

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effets du peroxyde d'hydrogène sur différentes souches de fibroblastes humains

Roland, Isabelle H.

Award date:
1991

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Rue de Bruxelles 61 - 5000 Namur

Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam - b - Telefax 081/23.03.91

Effets du peroxyde d'hydrogène sur différentes souches de fibroblastes humains.

Roland Isabelle

Résumé:

L'objectif de ce mémoire est de comparer la sensibilité au peroxyde d'hydrogène de fibroblastes humains normaux et pathologiques: cellules normales WI-38 (poumon) et CRL 1501 (peau) et cellules pathologiques WI-38 VA 13 (transformées) et GM 00806 (peau, galactosialidose, surcharge lysosomale).

* Les comparaisons des activités et de la distribution subcellulaire des enzymes lysosomales (β -galactosidase, cathepsine C) et des enzymes détoxifiant le peroxyde d'hydrogène (glutathion peroxydase, catalase) ont été établies.

* L'utilisation du Triton X-100 lors de la mesure d'activité de la lactate déshydrogénase a révélé le caractère sédimentable de cette enzyme et donc sa difficulté d'utilisation comme marqueur d'altération de la membrane plasmique.

* Le peroxyde d'hydrogène, produit par la glucose oxydase exogène, dans un milieu dépourvu de sérum (H_2O_2 peut interagir avec certains composés sériques), provoque une altération des enzymes lysosomales spécialement marquée dans le cas des cellules surchargées. Les enzymes détoxifiant le peroxyde d'hydrogène résistent mieux à l'action de cet agent toxique que les hydrolases acides. Il a été vérifié que l'absence de sérum dans un milieu de culture n'entraînait pas de souffrance cellulaire importante dans les limites temporelles de nos expériences.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Année 1990-1991

Promoteur: Professeur S. Wattiaux-De Coninck

Arrivée au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toute personne qui, de près ou de loin, a contribué à sa réalisation.

Tout d'abord, je voudrais remercier le professeur R. Wattiaux de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Ensuite, je souhaiterais exprimer toute ma gratitude envers le professeur S. Wattiaux-De Coninck pour toute l'aide apportée au cours de cette année et pour toute la compréhension dont elle a fait preuve à mon égard.

Je remercie également Jacqueline Thirion, co-promoteur de ce mémoire, pour ses conseils dans la réalisation tant de la partie expérimentale que rédactionnelle.

J'aimerais remercier également Arlette Dautreloux pour son aide technique lors de la concrétisation de mes expériences.

Pour le chapitre concernant la microscopie électronique, mes plus vifs remerciements s'adressent à Marie Jeanne pour toute sa compétence et pour tous les services rendus durant ces quelques mois.

Pour la rédaction de ce mémoire, je tiens tout particulièrement à exprimer ma reconnaissance à J.M. Van Dijk, J. Thirion et A. Dautreloux.

Merci à Isabelle pour m'avoir fourni tous les renseignements dont j'avais besoin et pour toute la gentillesse dont elle a fait preuve à mon égard. De même, je voudrais remercier Françoise, Nathalie et Véronique pour leur soutien moral.

Je terminerais par une pensée toute spéciale à mes parents qui m'ont permis d'entreprendre et de poursuivre mes études.

Chapitre 1: Introduction.

1. La galactosialidose.	1
2. La transformation cellulaire par le virus SV 40.	3
1) Description du virus.	3
2) Transformation cellulaire.	3
3) Caractéristiques des cellules transformées.	4
A) Réduction des besoins en facteurs de croissance.	4
B) Perte du pouvoir d'arrêt de croissance.	4
C) Perte de la nécessité d'un ancrage pour la croissance.	4
D) Modification de la morphologie cellulaire.	4
E) Perte de l'inhibition de contact.	4
F) Modification de la surface cellulaire.	5
G) Augmentation du transport de glucose.	5
H) Immortalisation.	5
I) Les métastases.	5
3. L'oxygène et ses dérivés actifs.	6
1) Description des dérivés actifs de l'oxygène.	6
2) Production des dérivés actifs de l'oxygène.	7
A) $O_2^{\cdot-}$	7
1) Les cellules phagocytaires.	7
2) Dans d'autres types cellulaires.	7
B) H_2O_2	8
1) Dismutation de l'anion superoxyde.	8
2) Les enzymes.	8
- Des peroxysomes.	8
- Des mitochondries.	8
C) OH^{\cdot}	8
3) Effets biologiques des dérivés actifs de l'oxygène.	9
A) $O_2^{\cdot-}$	9
B) H_2O_2	9
C) OH^{\cdot}	9
4) Les moyens de protection.	10
A) Les molécules de petite taille.	10
1) Le β -carotène.	10
2) La vitamine E.	10

3) La vitamine C.	10
4) Le glutathion.	10
B) Les enzymes.	11
1) La superoxyde dismutase.	11
2) Les glutathion peroxydase et réductase.	11
3) La catalase.	12

Chapitre 2: But et démarche expérimentale. 13

Chapitre 3: Matériel et méthodes. 15

1. Les fibroblastes WI-38, WI-38 VA 13, CRL 1501 et GM 00806.	15
1) Culture cellulaire.	15
A) Caractérisation des cellules.	15
B) Méthodes de culture.	15
2) Préparation des homogénats.	16
3) Fractionnement complet par centrifugation différentielle.	16
4) Les enzymes de référence, les protéines et le DNA.	16
5) Etude morphologique.	17
6) Mise en évidence histochimique de la catalase.	17
2. Présentation des résultats.	17
1) Unités d'activités enzymatiques.	17
2) Fractionnements.	17
3) Analyse statistique.	18

Chapitre 4: Résultats expérimentaux.

Première partie:

Aspect morphologique des fibroblastes WI-38, WI-38 VA 13, CRL 1501 et GM 00806.	19
1. Microscopie en contraste de phase.	19
2. Microscopie électronique.	19

1) Le réticulum endoplasmique et les ribosomes libres.	20
2) L'appareil de Golgi.	20
3) Le noyau.	20
4) Les mitochondries.	20
5) Les lysosomes.	20
6) Les peroxysomes.	21
Deuxième partie: Etude biochimique.	21
1. Etude des enzymes détoxifiant le peroxyde d'hydrogène.	21
1) Activités spécifiques de la catalase et de la glutathion peroxydase.	21
A) La catalase.	21
B) La glutathion peroxydase.	22
2) Distribution subcellulaire de la catalase et de la glutathion peroxydase.	22
A) La catalase.	22
B) La glutathion peroxydase.	22
3) Discussion.	23
A) La catalase.	23
B) La glutathion peroxydase.	23
2. Marqueurs enzymatiques et contenu en DNA des quatre souches de fibroblastes.	24
1) Marqueurs enzymatiques.	24
A) La cathepsine C.	24
B) La β -galactosidase.	24
C) La lactate déshydrogénase.	25
2) Contenu cellulaire en DNA.	25
3) Discussion.	25
A) Marqueurs enzymatiques.	25
B) Contenu cellulaire en DNA.	26
3. Effet du Triton X-100 sur l'activité de la lactate déshydrogénase.	26
1) Résultats.	26
A) Activité enzymatique spécifique de la LDH.	26
B) Fractionnements cellulaires.	26
1) La LDH mesurée en absence de Triton .	26
2) La LDH mesurée en présence de Triton X.	26
2) Discussion.	27

4. Effet d'un renouvellement de milieu de culture avec ou sans sérum, sur le contenu cellulaire en protéines et sur les activités enzymatiques.	28
1) Résultats.	28
A) Protéines.	28
B) Enzymes lysosomales.	29
C) La catalase.	29
2) Discussion.	29
A) Protéines.	29
B) Enzymes lysosomales.	30
C) La catalase.	30
5. Fibroblastes humains soumis à l'action du peroxyde d'hydrogène.	30
1) Résultats.	31
A) Effet d'une incubation en présence de glucose oxydase.	31
1) Aspect morphologique.	32
2) Les enzymes.	32
B) Action de la glucose oxydase après 4 heures d'incubation.	33
1) Activité spécifique du tapis cellulaire.	33
a) La catalase.	33
b) La glutathion peroxydase.	33
c) La cathepsine C.	33
d) La β -galactosidase.	33
e) La lactate déshydrogénase.	34
2) Activité enzymatique libérée dans le milieu de culture.	34
a) La cathepsine C.	34
b) La β -galactosidase.	34
c) La LDH.	34
2) Discussion.	35
A) Les enzymes lysosomales et la LDH.	35
B) La catalase et la glutathion peroxydase.	35

Chapitre 5: Discussion. 37

1. L'examen morphologique.	37
2. L'examen biochimique.	38

3. Effet d'un renouvellement de milieu. 40

4. Effet du peroxyde d'hydrogène.

Chapitre 6: Bibliographie. 44

Abréviations.

kD :	kilodaltons.
O ₂ :	Molécule d'oxygène.
O ₂ ⁻ :	Anion superoxyde.
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène.
OH [·] :	Radical hydroxyle.
¹ O ₂ :	Oxygène singulet.
H ⁺ :	Ion hydrogène.
H ₂ O :	Molécule d'eau.
Fe ⁺⁺ :	Ion ferreux.
Fe ⁺⁺⁺ :	Ion ferrique.
GSH :	Glutathion.
SOD :	Superoxyde dismutase.
LDH :	Lactate déshydrogénase.
GO :	Glucose oxydase.

Chapitre 1. INTRODUCTION.

Le but de ce travail est de comparer la résistance à un stress oxydatif de cellules pathologiques (galactosialidose et cellules transformées) et de cellules normales .

La galactosialidose, maladie de surcharge lysosomale, ainsi que le processus de transformation maligne seront décrits. Dans les deux cas, nous aborderons les hypothèses qui mènent à penser que ces deux types cellulaires pourraient se comporter autrement qu'une cellule normale face à un stress oxydatif. Enfin, le stress oxydatif lui-même sera évoqué.

1. La galactosialidose.

(Fibroblastes GM 00806)

(Darnell, Lodish et Baltimore: 1988; de Duve, 1988; Nanba, Tsuji, Omura et Suzuki: 1987; Holtzman:1989).

Cette maladie génétique résulte d'une déficience en deux enzymes lysosomales: la β -galactosidase et l' α -neuraminidase.

Dans toute cellule, les lysosomes jouent un rôle important. Ils contiennent des hydrolases acides qui dégradent les polymères en monomères: protéines en acides aminés, acides nucléiques en nucléotides, lipides en acides gras, glycérol, sphingosine, sucres, alcools aminés, autres substituants ou groupements phosphate. Le pH intralysosomal acide est maintenu grâce à une pompe à protons située dans la membrane de cet organite. Ce pH acide (4,5 à 5) favorise la dénaturation des protéines alors que les enzymes lysosomales résistent à ce même pH.

Les lysosomes ont des dimensions et des formes variables et une cellule peut en contenir plusieurs centaines.

Dans le cas de la galactosialidose, la déficience en β -galactosidase serait due à une dégradation exagérée de l'enzyme. La déficience en α -neuraminidase s'expliquerait par le fait que cette enzyme serait beaucoup moins stable. Ces deux altérations résulteraient d'une malformation ou de l'inexistence de la "protective protein".

En effet, Nanba, Tsuji, Omura et Suzuki (1987) ont démontré qu'une protéine sécrétée par les fibroblastes sains restaure les activités en β -galactosidase et en α -neuraminidase des fibroblastes de patients atteints de galactosialidose. Cette protéine a reçu le nom de "Facteur correctif" ou "Protective protein". Elle est de nature glycoprotéique et aurait une activité de carboxypeptidase.

La β -galactosidase, l' α -neuraminidase et la "protective protein" forment un complexe de haut poids moléculaire logé dans la membrane des lysosomes. Ce dernier est connu sous le nom de "complexe de Galjaard".

Du fait de la déficience en ces 2 ou 3 enzymes lysosomales, les lysosomes vont se remplir de matériaux qui auraient dû être digérés par ces enzymes manquantes. A cause de ce dépôt progressif, ces organites gonflent, atteignent des tailles énormes.

Ces maladies de dépôt sont rares, mais elles sont extrêmement handicapantes. Les enfants atteints, souffrent souvent d'arriération mentale grave et meurent jeunes.

La galactosialidose est aussi désignée sous d'autres noms tels que "le syndrome de Goldberg", "La sialidose de type 2" ou la "Cherry-red spot myoclonus". Ce dernier terme a pour origine la tache rouge cerise située au niveau de la rétine des patients atteints de cette surcharge lysosomale.

Un grand nombre d'anomalies peuvent affliger les cellules atteintes de surcharge lysosomale sans que l'on sache pour autant lesquelles sont prépondérantes et mènent au dysfonctionnement de l'organe et à la mort de l'individu. Ces anomalies peuvent atteindre des mécanismes aussi divers que les processus d'autophagie et d'hétérophagie, la contraction musculaire, les interactions cellules-cellules du fait d'une géométrie anormale de celles-ci, la perte de latence des hydrolases, le mouvement des organites. Du fait de l'accumulation de macromolécules non dégradées, la synthèse des hydrolases lysosomales peut être accélérée pour compenser les processus de dégradation insuffisants. De plus, la prolifération des cellules hétérophagiques, PMN et macrophages, peut être induite pour essayer de compenser ce même déficit. La circulation sanguine locale peut être inhibée du fait de l'accumulation de cellules de tailles énormes et de formes anormales.

Ces deux dernières hypothèses ont en commun le point suivant: une accumulation de PMN peut mener à une production locale de dérivés actifs de l'oxygène. Par ailleurs, une hypoxie locale peut induire la transformation d'une enzyme inoffensive (la Xanthine déshydrogénase) en une enzyme toxique (La Xanthine oxydase) libérant ainsi des dérivés actifs de l'oxygène.

Ces deux hypothèses nous ont semblé plausibles. C'est pourquoi, nous avons décidé de tester l'action d'un dérivé actif de l'oxygène à savoir l'eau oxygénée sur les cellules GM 00806: fibroblastes de peau provenant d'un patient atteint de galactosialidose et sur les fibroblastes témoins.

2. La transformation cellulaire par le virus SV40.

(Fibroblastes WI-38 VA 13)

(Depelchin A: 1987 ; Darnell, Lodish et Baltimore: 1988)

1) Description du virus:

Le Simian virus, plus connu sous le nom de SV40, se multiplie dans les cellules provenant de singe Rhésus sans causer d'effets cytopathogènes c'est-à-dire sans entraîner la lyse des cellules. Mais, ce virus injecté à des animaux d'autres espèces peut donner lieu à la formation de sarcome.

Il fait partie du groupe des Papovirus qui sont des virus à ADN à double hélice circulaire de 5 kB. Il ne possède pas d'enveloppe mais a une capsidie icosaédrique de 50 nm comportant 72 capsomères.

Ce virus, comme la plupart des virus à ADN, se multiplie dans le noyau des cellules hôtes.

2) Transformation cellulaire.

Les virus ont besoin d'une cellule vivante pour s'y multiplier. Celle-ci leur fournit:

- * L'énergie.
- * La machine ribosomale nécessaire.
- * Les éléments biochimiques précurseurs de leurs protéines et acides nucléiques.

Avant de pouvoir pénétrer dans la cellule hôte, le virus doit s'attacher à la surface de celle-ci. Cette adsorption est réglée par des rapports spécifiques entre des constituants superficiels du virus avec des sites récepteurs de la membrane cellulaire. Cette spécificité explique le fait que les virus ne peuvent infecter que certaines cellules.

Une fois la liaison effectuée, les virus non enveloppés, tels les Papovirus, sont le plus souvent introduits par une réaction membranaire comparable à la phagocytose.

A ce moment, des enzymes soit cytoplasmiques soit codées par le génôme viral désagrègent les protéines de la nucléocapsidie et libèrent l'acide nucléique qui va s'introduire dans le noyau de la cellule-hôte pour exprimer l'information qu'il porte.

Un Papovirus se multiplie grâce à un processus d'infection réalisé en deux phases: une phase précoce durant laquelle il réplique son ADN et induit la cellule à produire plus d'ADN viral et une phase tardive où il y a synthèse des protéines de la capsidie. Ces deux phases permettent la production de nouveaux virions matures.

Il faut distinguer les cellules permissives et non permissives:

A) *Les cellules permissives* sont des cellules où la phase tardive suit la phase précoce entraînant la synthèse d'une grande quantité de virions et la mort cellulaire de l'hôte.

B) *Les cellules non permissives* où il n'y a pas de réplication de l'ADN viral. L'infection y est donc arrêtée avant d'atteindre la phase tardive et les cellules ne meurent pas. On peut distinguer deux voies dans ce cas:

- * La plupart des cellules vont perdre le génôme viral et retrouver leurs propriétés de croissance normale: on parle de transformation abortive.

- * Le génôme viral s'intègre parfois à l'ADN cellulaire et les cellules-filles sont transformées de façon permanente.

3) Caractéristiques des cellules transformées.

A) Réduction des besoins en facteurs de croissance:

Certaines cellules transformées synthétisent des substances analogues à des facteurs de croissance de façon à pourvoir à leurs propres besoins.

B) Perte du pouvoir d'arrêt de croissance:

Lorsque la concentration de l'un des éléments nutritifs est plus faible que la valeur seuil minimale, la croissance des cellules normales s'arrête tandis que les cellules transformées croissent toujours.

C) Perte de la nécessité d'un ancrage pour la croissance:

Si des cellules saines sont étalées sur une surface à laquelle elles ne peuvent s'accrocher, elles demeurent viables mais ne prolifèrent plus, contrairement aux cellules tumorales.

D) Modification de la morphologie cellulaire:

Une cellule transformée est plus ronde et possède moins de prolongements que les cellules saines. De plus, celles-ci se disposent en une seule couche selon un motif ordonné tandis que les cellules tumorales croissent en couches multiples et de façon désordonnée.

E) Perte de l'inhibition de contact:

Lorsqu'une cellule saine est entourée d'autres cellules, elle s'immobilise et établit des jonctions avec les cellules avoisinantes, la division cellulaire s'arrête. Les cellules tumorales établissent rarement de jonctions avec les voisines, ne s'immobilisent pas et continuent à proliférer indéfiniment.

F) Modification de la surface cellulaire:

Les glycoprotéines et les glycolipides sont modifiés dans les cellules transformées. On y observe également une mobilité beaucoup plus importante des protéines de la membrane plasmique.

G) Augmentation du transport du glucose:

Ceci serait un corrolaire de l'augmentation de la glycolyse dans les cellules transformées.

H) Immortalisation:

Les cellules normales ont un potentiel de croissance limité. Ceci ne s'applique pas aux cellules tumorales auxquelles la transformation confère l'immortalisation.

Il est également à considérer que les cellules tumorales poussent plus vite que les cellules saines correspondantes.

I) Les métastases:

Les métastases cancéreuses sont des foyers secondaires disséminés par voie lymphatique ou sanguine à partir d'un foyer primitif.

Malgré les problèmes importants provoqués par les métastases dans la thérapie cancéreuse, une des caractéristiques de la métastase tumorale est le peu d'efficacité du processus. *Il a été calculé*, d'une part à partir de cellules tumorales inoculées ou à partir du nombre de cellules tumorales qui se détachent spontanément d'une tumeur et, d'autre part, à partir du nombre de colonies métastatiques formées *que la survie des cellules disséminées est largement en-dessous du taux de 1 %.*

Cela peut-être dû à plusieurs mécanismes:

- * La destruction des cellules cancéreuses par des phénomènes immunitaires.
- * La perte de potentiel de former un clone et l'établissement d'un stade "dormant".
- * La mort des cellules tumorales dans les capillaires sanguins: ceci pourrait résulter de la toxicité de l'oxygène.

Ce dernier point est étayé par les observations:

1. L'oxygène inhibe la croissance des cellules cancéreuses au niveau des poumons.
2. Les cellules cancéreuses prélevées in vivo poussent mieux in vitro à des concentrations en oxygène en dessous de celle en équilibre avec l'atmosphère.
3. Le taux de lyse des cellules tumorales dans les différents organes varie et cette différence peut être mise en relation avec la concentration en oxygène.

3. L'oxygène et ses dérivés actifs:

Les cellules atteintes de galactosialidose et les cellules transformées pourraient présenter une susceptibilité à l'oxygène différente de celle des cellules normales.

Seront décrits, dans ce paragraphe, les différents dérivés actifs de l'oxygène, leur production, leurs effets biologiques et les moyens de protection dont disposent la cellule.

1) Description des dérivés actifs de l'oxygène.

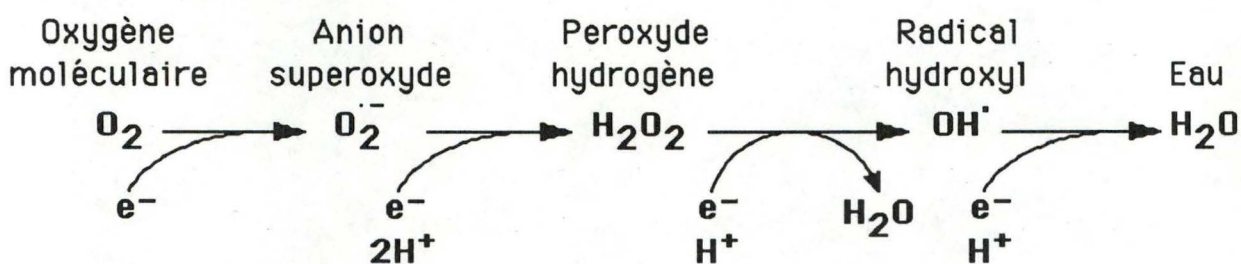
(Halliwell, Gutteridge: 1984, 1986; Freeman, Crapo: 1982; Fisher: 1987).

L'oxygène peut avoir des effets toxiques sur les cellules si sa concentration excède les 20 % que contient l'air qui nous entoure. Les effets observés varient suivant le type d'organisme, son âge, son stade physiologique et ses défenses anti-oxydantes telles que les vitamines E, C ou les enzymes détoxifiantes.

Beaucoup de dégâts cellulaires pourraient être dûs à la formation de dérivés actifs de l'oxygène moléculaire. Si ces dérivés deviennent trop nombreux, les défenses cellulaires sont surpassées et la cellule finit par mourir.

L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ dérive de la molécule d'oxygène par suppression de la restriction de spin ce qui en fait une molécule beaucoup plus réactionnelle que l'oxygène.

En additionnant des électrons à l'oxygène en suivant la voie de réduction monovalente, il se forme les dérivés suivants:



Cette réduction monovalente entraîne la formation de plusieurs radicaux libres. Ceux-ci sont des espèces chimiques capables de mener une existence indépendante, contenant un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) et étant, dès lors, très réactionnels (Halliwell, Gutteridge: 1985). Ces radicaux sont des agents destructeurs des tissus.

On regroupe donc sous le terme de dérivés actifs de l'oxygène:

$O_2^{\cdot -}$; H_2O_2 et OH^{\cdot} soit respectivement l'anion superoxyde, l'eau oxygénée et le radical hydroxyle.

2) Production des dérivés actifs de l'oxygène.

Ceux-ci peuvent être produits in vivo:

A) $O_2^{\cdot -}$: L'anion superoxyde.

Les différentes sources de ce radical sont:

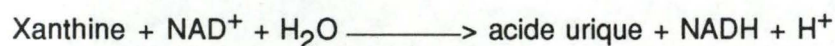
1) La poussée respiratoire des cellules phagocytaires lorsqu'elles entrent en contact avec des particules étrangères ou avec des complexes immuns. Ces cellules comprennent les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les éosinophiles. Ces $O_2^{\cdot -}$ servent à détruire toutes les particules étrangères à la cellule.

2) Dans d'autres types cellulaires, les anions superoxydes sont produits comme suit:

- Par autooxydation de petites molécules solubles soumises à des réactions d'oxydoréductions telles que les thiols, les hydroquinones, les catécholamines, les flavines,...
- Au cours du fonctionnement de la chaîne respiratoire des mitochondries au niveau:
 - * De l'ubiquinone - cytochrome B.
 - * De la NADH déshydrogénase.
- Au niveau du réticulum endoplasmique et plus précisément de la NADPH cytochrome P450 réductase.
- Dans le cytosol par la transformation de la Xanthine déshydrogénase en Xanthine oxydase.

La Xanthine oxydase est une enzyme produite au cours de l'hypoxie ou anoxie. C'est la source majeure de $O_2^{\cdot -}$. On la retrouve dans la plupart des tissus animaux et notamment dans l'intestin, les poumons et le foie (Mac Cord, 1985).

