

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE**



Année 1994

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 121406 2

HESE N° 107

**ANTIOXYDANTS DANS LE LAVAGE BRONCHOALVEOLAIRE
DE PATIENTS ATTEINTS DE CANCER BRONCHIQUE
COMPARAISON AVEC DES SUJETS FUMEURS**

THESE

Pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement le 11 Février 1994

par

Marie-Anne PAUZIE épouse LEFEBVRE

née le 21 juillet 1964 à Toulouse (Haute-Garonne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur **GERMOUTY**
Monsieur le Professeur **BONNAUD**
Monsieur le Professeur **BONNETBLANC**
Monsieur le Professeur **RIGAUD**
Monsieur le Docteur **MELLONI**
Monsieur le Docteur **VERGNEGRE**

Président
Juge
Juge
Juge
Membre invité
Membre invité

ex: 2

Silil:

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE**



Année 1994

THESE N° 107

**ANTIOXYDANTS DANS LE LAVAGE BRONCHOALVEOLAIRE
DE PATIENTS ATTEINTS DE CANCER BRONCHIQUE
COMPARAISON AVEC DES SUJETS FUMEURS**

THESE

Pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine
Présentée et soutenue publiquement le 11 Février 1994

par

Marie-Anne PAUZIE épouse LEFEBVRE
née le 21 juillet 1964 à Toulouse (Haute-Garonne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur GERMOUTY	Président
Monsieur le Professeur BONNAUD	Juge
Monsieur le Professeur BONNETBLANC	Juge
Monsieur le Professeur RIGNAUD	Juge
Monsieur le Docteur MELLONI	Membre invité
Monsieur le Docteur VERGNENEGRE	Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur BONNAUD

ASSESSEURS : Monsieur le Professeur PIVA
: Monsieur le Professeur VANDROUX

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEURS DES UNIVERSITES

ADENIS Jean-Paul	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Luc	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIE
BARTHE Dominique	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BAUDET Jean	CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNECOLOGIE
BENSAID Julien	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE
BERNARD Philippe	DERMATOLOGIE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO RHINO LARYNGOLOGIE
BONNAUD François	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOULESTEIX Jean	PEDIATRIE
BOQUIER Jean-José	CLINIQUE DE PEDIATRIE
BOUTROS-TONI Fernand	BIOSTATISTIQUE ET INFORMATIQUE MEDICALE
BRETON Jean-Christian	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
CAIX Michel	ANATOMIE
CATANZANO Gilbert	ANATOMIE PATHOLOGIQUE
CHASSAIN Albert	PHYSIOLOGIE
CHRISTIDES Constantin	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel	PEDIATRIE
DENIS François	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard	ANATOMIE
DUDOGNON Pierre	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Michel	NEUROLOGIE
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE
DUMONT Daniel	MEDECINE DU TRAVAIL
DUPUY Jean-Paul	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
FEISS Pierre	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé	REANIMATION MEDICALE
GAY Roger	REANIMATION MEDICALE
GERMOUTY Jean	PATHOLOGIE MEDICALE ET RESPIRATOIRE
HUGON Jacques	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE

LABADIE Michel
LABROUSSE Claude
LABROUSSE François
LASKAR Marc
LAUBIE Bernard
LEGER Jean-Marie
LEROUX-ROBERT Claude
LIOZON Frédéric
MALINVAUD Gilbert
MENIER Robert
MERLE Louis
MOREAU Jean-Jacques
MOULIES Dominique

OUTREQUIN Gérard
PECOUT Claude
PERDRISOT Rémy
PESTRE-ALEXANDRE Madeleine
PILLEGAND Bernard
PIVA Claude
PRALORAN Vincent
RAVON Robert
RIGAUD Michel
ROUSSEAU Jacques
SAUTEREAU Denis
SAUVAGE Jean-Pierre
TABASTE Jean-Louis
TREVES Richard
VALLAT Jean-Michel
VALLEIX Denis
VANDROUX Jean-Claude
WEINBRECK Pierre

