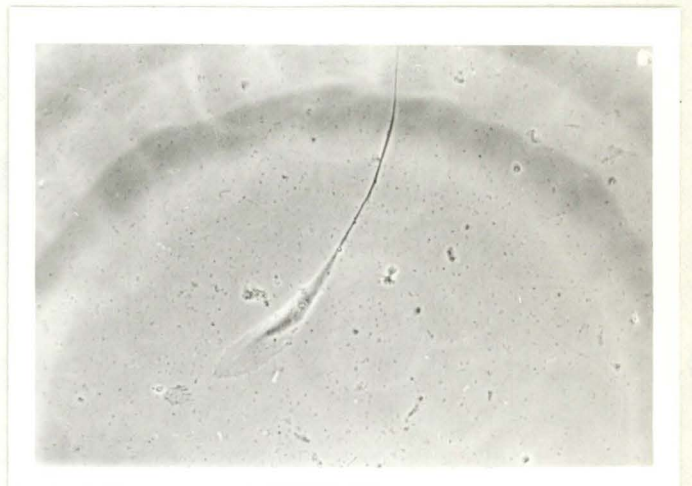
4^e jour



7^e jour



5^e jour



8^e jour

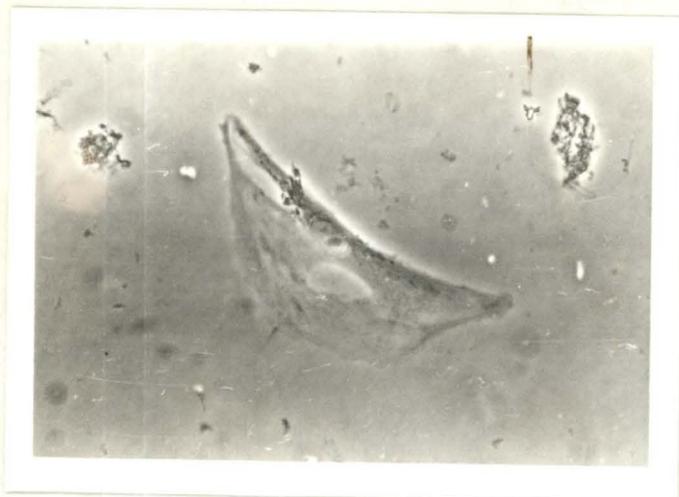


6^e jour

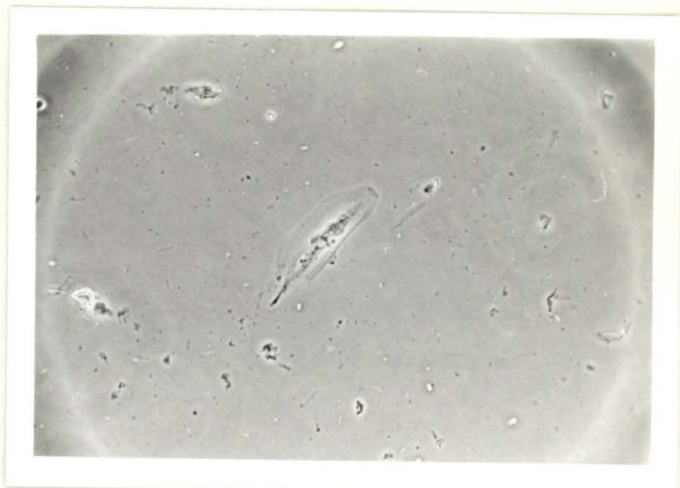


9^e jour

Fig 5 : Evolution d'un fibroblaste soumis à une atmosphère d'oxygène entre le 4^e et le 9^e jour d'incubation (gross. : x200).



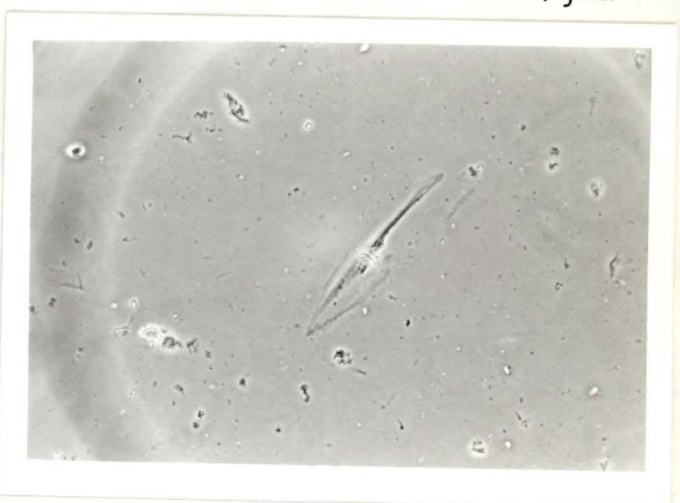
4^e jour



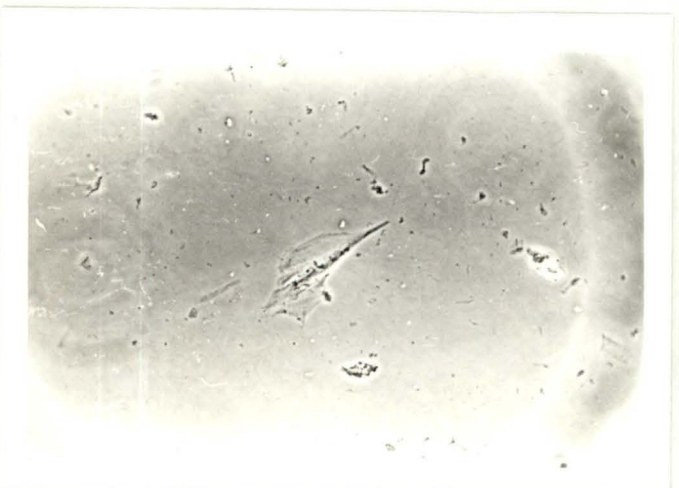
7^e jour



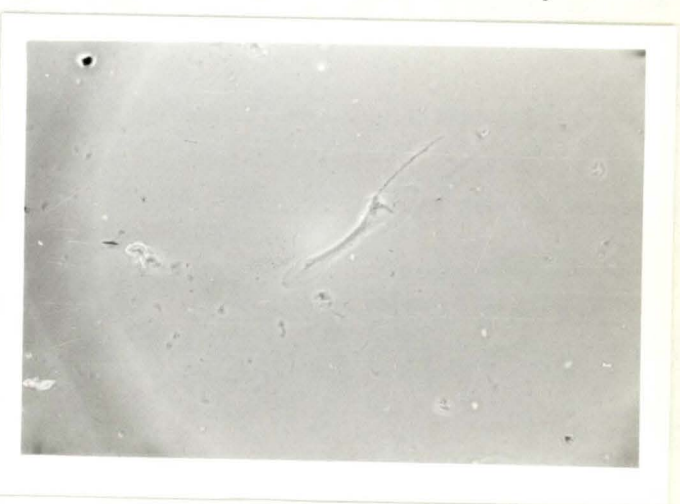
5^e jour



8^e jour



6^e jour



9^e jour

Fig 6 : Evolution d'un fibroblaste soumis à une atmosphère d'oxygène entre le 4^eme jour et le 9^eme jour (gross. : x200, sauf les deux premières photos : x640).

	Cellules injectées		Cellules non injectées	
	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour
Injection le 4ème jour sous oxygène	10	7	10	8

Injection le 5ème jour sous oxygène	10	5	10	8
	10	8	10	7
	10	9	10	8
	10	5	10	7
	<u>10</u>	<u>5</u>	<u>10</u>	<u>9</u>
Total	50	32	50	39
Moyenne		6,40		7,80
Variance		3,04		0,56

Injection le 6ème jour sous oxygène	10	8	10	9
	10	9	10	6
	10	4	10	9
	10	3	10	5
	10	3	10	4
	10	8	10	6
	10	9	10	8
	10	5	10	10
	10	7	10	8
	10	9	10	9
	10	8	10	9
	<u>10</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>10</u>
Total	120	82	120	93
Moyenne		6,83		7,75
Variance		5,31		3,69

Injection le 7ème jour sous oxygène	10	4	10	6
	10	5	10	6
	10	8	10	7
	<u>10</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	<u>9</u>
Total	40	25	40	28
Moyenne		6,25		7,00
Variance		3,19		1,50

Tableau VIII : Injection de catalase et SOD après 4,5,6 ou 7 jours d'incubation sous une atmosphère d'O₂ à 95 %.

Ces résultats montrent une augmentation de la toxicité de l' O_2 en fonction du temps d'incubation puisqu'on passe d'un taux de survie de 80 % après 4 jours d'incubation à un taux de 70 % après 7 jours pour les cellules non injectées. Pour les cellules injectées avec la catalase et la SOD, on remarque également une augmentation de la toxicité de l' O_2 en fonction du temps d'incubation. Cependant, les taux de survie des cellules injectées restent toujours légèrement inférieurs à ceux des cellules non injectées. Et de manière générale, nous pouvons constater que les taux de survie des fibroblastes sont relativement élevés même après 7 jours d'incubation sous O_2 .