Dans les conditions physiologiques normales, cette enzyme existe principalement sous la forme de Xanthine déshydrogénase et catalyse la réaction suivante:



Au cours de l'ischémie qui consiste en une interruption de la circulation sanguine avec comme conséquence une diminution des apports en oxygène et en nutriments pour les cellules et une évacuation ralentie des déchets métaboliques, la Xanthine déshydrogénase sera transformée en Xanthine oxydase. Cette transformation peut être réversible si elle est due à une oxydation des groupements sulfhydryles ou irréversible si elle est due à une protéolyse

partielle de la Xanthine déshydrogénase. La Xanthine déshydrogénase est la forme inoffensive de l'enzyme. Par contre, la Xanthine oxydase catalyse la réaction suivante produisant l'anion superoxyde:

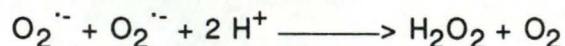


Ce dernier peut être détruit par la réaction de Fenton et ainsi donner naissance aux OH^{\cdot} ou alors, deux molécules d'anions superoxydes peuvent réagir avec deux hydrogènes et former H_2O_2 .

La proportion relative d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène dépend du pH, de la concentration en oxygène et en substrat.

B) H_2O_2 : Cette molécule peut être formée par:

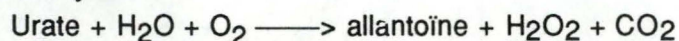
1) Dismutation de l'anion superoxyde:



2) les enzymes:

- des peroxysomes:

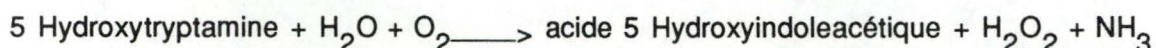
* Urate oxydase:



* D Amino acide oxydase:

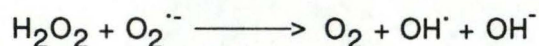


-des mitochondries: Monoamine oxydase se situant dans la membrane externe de cet organite:



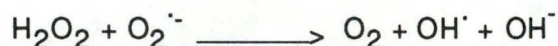
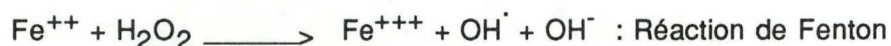
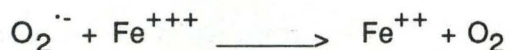
C) OH^{\cdot}

En 1934, Haber et Weiss postulèrent la réaction suivante:



Cependant, la vitesse de cette réaction en solution aqueuse a été démontrée comme étant pratiquement nulle et, de plus, il n'est pas possible de produire OH^{\cdot} in vivo, les concentrations en peroxyde d'hydrogène et en anion superoxyde étant très faibles (Halliwell 1981).

Fenton a montré que la formation de OH^{\cdot} est catalysée par des traces de métaux de transition.



Pour prouver la nécessité de la présence du fer dans cette réaction, Gutteridge et al (1979) montrèrent qu'un chélateur de Fe^{+++} , la desferrioxamine, inhibe la formation de OH^{\cdot} en empêchant la réduction de Fe^{+++} par $\text{O}_2^{\cdot -}$.

Le fer utilisé provient essentiellement de la ferritine, de l'hémoglobine et du fer complexé par de petites molécules.

3) Effets biologiques des dérivés actifs de l'oxygène.

A) $\text{O}_2^{\cdot -}$: Cette molécule peut donner lieu à des blessures tissulaires importantes. Ce radical est hautement réactif dans les environnements hydrophobes et peu réactif dans les solutions aqueuses. Sa toxicité est due au fait qu'elle engendre des OH^{\cdot} . $\text{O}_2^{\cdot -}$ doit passer par les canaux ioniques pour entrer dans les cellules où elle peut se transformer en HO_2^- en se liant à un proton. HO_2^- est un oxydant plus fort que $\text{O}_2^{\cdot -}$.

B) H_2O_2 : Contrairement aux $\text{O}_2^{\cdot -}$, H_2O_2 peut traverser les membranes biologiques et agir loin de son site de formation. Cela est dû au fait que le peroxyde d'hydrogène ne possède pas de charge et a des propriétés semblables à l'eau.

C) OH^{\cdot} : Les OH^{\cdot} formés sont beaucoup plus réactionnels que les deux molécules citées plus haut. Cependant, ils ne survivent pas longtemps et n'induisent de dégâts qu'à proximité de leur site de formation.

Les principales cibles de ces différents dérivés actifs de l'oxygène sont:

* Le DNA qui subira:

- Une modification chimique des bases.
- Une rupture des brins d'ADN.

* Les protéines où il y aura:

- Une modification des acides aminés à résidus contenant des doubles liaisons ou un soufre: Le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine, l'histidine, la méthionine et la cystéine.

- Une hydroxylation de la lysine.
- Une oxydation des groupements SH.
- La fragmentation ou l'agrégation de certaines protéines.

* Les membranes lipidiques sont altérées à deux niveaux.

La peroxydation lipidique provoque:

- Une augmentation de la perméabilité membranaire car les phospholipides dont les acides gras sont peroxydés et devenus plus hydrophiles fuient le centre de la bicouche.
- Une oxydation de protéines importantes pour le maintien de la structure de la membrane a comme conséquence une rupture du gradient transmembranaire ionique, une inhibition de certains processus métaboliques liés à ces membranes.

La mort cellulaire n'est pas due à la peroxydation lipidique mais à l'augmentation en Ca^{++} cytosolique qui en résulte avec comme conséquence: une activation de protéases et de nucléases, la formation de "blebs" membranaires, l'oxydation de groupements SH à importance critique pour la cellule et une destruction de l'ADN (Halliwell, Gutteridge; 1990).

4) Les moyens de protection:

La cellule, face aux radicaux libres, possède différents moyens de protection qui sont soit des molécules relativement simples soit des enzymes (Freeman, Crapo: 1982; Michiels, Remacle: 1988)

A) Les molécules de petite taille: le β carotène, la vitamine E (ou α tocophérol), la vitamine C (ou acide ascorbique) et le glutathion.

1. Le β carotène: principalement efficace sur $^1\text{O}_2$ inhibe la peroxydation lipidique.

2. La vitamine E (ou α tocophérol): C'est une molécule hydrophobe qui se loge dans les membranes. Elle réduit $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $^1\text{O}_2$, les radicaux lipidiques peroxylés et autres espèces radicalaires.

3. La vitamine C (ou acide ascorbique): molécule hydrophile localisée dans le cytoplasme et qui est capable de capter les $\text{O}_2^{\cdot-}$ et les OH^{\cdot} .

4. Le glutathion (γ Glutamylcystéinyglycocolle: GSH): est une molécule importante car elle:

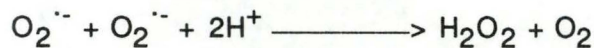
- * Peut réduire le peroxyde d'hydrogène, les peroxydes lipidiques et les disulfures.
- * Régénère l'acide ascorbique et l' α tocophérol.

* Est le substrat de la glutathion peroxydase, enzyme protecteur contre les radicaux libres.

Le glutathion est une petite molécule abondante dans le cytoplasme et dans les mitochondries. On la retrouve aussi dans des proportions moindres dans les membranes plasmiques et probablement dans les lysosomes, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes (Mbemba, Houbion, Raes, Remacle: 1985).

B) Les enzymes : Parmi lesquelles: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et les glutathion peroxydase et réductase.

1. La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la réaction suivante:



En fait, il existe deux types de superoxyde dismutases:

* La Cu-Zn SOD présente dans le cytoplasme et dans l'espace intermembranaire des mitochondries.

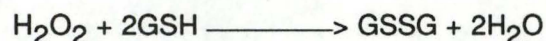
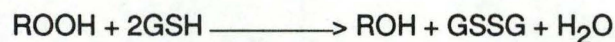
* La Mn SOD localisée dans la matrice mitochondriale.

Del Rio, Sandalio et Palma (1990) ont mis en évidence la présence de SOD dans les peroxysomes.

2. Les glutathion peroxydase et réductase (Mbemba, Houbion, Raes, Remacle:1985):

La glutathion peroxydase est une enzyme contenant du sélénium et utilisant, comme substrat le glutathion. Son activité ainsi que celle de la glutathion réductase sont restreintes au cytoplasme et aux mitochondries.

La glutathion peroxydase présente dans les mitochondries et dans le cytosol catalyse les deux réactions suivantes:

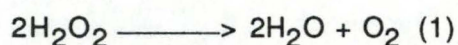


La forme oxydée du glutathion est réduite grâce à la glutathion réductase en utilisant, comme cofacteur, le NADPH.

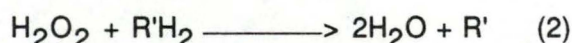


3. La catalase: (Del Rio, Sandalio et Palma: 1990).

Cette enzyme permet la destruction du peroxyde d'hydrogène suivant la réaction:



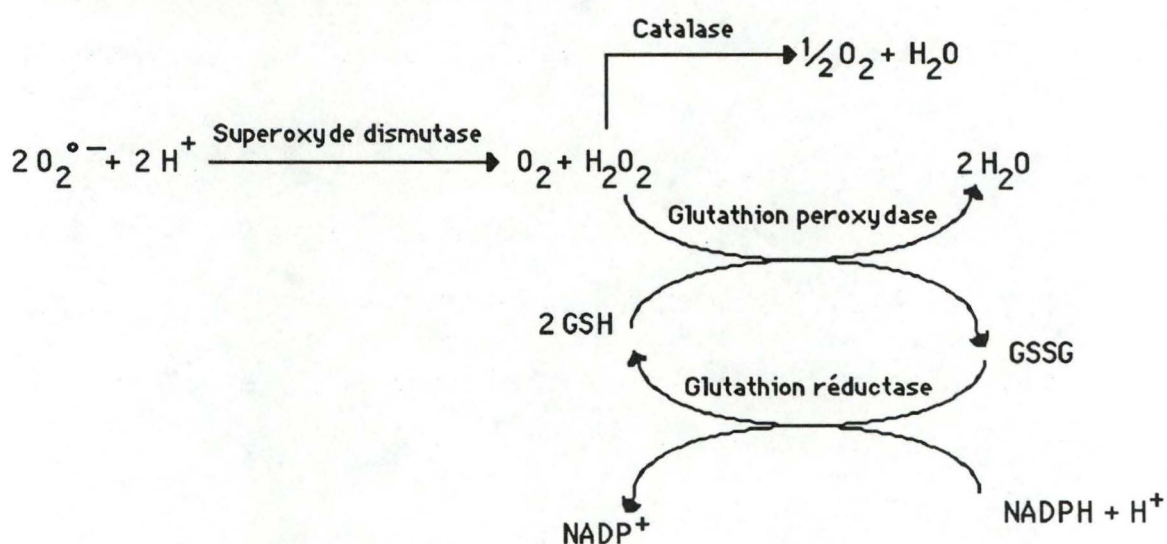
La catalase utilise le peroxyde d'hydrogène généré par d'autres enzymes pour oxyder une variété de substrats -incluant: les phénols, l'acide formique, la formaldéhyde et l'alcool- par la réaction peroxydative:



A de faibles concentrations en $\text{R}'\text{H}_2$, la catalase convertira le peroxyde d'hydrogène en eau comme indiqué dans la réaction (1):

Cela évite donc la formation d'espèces radicalaires encore plus dangereuses pour les cellules. Le peroxyde d'hydrogène est détruit à son site de synthèse. En effet, la catalase est principalement située dans les peroxysomes.

En résumé, on peut schématiser les différents systèmes enzymatiques protecteurs contre les dérivés actifs de l'oxygène comme suit:



Chapitre 2. But et démarche expérimentale.

Comme nous l'avons exposé dans l'introduction, nous nous sommes posé la question de savoir si le fait qu'une cellule soit atteinte de surcharge lysosomale ou transformée entraîne ou non une plus grande sensibilité aux dérivés actifs de l'oxygène par rapport aux cellules témoins.

Dans le cas de surcharge lysosomale, la circulation locale peut être inhibée produisant un état d'hypoxie. Les cellules transformées semblent sensibles à l'oxygène.

Nous disposons de quatre souches **de fibroblastes humains**. Deux souches sont pathologiques d'une part, des cellules de poumon transformées par le virus SV40 (WI-38 VA 13) et, d'autre part, des fibroblastes de peau provenant d'un malade atteint de galactosialidose (GM 00806). Les deux autres souches cellulaires sont les fibroblastes normaux correspondants (WI-38: Fibroblastes de poumon et CRL 1501: Fibroblastes de peau).

Le peroxyde d'hydrogène est un dérivé actif très toxique de l'oxygène. C'est pourquoi dans le cadre de ce travail, nous avons examiné l'action du peroxyde d'hydrogène sur ces quatre souches de fibroblastes humains.

* Certains préliminaires sont nécessaires. Il faut déterminer l'équipement enzymatique des cellules confluentes en enzymes détoxifiant le peroxyde d'hydrogène c'est-à-dire la catalase et la glutathion peroxydase. Il faut établir l'activité d'au moins un marqueur enzymatique du cytosol et des lysosomes. De plus, la répartition subcellulaire de ces différentes enzymes doit être vérifiée dans les différentes souches de fibroblastes. En effet, ces enzymes seront les témoins d'une atteinte cellulaire éventuelle. L'analyse biochimique est complétée par un examen morphologique.

* Le traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène ne peut se faire en présence de sérum car celui-ci peut contenir des composés protecteurs: protéines, vitamines, enzymes détoxifiantes. Il faut, de ce fait, vérifier que les différentes souches utilisées résistent à une culture dans un milieu dépourvu de sérum pendant le temps du traitement.

Une fois ces préliminaires effectués, nous pourrons tester l'effet du peroxyde d'hydrogène sur les différentes souches de fibroblastes afin de déterminer les dommages occasionnés par cet agent toxique.

La glucose oxydase, synthétisée par *Aspergillus niger*, permet de produire artificiellement le peroxyde d'hydrogène. Cependant, il faut déterminer la concentration en glucose oxydase la plus adéquate pour provoquer une atteinte cellulaire permettant de différencier la résistance des différentes souches.

Le stress produit est apprécié en dosant les activités de la catalase, de la glutathion peroxydase et d'enzymes marqueurs du cytoplasme et des lysosomes dans les cellules et dans le milieu de culture en présence et en absence du peroxyde d'hydrogène. Ceci permettrait de répondre aux questions suivantes: les membranes plasmiques et lysosomales sont-elles ou non altérées sous l'action de H_2O_2 ? Si oui, le sont-elles de façon différente suivant le type cellulaire envisagé?

Chapitre 3. Matériel et méthodes.

1. Les fibroblastes WI-38, WI-38 VA 13, CRL 1501 et GM 00806.

1) Culture cellulaire.

A) Caractérisation des cellules.

Quatre souches de fibroblastes humains sont utilisées.

- WI-38: fibroblastes provenant de **poumon** d'embryon humain, il s'agit d'une souche de cellules témoins.
- WI-38 VA 13: fibroblastes WI-38 transformés par le virus SV 40 (voir introduction).
- CRL 1501: fibroblastes de **peau** d'un bébé d'une semaine, servant de témoins.

Ces trois souches cellulaires nous ont été fournies par l'American Tissue Type collection (C/O Sales and Marketing Department, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA).

- GM 00806: fibroblastes de **peau** provenant d'un enfant de 30 mois souffrant de galactosialidose. Cette maladie génétique résulte d'une déficience en deux enzymes lysosomales: la β -galactosidase et l' α -neuraminidase (voir introduction).

Cette dernière souche cellulaire nous a été fournie par le Genetic Mutant Cell Repository (Institut for Medical Research, Copewood and Davis Street, Camden, New Jersey 08103, USA).

B) Méthodes de culture.

Toutes les cellules sont cultivées à 37°C dans le Milieu Essentiel Minimum (MEM) de Eagle, additionné de NaHCO₃ (2,18 g/l), de pénicilline (100 000 U/l) et de streptomycine (100 mg/l). Extemporément, du sérum de veau foetal (10 % en concentration finale) est ajouté et le pH du milieu est ajusté à 7,4.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes fermées en plastique à la surface desquelles elles adhèrent et se multiplient (boîtes NUNC de 25 cm² ou 75 cm²).

Dès leur arrivée à confluence les cellules sont détachées de leur support par une solution saline de trypsine (0,1%). Elles sont ensuite repiquées le plus généralement à une dilution de 1/4.

2) Préparation des homogénats.

Les cellules sont lavées deux fois à l'aide de tampon phosphate 10 mmol/l, pH 7,4, contenant du NaCl 0,15 mol/l à 0°C (PBS) et une fois par du saccharose 0,25 mol/l glacé. Les cellules sont raclées dans le saccharose (0,25 mol/l) glacé à l'aide d'une gomme et transférées dans des tubes coniques, puis centrifugées à 0°C à la centrifugeuse "Sorvall Instruments", pendant 10 minutes à 600 g (1000 rpm).

L'homogénéisation des fibroblastes (WI-38, CRL1501, GM 00806) est réalisée à l'homogénéiseur de Dounce de 7 ml (Kontes Glass Co) par 20 passages d'un piston serré. Les cellules WI-38 VA13, beaucoup plus fragiles (N.B: leur noyau est plus important), sont homogénéisées à l'aide d'un piston lâche et par trois passages seulement.

La majorité des membranes plasmiques sont ainsi rompues laissant intacts la plupart des organites subcellulaires.

Les homogénats obtenus sont conservés au congélateur, à -20°C, ou soumis à une centrifugation différentielle.

3) Le fractionnement complet par centrifugation différentielle.

Les fractionnements subcellulaires sont effectués selon la méthode décrite pour le foie par de Duve *et al.* (1955) en tenant compte des adaptations proposées par Remacle *et al.* (1980).

4) Les enzymes de référence, les protéines et le DNA.

Les mesures d'activités enzymatiques sont effectuées sur les homogénats de fibroblastes, sur les fractions subcellulaires et sur le milieu de culture.

Résumé des conditions de dosages des enzymes mesurées.

Organites subcellulaires	Enzymes	Substrats	Conc.	pH	Mesure	Références
Lysosomes	β -galactosidase	4-Méthylum-bélliféryl β -D galactopyranoside	0,5 mM	4	fluorimétrique du 4-méthylum-bélliféron	Peters <i>et al.</i> (1972)
	Cathepsine	Glycyl-L-arginine- β -naphtylamide	0,2 mM	6	fluorimétrique de la β -naphtylamine	Jadot <i>et al.</i> (1984)
Peroxisomes	Catalase	H ₂ O ₂	1,5 mM	7	colorimétrique de H ₂ O ₂	Baudhuin <i>et al.</i> (1964)
Cytosol et mitochondries	LDH _ Triton	Pyruvate NADH	1 mM 0,1 mM	7,4	Spectrophotométrique du NADH réduit	Wroblewski <i>et al.</i> (1955)
	LDH + Triton	Pyruvate NADH Triton X-100 Tampon Tris-HCl	0,91 mM 0,09 mM 0,18 % 45,5 mM	7,4	Spectrophotométrique du NADH réduit	
Cytosol et mitochondries	glutathion	Glutathion réduit	0,04 mM	8	Spectrophotométrique	Flohé et Günzler
	peroxydase	Tert-butylhydro-peroxyde	0,090 mM		du glutathion réduit	(1984)

Les techniques de dosages ainsi que les références auxquelles nous avons fait appel sont résumées dans le **tableau ci-contre**. Les protéines sont mesurées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). Le DNA est mesuré par la technique de Brunk *et al.* (1979).

5) Etude morphologique.

Les cellules sont fixées à la glutaraldéhyde (1,5 %) dans un tampon cacodylate 0,1 mol/l, pH 7,4, et à l'acide osmique (1 %). La déshydratation est faite à l'éthanol et l'enrobage à l'épon; la coloration, à l'acétate d'uranyle (0,5 % dans l'alcool 50 %) et le Reynolds (JCB 1963, 17, 208).

6) Mise en évidence histochimique de la catalase.

La mise en évidence histochimique de la catalase des différentes souches de fibroblastes a été réalisée comme suit :

- fixation: glutaraldéhyde 1,5 % et formol 4 % dans un tampon cacodylate 0,1 mol/l pH 7,2.
- incubation: 30 minutes dans un tampon glycine-NaOH 0,1 mol/l, pH 10,5, contenant la diaminobenzidine (0,5 mg/ml) et de l' H_2O_2 (0,15 %). Les témoins sont incubés en absence d' H_2O_2 .

2. Présentation des résultats.

1) Unités d'activités enzymatiques.

Les mesures d'activités enzymatiques concernant toutes les enzymes, à l'exception de la catalase, sont exprimées en mU/min.mg de protéines. Les unités de catalase sont celles définies par Baudhuin *et al.* (1964).

2) Fractionnements.

Nous utilisons pour présenter les résultats, les méthodes décrites par de Duve *et al.* (1955).

Les résultats sont portés en histogrammes:

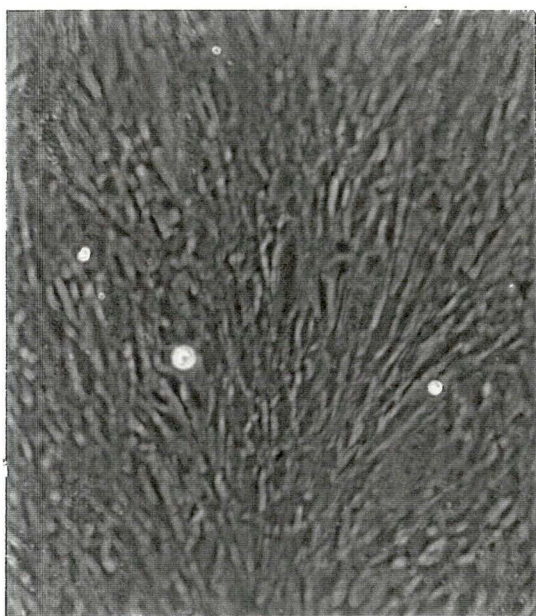
- en ordonnée, l'activité spécifique relative, c'est-à-dire le rapport entre le pourcentage d'activité totale de la fraction considérée et le pourcentage de protéines dans cette même fraction.
- en abscisse, la quantité relative de protéines des cinq fractions cumulées.

Chacune des fractions est donc représentée par un rectangle dont la hauteur équivaut à la purification de l'enzyme et la base au pourcentage de protéines dans la fraction (rapporté à l'homogénat). La surface de ce rectangle représente le pourcentage en enzyme dans la fraction. Pour les dosages enzymatiques, ainsi que pour le dosage de protéines, la récupération est calculée en sommant les valeurs trouvées dans les fractions N, M, L, P et S rapportées à l'activité de l'homogénat, qui équivaut à E+N.

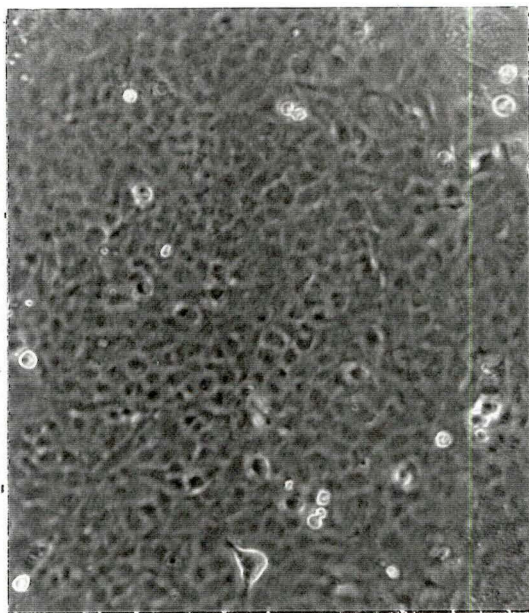
3) Analyse statistique.

Pour faciliter l'interprétation des résultats, nous avons réalisé, lorsque la structure des données le permettait, une analyse statistique, par comparaisons multiples des moyennes. L'analyse de la variance à un critère de classification est suivie de comparaisons de moyennes deux à deux par contraste: test de t basé sur l'estimation de la variance globale. Pour l'analyse des activités spécifiques d'enzymes (tableaux 1 et 2), il y a eu transformation logarithmique afin de procéder à la normalisation et l'homogénéisation des variances.

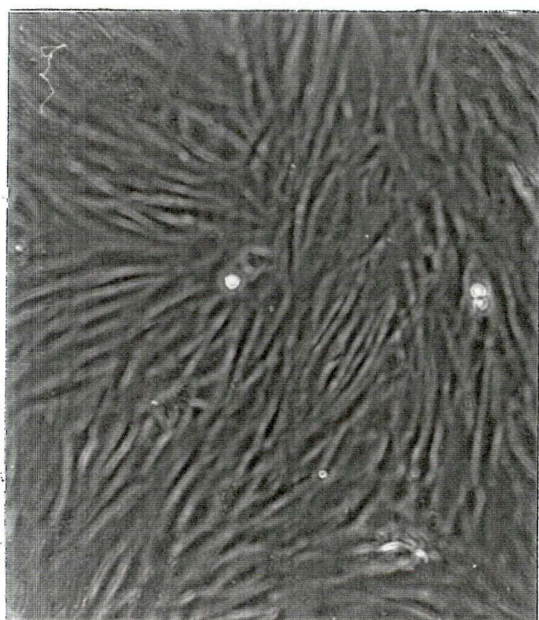
Planche 1. Aspect des fibroblastes WI-38, WI-38 VA 13, CRL 1501 et GM 00806, observés au microscope à contraste de phase (grossissement: 130x).