MOULIN Jean-Louis

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
REEDUCATION FONCTIONNELLE
ANATOMIE PATHOLOGIQUE
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
ENDOCRINOLOGIE ET MALADIES METABOLIQUES
PSYCHIATRIE D'ADULTES
NEPHROLOGIE
CLINIQUE MEDICALE A
HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
PHYSIOLOGIE
PHARMACOLOGIE
NEUROCHIRURGIE
CHIRURGIE INFANTILE

ANATOMIE
CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
PARASITOLOGIE
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
MEDECINE LEGALE
HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
NEUROCHIRURGIE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
THERAPEUTIQUE
NEUROLOGIE
ANATOMIE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
MALADIES INFECTIEUSES

Professeur associé à mi-temps

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Maryse POMMARET

A Gilles, mon mari

A Vincent, mon fils

A mes parents,

A mes beaux-parents,

A ma famille,

A mes amis

Avec toute mon affection.

A notre Président de Thèse,

Monsieur le Professeur **GERMOUTY**,

Professeur des Universités de Pneumologie

Médecin des hôpitaux

Chef de Service

Vous nous avez fait l'honneur de bien vouloir présider ce jury de thèse.

Pour la valeur de l'enseignement que vous nous avez dispensé et l'accueil toujours bienveillant que vous nous avez réservé,

Veillez trouver ici le témoignage de notre admiration et de notre plus profond respect.

A nos Juges,

Monsieur le Professeur **BONNAUD**,
Professeur des Universités de Pneumologie
Médecin des Hôpitaux
Doyen de la faculté de médecine

Nous sommes honorée que vous acceptiez de juger ce travail.

L'étendue de vos connaissances et votre rigueur intellectuelle, la gentillesse et la confiance que vous nous avez toujours manifestées, seront pour nous exemplaires.

Permettez nous, à cette occasion, de vous témoigner notre admiration et notre très vive reconnaissance.

Monsieur le Professeur **BONNETBLANC**,
Professeur des Universités de Dermatologie
Médecin des Hôpitaux
Chef de Service

L'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail nous a profondément touchée.

Soyez-en vivement remercié, et veuillez trouver ici le témoignage de notre très haute estime.

Monsieur le Professeur **RIGAUD**,
Professeur des Universités de Biochimie et Biologie moléculaire
Biologiste des Hôpitaux

Vous nous avez fait l'honneur de bien vouloir juger cette thèse.

Votre compétence et vos conseils nous ont été véritablement précieux tout au long de son élaboration.

Veillez trouver ici notre entière reconnaissance.

Monsieur le Docteur **MELLONI**,

Pneumologue
Praticien Hospitalier

En nous inspirant ce sujet de thèse, tu nous a permis d'aborder et d'apprécier le domaine de la recherche.

Pour ta compétence et ta rigueur intellectuelle, ta disponibilité et ta gentillesse, reçois avec ce travail le témoignage de notre très vive reconnaissance et de notre amitié.

Monsieur le Docteur **VERGNENEGRE**,

Pneumologue
Praticien Hospitalier

Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Permettez nous ici de vous témoigner notre profonde gratitude et notre amitié.

A tous ceux qui nous ont aidée :

Monsieur le Professeur BRETON,

Professeur des Universités de Biochimie
Biologiste des Hôpitaux
Chef de service

Votre contribution a été indispensable à la réalisation de ce travail.

Veillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre très haute estime.

Madame le Docteur M.T. ANTONINI

Chef de Travaux du service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire

Ton enseignement, ta gentillesse et ta disponibilité de tous les instants, nous ont beaucoup apporté.

Sois assurée de notre gratitude, et trouve ici l'expression de toute notre amitié.

Monsieur le Docteur EICHLER,
Monsieur le Docteur TOURAINÉ,

Vous avez su partager vos connaissances, et nous avez fait part de votre grande expérience.

Soyez-en vivement remerciés, et croyez à notre reconnaissance et à notre amitié sincère.

Ce travail est également pour nous l'occasion d'exprimer nos remerciements :

- au personnel des services de Pathologie Respiratoire, de la Fibroscopie Bronchique et du Laboratoire de Biochimie.
- à tous mes collègues de l'Internat de Limoges.
- à Sylvie et Françoise, secrétaires de l'unité fonctionnelle d'information médicale.

Qu'ils trouvent tous ici l'expression de notre sympathie, et du plaisir que nous avons eu à travailler avec eux.

PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE I - SYSTEME OXYDANT-ANTIOXYDANT ET POUMON

I. RAPPELS BIOCHIMIQUES

II. OXYDANTS

- 2.1. Nature des oxydants
 - 2.1.1. Métabolites dérivés de l'oxygène
 - 2.1.2. Radicaux libres et oxydants non dérivés de l'oxygène
- 2.2. Production des radicaux libres.
 - 2.2.1. Production intracellulaire des M.D.O.
 - 2.2.2. Production extracellulaire des M.D.O.

III. EFFETS CELLULAIRES DES OXYDANTS

- 3.1. Rôle physiologique
- 3.2. Toxicité directe
 - 3.2.1. Lipides polyinsaturés
 - 3.2.2. Protéines
 - 3.2.3. Acides nucléiques
- 3.3. Toxicité indirecte
 - 3.3.1. Interactions avec le système protéases-antiprotéases
 - 3.3.2. Interactions avec le système des prostaglandines
 - 3.3.3. Interactions avec d'autres médiateurs de l'inflammation

IV. INTERVENTION DES OXYDANTS EN PATHOLOGIE PULMONAIRE

- 4.1. Toxicité de l'oxygène normobare
- 4.2. Inhalation de gaz oxydants
 - 4.2.1. Ozone
 - 4.2.2. Dioxyde d'azote
- 4.3. Tabac-Emphysème
- 4.4. Asthme
- 4.5. Fibrose pulmonaire idiopathique
- 4.6. Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte

- 4.7. Pathologie professionnelle : asbeste, silice
 - 4.7.1. Asbeste
 - 4.7.2. Silicose
- 4.8. Xénobiotiques
 - 4.8.1. Paraquat
 - 4.8.2. Médicaments
- 4.9. Radiations ionisantes
- 4.10. Ischémie-reperfusion
- 4.11. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (V.I.H.)

V. MECANISMES PULMONAIRES DE DEFENSE ANTI-OXYDANTE

- 5.1. Prévention et compartimentalisation de la formation des radicaux libres
 - 5.1.1. Prévention de la formation de radicaux libres
 - 5.1.2. Compartimentalisation des métaux transitionnels
- 5.2. Antioxydants endogènes
 - 5.2.1. Antioxydants endogènes enzymatiques
 - 5.2.2. Antioxydants endogènes non enzymatiques
- 5.3. Antioxydants exogènes
 - 5.3.1. Vitamines
 - * Vitamine E : alpha-Tocophérol
 - * Béta carotène
 - * Vitamine C : acide ascorbique
 - 5.3.2. Minéraux
 - 5.3.3. Lipides
 - 5.3.4. Protéines
- 5.4. Compartimentalisation des antioxydants

CHAPITRE II - GLUTATHION : PROPRIETES ET ROLES EN PATHOLOGIE PULMONAIRE

I. INTRODUCTION

II. ASPECTS BIOCHIMIQUES

- 2.1. Structure biochimique du glutathion
- 2.2. Synthèse du glutathion
- 2.3. Transport extracellulaire

2.4. Catabolisme du glutathion

III. FONCTIONS DU GLUTATHION

- 3.1. Rôle antioxydant
- 3.2. Conjugaison du glutathion
 - 3.2.1. Conjugaison du GSH avec des molécules endogènes
 - 3.2.2. Conjugaison du GSH avec des molécules exogènes
- 3.3. Système de transport ATP dépendant
- 3.4. Transport des acides aminés
- 3.5. Modulation de la réponse immunitaire
- 3.6. Maintien de l'intégrité des corps lamellaires des pneumocytes II
- 3.7. Autres fonctions du GSH

IV. GLUTATHION ET POUMON NORMAL

- 4.1. Système surfactant du poumon
 - 4.1.1. Synthèse du surfactant
 - 4.1.2. Composition du surfactant
 - 4.1.3. Rôle du surfactant
- 4.2. Etude du glutathion dans le liquide de recouvrement épithélial