3.3.3. Etude de la toxicité de l'oxygène à une pression de deux atmosphères

Etant donné l'évolution lente de la dégénérescence cellulaire en présence d'une atmosphère (95 %) en O_2 , nous avons décidé d'augmenter la pression en oxygène à deux atmosphères.

- Evolution morphologique des fibroblastes

La figure 7 représente deux cellules soumises à une pression de 2 atmosphères d' O_2 ; leur évolution est observée entre le 5ème et le 7ème jour d'incubation. Nous pouvons voir qu'après le 7ème jour, une des deux cellules est complètement dégénérée.

La figure 8 représente cinq cellules après cinq jours d'incubation sous O_2 . Nous constatons que sur les 5 cellules, une seule a survécu.

De manière générale, nous pouvons constater

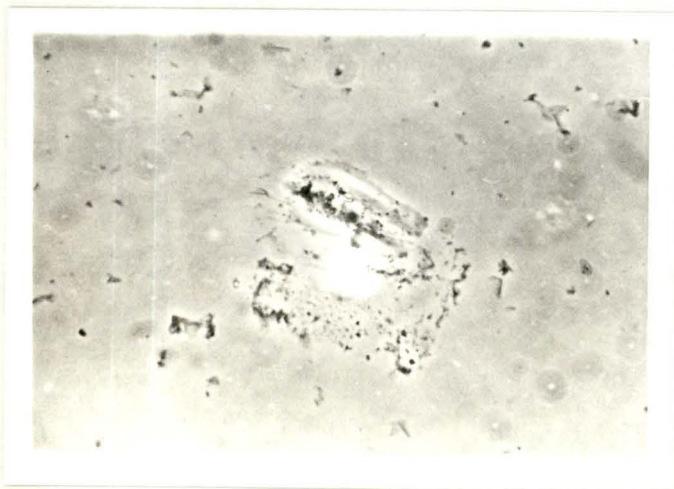
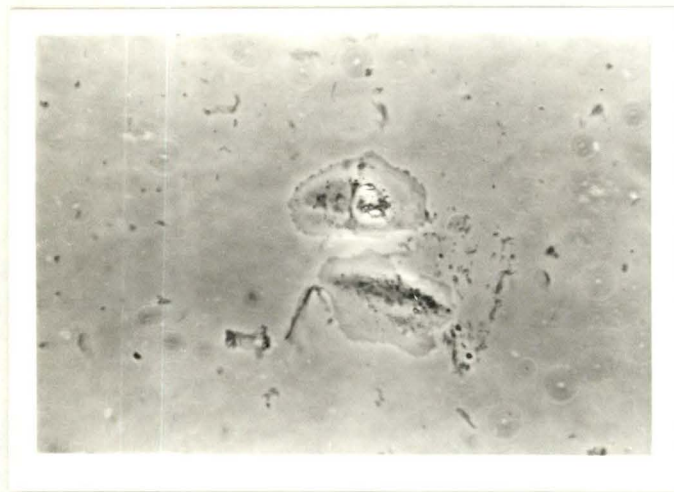
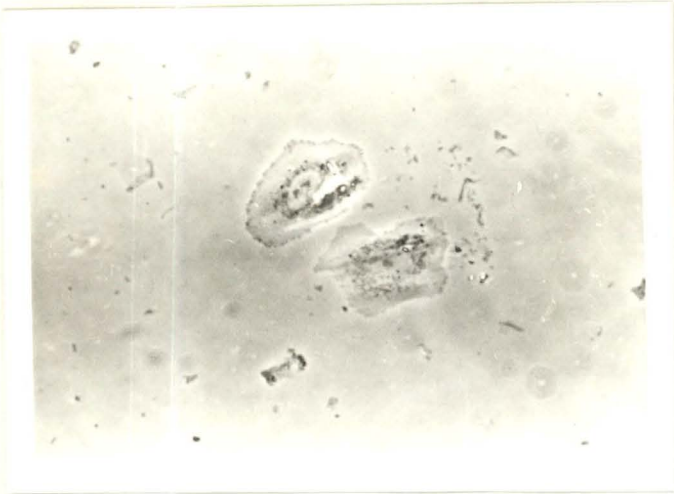


Fig 7 : Evolution de deux cellules soumises à une pression de deux atmosphères (95 %) d' O_2 entre le 5ème et le 7ème jour d'incubation. (gross : x500)

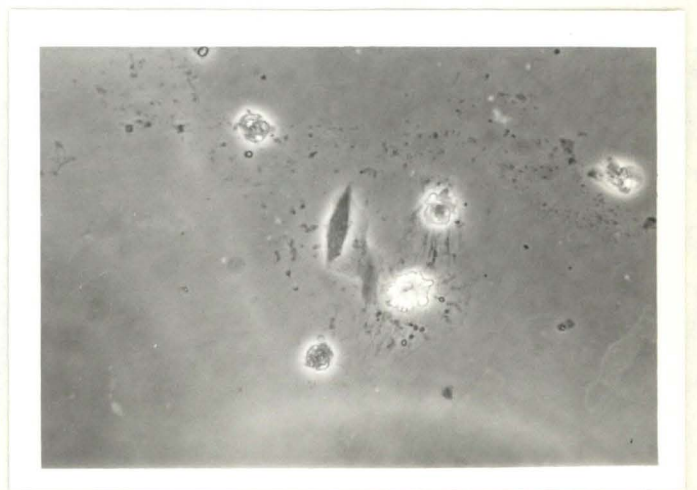


Fig 8 : Cinq fibroblastes après cinq jours d'incubation sous deux atmosphères (95 %) d'oxygène (gross : x500).

une dégénérescence plus rapide des cellules lors d'une exposition à une pression de 2 atmosphères par rapport à la pression atmosphérique. Cependant, ici aussi, nous remarquons une hétérogénéité dans les temps de dégénérescence face à l'oxygène.

- Résultats quantitatifs sur les micro-injections de cellules maintenues en présence de 2 atmosphères en oxygène.

a. Dans un premier temps, nous avons injecté de la catalase seule dans des fibroblastes soumis à une pression de deux atmosphères (95 %) en O₂ depuis 4 et 5 jours (voir Tableau IX).

	Cellules injectées		Cellules non injectées	
	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour
Injection le 4ème jour	10 10	6 8	10 10	8 7
Total	20	14	20	15
Moyenne		7,00		7,50
Variance		1,00		0,25

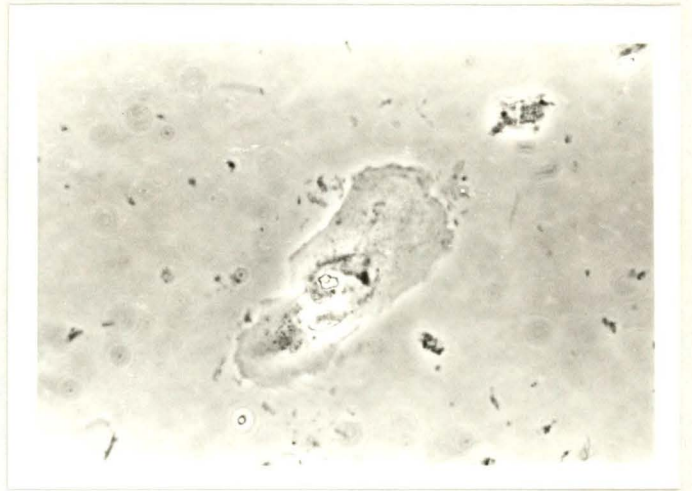
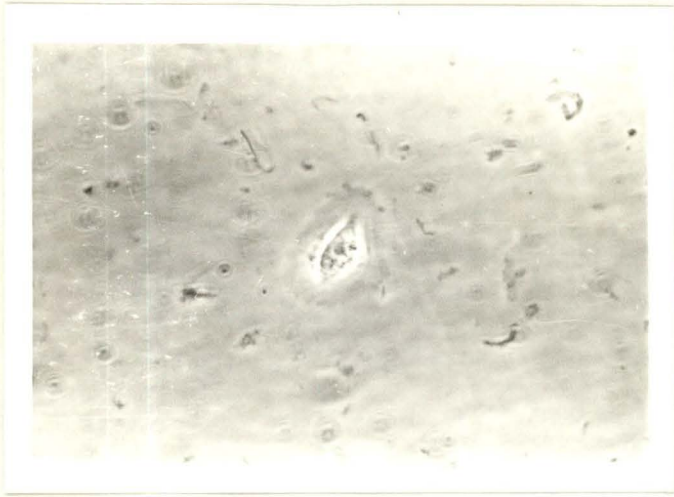
Injection le 5ème jour	10 10	6 4	10 10	5 5
Total	20	10	20	10
Moyenne		5,00		5,00
Variance		1,00		1,00

Tableau IX : Injection de catalase après 4 et 5 jours d'incubation sous une pression de 2 atmosphères en O₂.