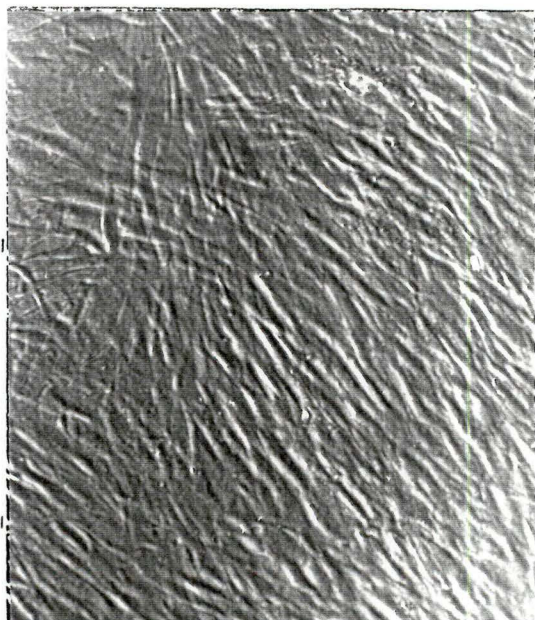
WI-38



WI-38 VA 13



CRL 1501



GM 00806

Chapitre 4. Résultats expérimentaux

Première partie. Aspect morphologique des fibroblastes WI-38, WI-38 VA13, CRL1501 et GM 00806.

Quatre souches cellulaires humaines sont utilisées que l'on peut présenter en deux groupes.

- D'une part, des fibroblastes servant de témoins sains: les cellules de poumon, WI-38 et les cellules de peau, CRL 1501.
- D'autre part, des cellules pathologiques: les fibroblastes de poumon transformés par le virus SV 40, WI-38 VA13 et les fibroblastes de peau provenant d'un malade atteint de galactosialidose (GM 00806).

1. Microscopie en contraste de phase (Planche 1).

Les fibroblastes WI-38, CRL 1501 et GM 00806, appartenant à des cultures jeunes, ont un aspect fusiforme et se disposent en un assemblage organisé lorsqu'ils arrivent à confluence.

Le nombre maximal de générations aisément obtenu est de ± 45 pour les WI-38 et les CRL 1501. Il est de ± 40 pour les GM 00806.

Les fibroblastes WI-38 VA 13 ont un aspect plus arrondi et se disposent de façon désordonnée. Ils peuvent être repiqués indéfiniment suite à l'immortalisation acquise par la transformation.

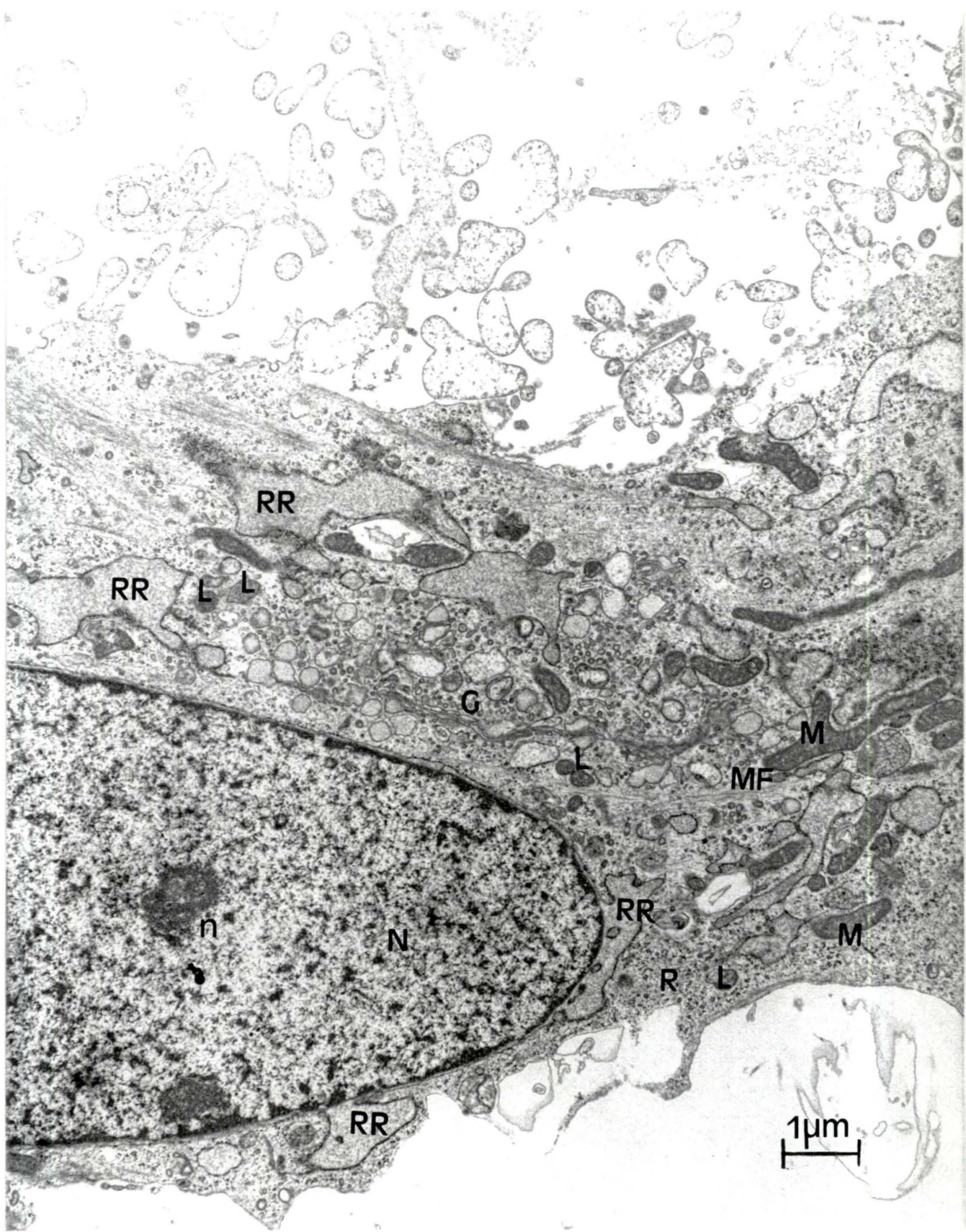
2. Microscopie électronique.

Les planches 2, 3, 4, 5 et 6 représentent respectivement les fibroblastes WI-38, WI-38 VA13, CRL 1501, GM 00806 et des hépatocytes de rat en culture, à titre de comparaison.

Observons les différents organites subcellulaires afin de mettre en évidence d'éventuelles différences d'une souche de fibroblastes à l'autre.

Planche 2. Micrographie électronique de fibroblastes WI-38.

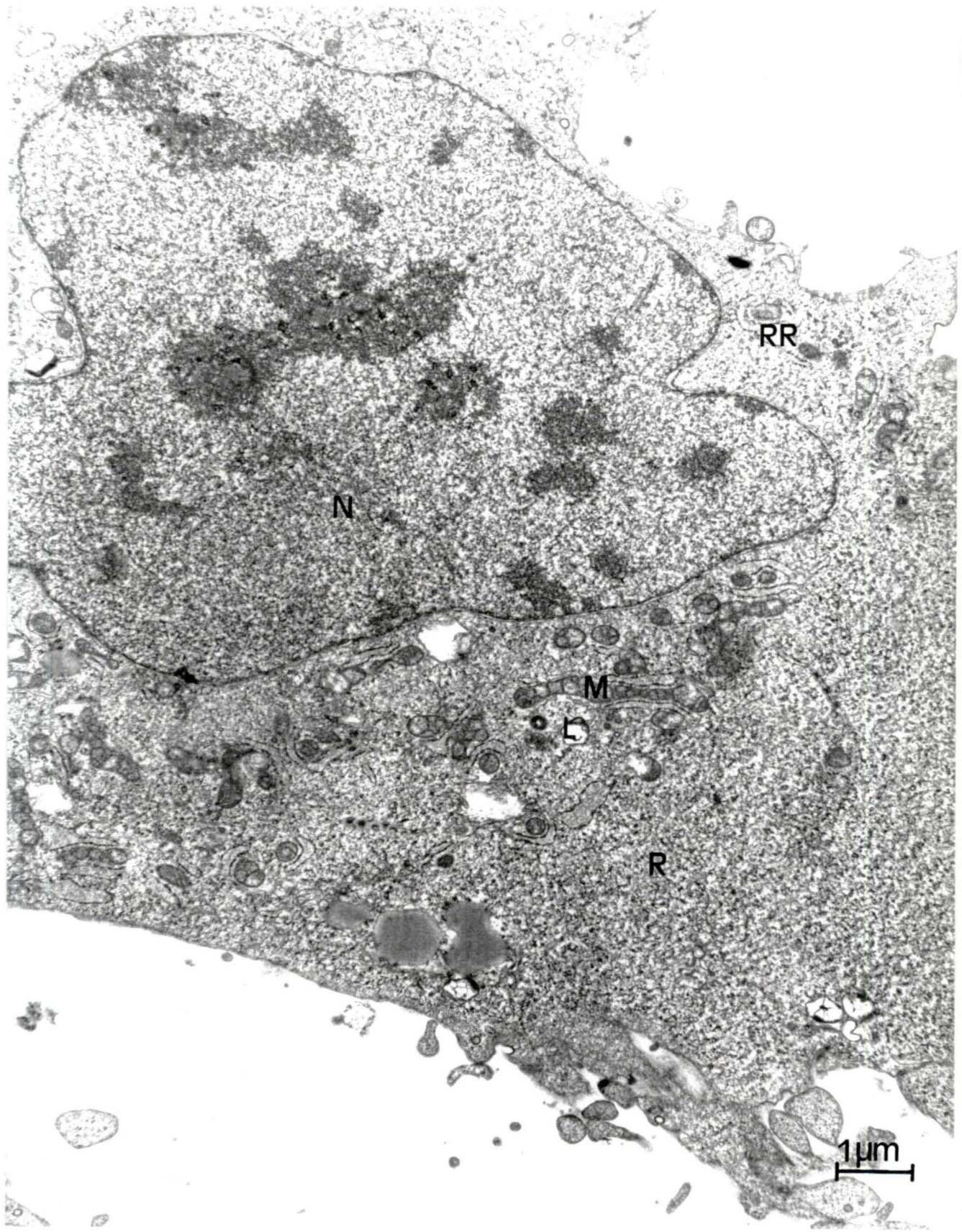
RR: réticulum rugueux; G: appareil de Golgi; N: noyau; n: nucléole; M: mitochondrie; L: lysosome; MF: microfilaments.



WI-38

Planche 3. Micrographie électronique de fibroblastes **WI-38 VA 13.**

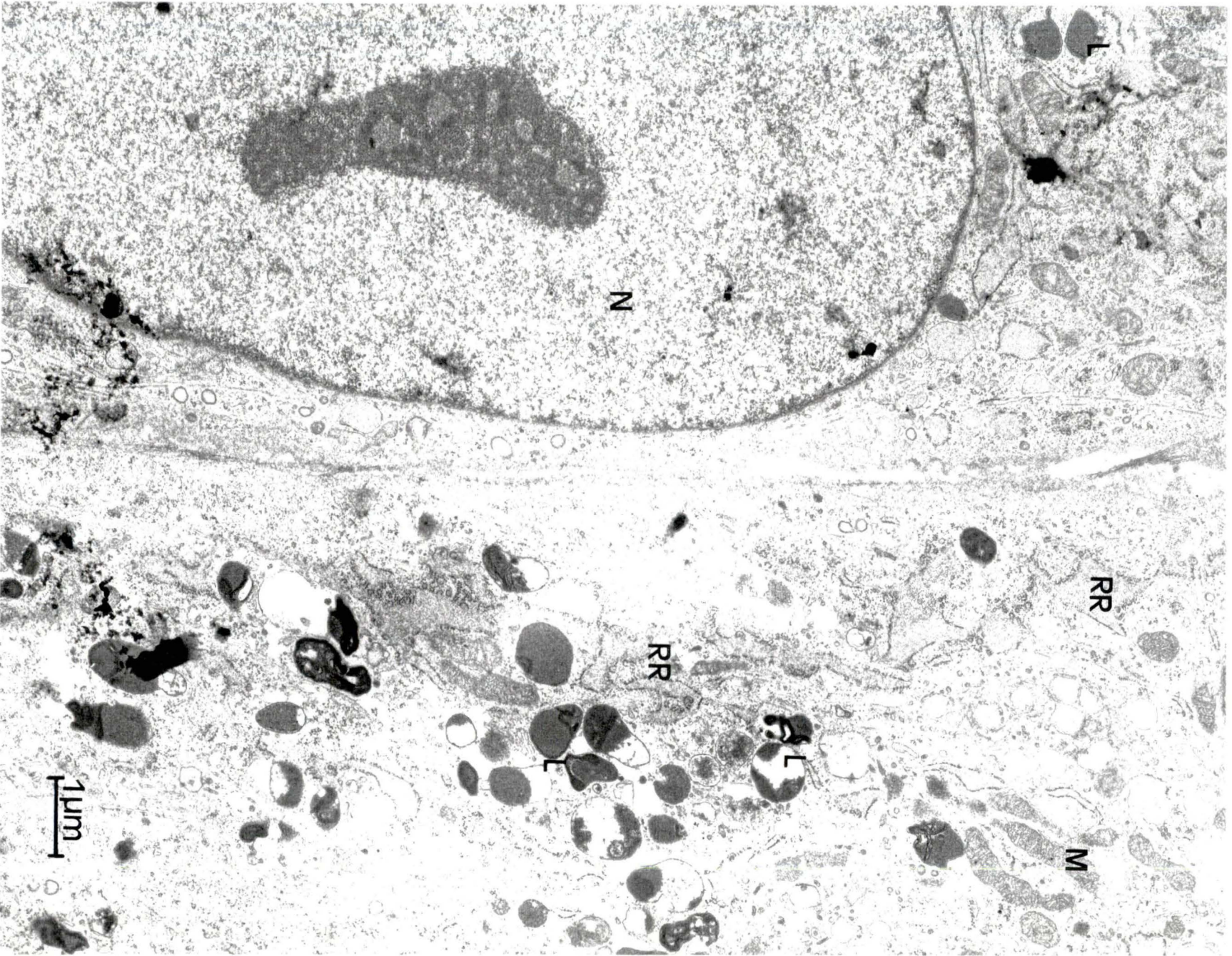
RR: réticulum rugueux; r: ribosomes libres; N: noyau; ; M: mitochondrie;
L: lysosome.



WI-38 VA 13

Planche 4. Micrographie électronique de fibroblastes **CRL 1501.**

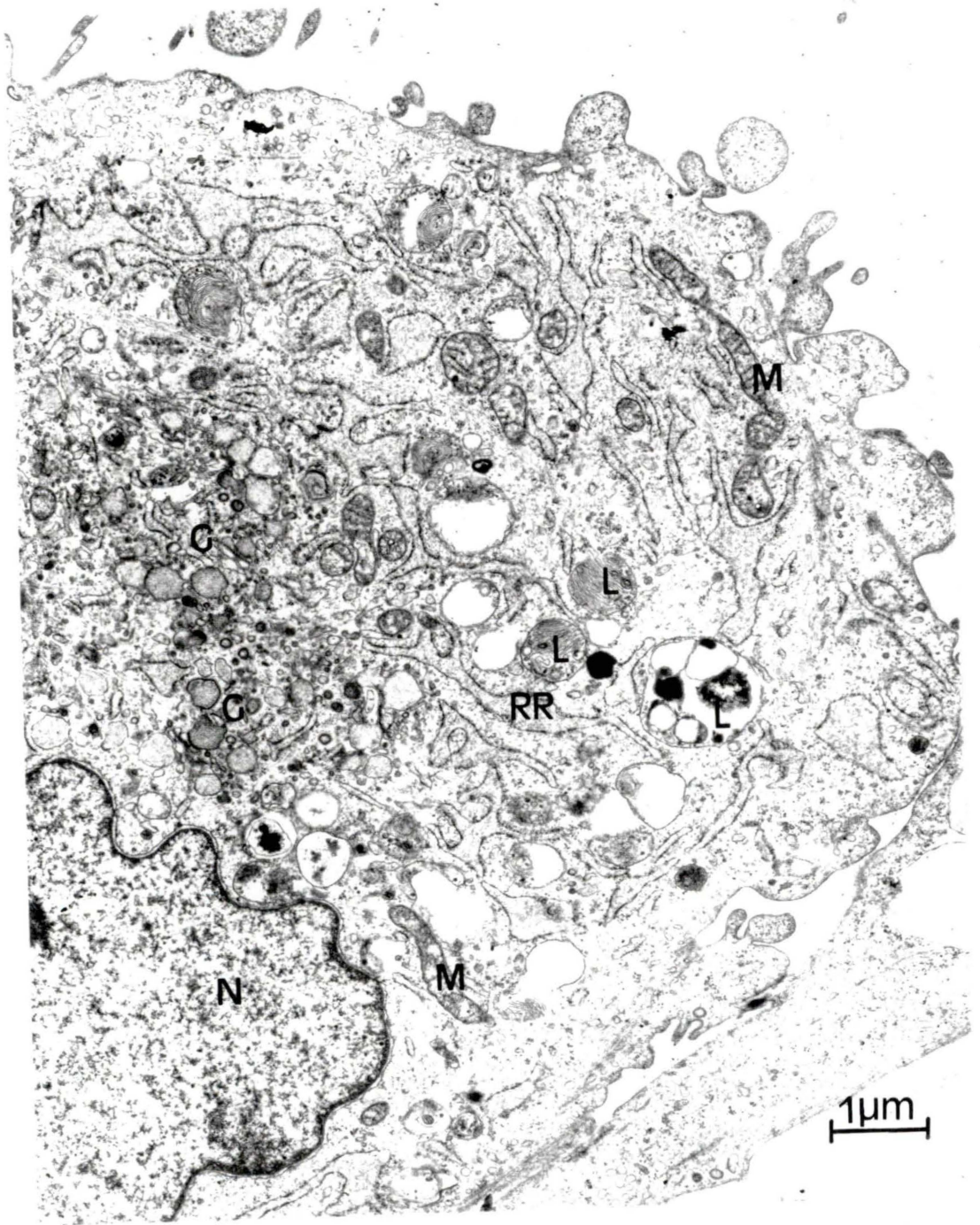
RR: réticulum rugueux; N: noyau; M: mitochondrie; L: lysosome.



CRL 1501

Planche 5. Micrographie électronique de fibroblastes GM 00806.

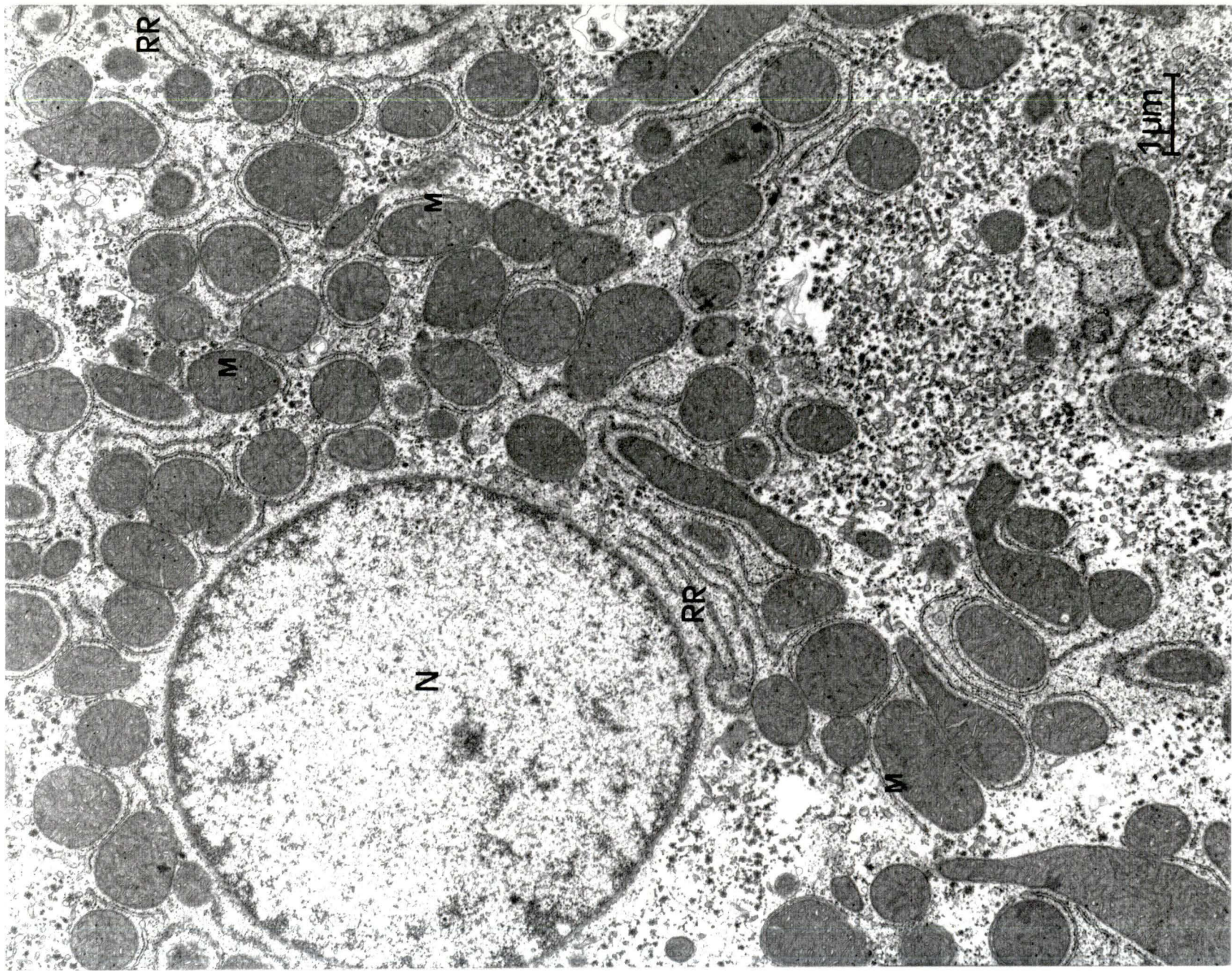
RR: réticulum rugueux; G: appareil de golgi; N: noyau; M: mitochondrie;
L: lysosome.



GM 00806

Planche 6. Micrographie électronique d'hépatocyte en culture.

RR: réticulum rugueux; N: noyau; ; M: mitochondrie;.



1) Le réticulum endoplasmique et les ribosomes libres.

Le réticulum endoplasmique des fibroblastes est la structure dominante du cytoplasme. Il est plus dilaté que dans les hépatocytes. Le nombre de ribosomes fixés sur le réticulum est grand (WI-38, CRL 1501, GM 00806). Ceci traduit une synthèse protéique intense (planches 2, 4 et 5). Dans les cellules WI-38 VA 13, les ribosomes libres prédominent. Les fibroblastes sont responsables de la synthèse de composés de la substance fondamentale du tissu conjonctif, tels: le collagène, l'élastine, les protéoglycans et les glycoprotéines (Weiss).

2) L'appareil de Golgi.

Cet organite est également plus développé dans les fibroblastes que dans les hépatocytes (planches 2 et 5). L'appareil de Golgi permet notamment la glycosylation des protéines synthétisées dans le réticulum rugueux et destinées à la membrane plasmique, aux lysosomes et à la sécrétion.

3) Le noyau.

La chromatine est condensée dans tout le noyau et cette condensation s'accroît encore au niveau de la membrane nucléaire. Le fibroblaste a 2 ou 4 nucléoles. Des figures de mitose sont visibles dans les cellules, WI-38 VA 13. Elles se remarquent plus aisément dans ces cellules transformées qui se divisent plus rapidement que les autres.

4) Les mitochondries.

Dans les fibroblastes, les mitochondries semblent beaucoup moins nombreuses que dans les hépatocytes. Elles sont plus allongées et présentent des digitations. Cela pourrait traduire une dépendance énergétique des fibroblastes orientée davantage vers la glycolyse que vers la chaîne respiratoire (Darnell, Lodish et Baltimore, 1988).