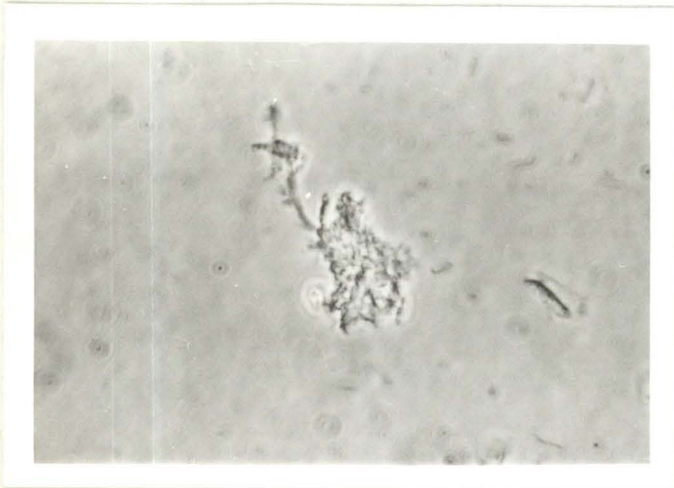
Le tableau IX nous montre une augmentation de

la toxicité de l'oxygène avec le temps d'incubation. L'injection de catalase ne semble pas avoir un effet protecteur sur les cellules.

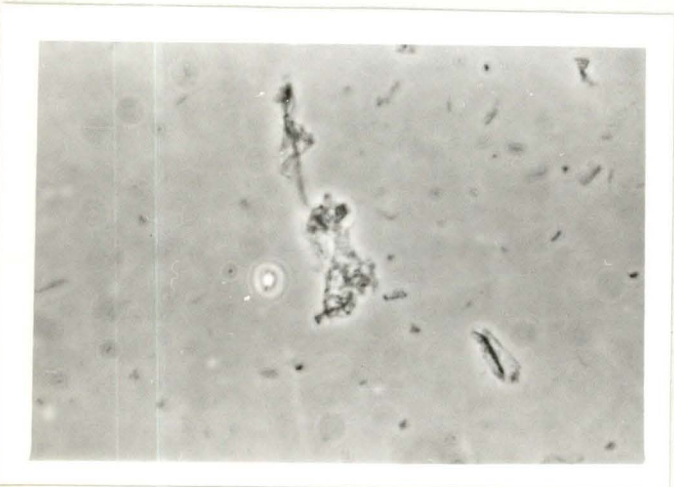
Dans les cellules injectées avec la catalase, nous pouvons observer des cellules qui dégénèrent alors que d'autres cellules ne semblent affectées ni par l'injection, ni par l'oxygène. (fig 9) Ce comportement ne diffère pas de celui des cellules non injectées.



5^e jour



6^e jour



7^e jour

Fig 9 : Cellules injectées avec de la catalase après 4 jours d'incubation à l'oxygène à deux atmosphères. A gauche, le fibroblaste injecté dégénère. A droite, le fibroblaste injecté ne montre pas de dégénérescence apparente. (gross. x 500)

b. Après les injections de catalase, nous avons réalisé des expériences en injectant catalase et SOD toujours après 4,5,6 et 7 jours d'incubation sous 2 atmosphères (95 %) en O_2 . (voir Tableaux X et XI).

Nous pouvons constater ici aussi l'augmentation de la toxicité de l'oxygène en fonction du temps d'incubation, que ce soit pour les cellules injectées comme pour les cellules non injectées. Nous avons également une mortalité légèrement supérieure pour les cellules injectées : cette différence ne semble pas dépasser les valeurs de mortalité dûes à la technique d'injection.

Bien que l'effet toxique de l'oxygène semble évident, nous pouvons nous étonner de la variabilité de comportement des fibroblastes face à un même temps d'incubation. En effet, si on considère les taux de survie des fibroblastes après 6 jours d'incubation à l' O_2 (voir Tableau XI), nous pouvons remarquer que dans certaines boîtes, les 10 cellules observées sont encore vivantes alors que dans d'autres boîtes, toutes les cellules ont disparu.

Nous avons ensuite suivi l'évolution de fibroblastes injectés avec de la catalase + SOD après une exposition prolongée à une pression de deux atmosphères 95 % en O_2 .

Dans la figure 10, nous pouvons voir l'évolution de cellules injectées dont certaines montrent une dégénérescence évidente alors que d'autres ne montrent pas de changements importants. Les figures 11(a) et 11(b) montrent à plus fort grossissement ces variations de comportement tant pour les cellules injectées que pour les non injectées. Les figures 12 et 12 bis montrent en microscopie électronique les différentes modifications apparaissant après incubation sous 2 atmosphères (95 %) d' O_2 .

	Cellules injectées		Cellules non injectées	
	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour
Injection le 4ème jour	10	9	10	9
	10	7	10	8
	10	5	10	8
	10	5	10	7
	10	6	10	5
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
Total	50	32	50	37
Moyenne		6,40		7,40
Variance		2,24		1,84

Injection le 5ème jour	10	7	10	9
	10	8	10	2
	10	8	10	9
	10	5	10	8
	10	7	10	8
	10	6	10	9
	10	6	10	7
	10	7	10	8
	10	6	10	6
	10	9	10	8
	10	5	10	9
	10	4	10	7
	10	6	10	8
10	5	10	0	
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
Total	140	89	140	98
Moyenne		6,36		7,00
Variance		1,80		6,85

Tableau X : Injection de catalase et SOD dans des cellules soumises à une pression de deux atmosphères en O₂ depuis 4 et 5 jours.

	Cellules injectées		Cellules non injectées	
	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour	Total	Nombre de cellules vivantes après un jour
Injection le 6ème jour	10	9	10	7
	10	9	10	7
	10	7	10	6
	10	6	10	9
	10	8	10	8
	10	7	10	7
	10	6	10	7
	10	5	10	7
	10	4	10	7
	10	6	10	8
	10	7	10	10
	10	5	10	8
	10	8	10	9
	10	7	10	8
	10	6	10	0
	10	6	10	6
	10	5	10	8
	10	6	10	7
	10	3	10	7
	10	7	10	7
10	6	10	8	
Total	210	133	210	151
Moyenne		6,33		7,19
Variance		2,13		3,49

Injection le 7ème jour	10	7	10	7
	10	5	10	5
	10	4	10	8
	10	6	10	5
	10	6	10	3
	10	5	10	8
Total	60	33	60	36
Moyenne		5,50		6,00
Variance		0,92		3,33

Tableau XI : Injection de catalase et SOD dans des cellules soumises à une pression de deux atmosphères en O₂ depuis 6 et 7 jours.

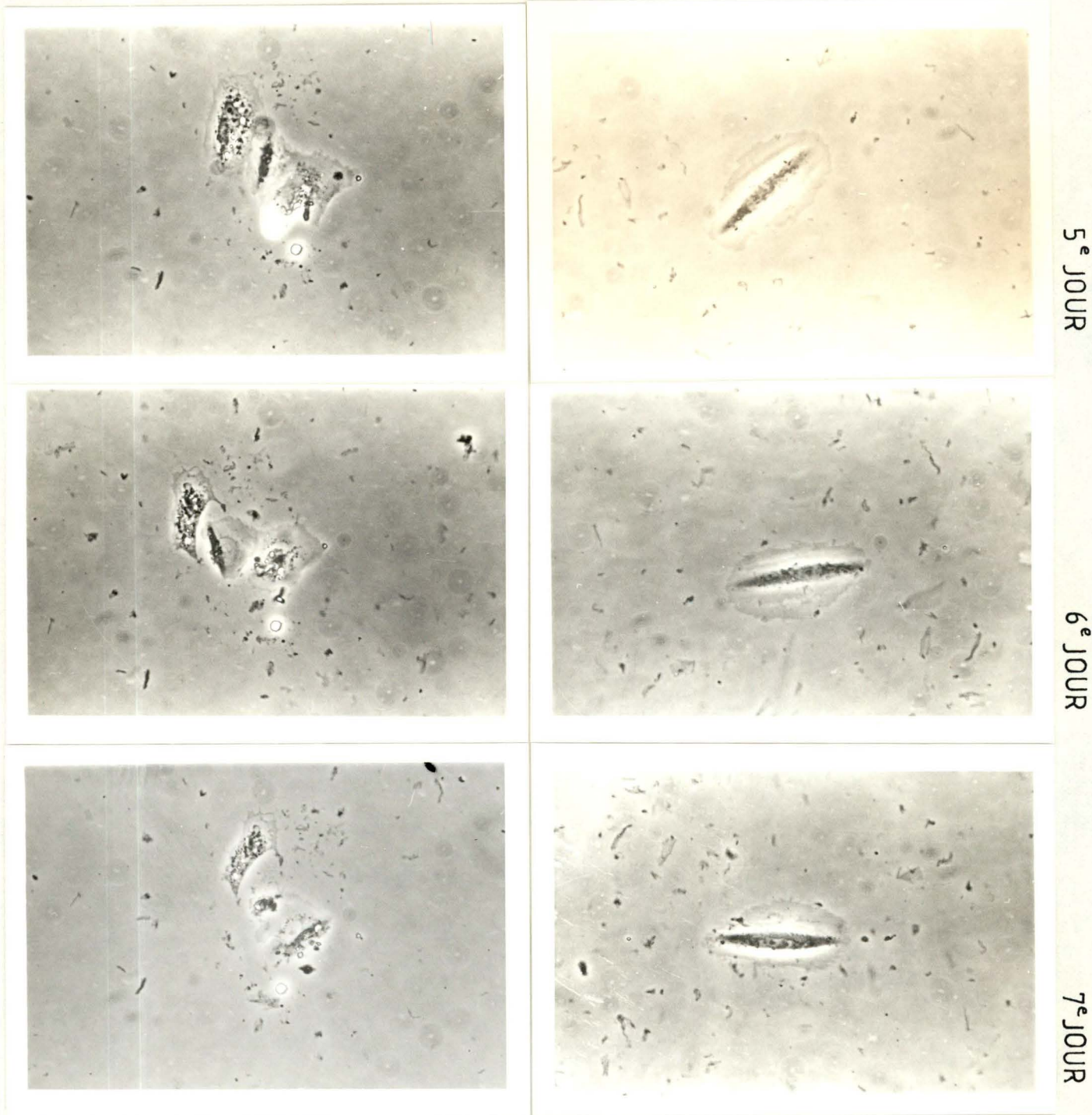


Fig 10 : Evolution de cellules injectées avec catalase + SOD après 5 jours d'incubation sous O_2 à 2 atmosphères.
(gross. : $\times 500$)