5) Les lysosomes.

Les cellules WI-38, WI-38 VA 13 et CRL 1501 montrent un aspect classique des lysosomes. Ceux-ci contiennent des substances soumises à la digestion ou des résidus indigestes. Ces résidus semblent plus abondants que dans les hépatocytes. Les lysosomes des

Comparaison des activités spécifiques de la Catalase et de la Glutathion peroxydase des fibroblastes normaux et malades.

	Poumon		Peau	
	WI-38	WI-38 VA 13	CRL 1501	GM 00806
Catalase	11,77 ± 1,21 n = 6	3,58 ± 0,76 n = 8	8,50 ± 0,78 n = 7	7,72 ± 1,35 n = 6
Glutathion peroxydase	13,03 ± 5,09 n = 4	22,79 ± 7,29 n = 7	15,35 ± 7,24 n = 4	19,31 ± 7,62 n = 4

Tableau 1. Mesures d'activités spécifiques de deux enzymes détoxifiant l' H₂O₂. Comparaison des cellules témoins (WI-38 et CRL 1501) et des cellules malades (WI-38 VA 13 et GM 00806). Les activités sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs représentent les moyennes de n déterminations accompagnées de l'écart-type.

Analyse statistique

	Catalase	Glutathion peroxydase
WI-38 — WI-38 VA 13	SSS	ns
CRL 1501 — WI-38 VA 13	SSS	ns
GM 00806 — WI-38 VA 13	SSS	ns
WI-38 — GM 00806	SSS	ns
WI-38 — CRL 1501	SSS	ns
CRL 1501 — GM 00806	ns	ns

Tableau 1-bis. SSS : P<0,001; SS : P<0,01; S : P<0,05; ns : non significatif.

cellules GM 00806 montrent un aspect typique de surcharge sous forme d'inclusions lamellaires concentrées et disposées en stries.

6) Les peroxysomes.

Dans aucune des souches de fibroblastes, nous n'avons pu repérer de structures analogues à des peroxysomes d'hépatocytes, ce qui pourrait laisser supposer qu'ils sont inexistantes ou en tous cas, peu nombreux, et de petite taille.

Deuxième partie. Etudes biochimiques.

I. Etude des enzymes détoxifiant le peroxyde d'hydrogène.

1) **Activités spécifiques de la catalase et de la glutathion peroxydase (tableau 1 et tableau 1 bis).**

Le peroxyde d'hydrogène, agent toxique (produit de façon exogène dans nos expériences, voir plus loin), peut être détruit par la catalase et par la glutathion peroxydase. Ces activités enzymatiques ont été mesurées dans des homogénats des quatre souches de fibroblastes.

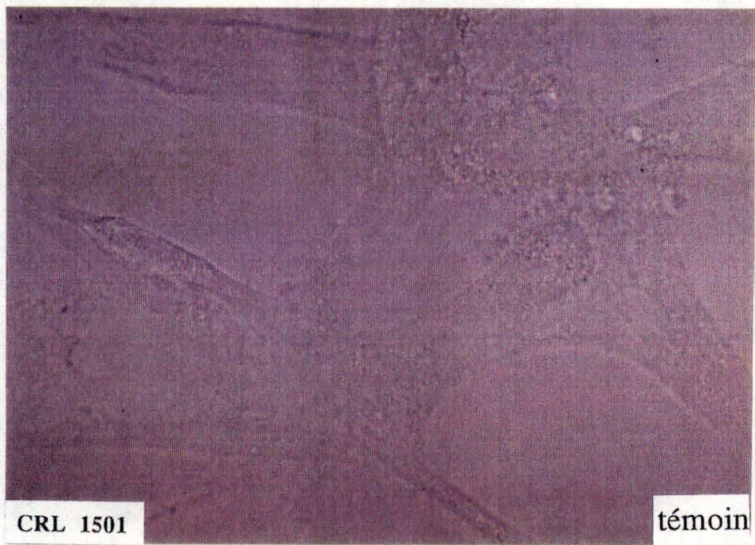
A) La catalase.

L'analyse statistique montre que les fibroblastes WI-38 contiennent une quantité de catalase significativement plus élevée que les autres types de fibroblastes (WI-38 VA 13, CRL 1501 et GM 00806). Les fibroblastes transformés (WI-38 VA 13) renferment une quantité nettement moindre que WI-38, CRL 1501 et GM 00806.

Notons que l'activité spécifique de cette enzyme, même chez les cellules normales, est très faible (de 8,50 à 11,77 mU/min.mg de protéines) comparativement à celle des hépatocytes de rat ($248,6 \pm 57,6$ mU/min.mg de protéines) (Hamer, I communication personnelle).

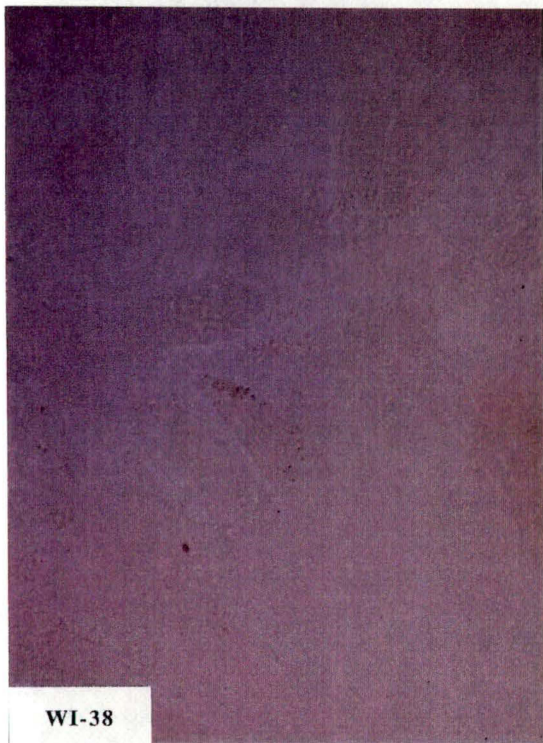
Les expériences de mise en évidence histochimique de la catalase dans les fibroblastes et dans les hépatocytes confirment les résultats biochimiques et les observations morphologiques. Alors que les hépatocytes présentent un marquage intense et punctiforme

Planche 7. Mise en évidence histochimique de la catalase de différentes souches de fibroblastes (grossissement.40.x).



CRL 1501

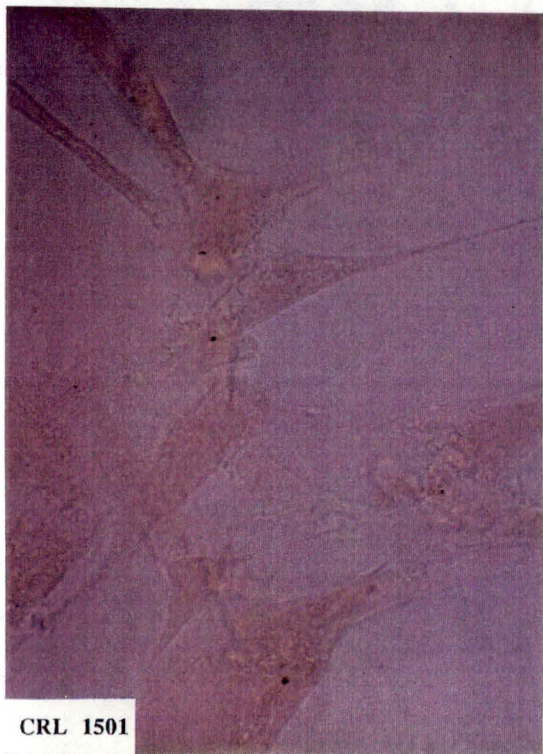
témoin



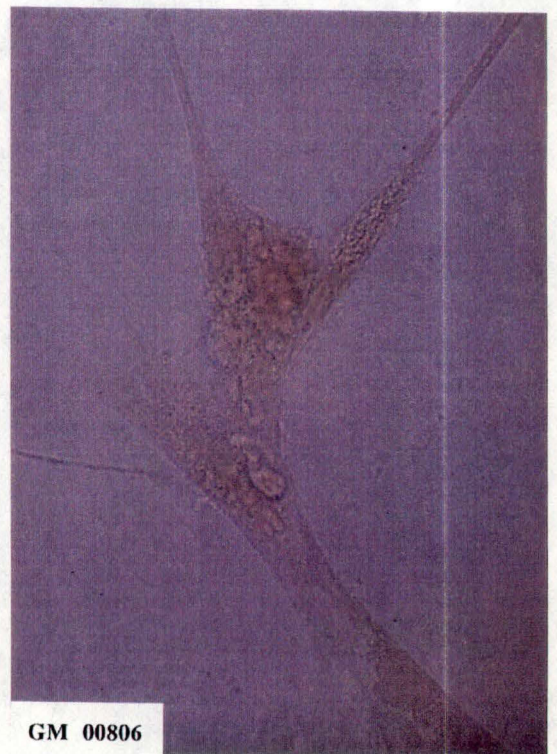
WI-38



WI-38 VA 13



CRL 1501



GM 00806

Distribution intracellulaire de la Catalase

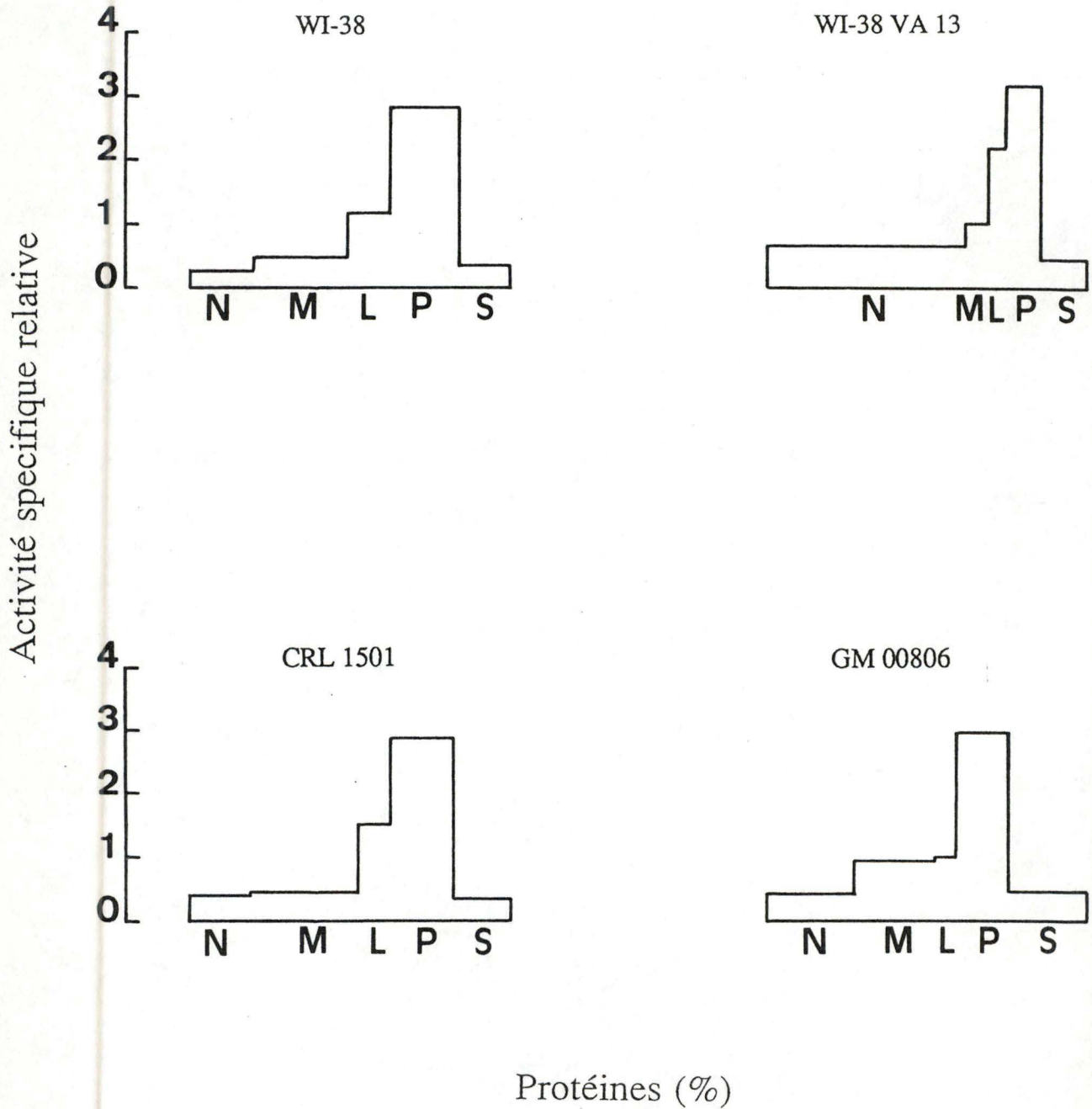


Fig. 1. Distribution intracellulaire de la Catalase après centrifugation différentielle d'homogénats de fibroblastes témoins (WI-38 et CRL 1501) et malades (WI-38 VA 13 et GM 00806). Les résultats représentent pour les cellules WI-38 et CRL 1501, les valeurs d'un seul fractionnement; pour les cellules WI-38 VA 13, les moyennes de 3 fractionnements et pour les cellules GM 00806, les moyennes de 2 fractionnements.

(résultats non montrés), les fibroblastes, (planche 7) quelle que soit la souche examinée, montrent un marquage faible mais uniforme. En microscopie électronique (résultats non montrés), on reconnaît effectivement des peroxysomes marqués dans les hépatocytes, à l'encontre des fibroblastes où aucune structure marquée n'a pu être décelée.

B) La glutathion peroxydase.

Comme le montrent les valeurs élevées de l'écart-type, les activités spécifiques de la glutathion peroxydase sont plus variables que celles de la catalase et ceci pour chaque type cellulaire. L'analyse statistique montre qu'il n'existe pas de différence significative de l'activité de cette enzyme entre les quatre souches de fibroblastes étudiés. Les activités de cette enzyme chez les fibroblastes normaux (de 13,03 à 15,35 mU/mg de protéines) sont nettement moins importantes que celles des hépatocytes ($418 \text{ mU} \pm 39,7/\text{mg}$ de protéines; $n=7$ (Hamer, communication personnelle)).

2) Distribution subcellulaire de la catalase et de la glutathion peroxydase.

A) La catalase (figure 1 et tableau en annexe 1, 2, 3 et 4).

La distribution de la catalase (figure 1) est comparable dans les quatre souches cellulaires. Cette enzyme, essentiellement sédimentable, se retrouve principalement dans la fraction P, microsomale et dans une moindre mesure, dans la fraction L. Il est à noter que le pourcentage dans la fraction S est faible, il atteint au maximum 11 %.

NB: Le contenu relatif en protéines des fractions subcellulaires, obtenues après centrifugation différentielle de l'homogénat des cellules transformées: WI-38 VA 13, est nettement différent de celui obtenu pour les trois autres souches. Nous interprétons cette différence comme étant le reflet de l'extrême fragilité des cellules lors de l'homogénéisation et d'un rapport noyau/cytoplasme plus élevé que dans les cellules normales.

B) La glutathion peroxydase (Figure 2 et tableau en annexe 1, 2, 3 et 4).

La distribution de la glutathion peroxydase (figure 2) est également quasi identique pour les quatre souches de fibroblastes. Elle est bimodale, on la retrouve à la fois dans les fractions sédimentables M et L et dans la fraction non sédimentable S.

Distribution intracellulaire de la Glutathion peroxydase

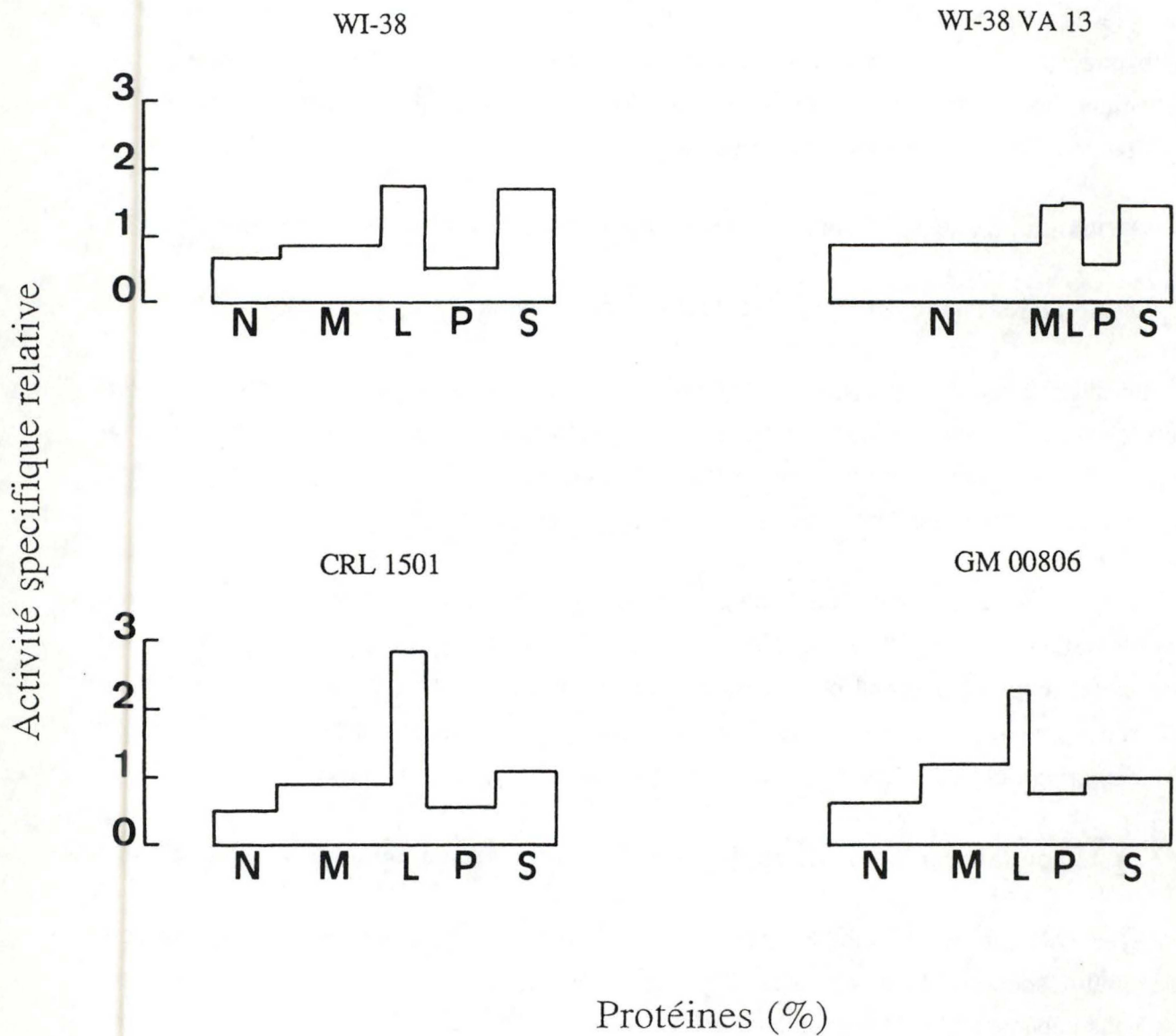


Fig. 2. Distribution intracellulaire de la Glutathion peroxydase après centrifugation différentielle d'homogénats de fibroblastes témoins (WI-38 et CRL 1501) et malades (WI-38 VA 13 et GM 00806). Les résultats représentent pour les cellules WI-38 et CRL 1501, les valeurs d'un seul fractionnement; pour les cellules WI-38 VA 13, les moyennes de 3 fractionnements et pour les cellules GM 00806, les moyennes de 2 fractionnements.

3) Discussion

A) La catalase.

Selon Tulkens *et al.* (1974) qui ont étudié des fibroblastes d'embryon de rat, il n'existerait pas, dans ces cellules, de preuve biochimique de l'existence de peroxysomes analogues à ceux décrits dans le foie et le rein. Dans ces organes, les peroxysomes contiennent un nombre élevé d'oxydases produisant de l'eau oxygénée, enzymes qui n'ont pu être détectées chez les fibroblastes. L'activité catalasique étant cependant essentiellement sédimentable, il conviendrait, selon ces auteurs de parler d'**organites porteurs de catalase**. Remacle *et al.* (1980), analysant des fibroblastes de poumon humain WI-38, signalent aussi l'existence d'organites porteurs de catalase.

Les résultats que nous avons obtenus pour les quatre souches de fibroblastes humains sont en accord avec cette idée: la catalase est sédimentable, la morphologie ne permet pas de détecter des peroxysomes classiques, après marquage histochimique. De plus, l'activité spécifique de la catalase, dans ces quatre souches de fibroblastes, est environ 100 fois plus faible que dans les hépatocytes.

L'activité spécifique de la catalase est légèrement plus faible dans les fibroblastes normaux de peau (CRL 1501) que dans les fibroblastes normaux de poumon. Ceci pourrait traduire une meilleure défense de ces derniers qui se trouvent, *in situ*, en présence d'un taux d'oxygène plus élevé.

B) La glutathion peroxydase.

Les activités spécifiques de la glutathion peroxydase présentent une très grande variabilité d'une culture à l'autre. Notons à ce propos que Mbemba *et al.* (1985) ont mis en évidence l'évolution de l'activité de cette enzyme dans les fibroblastes WI-38 en fonction du nombre de jours suivant la mise en culture. Cette activité passe par un maximum après 4 à 5 jours où elle est multipliée par un facteur 3 par rapport à la valeur de base. Nous n'avons pas, dans nos expériences, établi de façon systématique l'activité de la glutathion peroxydase en fonction de ce paramètre. Dans nos conditions de mesures, l'analyse statistique n'a fait apparaître aucune différence significative de l'activité spécifique de cette enzyme entre les quatre souches de fibroblastes. Comme celle de la catalase, l'activité de cette enzyme est considérablement plus faible que dans le foie.

Activités spécifiques de marqueurs enzymatiques des lysosomes et du cytosol : comparaison des fibroblastes normaux et malades

	Poumon		Peau	
	WI-38	WI-38 VA 13	CRL 1501	GM 00806
Cathepsine C	466 ± 122 n = 10	194 ± 32 n = 8	43,5 ± 17,2 n = 10	86,3 ± 8,4 n = 9
β-Galactosidase	4,37 ± 1,42 n = 11	3,27 ± 1,25 n = 8	5,47 ± 1,42 n = 10	1,18 ± 0,16 n = 11
Lactate déshydrogénase	0,124 ± 0,021 n = 4	0,276 ± 0,088 n = 7	0,203 ± 0,049 n = 4	0,188 ± 0,035 n = 6

Tableau 2. Mesures d'activités spécifiques de la cathepsine C, de la β-galactosidase (marqueurs enzymatiques des lysosomes) et de la lactate déshydrogénase (marqueur enzymatique du cytosol). Comparaison des cellules témoins (WI-38 et CRL 1501) et des cellules malades (WI-38 VA 13 et GM 00806). Les activités sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs représentent les moyennes de n déterminations accompagnées de l'écart-type.

Analyse statistique

	Cathepsine C	β-Galactosidase	LDH
WI-38 — WI-38 VA 13	SSS	S	SS
CRL 1501 — WI-38 VA 13	SSS	SS	ns
GM 00806 — WI-38 VA 13	SSS	SSS	S
WI-38 — GM 00806	SSS	SSS	ns
WI-38 — CRL 1501	SSS	ns	ns
CRL 1501 — GM 00806	SSS	SSS	ns

Tableau 2-bis. SSS : P<0,001; SS : P<0,01; S : P<0,05; ns : non significatif.

Les fibroblastes apparaissent donc comme des cellules pauvres en enzymes capables de détoxifier l' H_2O_2 .

II. Marqueurs enzymatiques et contenu en DNA des quatre souches de fibroblastes.

Nous avons déterminé sur des homogénats cellulaires :

- les activités enzymatiques spécifiques de deux marqueurs des lysosomes: la cathepsine C et la β -galactosidase, et d'une enzyme cytosolique, marqueur classique de l'intégrité de la membrane plasmique: la lactate déshydrogénase.

- le contenu en DNA, rapporté au nombre de cellules ou aux protéines totales.

1) Marqueurs enzymatiques (tableau 2 et tableau 2 bis).

A) La cathepsine C.

L'activité de cette enzyme est très variable d'une souche cellulaire à l'autre. L'analyse statistique montre qu'elle est beaucoup plus élevée dans les fibroblastes de poumon normaux ou transformés que dans les fibroblastes de peau normaux ou atteints de surcharge lysosomale. Elle est plus faible dans les cellules transformées de poumon que dans les fibroblastes de poumon témoins. Quoique réduite, cette activité est cependant plus forte dans les fibroblastes provenant d'un malade atteint de galactosialidose (GM 00806) que dans la souche témoin (CRL 1501).

B) La β -galactosidase.

Il n'existe pas de différence significative entre l'activité de la β -galactosidase de fibroblastes normaux de poumon et de peau. Les cellules transformées (WI-38 VA13) sont un peu moins riches en cette enzyme que leurs témoins (WI-38). Comme attendu, les fibroblastes GM 00806 (peau, galactosialidose) présentent une activité très réduite en β -galactosidase.

**Contenu en DNA des fibroblastes confluents
normaux et malades.**

	Poumon		Peau	
	WI-38	WI-38 VA 13	CRL 1501	GM 00806
$\mu\text{g DNA/mg de protéines}$	$37,40 \pm 4,46$	$89,93 \pm 1,57$	$37,90 \pm 2,04$	$42,14 \pm 7,48$
nombre ($\times 10^6$) de cellules/mg de protéines	$3,33 \pm 0,09$	$2,27 \pm 0,49$	$3,41 \pm 0,50$	$2,62 \pm 0,14$
$\mu\text{g DNA}/10^6$ cellules	11,23	39,61	11,11	16,08
mg de protéines/ 10^6 cellules	0,30	0,44	0,29	0,38

Tableau 3. Les valeurs représentent les moyennes de 4 déterminations accompagnées de l'écart-type.

C) La lactate déshydrogénase.

L'analyse statistique révèle deux différences significatives. Les cellules transformées (WI-38 VA 13) possèdent plus de lactate déshydrogénase que les fibroblastes témoins (WI-38) et que les cellules GM 00806 (peau, galactosialidose).

2) Contenu cellulaire en DNA (Tableau 3).

Le rapport DNA/protéines est comparable pour toutes les souches, à l'exception des cellules transformées où il est doublé. Notons, de plus, que la quantité de protéines cellulaires semble légèrement augmenter dans les deux souches pathologiques, comparées aux témoins.

3) Discussion.

A) Marqueurs enzymatiques.

Les activités spécifiques de la cathepsine C sont nettement plus élevées dans les fibroblastes originaires de poumon que dans les cellules provenant d'une biopsie de peau. Il n'est pas exclu que cette différence reflète celle des contenus en cette enzyme des deux organes. Le poumon contient environ quatre fois plus de cathepsine C que la peau (Ken McDonald et Schwabe, 1977). Toutefois, la proportion de fibroblastes dans le poumon par rapport aux autres types cellulaires (macrophages, cellules endothéliales et alvéolaires) est faible. De plus, le rôle physiologique de la cathepsine C n'étant pas clairement établi, il ne nous est pas possible de proposer une explication à cette situation.

Cette différence dans le contenu enzymatique des cellules témoins en fonction de leur origine ne se retrouve pas du tout pour la β -galactosidase. L'activité de cette enzyme décroît selon l'ordre WI-38/ 1501 > WI-38 VA 13 > GM 00806. Pour les fibroblastes GM00806, la déficience en cette activité était bien sûr attendue.

Soulignons enfin, l'activité plus élevée de la lactate déshydrogénase dans les cellules transformées (WI-38 VA 13). Celle-ci pourrait refléter un métabolisme glycolytique plus intense, ainsi qu'il est décrit pour les cellules cancéreuses (Darnell *et al.*, 1988).

**Effet du Triton X-100 sur l'activité de la Lactate
Déshydrogénase des fibroblastes normaux et malades.**

	Poumon		Peau	
	WI-38 n = 4	WI-38 VA 13 n = 7	CRL 1501 n = 4	GM 00806 n = 6
I. LDH - Triton	0,124 ± 0,021	0,276 ± 0,088	0,203 ± 0,049	0,188 ± 0,035
2.LDH + Triton X-100 0,2 %	0,611 ± 0,079	0,444 ± 0,110	0,755 ± 0,120	0,686 ± 0,223
Rapport 2/1	5,13 ± 1,63	1,69 ± 0,57	3,88 ± 1,18	3,78 ± 1,60

Tableau 4. Les activités enzymatiques sont exprimées en $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ de protéines. Les valeurs représentent les moyennes de n déterminations accompagnées de l'écart-type.

B) Contenu cellulaire en DNA.

La valeur élevée du rapport DNA/protéines, pour les cellules WI-38 VA 13 comparé à celui des autres fibroblastes, provient du fait que les cellules transformées se divisent plus rapidement que les cellules normales et que leur noyau occupe un plus grand volume.

Le nombre de mg de protéines par cellules est légèrement plus élevé pour les cellules malades: WI-38 VA13 et GM 00806. Ces dernières sont peut-être plus volumineuses que leurs témoins CRL1501 sans que cela ne soit décelable en microscopie optique.

III. Effet du Triton X-100 sur l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH).

1) Résultats.

A) Activité enzymatique spécifique de la LDH (tableau 4).

Pour chaque type cellulaire, l'activité spécifique de la LDH, mesurée sur homogénats est très nettement augmentée lorsque celle-ci est mesurée en présence de Triton X-100. Cette augmentation varie cependant d'une souche à l'autre, comme le montrent les valeurs des rapports des activités mesurées avec et sans Triton X-100. Il est plus élevé pour les cellules WI-38 de poumon que pour les fibroblastes de peau. Il est beaucoup plus faible pour les cellules transformées WI-38 VA 13.

B) Fractionnements cellulaires (figures 3 et 4 et tableau annexe 5).

1) La LDH mesurée en absence de Triton X-100.

L'activité de cette enzyme se retrouve dans toutes les fractions sédimentables (principalement N et M) mais une proportion importante se retrouve également dans la fraction non sédimentable S.

2) La LDH mesurée en présence de Triton X-100.

La distribution de l'activité de la LDH est fortement modifiée. La proportion non sédimentable est très diminuée, et l'activité se concentre principalement dans les fractions M et L.

Effet du Triton X-100 sur l'activité de la Lactate déshydrogénase des fibroblastes WI-38 et WI-38 VA 13.
Distribution intracellulaire.

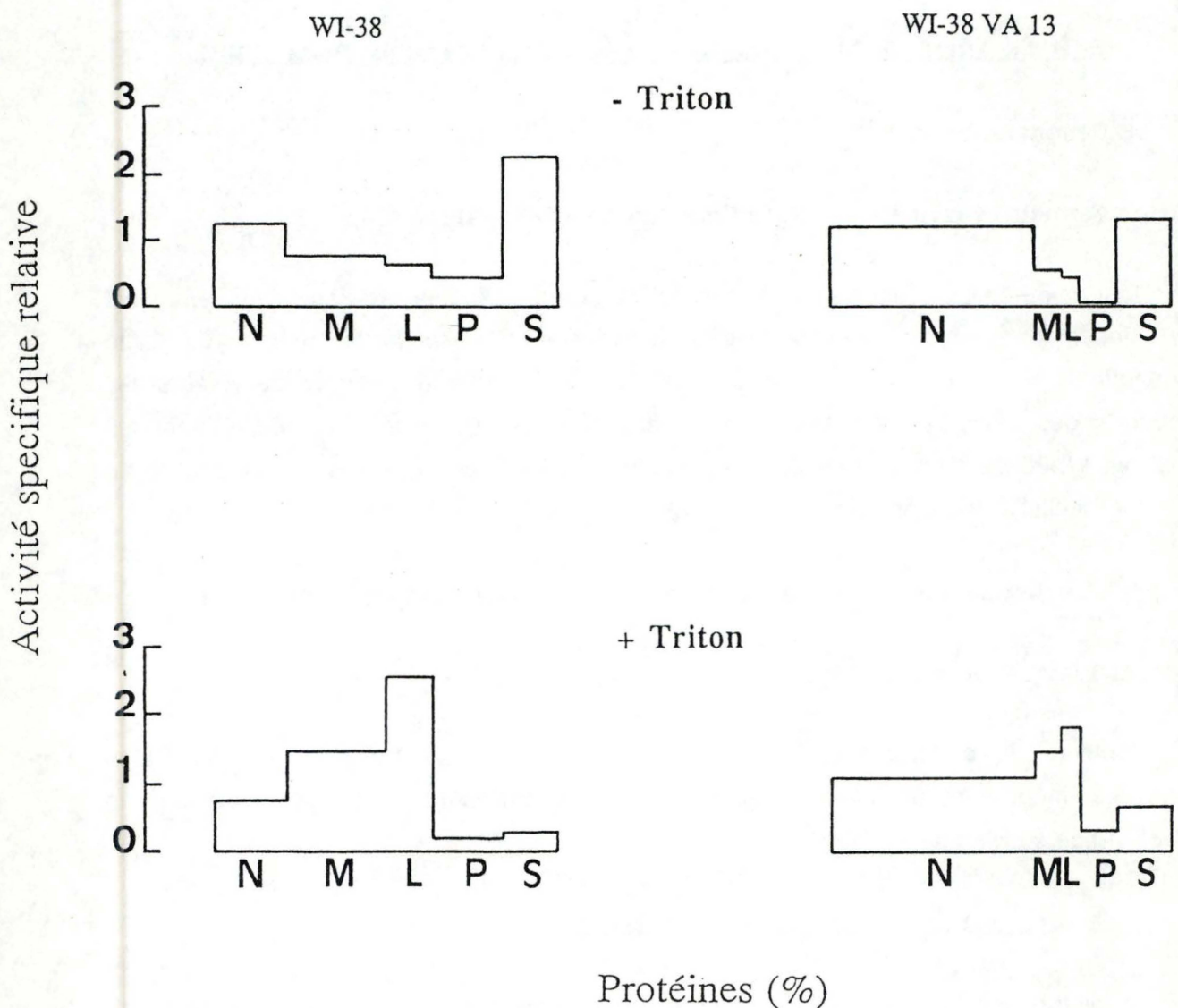


Fig. 3. Distribution intracellulaire de la Lactate déshydrogénase après centrifugation différentielle d'homogénats de fibroblastes de poumon témoins (WI-38) et malades (WI-38 VA 13). Effet du Triton X-100 (0,2 %). Les résultats représentent pour les cellules WI-38, les valeurs d'un seul fractionnement et pour les cellules WI-38 VA 13, les moyennes de 3 fractionnements.

Effet du Triton X-100 sur l'activité de la Lactate déshydrogénase des fibroblastes CRL 1501 et GM 00806.
Distribution intracellulaire.

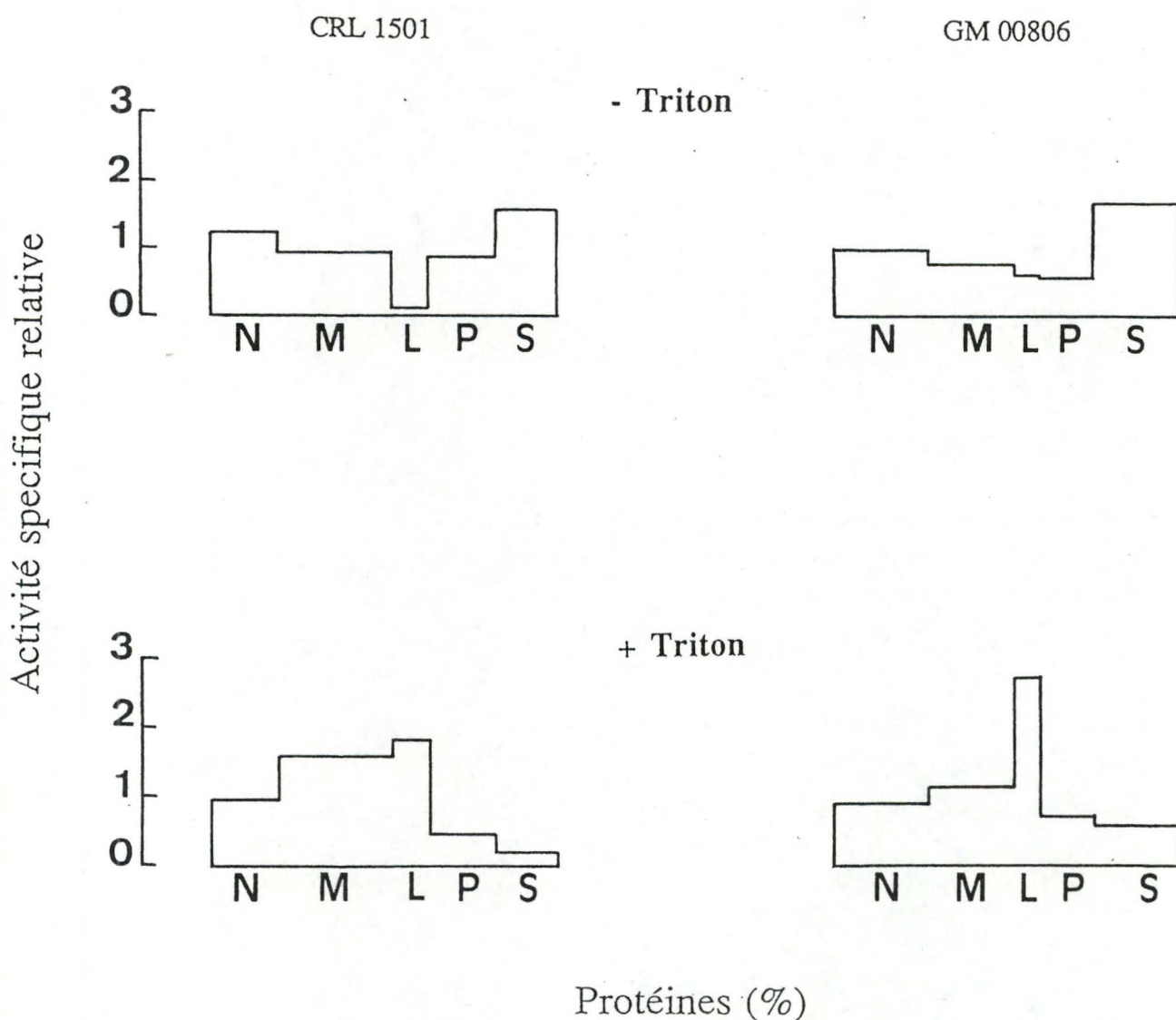


Fig. 4. Distribution intracellulaire de la Lactate déshydrogénase après centrifugation différentielle d'homogénats de fibroblastes de peau témoins (CRL 1501) et malades (GM 00806). Effets du Triton X-100 (0,2 %). Les résultats représentent pour les cellules CRL 1501, les valeurs d'un seul fractionnement, et pour les cellules GM 00806, les moyennes de deux fractionnements.

2) Discussion.

La LDH est une enzyme glycolytique, généralement décrite comme essentiellement cytosolique. La fuite de cette enzyme dans le milieu extra-cellulaire ou le milieu de culture, est, de ce fait, fréquemment utilisée comme un signe d'altération de la membrane plasmique. La distribution intracellulaire de la LDH dans les quatre souches de fibroblastes indique que cette activité, contrairement à l'attente, est largement ($\pm 50\%$) sédimentable. Cette situation nous a conduit à tester l'action d'un détergent, le Triton X-100, sur l'activité de l'enzyme. Les résultats montrent, qu'en présence de Triton X-100, l'activité mesurée est accrue et sa répartition intracellulaire modifiée.

Pour tenter d'expliquer ce phénomène, diverses hypothèses peuvent être proposées:

a) La LDH et les enzymes glycolytiques, en général, peuvent s'associer de façon réversible aux structures membranaires intracellulaires. Cette association dépend du pH, de la force ionique et/ou de la concentration de métabolites spécifiques. De telle sorte, l'état métabolique de la cellule, détermine la localisation subcellulaire de ces enzymes. Ce phénomène est probablement très important pour la régulation de la glycolyse. En effet, les enzymes adsorbées ont des propriétés cinétiques différentes des enzymes non adsorbées (Dabrowska et Gutowicz, 1986). La présence de Triton (lors de la mesure de l'activité enzymatique) pourrait modifier l'activité de certaines de ces enzymes adsorbées.

b) Le sérum de veau fœtal additionné dans le milieu de culture contient de la LDH. Cette enzyme pourrait être endocytée au cours de la culture cellulaire et devenir, de ce fait, sédimentable. Cette partie de la LDH sédimentable serait, dans ce cas, d'origine exogène. Le Triton X-100 libérerait cette activité latente dans les lysosomes. Une endocytose spécifique de la LDH par les cellules de Kupffer est décrite dans le foie de rat (Smit *et al.* 1987).

c) La LDH serait une enzyme partiellement mitochondriale localisée soit dans la matrice (spermatozoïdes, Montamat *et al.* 1988) soit dans l'espace intermembranaire et dans la membrane externe (foie de rat, Kline *et al.* 1986) soit à la surface externe de la membrane interne (foie de rat, Skilleter *et al.* 1972) soit encore à la surface externe des mitochondries (foie de rat, Brdiczka *et al.* 1973). Une localisation mitochondriale de la LDH pourrait éventuellement exister également dans les fibroblastes et ne serait libérée que sous l'action du détergent. L'activité sédimentable mesurée en présence de Triton X-100 nous semble cependant trop importante que pour représenter uniquement une activité spécifiquement mitochondriale.

Effets d'un renouvellement de milieu, avec ou sans sérum, sur le contenu en protéines et sur les activités enzymatiques des fibroblastes confluents.

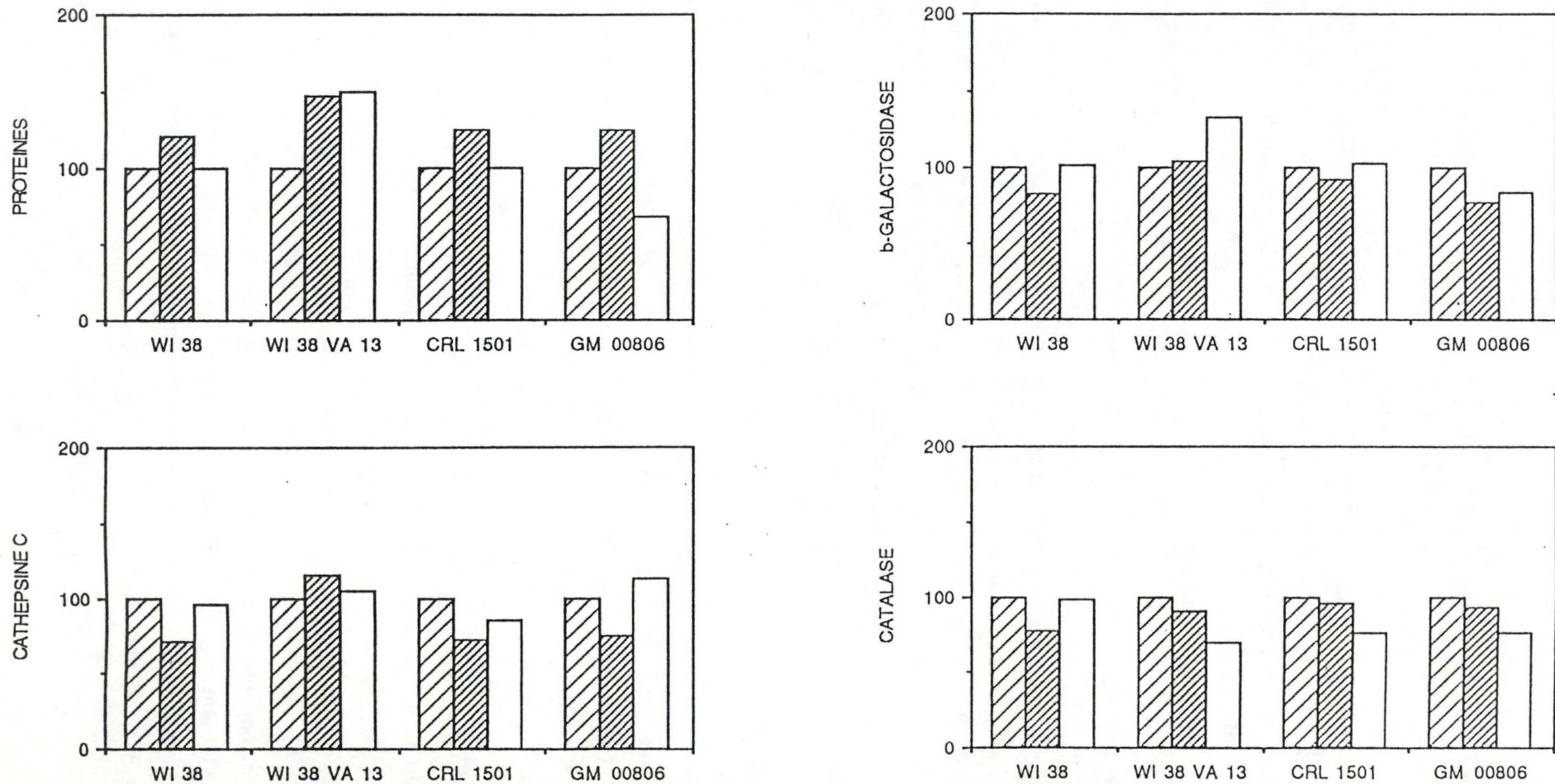





Fig. 5. Les cellules confluentes sont maintenues 24 h. 1: dans le milieu initial  ; 2: dans du milieu frais additionné de sérum (10 %)  ; 3: dans du milieu frais dépourvu de sérum  . Les activités enzymatiques sont calculées en mU/mg de protéines. Les résultats représentent les moyennes de 2 expériences et sont exprimés en pour-cent de l'activité des cellules maintenues dans le milieu 1.

d) Dans le muscle squelettique, beaucoup, si pas tous les enzymes glycolytiques sont associées, dans une certaine mesure, aux filaments d'actine. Clegg (1984) a montré, par immunofluorescence et en microscopie électronique, que plusieurs enzymes sont intimement associées aux filaments d'actine dans les fibroblastes. L'actine étant elle-même associée à plusieurs structures subcellulaires, il ne serait pas impossible, si cette association se maintient après homogénéisation des cellules, que certaines enzymes, dont la LDH, normalement solubles, soient sédimentables et que leurs activités soient révélées par le Triton X-100.

IV. Effet d'un renouvellement de milieu de culture, avec ou sans sérum, sur le contenu cellulaire en protéines et sur les activités enzymatiques.

Avant de commencer l'étude comparative des effets du peroxyde d'hydrogène sur les différentes souches de fibroblastes, il convient de vérifier que l'absence de sérum dans le milieu n'a pas, en elle-même, de conséquence particulière sur les activités enzymatiques que nous comptons examiner. En effet, c'est dans un milieu dépourvu de sérum que l'action du peroxyde d'hydrogène sera testée. Différents éléments contenus dans le sérum (protéines, vitamines, enzymes détoxifiantes,) pourraient interférer avec l'action des dérivés actifs de l'oxygène sur les cellules.

1) Résultats (figure 5 et tableau annexe 6).

Les fibroblastes arrivés à confluence sont partagés en trois groupes. Durant 24 heures, les cellules du premier groupe sont maintenues dans leur milieu initial, celles du second reçoivent du milieu frais additionné de sérum et celles du troisième groupe reçoivent du milieu frais dépourvu de sérum. Le contenu en protéines et les activités spécifiques de la β -galactosidase, de la cathepsine C et de la catalase sont mesurés sur les homogénats provenant des trois groupes de cellules.

A) Protéines.

Pour les quatre types cellulaires, le contenu en protéines des boîtes de culture est augmenté lorsque le milieu est renouvelé par du milieu frais **contenant du sérum**.

Si les cellules ont reçu du milieu frais **dépourvu de sérum**, on ne remarque aucun effet sur le contenu en protéines des cellules témoins (WI-38 et CRL 1501). Dans les cellules transformées (WI-38 VA 13), le fait de renouveler le milieu de culture, que celui-

ci contienne ou non du sérum, provoque une augmentation de la quantité de protéines. Le changement de milieu stimule donc la synthèse de protéines ou inhibe leur dégradation. Par contre, les cellules GM 00806 semblent dépendantes de la présence de sérum, le contenu en protéines des boîtes de culture diminue nettement en son absence.

B) Enzymes lysosomales.

Les activités spécifiques de la β -galactosidase et de la cathepsine C de toutes les souches, à l'exception des cellules WI-38 VA13, diminuent légèrement lorsque le milieu renouvelé **contient du sérum**. Elles sont pratiquement inchangées lorsque le milieu renouvelé ne contient **pas de sérum** à l'exception toutefois de la β -galactosidase des fibroblastes GM 00806.

C) Catalase.

L'activité spécifique de la catalase semble diminuée lorsque le milieu est remplacé par du milieu **sans sérum** et pratiquement inchangée lorsqu'il contient du sérum sauf dans le cas des cellules témoins WI-38.

2) Discussion.

A) Protéines.