3.3.4. Analyse de la variance

En ce qui concerne la toxicité de l'oxygène, nous avons également repris les différentes données pour établir un test d'analyse de la variance à un

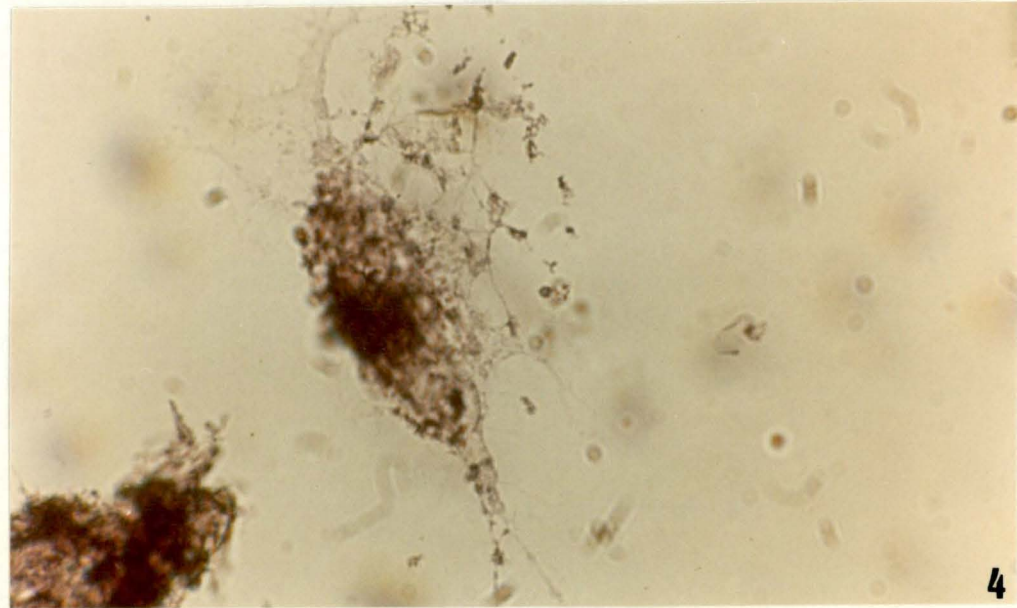
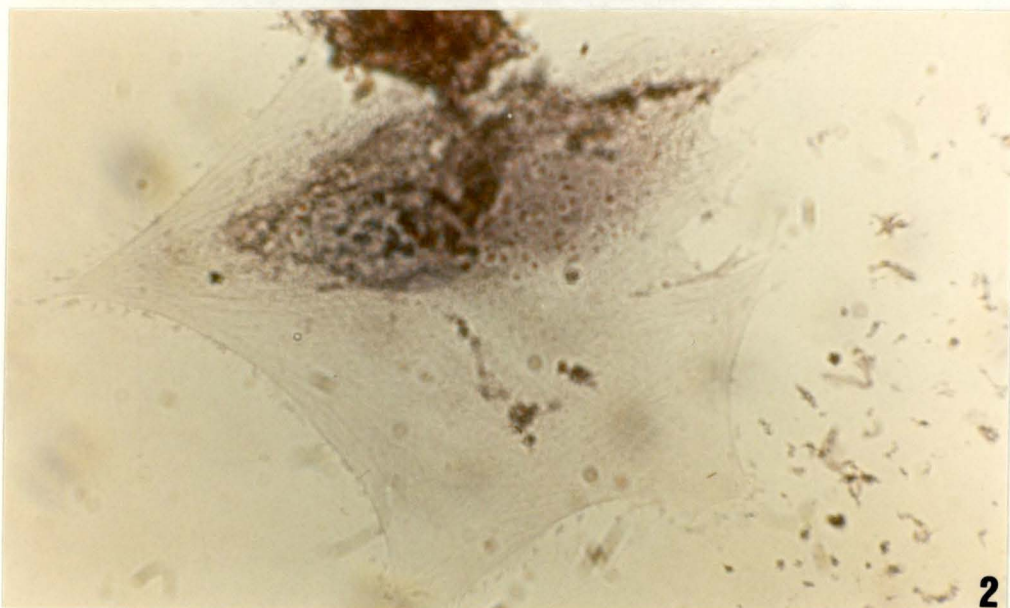
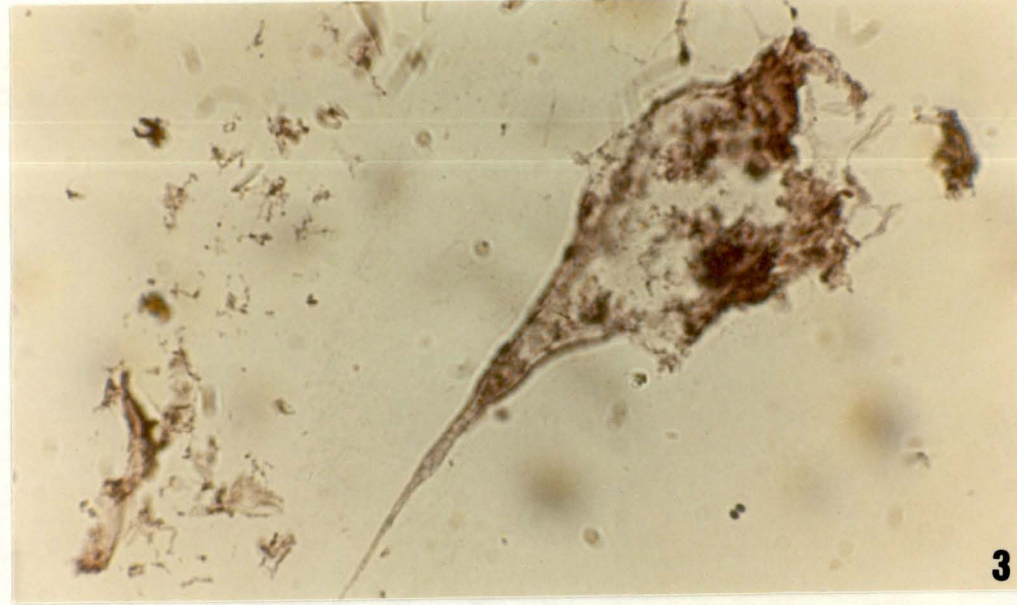
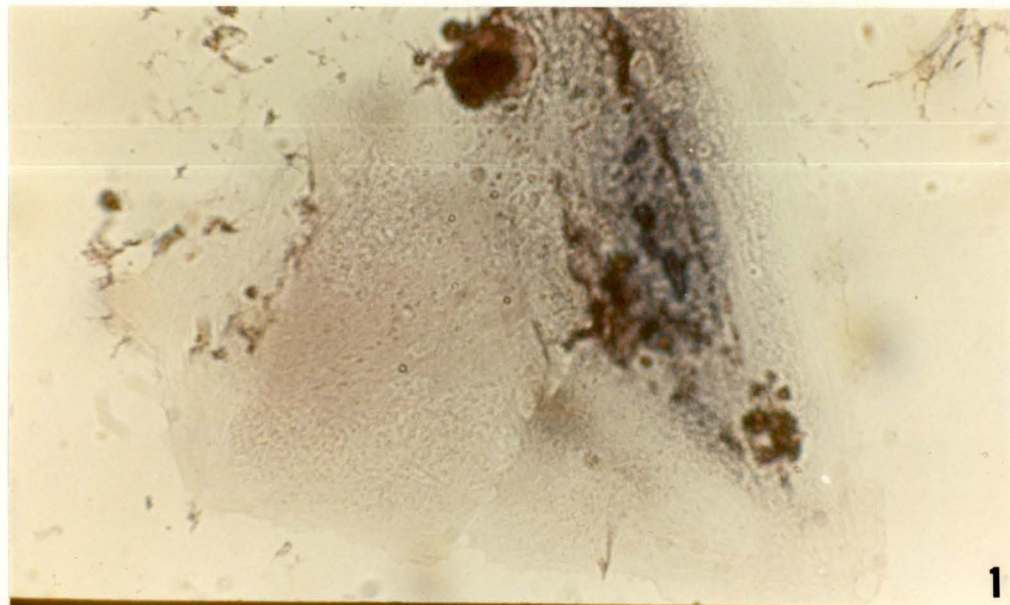


Fig 11 (a) : Cellules injectées avec catalase + SOD après incubation sous deux atmosphères d' O_2 : les deux premières semblent normales, les deux suivantes sont dégénérées (gross. : x3200).

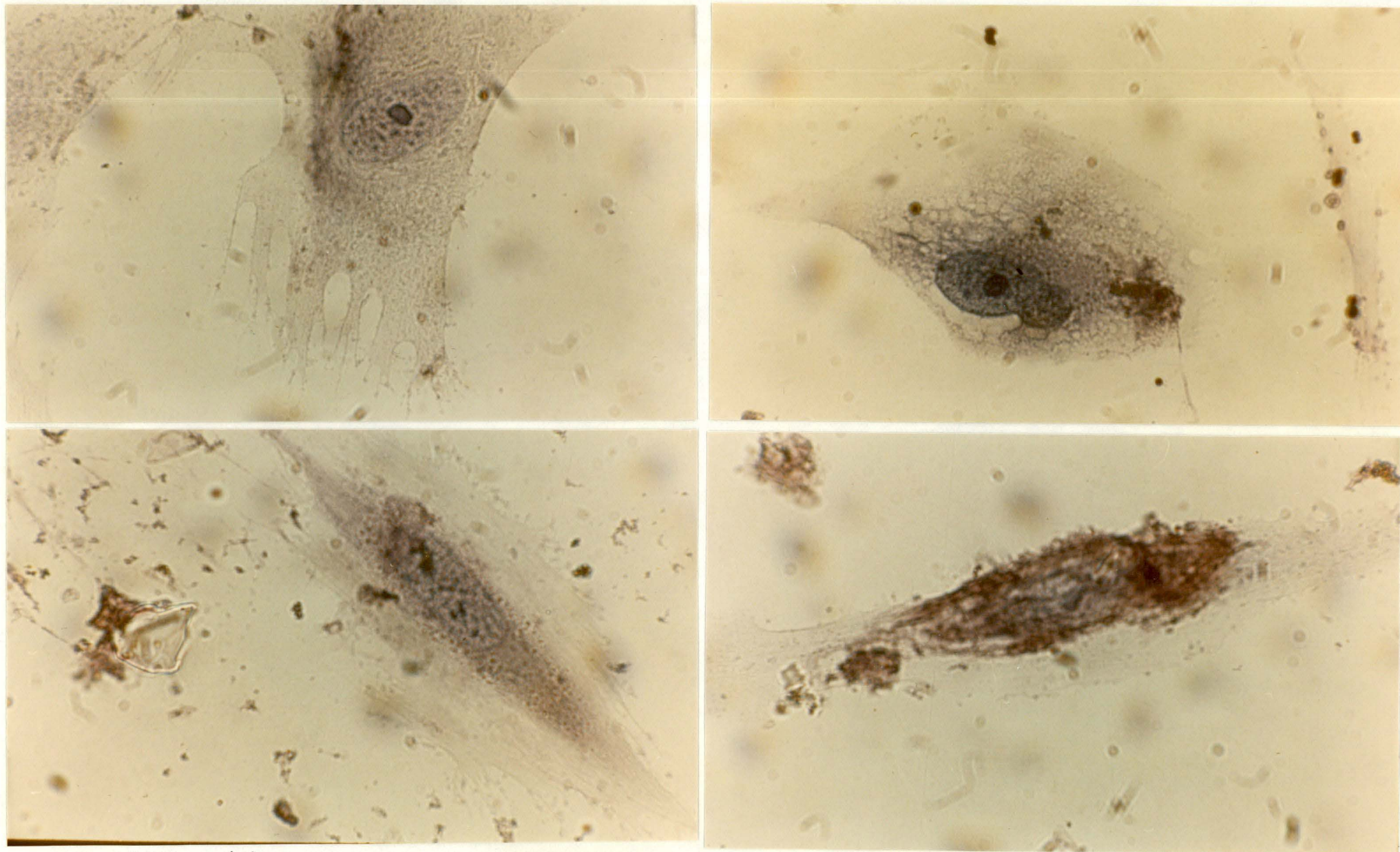


Fig 11 (b) : Cellules non injectées incubées sous deux atmosphères d'oxygène : comme pour les cellules injectées, certains fibroblastes dégénèrent alors que d'autres ne semblent pas montrer de changements (gross. : x3200).