Lorsque le nouveau milieu apporté aux cellules renferme du sérum, la quantité de protéines par boîte de culture augmente. Ceci peut résulter à la fois de l'apport de nouvelles sources nutritives et de l'apport de facteurs de croissance. Une ingestion de protéines sériques par les fibroblastes est également probable. Lorsque le milieu ne contient pas de sérum, cet effet n'apparaît pas sauf chez les cellules transformées WI-38 VA 13. Peut-être celles-ci n'exigent-elles pas de facteurs de croissance exogènes (Darnell *et al.* 1988).

Les cellules provenant d'un malade atteint de galactosialidose (GM 00806) souffrent davantage de l'absence de sérum que les autres fibroblastes.

B) Enzymes lysosomales.

La baisse systématique de l'activité spécifique des enzymes, lorsque le nouveau milieu contient du sérum, est normale si les activités absolues restent stables alors que les protéines totales augmentent.

C) Catalase.

Notons enfin, qu'en **absence de sérum**, les activités spécifiques et les activités absolues de la catalase diminuent légèrement dans tous les types cellulaires à l'exception des cellules WI-38.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que l'absence de sérum n'entraîne pas, après 24 h, de souffrance cellulaire importante et qu'il est donc possible d'analyser l'effet du peroxyde d'hydrogène dans ces conditions expérimentales.

V. Fibroblastes humains soumis à l'action du peroxyde d'hydrogène.

La glucose oxydase (*Aspergillus niger*) est une enzyme produisant, en présence de glucose, du peroxyde d'hydrogène. Nous avons choisi d'utiliser ce système comme source d' H_2O_2 afin de tester la sensibilité des différentes souches de fibroblastes à ce dérivé actif de l'oxygène.

Nous avons, tout d'abord, tenté de définir la concentration en glucose oxydase entraînant des lésions des différents organites, mesurables au niveau des enzymes marqueurs. Cette concentration étant déterminée, nous avons multiplié les expériences et étendu le nombre d'enzymes analysées.

Les expériences sont menées comme suit :

Les cellules arrivées à confluence sont lavées trois fois par du milieu sans sérum afin d'éliminer toute trace de ce dernier.

Elles reçoivent ensuite du milieu frais dépourvu de sérum, contenant le glucose (2.5 g/l) et la glucose oxydase (de 0 à 450 mU/ml). Les homogénats cellulaires sont réalisés après 4 heures de ce traitement. Les cellules contrôles sont traitées et incubées de la même manière

Effets de l' H_2O_2 produite sous l'action de la Glucose oxydase sur les activités enzymatiques des fibroblastes WI-38

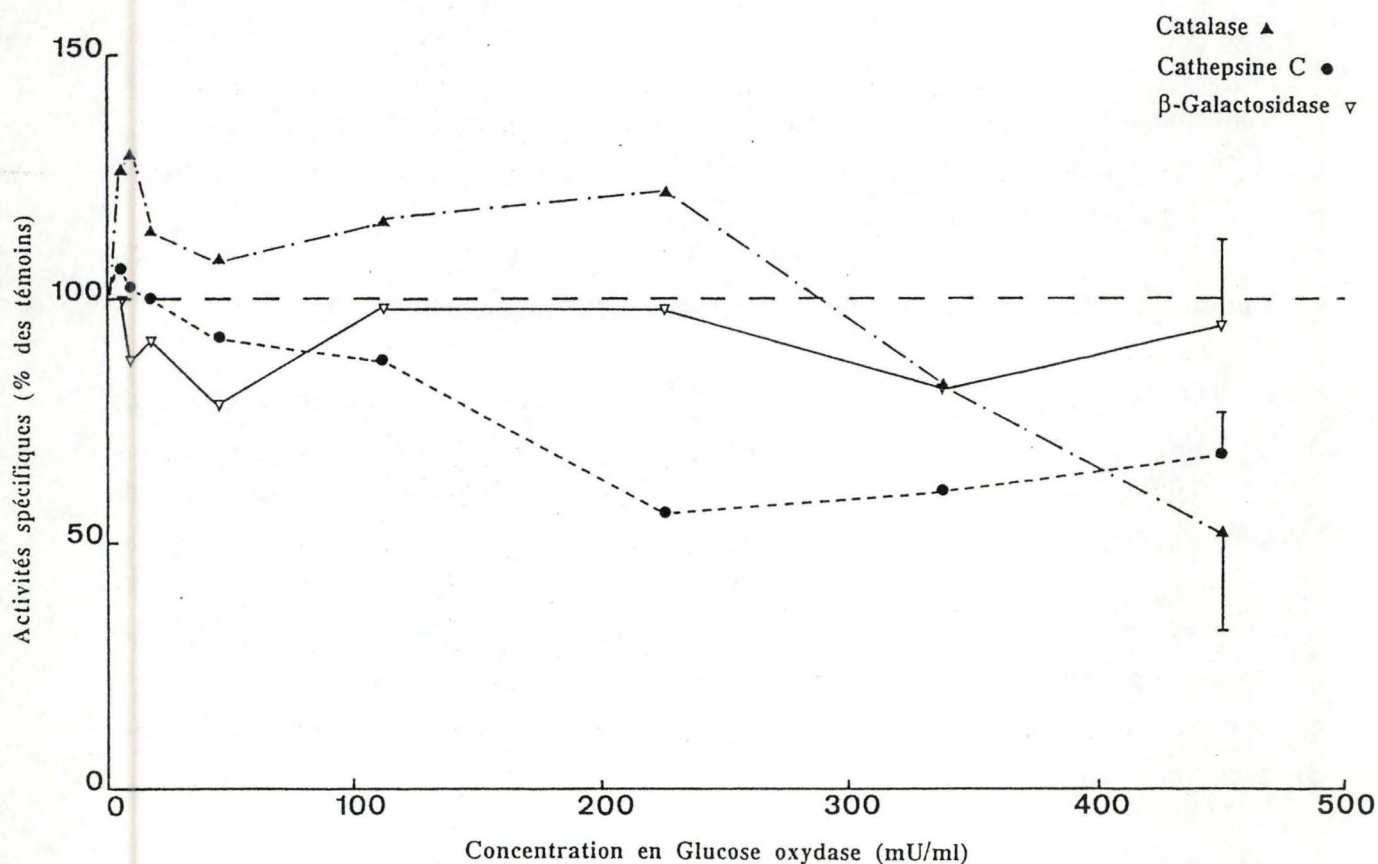


Fig. 6. Les cellules confluentes sont incubées pendant 4 h dans le milieu MEM dépourvu de sérum et additionné de Glucose oxydase (de 0 à 450 mU/ml). Les activités spécifiques des enzymes sont représentées en pour-cent de celles des cellules maintenues en absence de Glucose oxydase. Les résultats sont ceux d'une seule expérience à l'exception des valeurs correspondant à 450 mU/ml de G. O. qui sont reprises au tableau 5.

mais en absence de glucose oxydase. Les activités spécifiques cellulaires de la β -galactosidase, de la cathepsine C et de la catalase sont mesurées.

1) Résultats (Figures 6, 7, 8 et 9).

A) Effet d'une incubation en présence de glucose oxydase (de 0 à 450 mU/ml).

En présence de glucose oxydase, la **morphologie** des monocouches de fibroblastes, observées au microscope à contraste de phase, est altérée pour toutes les sources cellulaires, mais la concentration minimale pour laquelle les cellules se rétractent varie d'un type de fibroblastes à l'autre (voir tableau ci-après). Les cellules les plus résistantes sont les WI-38 puis les CRL 1501. Les deux souches de cellules malades: WI-38 VA 13 (transformées) et GM 00806 (galactosialidose) se montrent très fragiles.

Les figures 6, 7, 8 et 9 montrent l'évolution des **activités spécifiques** de la β -galactosidase, de la cathepsine C et de la catalase en fonction de la concentration appliquée en glucose oxydase.

On constate, pour ...

- la β -galactosidase: une légère diminution pour les cellules de poumon (WI-38 et WI-38 VA 13) et les cellules témoins de peau (CRL 1501), une diminution beaucoup plus importante pour les cellules surchargées GM 00806.

- la **cathepsine C**: peu ou pas de diminution pour les fibroblastes transformés WI-38 VA 13, une baisse importante pour les autres cellules, croissante dans l'ordre WI-38, CRL1501, GM 00806.

- la **catalase**: chez les cellules de poumon (témoins et transformées) une augmentation de l'activité suivie d'une baisse progressive, plus marquée pour les témoins WI-38. Pour les fibroblastes de peau, cette augmentation n'existe quasi pas, mais la baisse progressive de l'activité est comparable.

Le tableau ci-dessous reprend de façon simplifiée les résultats morphologiques et ceux des figures 6, 7, 8 et 9.

Effets de l' H_2O_2 produite sous l'action de la Glucose oxydase sur les activités enzymatiques des fibroblastes WI-38 VA 13

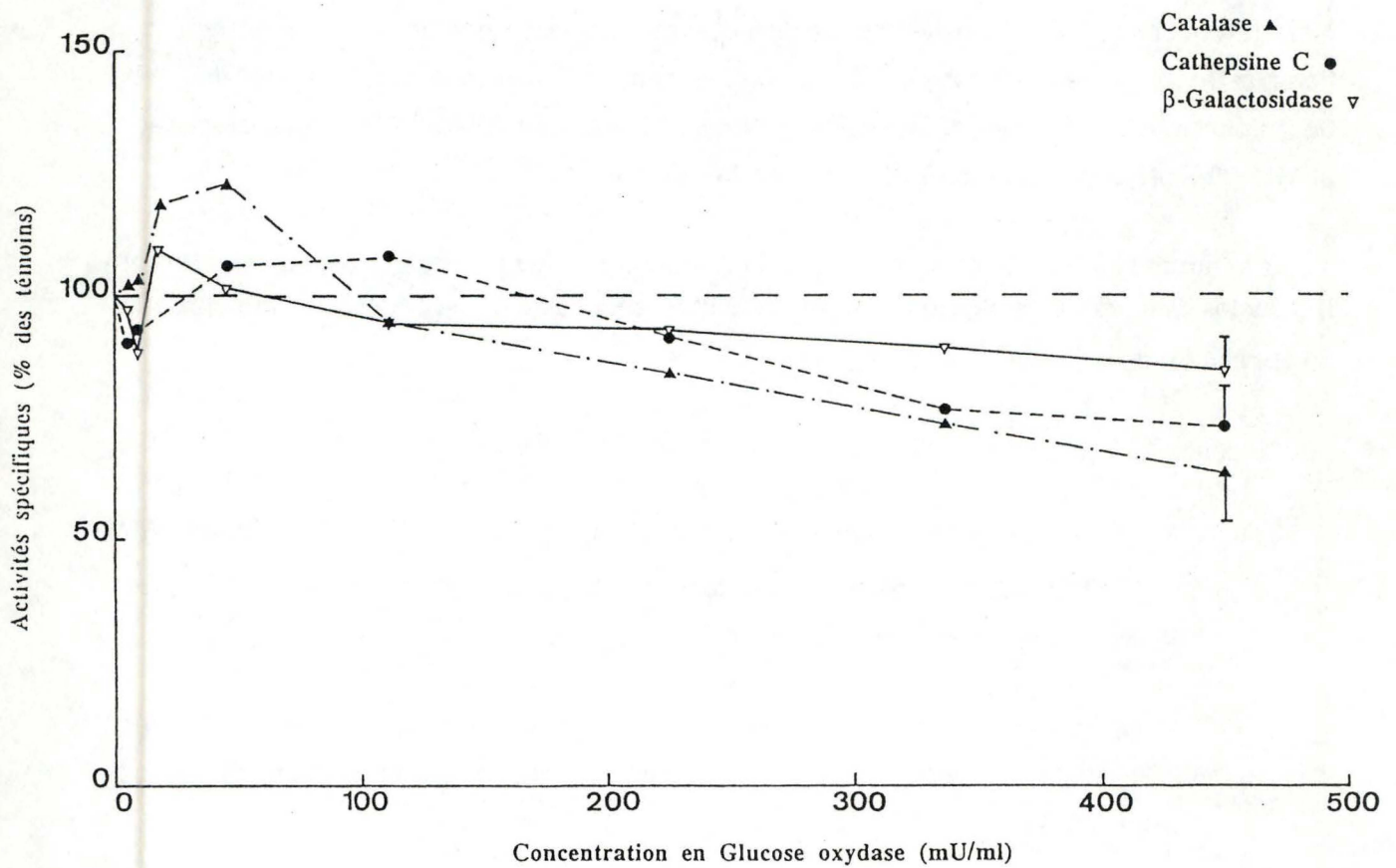


Fig. 7. Les cellules confluentes sont incubées pendant 4 h dans le milieu MEM dépourvu de sérum et additionné de Glucose oxydase (de 0 à 450 mU/ml). Les activités spécifiques des enzymes sont représentées en pour-cent de celles des cellules maintenues en absence de Glucose oxydase. Les résultats sont ceux d'une seule expérience à l'exception des valeurs correspondant à 450 mU/ml de G. O. qui sont reprises au tableau 5.

Concentration en glucose oxydase (en mU/ml) provoquant :	WI-38	WI-38 VA 13	CRL 1501	GM 00806
... une rétraction cellulaire	225	18	112,5	18
... une chute de l'activité spécifique d'enzymes d'au moins 20 % β-Galactosidase	-	-	62	62
Cathepsine C	225	337	225	62
Catalase	450	337	337	225

1) Aspect morphologique.

La rétraction cellulaire se manifeste déjà à faible concentration, ce qui traduirait une atteinte très précoce du cytosquelette et/ou de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes témoins sont nettement moins fragiles que les fibroblastes malades.

2) Les enzymes.

Les enzymes lysosomales des fibroblastes provenant d'un malade atteint de galactosialidose (GM 00806) sont nettement plus fragiles que celles des autres souches examinées. Ceci pourrait s'interpréter comme une conséquence de la surcharge lysosomale. Notons que la diminution de l'activité spécifique du tapis cellulaire peut, dans tous les cas, représenter à la fois une dénaturation de l'enzyme et/ou une libération de celui-ci dans le milieu de culture.

La catalase semble subir, pour de faibles concentrations en glucose oxydase et donc en H₂O₂, une légère activation dans les deux souches de cellules de poumon. Ce fait pourrait traduire une protection de l'enzyme par son substrat (Leighton 1968). Pour des concentrations plus élevées en glucose oxydase, l'activité de la catalase est réduite dans toutes les souches de fibroblastes.

Effets de l' H_2O_2 produite sous l'action de la Glucose oxydase sur les activités enzymatiques des fibroblastes CRL 1501

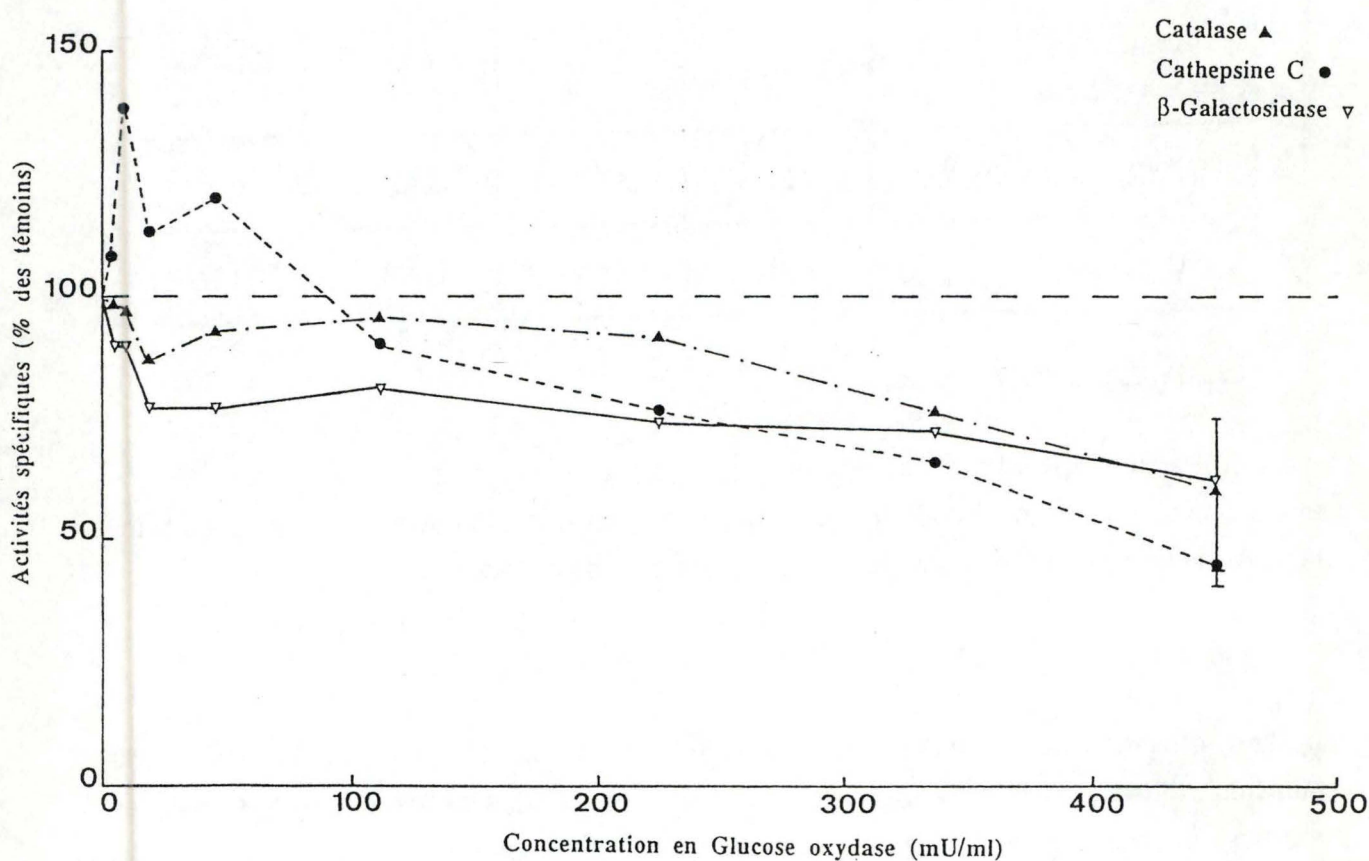


Fig. 8. Les cellules confluentes sont incubées pendant 4 h dans le milieu MEM dépourvu de sérum et additionné de glucose oxydase (de 0 à 450 mU/ml). Les activités spécifiques des enzymes sont représentées en pour-cent de celles des cellules maintenues en absence de glucose oxydase. Les résultats sont ceux d'une seule expérience à l'exception des valeurs correspondant à 450 mU/ml de G. O. qui sont reprises au tableau 5.

Effets de l' H_2O_2 produite sous l'action de la Glucose oxydase sur les activités enzymatiques des fibroblastes GM 00806

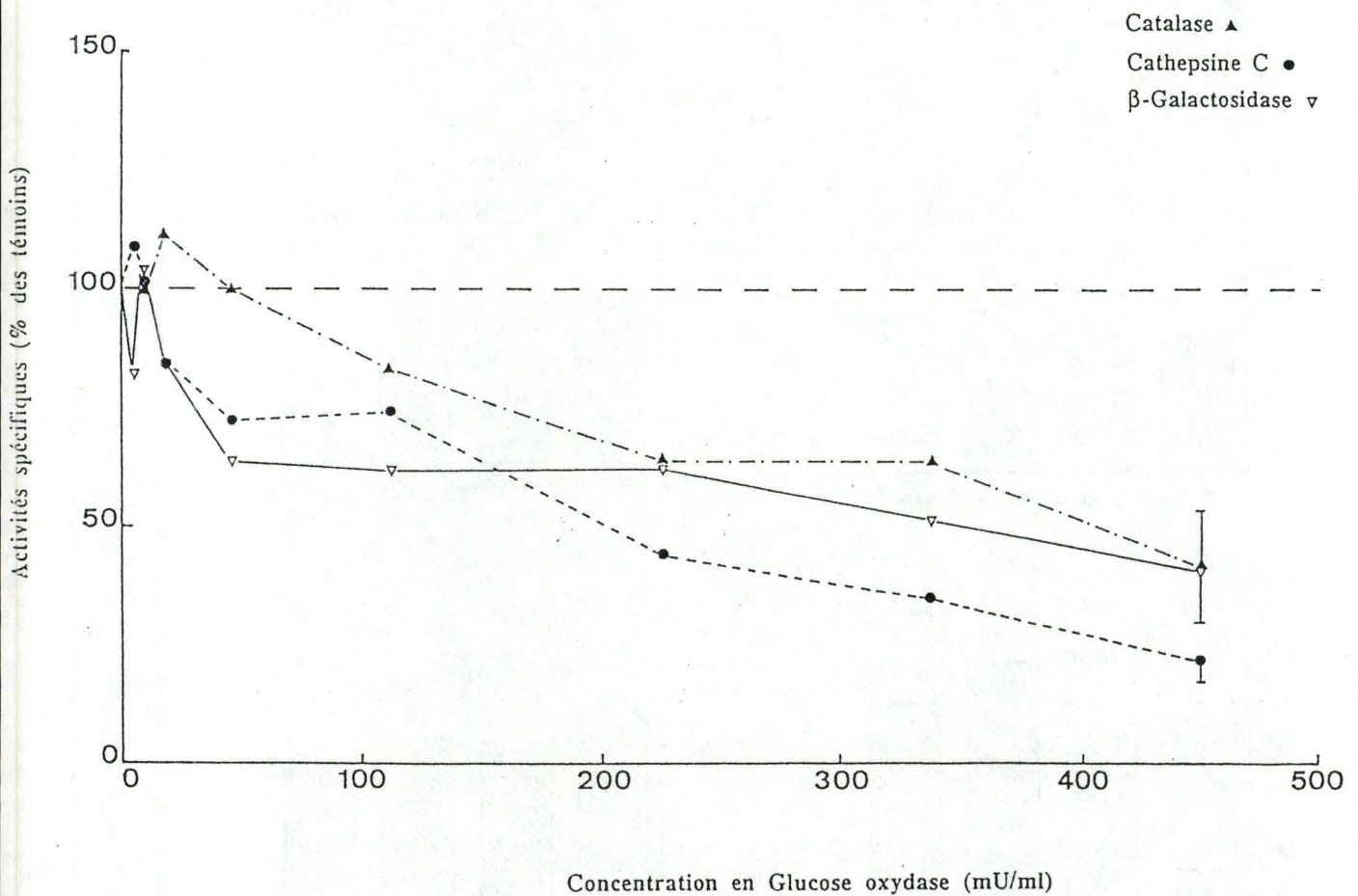


Fig. 9. Les cellules confluentes sont incubées pendant 4 h dans le milieu MEM dépourvu de sérum et additionné de glucose oxydase (de 0 à 450 mU/ml). Les activités spécifiques des enzymes sont représentées en pour-cent de celles des cellules maintenues en absence de glucose oxydase. Les expériences représentent les moyennes de deux expériences. Les valeurs représentent les moyennes des résultats de deux expériences à l'exception de celles correspondant à 450 mU/ml de G.O. (moyennes de n déterminations reprises au tableau 5).

Effets de l'H₂O₂ produite sous l'action de la Glucose Oxydase (450 mU/ml) sur les activités enzymatiques des fibroblastes normaux et malades.