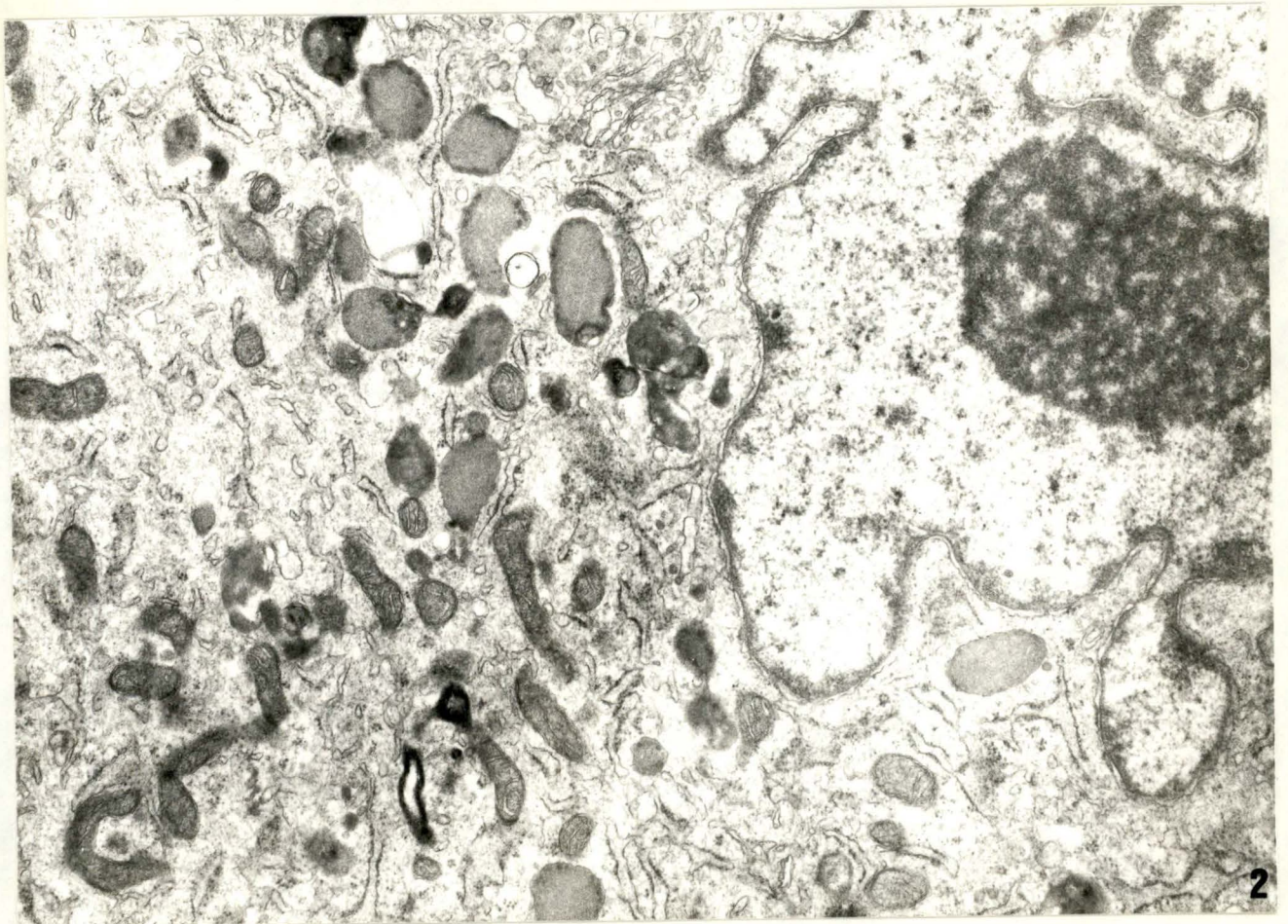
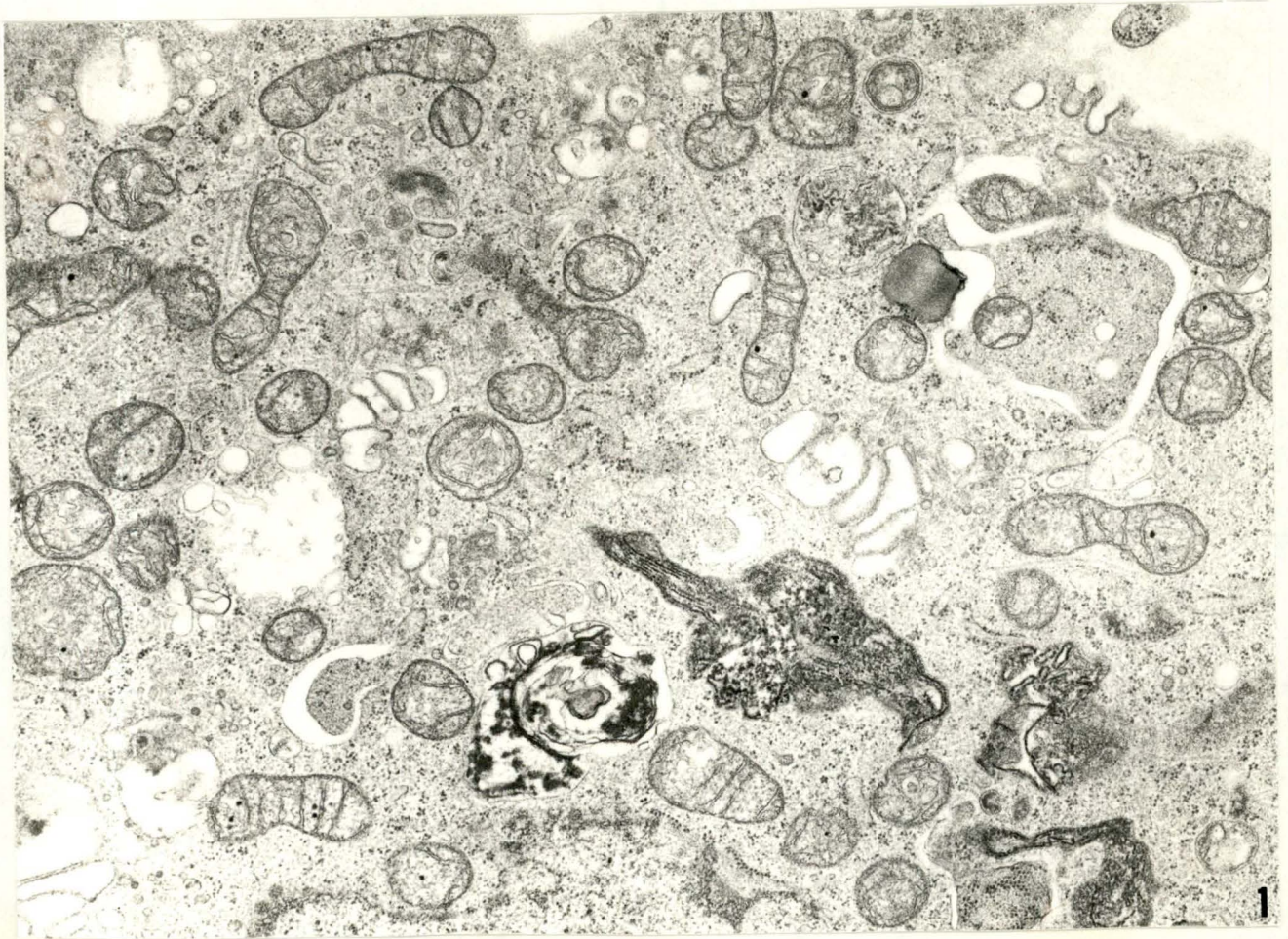
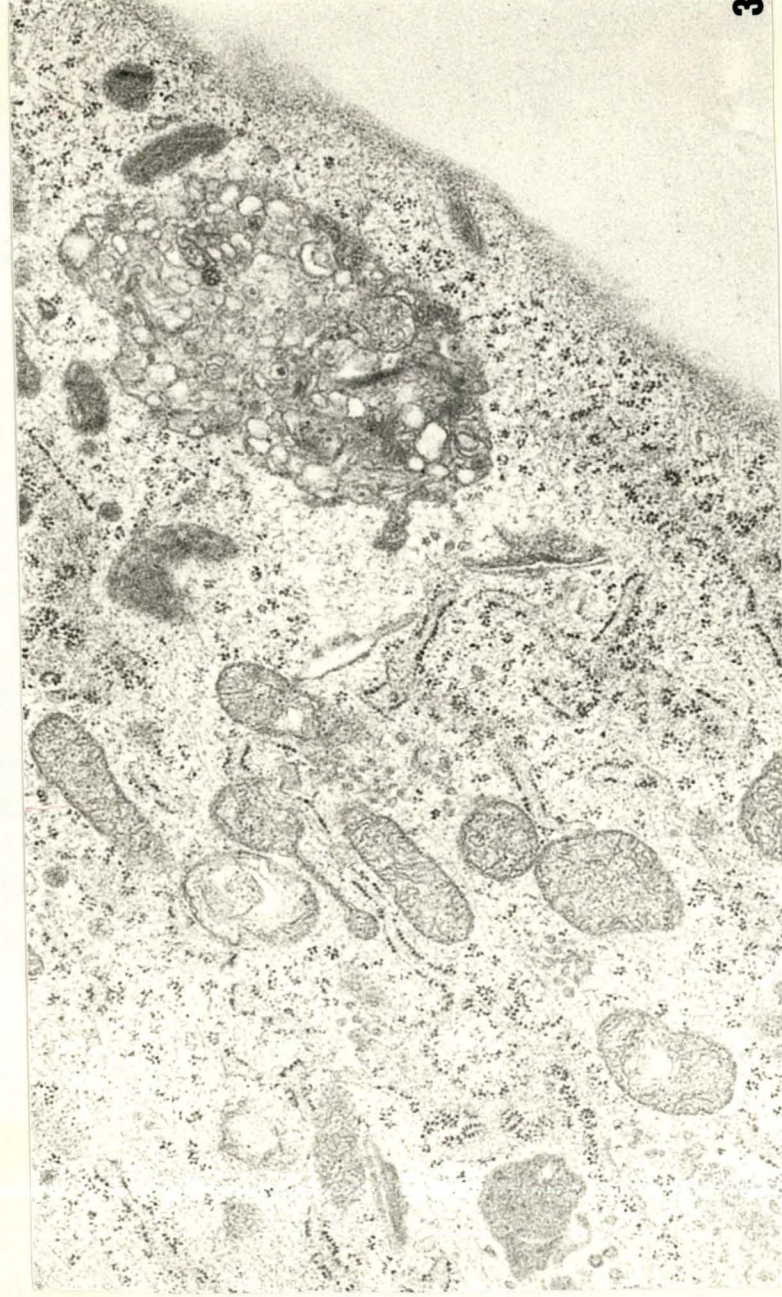
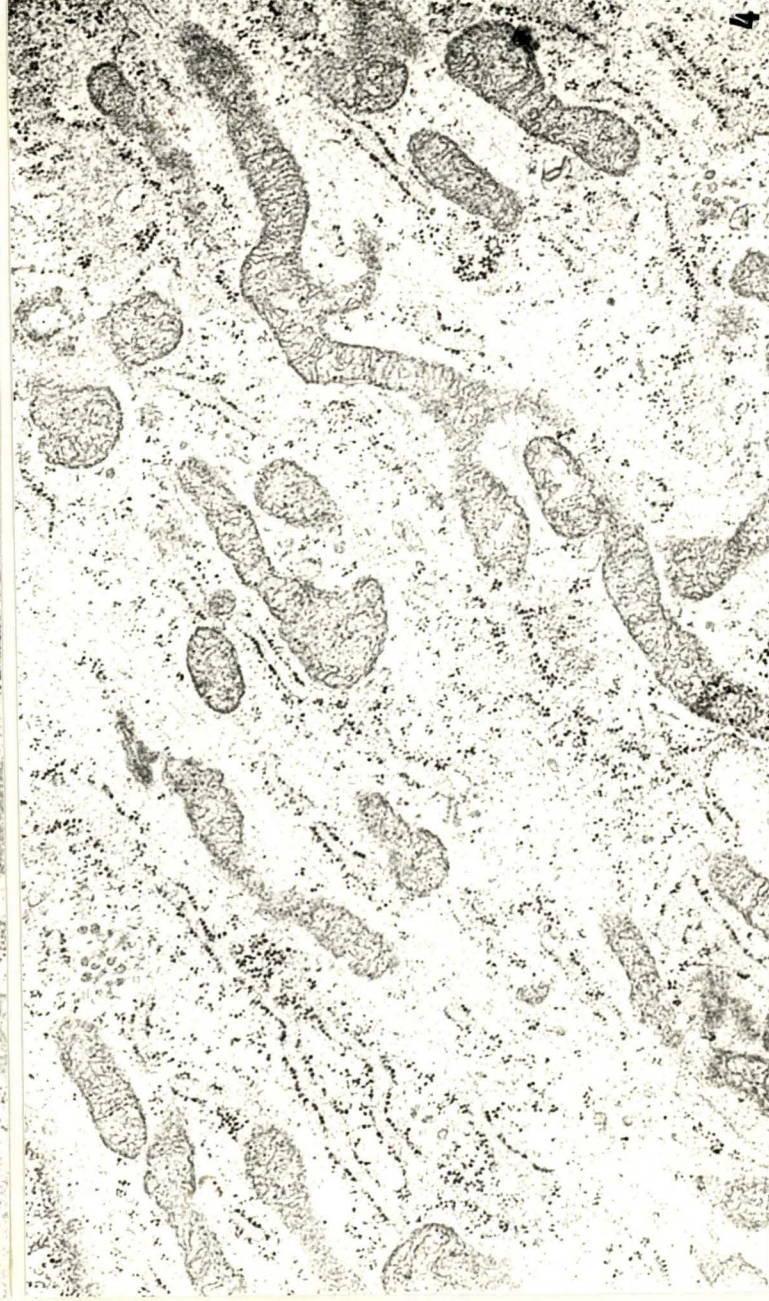


Fig 12 : 1. Fibroblaste WI-38 vieux (gross. : x 22800) ;
2. Fibroblaste WI-38 jeune (gross. : x 22200).
Ces deux cellules servent de témoins.



3



4

Fig 12 bis : 3-4 : fibroblaste WI-38 incubé en présence d' O_2

à 2 atmosphères.

Les caractères de dégénérescence ne sont pas encore apparents. Nous pouvons cependant remarquer quelques vacuoles autophagiques (cfr photo 3). Les mitochondries semblent également présenter un aspect particulier : comparées aux cellules témoins (fig 12 : photos 1 et 2), leur taille semble plus allongée et les crêtes semblent plus nombreuses : elles sont organisées parallèlement sur toute la largeur de la mitochondrie (photo 4). (gross. : x 22750)

critère de classification fixe, d'une part pour l'oxygène à pression atmosphérique (voir Tableau XII), et d'autre part pour l'oxygène à une pression de deux atmosphères (voir Tableau XIII).

Dans le tableau XII, 5 populations ont été considérées : les cellules non injectées, les cellules injectées avec du tampon, les cellules injectées le 5ème jour, le 6ème jour et le 7ème jour avec de la catalase et de la SOD.

Source de variation	SCE	dl	CM	F
Totale	89,14	28		
Factorielle	2,46	4	0,61	0,17 (NS)
Résiduelle	86,68	24	3,61	

Tableau XII : Analyse de la variance à un critère de classification fixe pour les populations soumises à l'O₂ à pression atmosphérique.

Dans le tableau XIII, nous avons comparé les moyennes de 8 populations : les cellules injectées avec du tampon, les cellules non injectées, les cellules injectées avec de la catalase le 4ème jour et le 5ème jour, les cellules injectées avec la catalase et la SOD le 4ème, le 5ème, le 6ème et le 7ème jour.

Source de variation	SCE	dl	CM	F
Totale	187,37	67		
Factorielle	14,72	7	2,10	0,73 (NS)
Résiduelle	172,65	60	2,88	

Tableau XIII : Analyse de la variance à un critère de classification fixe pour les populations soumises à l'O₂ à une pression de 2 atmosphères.

Dans ces deux tests d'analyse de la variance à un critère de classification fixe, nous avons un non rejet de l'hypothèse nulle, c'est-à-dire que les moyennes des différentes populations considérées ne sont pas significativement différentes.

Nous avons ensuite établi un test d'analyse de la variance à 2 critères de classification fixes croisés en considérant les résultats obtenus pour le paraquat et pour l'oxygène (Tableau XIV). Douze populations ont été considérées : 4 milieux d'incubation ont été considérés (paraquat 10^{-4} M, $5 \cdot 10^{-5}$ M, oxygène 1 atmosphère, 2 atmosphères) et pour chaque milieu, nous avons considéré trois types d'injections (cellules non injectées, cellules injectées avec du tampon, cellules injectées avec catalase + SOD).

	SCE	dl	CM	F	
Incubation	27,73	3	9,24	3,43	S
Injection	7,87	2	3,93	1,46	NS
Interaction	20,46	6	3,41	1,27	NS
Résiduelle	96,75	36	2,69		
Totale	152,81				

Tableau XIV : Analyse de la variance à deux critères de classification fixes croisés.

D'après le tableau XIV, nous constatons que seul le milieu d'incubation a une influence significative sur les taux de survie des cellules. Le fait que les cellules aient été ou non injectées n'influence pas significativement leur taux de survie et ceci, quel que soit le milieu d'incubation (interaction non significative).

4.1. TABLEAU RÉCAPITULATIF

Milieu d'incubation	Solution micro-injectée	Jour de la micro-injection	Taux de survie des cellules injectées	Taux de survie des cellules non injectées
PARAQUAT $5 \cdot 10^{-5}$ M	CATALASE	1	43,7 %	61,2 %
	CAT. + SOD	1	47,8 %	67,2 %
PARAQUAT 10^{-4} M	CAT. + SOD	1	45,0 %	55,0 %
OXYGENE 1 ATM.	CAT. + SOD	4	70,0 %	80,0 %
		5	64,0 %	78,0 %
		6	68,3 %	77,5 %
		7	62,5 %	70,0 %
OXYGENE 2 ATM.	CATALASE	4	70,0 %	75,0 %
		5	50,0 %	50,0 %
	CAT. + SOD	4	64,0 %	74,0 %
		5	63,6 %	70,0 %
		6	63,3 %	71,9 %
		7	55,0 %	60,0 %

Tableau XV : Tableau récapitulatif reprenant les résultats obtenus pour les différents types de solutions injectées et pour les différents milieux d'incubation.

4.2. EFFET DU PARAQUAT

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction, le rôle de la superoxyde dismutase est de protéger la cellule contre la toxicité des radicaux superoxydes. Si la toxicité du paraquat est liée à la formation des $O_2^{\cdot(-)}$, l'injection de SOD devrait donc minimiser la toxicité du paraquat.

D'après les expériences que nous avons réalisées, et comme on peut le voir dans le tableau récapitulatif (Tableau XV), l'effet toxique du paraquat est évident : 65 % de survie après un jour d'exposition au paraquat $5 \cdot 10^{-5}$ M, et 55 % pour une concentration de 10^{-4} M. Cependant, nous n'avons pas observé de différence significative dans les taux de survie des cellules injectées et des cellules non injectées, comme le montrent les tableaux Anova (Tableaux VI, VII). Cette observation est aussi bien valable pour les injections de catalase seule que pour l'injection combinée de catalase et de SOD.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Shri N. Giri (21) dans des expériences sur souris : des injections de SOD étaient réalisées sur des souris intoxiquées au paraquat. Les résultats de ces expériences montrent également que la différence de mortalité entre souris traitées à la SOD et souris contrôles est non significative.

Une des raisons possibles du manque d'efficacité de la SOD vis-à-vis du paraquat pourrait être la transformation continuelle de $PQ^{\cdot+}$ en PQ^{2+} et vice versa : cette transformation provoquerait la formation constante et en trop grande quantité de radicaux libres qui ne pourraient être neutralisés que partiellement

par la SOD.

Une seconde hypothèse généralement émise pour expliquer la toxicité du paraquat est celle de la peroxydation des lipides ; mais cette théorie est encore controversée : en effet certaines expériences montrent une augmentation de la peroxydation des lipides au niveau des microsomes induite par le paraquat, alors que d'autres montrent une diminution de cette peroxydation. Cette hypothèse pourrait être testée dans le modèle que nous utilisons en examinant l'effet protecteur éventuel d'enzymes comme la glutathione peroxydase qui peut arrêter les réactions en chaîne produites par la peroxydation des lipides. De toute façon, même si l' $O_2 \cdot (-)$ n'est pas le seul facteur important pour expliquer la toxicité du paraquat, il est toutefois indéniable que la présence d'oxygène est fondamentale et que la toxicité du paraquat implique l'intervention de l'oxygène.

4.3. EFFET DE L'OXYGENE

4.3.1. Evolution des protéines et du nombre de cellules en fonction du temps d'exposition à l'oxygène

Dans la figure 3 montrant l'évolution de la quantité de protéines en présence d'air ou en présence d' O_2 , nous n'avons pas de valeur de départ : en effet, dans cette expérience, les cellules ont été réparties dans 12 boîtes de cultures et ont directement été soumises à une atmosphère d' O_2 ou à l'air. Nous n'avons donc pas pu faire de dosage directement après le repiquage étant donné que les cellules n'étaient pas encore fixées à la boîte de culture.

Cependant, comme le montre le graphique, nous constatons une augmentation rapide de la quantité de protéines pour les boîtes cultivées en présence d'air : ces fibroblastes arrivent à confluence après 5 jours.

Par contre, en ce qui concerne les cellules cultivées en atmosphère d'oxygène, nous remarquons une diminution de la quantité de protéines correspondant soit à une diminution du nombre de cellules vivantes soit à une diminution de leur taille.

Parallèlement à cette expérience, nous avons donc voulu observer l'évolution du nombre de cellules : pour cela, il nous suffisait de compter le nombre de cellules contenues dans un champ du microscope de surface connue, pour obtenir le nombre total de cellules dans une boîte. Nous aurions ainsi obtenu l'évolution de la quantité de protéines par cellule ; cependant, les valeurs observées du nombre de cellules sont sous-estimées car il devient très difficile de compter les fibroblastes lorsqu'ils arrivent à confluence.