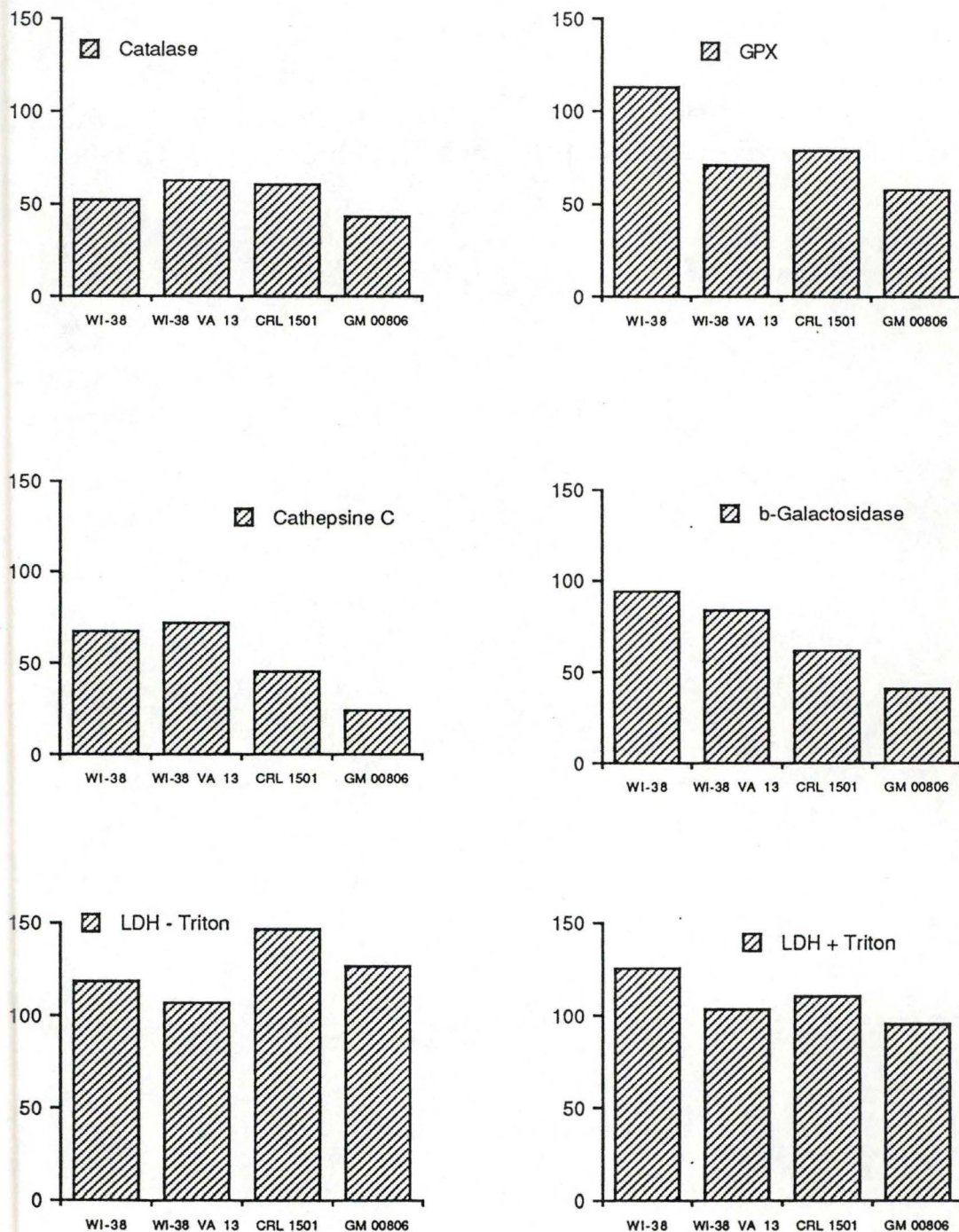


Fig. 10. Les cellules confluentes sont incubées pendant 4 h dans le milieu MEM dépourvu de sérum, additionné de glucose oxydase (450 mU/ml) Les activités spécifiques des enzymes sont représentées en pour-cent de celles des cellules maintenues en l'absence de glucose oxydase. Les valeurs représentent les moyennes de n déterminations (voir tableau 5).

B) Action de la glucose oxydase (450 mU/ml) après quatre heures d'incubation.

Nous avons multiplié les expériences d'analyse des effets de l' H_2O_2 produit sous l'action de la glucose oxydase à la plus forte concentration: 450 mU/ml. Les activités spécifiques de la β -galactosidase, de la cathepsine C et de la lactate déshydrogénase ont été mesurées à la fois sur les homogénats cellulaires et le milieu de culture. Les activités spécifiques de la catalase et de la glutathion peroxydase n'ont été mesurées que sur les homogénats.

1) Activités spécifiques du tapis cellulaire (Fig. 10 et tableaux 5bis).

a) La catalase.

Pour chaque type cellulaire, l'activité de la catalase est réduite. L'analyse statistique ne révèle aucune différence significative entre les différentes souches.

b) La glutathion peroxydase (GPX).

On observe une diminution du contenu en glutathion peroxydase pour tous les types de fibroblastes, à l'exception des cellules WI-38. Si l'on compare les souches entre elles, la seule différence significative est la suivante: l'enzyme des fibroblastes de poumon (WI-38) résiste mieux à l'action de l' H_2O_2 que celle des cellules surchargées (GM-00806).

c) La cathepsine C.

On constate une diminution de l'activité de cette enzyme dans tous les types cellulaires sous l'action de l' H_2O_2 . Lorsque l'on compare cette diminution dans les différentes souches, l'analyse statistique montre que l'activité de la cathepsine C des fibroblastes de poumons (transformés ou non) est beaucoup plus résistante à l'action de l' H_2O_2 que la cathepsine des fibroblastes de peau (surchargés ou non).

d) La β -galactosidase.

Une diminution de l'activité spécifique de la β -galactosidase s'observe pour tous les types cellulaires, sauf pour les cellules WI-38. Lorsque l'on compare les différentes souches entre elles, il apparaît que le taux de cette enzyme reste plus élevé après action de l'eau oxygénée sur les fibroblastes de poumon (WI-38 et WI-38 VA 13) que sur les fibroblastes

**Effets de l'H₂O₂ produite sous l'action de la Glucose Oxydase
(450 mU/ml) sur les activités enzymatiques des fibroblastes
normaux et malades.**

		Poumon		Peau	
		WI-38	WI-38 VA 13	CRL 1501	GM 00806
Catalase	-	100 %	100 %	100 %	100 %
	+	52 ± 16 (n = 3)	63 ± 10 (n = 4)	60 ± 16 (n = 4)	43 ± 12 (n = 5)
Glutathion peroxydase	-	100 %	100 %	100 %	100 %
	+	113 ± 36 (n = 3)	71 ± 9 (n = 3)	79 ± 15 (n = 4)	58 ± 23 (n = 4)
Cathepsine C	-	100 %	100 %	100 %	100 %
	+	68 ± 8 (n = 3)	72 ± 8 (n = 4)	45 ± 5 (n = 4)	24 ± 5 (n = 5)
β-Galactosidase	-	100 %	100 %	100 %	100 %
	+	94 ± 18 (n = 3)	84 ± 7 (n = 4)	62 ± 12 (n = 4)	41 ± 11 (n = 5)
Lactate déshydrogénase - Triton X-100	-	100 %	100 %	100 %	100 %
	+	119 (n = 2)	107 (n = 2)	146 ± 37 (n = 3)	127 ± 62 (n = 4)
Lactate déshydrogénase + Triton X-100	-	100 %	100 %	100 %	100 %
	+	126 (n = 2)	103 (n = 2)	110 ± 35 (n = 3)	95 ± 15 (n = 4)

Tableau 5. Les cellules confluentes sont incubées pendant 4 h dans le milieu MEM dépourvu de sérum, additionné (+) ou non (—) de glucose oxydase (450 mU/ml) Les activités spécifiques des enzymes sont exprimées en mU/mg de protéines. Les pourcentages sont calculés par rapport aux activités des cellules maintenues en l'absence de glucose oxydase. Les valeurs représentent les moyennes de n déterminations accompagnées de l'écart-type.

Analyse statistique

	Catalase LDH- et LDH+	Glutathion peroxydase	Cathepsine C	β-Galactosidase
WI-38 — WI-38 VA 13	ns	ns	ns	ns
CRL 1501 — WI-38 VA 13	ns	ns	SSS	S
GM 00806 — WI-38 VA 13	ns	ns	SSS	SSS
WI-38 — GM 00806	ns	S	SSS	SSS
WI-38 — CRL 1501	ns	ns	SS	S
CRL 1501 — GM 00806	ns	ns	SS	S

Tableau 5-bis. SSS : P<0,001; SS : P<0,01; S : P<0,05; ns : non significatif.

de peau (CRL 1501 et GM 00806). L'enzyme des fibroblastes GM 00806 (galactosialidose), déjà très déficiente, est encore plus labile que celle des fibroblastes de peau témoins.

e) La lactate déshydrogénase (avec ou sans Triton X 100).

L'augmentation apparente de l'activité spécifique de la LDH n'est significative pour aucune des lignées cellulaires, de même qu'il n'y a aucune différence d'une souche à l'autre.

2) Activités enzymatiques libérées dans le milieu de culture (figure 11 et tableau annexe 7).

Les différentes activités enzymatiques (catalase et GPX exceptées) ont été mesurées dans le milieu cellulaire et rapportées à la totalité de ce milieu, puis exprimées en pour-cent de l'activité du tapis cellulaire correspondant.

a) La cathepsine C.

L'activité de cette enzyme dans le milieu de culture est très faible, pour tous les types cellulaires, qu'il s'agisse des cellules témoins ou des cellules traitées par la glucose oxydase. Sauf chez les fibroblastes transformés (WI-38 VA 13), la libération de cette enzyme est légèrement accrue après action de l' H_2O_2 .

b) La β -galactosidase.

Le taux de β -galactosidase dans le milieu de culture des cellules témoins est très nettement supérieure à celle de la cathepsine C. Celui-ci s'accroît de manière importante après action du peroxyde d'hydrogène, sauf dans le cas des cellules WI-38 VA 13.

c) La lactate déshydrogénase (avec et sans triton X-100).

Aucune différence significative n'a pu être montrée, entre l'activité de la LDH dans le milieu de culture que les cellules aient été ou non soumises à l'action de l' H_2O_2 .

Effets de l' H_2O_2 produite sous l'action de la Glucose Oxydase (450 mU/ml) sur la libération d'enzymes par les fibroblastes dans leur milieu de culture.

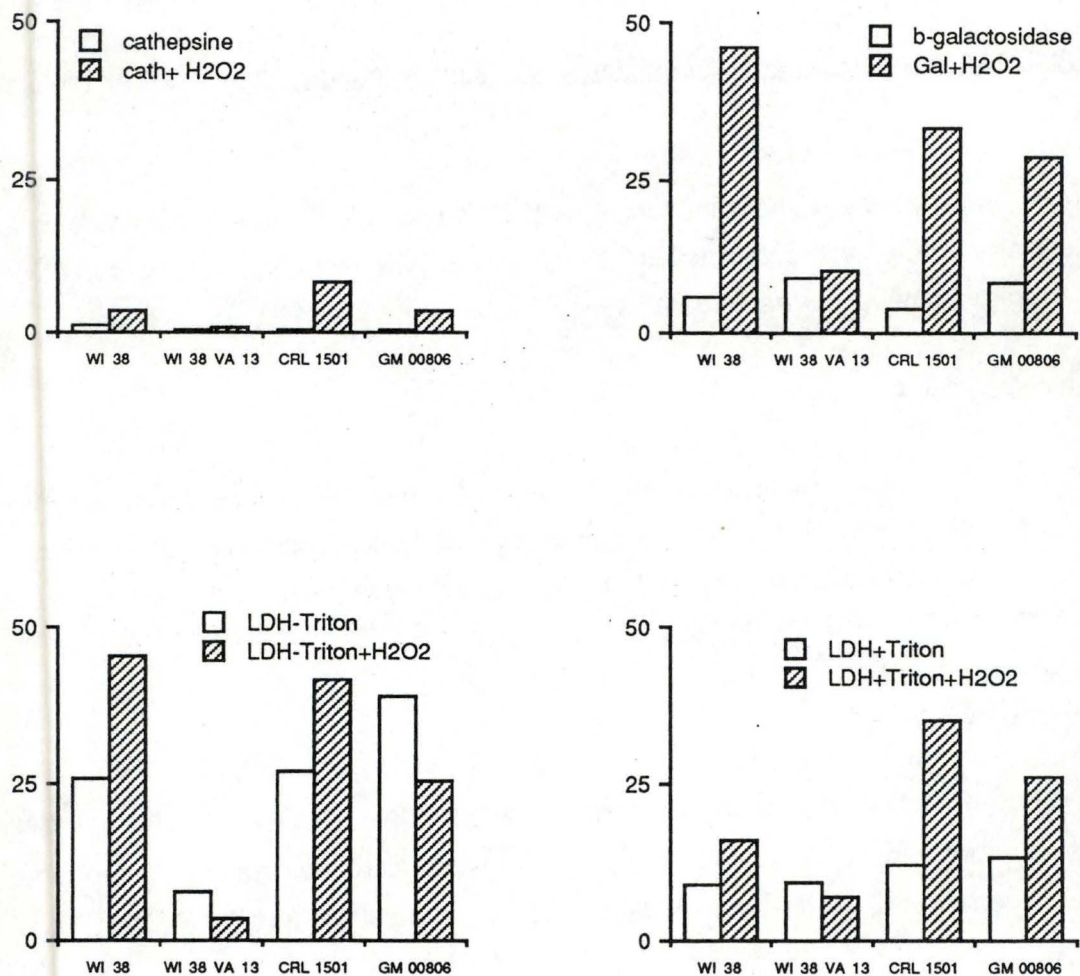


Fig. 11. Les activités enzymatiques sont mesurées dans les cellules et dans le milieu après 4 h d'incubation dans le milieu MEM dépourvu de sérum et additionné ou non de glucose oxydase (450 mU/ml). Les activités présentes dans la totalité du milieu sont exprimées en pour-cent de l'activité du tapis cellulaire et représentent les moyennes de n déterminations (voir tableau annexe 7)

2) Discussion.

A) Les enzymes lysosomales et la lactate déshydrogénase.

Pour faciliter la discussion des résultats, nous avons rassemblé (figure 12) les données obtenues sur les effets de l' H_2O_2 au niveau des activités enzymatiques des tapis cellulaires et des milieux de culture correspondants. Les valeurs sont exprimées en pour-cent du total des activités (cellules plus milieu) des cultures témoins. Il apparaît clairement :

- que l'activité spécifique de la cathepsine C est altérée par le traitement à l' H_2O_2 et que cette enzyme est plus sensible dans les cellules de peau que dans les cellules de poumon.
- que l'activité spécifique de la β -galactosidase n'est que faiblement réduite par l'eau oxygénée dans les cellules de poumon, plus significativement dans les cellules de peau et spécialement dans les fibroblastes surchargés.
- que la réduction des activités cellulaires, quand elle existe, n'est nullement compensée par une libération de l'enzyme dans le milieu de culture, même si celle-ci est accrue (β -galactosidase). Les activités totales de la cathepsine C et de la β -galactosidase sont donc réellement altérées par la présence de l' H_2O_2 . La libération plus massive de la β -galactosidase dans le milieu de culture des cellules traitées par la glucose oxydase indique de surcroît une atteinte de la membrane lysosomale.
- que l'activité de la β -galactosidase, très déficiente des cellules GM 00806 (galactosialidose) semble plus labile que celle des autres fibroblastes.

Dans aucun des cas, les activités de la lactate déshydrogénase (\pm Triton) ne se sont montrés modifiées significativement par l' H_2O_2 .

B) La catalase et la glutathion peroxydase.

A cette concentration, l'activité de la catalase est très nettement réduite dans tous les types cellulaires soumis à l'action de l' H_2O_2 sans distinction de sensibilité d'un type cellulaire à l'autre. Il s'agit d'une enzyme multimérique, hémique, il est donc facilement concevable qu'elle soit rapidement inactivée par le traitement.

Effets de l' H_2O_2 produite sous l'action de la glucose oxydase (450 mU/ml) sur les activités enzymatiques présentes dans le tapis cellulaire et dans le milieu de culture.

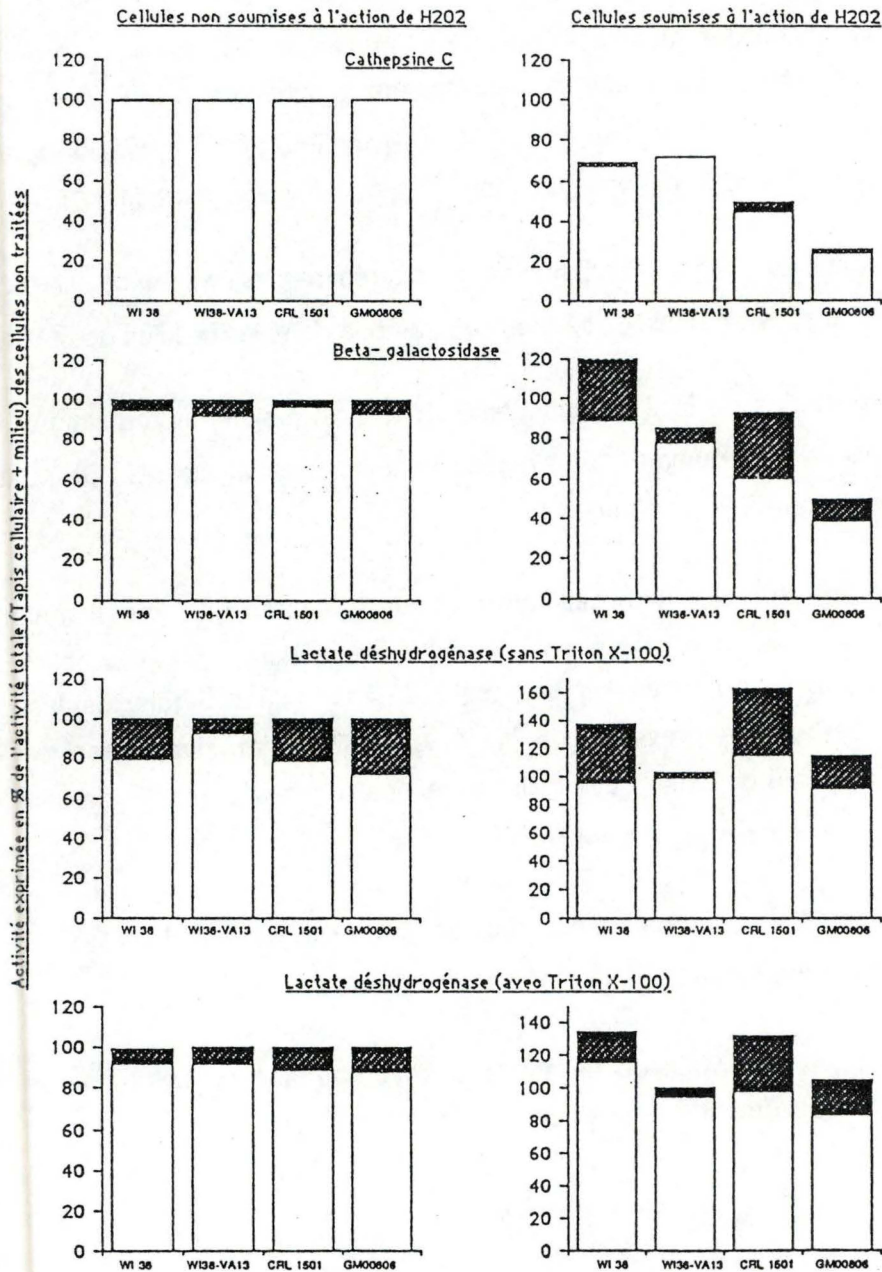


Figure 12. Les cellules confluentes sont incubées pendant 4 h dans le milieu MEM dépourvu de sérum, additionné ou non de glucose oxydase (450 mU/ml). Les activités enzymatiques sont mesurées dans les cellules et dans le milieu de culture, et rapportées à 1 mg de protéines cellulaires. Elles sont représentées en pour-cent de la somme des activités témoins présentes dans le tapis cellulaire et la totalité du milieu.
 □ : activités présentes dans le tapis cellulaire. ▨ : activités présentes dans la totalité du milieu de culture.

La glutathion peroxydase de tous les types cellulaires est sensible à l' H_2O_2 à l'exception de l'enzyme des fibroblastes WI-38. Cette enzyme tétramérique contient, à chacun des sites actifs une cystéine à sélénium, cible privilégiée des dérivés actifs de l'oxygène.

CHAPITRE 5. DISCUSSION.

Le but de ce travail est de comparer la résistance à un stress oxydatif de cellules pathologiques (cellules souffrant de surcharge lysosomale et cellules transformées) et de cellules normales.

Les cellules atteintes de surcharge lysosomale sont affligées d'un certain nombre d'anomalies sans que l'on sache pour autant lesquelles sont prépondérantes et mènent au dysfonctionnement de l'organe et à la mort de l'individu. L'accumulation de macromolécules non dégradées peut avoir comme conséquences: une synthèse des hydrolases lysosomales accélérée pour compenser les processus de dégradation insuffisants, une prolifération des cellules hétérophagiques, PMN et macrophages, induite pour essayer de compenser ce même déficit. D'autre part, la circulation sanguine locale peut être inhibée du fait de l'accumulation de cellules de taille énorme et de forme anormale. Cette hypoxie locale peut provoquer la transformation de la Xanthine déshydrogénase en Xanthine oxydase, enzyme productrice d'anion superoxyde et d'eau oxygénée. Prolifération de phagocytes et hypoxie locale produisent des dérivés actifs de l'oxygène.

Malgré les problèmes importants provoqués par les métastases dans la thérapie cancéreuse, il a été calculé que la survie des **cellules transformées** disséminées est largement en-dessous du taux de 1%. Parmi les différentes hypothèses proposées, pour expliquer ce faible taux de survie, a été retenu le fait que la mort des cellules tumorales dans les capillaires sanguins pourrait résulter de la toxicité de l'oxygène.

La toxicité des dérivés actifs de l'oxygène envers les cellules atteintes de surcharge lysosomale et les cellules transformées est, par conséquent, intéressante à étudier.

Nous avons comparé la résistance, à l'action de H_2O_2 , de cellules souffrant de surcharge lysosomale (galactosialidose, GM 00806, fibroblastes de peau), de cellules transformées (WI-38 VA 13: fibroblastes de poumon) et des cellules normales correspondantes (WI-38: fibroblastes de poumon et CRL 1501: fibroblastes de peau). Ces différents types cellulaires ont été examinés d'un point de vue morphologique et biochimique sans et après l'action du peroxyde d'hydrogène.

1. L'examen morphologique met en évidence les différences suivantes entre les différents types cellulaires:

En microscopie optique: les fibroblastes non transformés WI-38 (Fibroblastes témoins de poumon), les fibroblastes CRL 1501 (fibroblastes témoins de peau) et les fibroblastes GM 00806 (fibroblastes souffrant de galactosialidose) se disposent en un assemblage organisé lorsqu'ils arrivent à confluence.

WI-38 VA 13, fibroblastes transformés de poumon, présentent un aspect plus arrondi et se disposent de façon désordonnée. Ces fibroblastes, suite à l'immortalisation acquise lors de la transformation, peuvent être repiqués indéfiniment.

En microscopie électronique, on remarque, dans les 4 types de fibroblastes étudiés, un réticulum endoplasmique et un Golgi bien développés traduisant une synthèse intense de composés de sécrétion destinés à la substance fondamentale.

La relative rareté des mitochondries suggère un apport énergétique dû à la glycolyse plutôt qu'à la respiration.

Les lysosomes des fibroblastes GM 00806 (galactosialidose) montrent une accumulation de résidus plus importante que les lysosomes des autres types de fibroblastes, ce qui est dû au déficit simultané de β -galactosidase et d' α -neuraminidase.

Les fibroblastes ne possèdent pas de peroxysomes classiques. Ceci est confirmé par la détection cytochimique de la catalase (voir planche 7).

2. L'examen biochimique:

Les fibroblastes sont faiblement équipés en **enzymes détoxifiant le peroxyde d'hydrogène** (la glutathion peroxydase et la catalase) par comparaison avec les hépatocytes. Les fibroblastes de poumon, plus exposés à l'oxygène, ont une activité plus élevée en catalase que les fibroblastes de peau (tableaux 1 et 1 bis).

La catalase est essentiellement sédimentable, ceci est en accord avec la notion de "structures portant la catalase" (Tulkens *et al* : 1974; Remacle *et al* : 1979).

La glutathion peroxydase présente une distribution bimodale sédimentable et non sédimentable.

Les enzymes des lysosomes présentent les caractéristiques suivantes:

La cathepsine C mais non la β -galactosidase est plus élevée dans les fibroblastes normaux de poumon que de peau.

La β -galactosidase est, comme attendu, déficiente dans les fibroblastes GM 00806 provenant d'un malade atteint de galactosialidose.

La **lactate déshydrogénase** est plus importante dans les cellules WI-38 VA 13 ce qui traduit un métabolisme glycolytique plus intense. Ceci est le propre des cellules cancéreuses (Darnell et al: 1988).

La lactate déshydrogénase est décrite généralement comme étant une enzyme essentiellement cytosolique dont la libération est fréquemment utilisée comme un signe d'altération de la membrane plasmique.

Après examen de la distribution intracellulaire de cette enzyme dans les différentes souches de fibroblastes, on constate qu'elle est largement sédimentable. Après l'addition de Triton X-100, l'activité de la LDH mesurée augmente et sa répartition intracellulaire est modifiée. Le tableau suivant montre de façon résumée l'effet du Triton X-100 sur la répartition de la lactate déshydrogénase.