Nous avons donc suivi un certain nombre de cellules (figure 4) dans des boîtes de Pétri et nous constatons une diminution du nombre de cellules de 50 % après une exposition de 7 jours sous une atmosphère d'O₂. Ainsi donc, la présence d'oxygène provoque une dégénérescence et une perte des cellules attachées dans la boîte de culture. Haugaard (8) avait déjà mentionné une diminution de la croissance et de la division de cellules cultivées à des concentrations trop élevées en oxygène.

4.3.2. Toxicité de l'oxygène

D'après le tableau récapitulatif (Tableau XV), nous pouvons constater une augmentation de la

toxicité de l'oxygène en fonction de la pression et en fonction du nombre de jours d'exposition.

A pression atmosphérique, les taux de survie des fibroblastes sont cependant élevés : entre 70 et 76 % pour les cellules non injectées. Ces variations pourraient provenir de résistance variable des cellules à l'oxygène mais il n'est pas exclu qu'il puisse y avoir eu de légères pertes de l'atmosphère d'oxygène qui auraient pu modifier fortement les résultats. En effet, certaines expériences montrent une tolérance des cellules pour une atmosphère contenant jusqu'à 85 % d'oxygène (15).

A une pression de deux atmosphères, le taux de survie est inférieur aux valeurs observées à pression atmosphérique. L'augmentation de toxicité est également proportionnelle au temps d'exposition.

Cette toxicité se traduit toujours par une vacuolisation du cytoplasme qui semble être le début de la phase terminale de la cellule. Le seul facteur anormal observé avant cette vacuolisation est l'augmentation du nombre de crêtes mitochondriales. Mais nous devons toutefois souligner la variabilité de comportement des fibroblastes vis-à-vis de l'oxygène.

4.3.3. Micro-injections

Cette constatation sur les différences de comportement des fibroblastes nous amène à une remarque concernant le moment choisi pour la micro-injection. Comme nous l'avons expliqué, puisqu'il faut un certain temps avant de voir un effet de l'oxygène sur les cellules, nous avons réalisé la micro-injection après 4, 5 ou 6 jours étant donné que nous avons décidé d'observer l'effet des injections après 24 heures. La trop grande variabilité des comportements ne nous a pas permis de choisir un moment précis pour injecter. De ce fait, il se peut que pour certaines cellules, les injections aient été trop

tardives : dans ces conditions, la SOD et la catalase étaient peut-être insuffisantes pour enrayer des réactions de radicaux libres des cellules qui avaient peut-être déjà atteint un point de non retour.

Une seconde remarque peut être faite en ce qui concerne la protection de la SOD et de la catalase vis-à-vis de l'oxygène. Comme le montrent les analyses de la variance (voir Tableaux XII et XIII), que ce soit pour une pression de 1 ou 2 atmosphères, nous obtenons un non rejet de l'hypothèse nulle, c'est-à-dire que les moyennes des différentes populations considérées ne sont pas significativement différentes : il semble donc que la micro-injection des enzymes de défense n'ait pas apporté l'effet protecteur escompté contre les pressions en oxygène.

Les expériences de Crapo (15) montraient que des rats pré-exposés à 85 % d'oxygène développaient une tolérance pour une atmosphère contenant 100 % d'O₂ et ceci parallèlement à une augmentation de leur SOD. Cette constatation pouvait laisser penser à un rôle défensif de la SOD par rapport aux radicaux superoxydes. Cependant cette expérience n'a pu être vérifiée sur d'autres espèces. De plus, même chez le rat, elle n'est valable que pour les poumons et elle n'impliquerait qu'un seul type de cellules, celles de type alvéolaire II.

Cette grande diversité de comportements cellulaires influencés par de hautes concentrations en oxygène suggère que la toxicité de l'oxygène ne serait pas due à une action unique mais qu'elle impliquerait plusieurs actions et réactions de l'O₂. Ces actions dépendraient de la concentration en O₂ mais aussi du type de tissu et du type de cellules.

Nous pensons notamment à l'oxydation éventuelle de certains groupements comme les groupements sulfhydryles de certains enzymes ou à la modification de l'importance relative de certaines voies métaboliques (11).

5. CONCLUSIONS

Bien que les expériences réalisées dans ce travail nous aient montré l'effet toxique de l'oxygène et du paraquat sur les fibroblastes WI-38, l'absence d'effet des injections de catalase et de SOD ne nous a pas permis de vérifier si cette toxicité intervenait bien au niveau de la production de radicaux superoxydes avec pour conséquence finale des attaques de la cellule par des radicaux libres.

En effet, comme nous l'avons souligné ci-dessus, ce résultat négatif peut avoir plusieurs explications : soit la toxicité de l'oxygène et du paraquat n'est pas due uniquement à la production de radicaux $O_2^{(-)}$, soit nous intervenons trop tard dans la dégénérescence, soit enfin les enzymes micro-injectées ne sont pas suffisamment efficaces. Cette dernière hypothèse pourrait soit provenir des conditions expérimentales (il est certain que l'injection de ces enzymes ne peut protéger la matrice mitochondriale par exemple), soit être vraie dans l'absolu.

Il est à noter que l'activité de la SOD intracellulaire est normalement très élevée et que l'augmentation même de deux fois la quantité d'enzyme n'est peut-être pas en mesure de contrecarrer des effets toxiques importants.

Il serait intéressant dans l'avenir de vérifier l'importance de la SOD et de la catalase en utilisant d'autres sources de radicaux libres et notamment les radiations γ . En effet, les altérations causées par les radiations semblent similaires à celles provoquées par des pressions élevées en oxygène et des expériences ont

montré un effet bénéfique de la SOD sur des rats ayant subi des radiations γ (14). Les radiations semblent avoir une action bien spécifique contrairement à l'oxygène qui semble agir à plusieurs niveaux différents.

Une seconde expérience à réaliser serait de tester l'effet protecteur éventuel de la glutathione peroxydase qui permet d'agir sur les peroxydes en général.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. LEIBOVITZ, B. , BENJAMIN, S. (1980)
Aspects of free radical reactions in biological systems : aging.
Journal of Gerontology 35, N° 1, 45-56.
2. SMITH, L. , ROSE, M.S. , WYATT, I.
The pathology and biochemistry of paraquat.
Oxygen free radicals and Tissue Damage.
Ciba Foundation Symposium 65, 330-334.
3. DODGE, A.D. (1971)
The mode of action of the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat.
Endeavour 30, 130-135.
4. BUS, J.S. , AUST, S.D. , GIBSON, J.E. (1974)
Superoxide and singlet oxygen catalysed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat toxicity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 749-755.
5. ROSE, M.S. , SMITH, L.L. , WYATT, I. (1976)
Paraquat accumulation : tissue and species specificity.
Biochem. Pharmacol. 25, 419-423.
6. FISHER, H.K. , CLEMENTS, J.A. , WRIGHT, R.R. (1973)
Enhancement of oxygen toxicity by the herbicide paraquat.
Am. Rev. Resp. Dis. 107, 246-252.
7. CRAPO, J.D. , TIERNEY, D.F. (1974)
Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity.
Am. J. Physiol. 226, 1401-1407.
8. HAUGAARD, N. , (1968)
Cellular mechanisms of oxygen toxicity.
Physiological Reviews 48, 311-345.
9. FRIDOVICH, I. (1978)
The biology of oxygen radicals.
Science, 201, N° 8, 875-880.
10. PACKER, L. , FUERH, K. (1977)
Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells.
Nature 267, 423-425.

11. HALLIWELL, B. (1978)
Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms : the key role of superoxide dismutase.
Cell Biology International Reports 2, N° 2, 113-128.
12. SOMVILLE, M. (1982)
Modifications enzymatiques des SOD au cours de la sénescence des fibroblastes WI-38 en culture.
F.N.D.P. Namur
13. Mc CORD, J.M. (1979)
Superoxide dismutases : occurrence, structure, function and evolution.
Isozymes : Current Topics in Biological and Medical research 3, 1-21.
14. FRIDOVICH, I. (1975)
Superoxide dismutases.
Animal Review of Biochemistry 44, 147-159.
- 15. LENOIR, G. (1982)
Etude comparative de la toxicité et de l'activité de molécules radicophiles.
F.N.D.P. Namur
16. HOUBEN, A. (1976)
Modifications enzymatiques liées au vieillissement des cellules en culture.
F.N.D.P. Namur
17. HENIN, V. (1981)
Micro-injection du cytochrome b5 dans les fibroblastes WI-38 et étude de sa distribution sur les membranes subcellulaires.
F.N.D.P. Namur
18. STACEY, D.W. , ALLFREY, V.G. (1977)
Evidence for the autophagy of microinjected proteins in Hela cells.
J. Cell Biol. 75, 807-817
19. BROSEMER, R.W. , RUTTER, W.J. (1961)
The effect of oxygen tension on the growth and metabolism of a mammalian cell.
Experimental cell Research 25, 101-113.

20. RAES, M. (1983)

Culture de fibroblastes de hamster doré comme nouveau modèle de vieillissement. Importance du cytosquelette dans ce modèle.
F.N.D.P. Namur

21. GIRI, S.N. , HOLLINGER, M.A. , SCHIEDT, M.J. (1981)

The effects of paraquat and superoxide dismutase on pulmonary vascular permeability and edema in mice.
Archives of Environmental Health 36, N° 4, 149-154