Fibroblastes	% de l'activité totale de la LDH			
	En absence de Triton X-100		En présence de Triton X-100	
	Non sédimentable	Sédimentable	Non sédimentable	Sédimentable
WI-38	35,68	64,32	4,86	95,14
Wi-38 VA 13	20,40	79,60	10,47	89,53
CRL 1501	27,80	72,20	3,40	96,60
GM 00806	42,53	57,47	15,48	84,52

Ces valeurs proviennent du tableau annexe 5: le % d'activité de la LDH non sédimentable dans les fibroblastes correspond au % de la fraction S, le % d'activité sédimentable à la somme des % des fractions N, M, L et P.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer le caractère sédimentable et la latence de la LDH dans les fibroblastes:

* La LDH et les enzymes glycolytiques en général peuvent s'associer de façon réversible aux structures membranaires intracellulaires. Ce phénomène est probablement très important pour la régulation de la glycolyse.

* La LDH et les enzymes glycolytiques en général peuvent s'associer de façon réversible aux structures membranaires intracellulaires. Ce phénomène est probablement très important pour la régulation de la glycolyse.

* La LDH serait endocytée à partir du milieu de culture et persisterait dans les endosomes-lysosomes.

* La LDH serait une enzyme mitochondriale. Toutefois, l'augmentation de l'activité après l'action du Triton X-100 est trop importante pour pouvoir être attribuée exclusivement à une activité mitochondriale.

* Dans le muscle squelettique, les enzymes glycolytiques sont associées aux filaments d'actine, eux-mêmes reliés à plusieurs structures subcellulaires. Ceci permet de supposer que si cette association se maintient après l'homogénéisation des cellules, certaines enzymes, dont la LDH, seraient sédimentables. Cette idée pourrait être étendue aux fibroblastes. En effet, les fibroblastes sont également très riches en actine: 10 % des protéines de ce type cellulaire sont de l'actine.

La conclusion qui s'impose est que la LDH, du moins pour les souches de fibroblastes étudiées lors de ce mémoire, ne peut en aucun cas servir de marqueur d'altération de la membrane plasmique.

3. Effet d'un renouvellement de milieu.

Le traitement au peroxyde d'hydrogène des cellules ne peut se faire en présence de sérum car celui-ci peut contenir des composés protecteurs: protéines, vitamines, enzymes détoxifiants. Il faut, de ce fait, vérifier que les différentes souches utilisées résistent à une culture **dans un milieu dépourvu de sérum** pendant le temps du traitement.

Lorsque le milieu est renouvelé avec du milieu neuf contenant du sérum, on observe une augmentation modérée de **la quantité de protéines**. Cela peut-être du: à un apport de sources nutritives, de facteur de croissance et/ou à une ingestion de protéines sériques.

Si le nouveau milieu ne contient pas de sérum, cette augmentation de protéines n'apparaît pas sauf chez les cellules transformées. Peut-être, celles-ci n'exigent-elles pas de facteur de croissance exogène. Parmi les quatre souches de fibroblastes examinées, les fibroblastes GM 00806 souffrent le plus de l'absence de sérum.

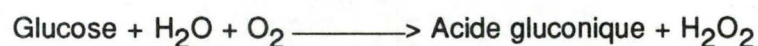
En ce qui concerne les différentes **enzymes** mesurées (β -galactosidase et cathepsine C), le renouvellement de milieu avec du milieu neuf contenant du sérum entraîne une diminution modérée de leur activité spécifique. On peut admettre que si les protéines totales augmentent

tandis que l'activité de l'enzyme reste constante, il s'ensuit une diminution de l'activité spécifique.

En résumé, un renouvellement de milieu avec du milieu neuf ne contenant pas de sérum n'entraîne pas de souffrance cellulaire importante.

4. Effet du peroxyde d'hydrogène.

La glucose oxydase (*Aspergillus niger*) a été utilisée comme source exogène du peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est produit suivant la réaction:



Nous avons testé, d'une part, une concentration croissante en glucose oxydase et donc en peroxyde d'hydrogène afin d'analyser l'évolution des dommages cellulaires et, ensuite, une série d'expériences à une concentration unique et élevée en glucose oxydase: 450 mU/ml. Ces résultats ont été analysés statistiquement. Le temps d'incubation était toujours de quatre heures.

L'examen morphologique (microscopie optique) a conduit aux observations suivantes (voir tableau A):

Les fibroblastes pathologiques (galactosialidose et transformés) sont plus fragiles que les fibroblastes normaux correspondants. Les cellules malades se rétractent à une concentration en glucose oxydase nettement plus faible que les fibroblastes normaux.

La rétraction cellulaire, conséquence de l'action du peroxyde d'hydrogène, peut résulter d'une atteinte précoce du cytosquelette et/ ou de la matrice extracellulaire.

L'interprétation de **l'examen biochimique** nécessite les préalables suivants:

1) La lactate déshydrogénase ne peut être utilisée comme preuve d'une altération de la membrane plasmique dans le cas des fibroblastes étudiés ici.

2) Les diminutions des activités spécifiques de la catalase, de la glutathion peroxydase, de la cathepsine C et de la β -galactosidase du tapis cellulaire peuvent être dues à une dénaturation de l'enzyme et/ ou une libération de celle-ci dans le milieu de culture.

Afin de simplifier la mise en mémoire des résultats obtenus, nous les avons repris dans des tableaux simplifiés (Tableaux A, B et C).

Tableau A:

Concentration en glucose oxydase (en mU/ml) provoquant :	WI-38	WI-38 VA 13	CRL 1501	GM 00806
... une rétraction cellulaire	225	18	112,5	18
... une chute de l'activité spécifique d'enzymes d'au moins 20 % β-Galactosidase	-	-	62	62
Cathepsine C	225	337	225	62
Catalase	450	337	337	225

Tableau A: résumé des résultats morphologiques et biochimiques obtenus pour une concentration variable en glucose oxydase:

Tableau B:

- * Glutathion peroxydase: WI-38 > GM 00806.
- * Cathepsine C: WI-38 / WI-38 VA 13 > CRL 1501 > GM 00806.
- * β-galactosidase: WI-38 / WI-38 VA 13 > CRL 1501 > GM 00806.

Tableau B: Comparaison de la résistance des différentes souches de fibroblastes à l'action du peroxyde d'hydrogène (Glucose oxydase: 450 mU/ml). Synthèse des tableaux 5 et 5 bis.

Est indiquée en premier lieu la souche cellulaire qui résiste le mieux au peroxyde d'hydrogène, en dernier lieu celle qui résiste le moins bien et ceci pour les différentes enzymes pour lesquelles une différence significative a pu être mise en évidence. Aucune différence significative n'a pu être montrée ni pour la catalase ni pour la lactate déshydrogénase que cette dernière enzyme ait été mesurée en présence ou en absence de Triton X-100.

A. Lorsque l'on met en jeu **une dose croissante de glucose oxydase** et donc un taux de peroxyde d'hydrogène croissant (Tableau A), il apparaît que, parmi les enzymes testées, la catalase résiste mieux à l'action du peroxyde d'hydrogène que les deux enzymes des lysosomes.

Les lysosomes des fibroblastes GM 00806 (galactosialidose) sont les plus fragiles.

B. Les résultats des expériences où **une dose unique de 450 mU/ ml de glucose oxydase** a été appliquée ont été analysés statistiquement.

Sous l'action du peroxyde d'hydrogène produit, le taux de catalase, de glutathion peroxydase, de cathepsine C et de β -galactosidase mais non de LDH diminue dans toutes les souches de fibroblastes (tableau 5).

L'action du peroxyde d'hydrogène ne met donc en évidence aucune modification de la LDH dans le tapis cellulaire. Ceci confirme la conclusion émise précédemment: pour les fibroblastes étudiés ici, la LDH ne peut être utilisée comme témoin d'une rupture de la membrane plasmique. En effet, on ne constate pas de diminution de LDH dans le tapis cellulaire ni d'augmentation significative de l'enzyme dans le milieu de culture alors que ces modifications sont observées pour la galactosialidose, enzyme séparée du milieu par deux barrières successives: la membrane lysosomale et la membrane plasmique.

Comparaison des souches de fibroblastes entre-elles:

Les lysosomes:

Sous l'action du peroxyde d'hydrogène, les lysosomes de fibroblastes de **peau** (Wi-38, WI-38 VA 13) sont plus fragiles que les lysosomes de fibroblastes de **poumon** (CRL 1501, GM 00806) (Tableau B).

Les enzymes des lysosomes subissent un abaissement plus marqué dans les fibroblastes de peau **galactosialidose** (GM 00806) que dans les fibroblastes de peau normaux.

Il n'existe pas de différence entre les lysosomes de fibroblastes normaux de **poumon transformés** (WI-38 VA 13) et **non transformés** (WI-38).

La diminution du taux des enzymes lysosomales résulte d'une rupture de la membrane lysosomale et d'une inactivation des enzymes. L'inactivation est la plus marquée pour la cathepsine C (Figure 12).

Tableau C:

* glutathion peroxydase > catalase.	S
* glutathion peroxydase > cathepsine C.	SS
* glutathion peroxydase = β -galactosidase.	ns
* catalase > β -galactosidase.	S
* catalase = cathepsine C.	ns
* β -galactosidase > cathepsine C.	SSS

Tableau C: Comparaison de la résistance des différentes enzymes à l'action du peroxyde d'hydrogène.

Les valeurs originales du tableau 5 ont été soumis à un test de Student. Est indiquée en premier lieu l'enzyme qui résiste le mieux au peroxyde d'hydrogène. La lactate déshydrogénase ne subit pas de modification significative sous l'action du peroxyde d'hydrogène.

SSS: P < 0,001; SS: P < 0,01; S: P < 0,05; ns: non significatif.

La glutathion peroxydase:

La seule différence qui ait pu être mise en évidence montre que le taux de cette enzyme diminue plus sous l'action du peroxyde d'hydrogène dans les cellules GM 00806 que dans les fibroblastes de poumon. Il est bon de rappeler que l'activité de cette enzyme varie suivant le nombre de jours de mise en culture et que ce paramètre n'a pas été examiné.

La LDH et la catalase:

L'analyse statistique n'a pu mettre en évidence de différences pour ces enzymes entre les différentes souches.

Comparaison des enzymes entre-elles (Tableau C):

Des deux enzymes détoxifiant le peroxyde d'hydrogène, la glutathion peroxydase persiste plus dans le tapis cellulaire que la catalase après action du peroxyde d'hydrogène. L'activité de cette enzyme se maintient mieux que celle de la cathepsine C. Par contre, aucune différence entre la glutathion peroxydase et la β -galactosidase n'a pu être montrée. La catalase résiste mieux que la β -galactosidase.

Globalement, les enzymes détoxifiant le peroxyde d'hydrogène résistent mieux à l'action de ce dernier que les enzymes lysosomales et plus particulièrement que la cathepsine C.

La β -galactosidase est plus stable sous l'effet de H_2O_2 que la cathepsine C.

Aucune relation n'a pu être mise en évidence entre l'activité spécifique de la glutathion peroxydase et la catalase et la résistance au peroxyde d'hydrogène. Il semble donc que c'est la surcharge lysosomale elle-même qui soit responsable de la fragilité des fibroblastes GM 00806.

Enfin, les critères biochimiques utilisés ici ont certainement trait à des altérations plus tardives que les critères morphologiques.

Chapitre 6. Bibliographie.

Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O. P., Wattiaux, R., Jacques, P. & de Duve, C., 1964.

"Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue".

Biochem. J. **92**: 179-184.

Brdiczka, D. & Krebs, W., 1973.

"Localization of enzymes by means of proteases".

Biochim. et Biophys. Acta. **297**: 203-212.

Brunck, C. F., Jones, K. C. & James, T. W., 1979.

"Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates".

Anal. Biochem. **92**: 497-500.

Clegg, J. S., 1984.

"Properties and metabolism of the aqueous cytoplasm and its boundaries".

Am. J. Physiol. **246**: 133-151.

Coming, D. E. & Okada, T. A., 1970.

"Electron microscopy of human fibroblasts in tissue culture during logarithmic and confluent stages of growth".

Experimental cell research. **61**: 295-301.

Dabrowska, A. & Gutowicz, J., 1986.

"Interaction of bovine heart lactate dehydrogenase with erythrocyte lipids".

Biochim. and Biophys. Acta. **855**: 99-104.

Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D., 1988.

"La cellule : Biologie moléculaire".

Editions Vigot.

de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F., 1955.

"Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue".

Biochem. J. **60**: 604-617.

de Duve, C., 1988.

"Une visite guidée de la cellule vivante".

Edition: De Boek Université.

Del Rio, L. A., Sandalio, L. M. & Palma, J. M., 1990.

"A new cellular function for peroxisomes related to oxygen free radicals".

Experientia **46**: 989-992.

Depelchin, A., 1987.

"Cours de microbiologie".

Chapitre 11: Les virus.

Fisher, A. B., 1987.

"Intracellular production of oxygen-derived free radicals".

Upjohn symposium 34-39.

Freeman, B. A. & Crapo, J. D., 1982.

"Free radicals and tissue injury".

Laboratory investigation. **47**: 412-422.

Fridovich, I., 1986.

"Biological effects of the superoxide radical".

Arch. of Biochem. and biophys. **247**: 1-11.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C., 1984.

"Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease".

Biochem. J. **219**: 1-14.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C., 1986.

"Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts".

Arch. Biochem. and Biophys. **246**: 501-514.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C., 1990.

"The measurement and mechanism of lipid peroxydation in biological systems".

TIBS **15**: 129-135.

Jadot, M., Colmant, C., Wattiaux-De Coninck, S. & Wattiaux, R., 1984.

"Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2 naphthylamide".

Biochem. J. **219**: 965-970.

Holtzman, E., 1989.

"Lysosomes".

Edition: Plenum Press. P: 357.

Kline, E. S., Brandt, R. B., Laux, J. E., Spainhour, S. E., Higgins, E. S., Rogers, K. S., Tinsley, S. B. & Waters, M. G., 1986.

"Localization of L-lactate dehydrogenase in mitochondria".

Arch. of Biochem. and Biophys. 246: 673-680.

Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J.W., Fowler, S. & De Duve, C., 1968.

"The large scale separation of peroxysomes mitochondria and lysosomes from the livers of rats injected with Triton WR-1339".

J. Cell Biology 37: 482.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J., 1951.

"Protein measurement with the Folin phenol reagent".

J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Mbemba, F., Houbion, A., Raes, M. & Remacle, J., 1985.

"Subcellular localization and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts".

Biochim. and Biophys. Acta. 838: 211-220.

MC Cord, J. M., 1985.

"Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury".

The New England Journal of Medicine. 312: 159-163.

Mc Donald, J. K. & Schwabe, C., 1977.

"Intracellular exopeptidases".

INBK: Proteinases in Mammalian cells and tissue, E.D: Barrett. P: 314-323.

Michiels, C. & Remacle, J., 1988.

"Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance".

J. Biochem. 177: 435-441.

Montomat, E. E., Vermouth, N. T. et Blanco, A., 1988.

"Subcellular localization of branched-chain amino acid aminotransferase and lactate dehydrogenase C₄ in rat and mouse spermatozoa".

Biochem. J. **255**: 1053-1056.

Nanba, E., Tsuji, A., Omura, K. & Suzuki, Y., 1987.

"A direct evidence that a 46- Kilodalton protein restores deficient enzyme activities in fibroblasts".

Biochem. and Biophys. Res. com. **144**: 138_142.

Peters, T. J., Müller, M. & De Duve, C., 1972.

"Lysosomes of the arterial wall".

J. Exp. Med. **136**: 1117-1139.

Remacle, J. A., Houbion, A. & Houben, A., 1980.

"Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts. Comparison between young and old cells".

Biochem. and biophys. Acta. **630**: 57-70.

Skilleter, D. N. & Kun, E., 1972.

"The oxidation of L-lactate by liver mitochondria".

Arch. Biochem. and Biophys. **152**: 92 _104.

Smit, M.J., Duursman, A.M., Bouma, J.M.W. & Gruber, M., 1987.

"Receptor-mediated Endocytosis of Lactate Deshydrogenase M₄ by Liver Macrophages: a Mechanism for Elimination of Enzymes from Plasma".

The journal of Biolog. Chem. **262**: 13020-13026.

Tulkens, P., Beaufay, H. & Trouet, A., 1974.

"Analytical fractionation of homogenates from cultured rat embryo fibroblasts".

J. Cell Biol. **63**: 383-401.

Wroblewski, F. & La Due, J.S., 1955.

"Lactic dehydrogenase activity in blood".

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **90**: 210-213.

**Distribution intracellulaire de la Catalase et de la Glutathion peroxydase
après centrifugation différentielle d'un homogénat de fibroblastes WI-38**

Fibroblastes WI-38	Activité (E+N)	N (% NMLPS)	M (% NMLPS)	L (% NMLPS)	P (% NMLPS)	S (% NMLPS)	Récup. (% de E+N)
Protéines (mg)	9,46	20,46	28,91	13,18	21,41	16,04	100,4
Catalase	9,62	5,09	13,65	15,04	60,18	6,02	95,0
Glutathion peroxydase	20,50	13,92	25,19	22,69	11,11	27,07	105,0

Tableau-Annexe 1. Les activités enzymatiques sont exprimées en mU/mg de protéines.

**Distribution intracellulaire de la Catalase et de la Glutathion peroxydase
après centrifugation différentielle d'un homogénat de fibroblastes WI-38 VA 13**

Fibroblastes WI-38 VA 13	Activité (E+N)	N (% NMLPS)	M (% NMLPS)	L (% NMLPS)	P (% NMLPS)	S (% NMLPS)	Récup. (% de E+N)
Protéines (mg)	6,94 ± 0,73	60,20 ± 3,03	7,55 ± 3,25	5,35 ± 1,98	11,04 ± 3,59	15,82 ± 3,59	99,1 ± 3,7
Catalase	3,58 ± 0,36	39,16 ± 7,58	7,57 ± 2,39	11,67 ± 3,01	34,36 ± 8,16	7,08 ± 0,62	???
Glutathion peroxydase	19,81 ± 2,25	51,54 ± 12,02	11,07 ± 4,53	7,96 ± 1,84	6,30 ± 4,20	23,06 ± 6,44	102,8 ± 2,3

Tableau-Annexe 2. Les activités enzymatiques sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs représentent les moyennes des résultats de trois fractionnements accompagnées de l'écart-type.

**Distribution intracellulaire de la Catalase et de la Glutathion peroxydase
après centrifugation différentielle d'un homogénat de fibroblastes CRL 1501**

Fibroblastes CRL 1501	Activité (E+N)	N (% NMLPS)	M (% NMLPS)	L (% NMLPS)	P (% NMLPS)	S (% NMLPS)	Récup. (% de E+N)
Protéines (mg)	11,11	18,78	33,19	10,18	19,63	18,20	94,0
Catalase	8,46	7,69	14,20	15,38	56,00	6,59	96,8
Glutathion peroxydase	10,11	9,77	30,23	29,01	11,18	19,79	99,8

Tableau-Annexe 3. Les activités enzymatiques sont exprimées en mU/mg de protéines.

**Distribution intracellulaire de la Catalase et de la Glutathion peroxydase
après centrifugation différentielle d'un homogénat de fibroblastes GM 00806**

Fibroblastes GM 00806	Activité (E+N)	N (% NMLPS)	M (% NMLPS)	L (% NMLPS)	P (% NMLPS)	S (% NMLPS)	Récup. (% de E+N)
Protéines (mg)	12,05	27,30	24,60	7,41	15,26	25,41	96,9
Catalase	8,57	12,15	23,17	7,55	45,13	11,97	96,4
Glutathion peroxydase	12,92	17,45	29,04	16,68	11,86	24,97	98,0

Tableau-Annexe 4. Les activités enzymatiques sont exprimées en mU/mg de protéines. Les valeurs représentent les moyennes des résultats de deux fractionnements.

**Effet du Triton X-100 sur l'activité de la Lactate déshydrogénase des fibroblastes normaux et malades.
Distribution intracellulaire après centrifugation différentielle de l'homogénat.**

Activité (E+N)	N (% NMLPS)	M (% NMLPS)	L (% NMLPS)	P (% NMLPS)	S (% NMLPS)	Récup. (% de E+N)
---------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------------

WI-38 n = 1							
Protéines (mg)	9,46	20,46	28,91	13,18	21,41	16,04	100,4
LDH - Triton X-100	0,141	25,00	22,15	8,08	9,06	35,68	83,7
LDH + Triton X-100 (0,2%)	0,546	14,90	42,45	33,22	4,53	4,86	101,0

WI-38 VA 13 n = 3							
Protéines (mg)	6,94 ± 0,73	60,20 ± 3,03	7,55 ± 3,25	5,35 ± 1,98	11,04 ± 3,59	15,82 ± 3,59	99,1 ± 3,7
LDH - Triton X-100	0,239 ± 0,128	72,00 ± 12,75	4,14 ± 2,84	2,51 ± 1,57	0,91 ± 0,57	20,40 ± 8,92	90,0 ± 13,8
LDH + Triton X-100 (0,2%)	0,394 ± 0,086	65,56 ± 8,79	10,89 ± 7,28	9,71 ± 4,35	3,33 ± 0,32	10,47 ± 1,34	90,6 ± 10,4

CRL 1501 n = 1							
Protéines (mg)	11,11	18,78	33,19	10,18	19,63	18,20	94,0
LDH - Triton X-100	0,272	23,30	31,20	0,99	16,60	27,80	74,0
LDH + Triton X-100 (0,2%)	0,726	18,20	51,20	18,50	8,70	3,40	99,0

GM 00806 n = 2							
Protéines (mg)	12,05	27,30	24,60	7,41	15,26	25,41	96,9
LDH - Triton X-100	0,194	26,03	18,08	4,45	8,91	42,53	80,5
LDH + Triton X-100 (0,2%)	0,415	24,48	28,21	20,41	11,32	15,48	93,5

Tableau-Annexe 5. Les activités enzymatiques sont exprimées en $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ de protéines. n représente le nombre de fractionnements effectués

Effets d'un renouvellement de milieu, avec ou sans sérum, sur le contenu en protéines et sur les activités enzymatiques des fibroblastes confluents.

	1. Milieu inchangé	2. Milieu nouveau + sérum	3; Milieu nouveau — sérum
WI-38			
Protéines/boîte	100	121	100
β -Galactosidase	100	83	101
Cathepsine C	100	71	96
Catalase	100	77	99
WI-38 VA 13			
Protéines/boîte	100	148	150
β -Galactosidase	100	104	133
Cathepsine C	100	116	105
Catalase	100	91	70
CRL 1501			
Protéines/boîte	100	125	100
β -Galactosidase	100	92	103
Cathepsine C	100	73	86
Catalase	100	96	76
GM 00806			
Protéines/boîte	100	125	69
β -Galactosidase	100	77	84
Cathepsine C	100	75	113
Catalase	100	93	76

Tableau-Annexe 6. Les cellules confluentes sont maintenues 24 h. 1: dans le milieu initial; 2: dans du milieu frais additionné de sérum (10 %); 3: dans du milieu frais dépourvu de sérum.

Les activités enzymatiques sont calculées en mU/mg de protéines. Les résultats représentent les moyennes de 2 expériences et sont exprimés en pour-cent de l'activité des cellules maintenues dans le milieu 1.

Effets de l'H₂O₂ produite sous l'action de la Glucose Oxydase (450 mU/ml) sur la libération d'enzymes par les fibroblastes dans leur milieu de culture.

		Poumon		Peau	
		WI-38	WI-38 VA 13	CRL 1501	GM 00806
Cathepsine C	-	1,18 ± 0,91	0,44 ± 0,36	0,44 ± 0,28	0,20
	+	3,48 ± 2,32 (n=3)	0,61 ± 0,37 (n=3)	8,04 ± 8,01 (n=4)	3,52 (n=2)
β-Galactosidase	-	5,77 ± 1,09	8,77 ± 3,24	3,84	8,30 ± 2,32
	+	46,2 ± 35,6 (n=3)	10,22 ± 5,36 (n=4)	33,30 (n=2)	28,84 ± 16,38 (n=5)
Lactate déshydrogénase - Triton X-100	-	25,39	7,77 ± 3,50	26,90	38,67 ± 10,49
	+	42,52 (n=2)	3,54 ± 2,93 (n=3)	41,60 (n=2)	25,29 ± 21,67 (n=4)
Lactate déshydrogénase + Triton X-100	-	8,76	9,22 ± 5,05	12,13	13,27 ± 8,09
	+	15,88 (n=2)	6,82 ± 2,87 (n=4)	34,69 (n=2)	25,9 ± 21,4 (n=3)

Tableau-Annexe 7. Les activités enzymatiques sont mesurées dans les cellules et dans le milieu après 4 h d'incubation dans le milieu MEM dépourvu de sérum et additionné (+) ou non (—) de glucose oxydase (450 mU/ml). Les activités présentes dans la totalité du milieu sont exprimées en pour-cent de l'activité du tapis cellulaire et représentent les moyennes de n déterminations accompagnées de l'écart-type