V. PATHOLOGIES PULMONAIRES ASSOCIEES A UNE ELEVATION DU GLUTATHION DANS LE LIQUIDE DE RECOUVREMENT EPITHELIAL

- 5.1. Exposition à l'hyperoxie
- 5.2. Asthme
- 5.3. Intoxication tabagique

VI. PATHOLOGIES PULMONAIRES ASSOCIEES A UNE DIMINUTION DU GLUTATHION DANS LE LIQUIDE DE RECOUVREMENT EPITHELIAL

- 6.1. Fibrose pulmonaire idiopathique
- 6.2. Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte
- 6.3. Mucoviscidose
- 6.4. Infection par le VIH

VII. IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES

- 7.1. Apport de GSH
- 7.2. Apport de précurseurs du GSH

CHAPITRE III

I. NOTIONS GENERALES SUR LA CANCEROGENESE

1.1. Etapes de la carcinogènèse

1.1.1. Rôle des carcinogènes

1.1.2. Individualisation de plusieurs étapes dans la carcinogènèse

1.2. Histogènèse des tumeurs malignes pulmonaires

II. IMMUNOLOGIE DU CANCER BRONCHIQUE

2.1. Rôle des macrophages alvéolaires

2.1.1. Notions générales

2.1.2. Macrophages alvéolaires et cancer bronchique

2.2. Rôle des lymphocytes

III. OXYDANTS ET CANCER

3.1. Participation des oxydants à la création de lésion de l'ADN

3.1.1. Rôle de H₂O₂

3.1.2. Rôle de OH°

3.2. Conséquence des lésions de l'ADN par les oxydants : carcinogènèse

3.3. Activité antitumorale des oxydants

IV. ANTIOXYDANTS ET CANCER

4.1. Rôle anticancéreux des antioxydants

4.1.1. Résultats en carcinogènèse expérimentale

4.1.2. Résultats expérimentaux in vivo

4.2. Rôle du glutathion dans le développement du cancer

4.2.1. Glutathion et croissance cellulaire tumorale

4.2.2. Glutathion et défense antioxydante des cellules cancéreuses

4.2.3. Glutathion, glutathion transférases et chimiorésistance

CHAPITRE IV : ETUDE EXPERIMENTALE

I. INTRODUCTION : BUT DE L'ETUDE

II. METHODES

2.1. Populations étudiées

- 2.2. Technique du lavage broncho-alvéolaire
- 2.3. Colorations cellulaires
- 2.4. Dosage de l'urée dans le liquide de LBA et dans le plasma
- 2.5. Dosage de l'anion superoxyde
- 2.6. Dosage de l'activité SOD
- 2.7. Dosage de l'activité de la catalase
- 2.8. Dosage du glutathion réduit GSH
- 2.9. Dosage de l'activité de la gamma-glutamyl transpeptidase
- 2.10. Méthode statistique

III. RESULTATS

- 3.1. Caractéristiques des populations étudiées
 - 3.1.1. Premier groupe : sujets fumeurs
 - 3.1.2. Second groupe : patients atteint d'un cancer bronchique
- 3.2. Résultats de l'étude du LBA
 - 3.2.1. Pourcentage de liquide de LBA recueilli
 - 3.2.2. Analyse cytologique du liquide de LBA
 - 3.2.3. Dosage de l'urée dans le liquide de LBA
 - 3.2.4. Dosage de GSH dans le liquide de LBA
 - 3.2.5. Dosage de l'activité de la gamma-glutamyl transpeptidase dans le liquide de LBA
 - 3.2.6. Dosage de l'activité de la SOD dans le liquide de LBA
 - 3.2.7. Dosage de l'activité de la catalase dans le liquide de LBA
- 3.3. Résultats de l'étude des macrophages alvéolaires
 - 3.3.1. Dosage des oxydants libérés par les MA
 - 3.3.2. Dosage du GSH dans les MA
 - 3.3.3. Dosage de l'activité de la SOD dans les MA

IV. DISCUSSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

MDO : Métabolites dérivés de l'oxygène

MA : Macrophages alvéolaires

PN : Polynucléaires neutrophiles

PE : Polynucléaires eosinophiles

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte

LBA : Lavage bronchoalvéolaire

SOD : Superoxyde dismutase

GSH : Glutathion réduit

GSH-PX : Glutathion peroxydase

GSSG: Glutathion oxydé (disulfide)

G6PD : Glucose 6 phosphate déshydrogénase

6PGD : 6 phosphogluconate déshydrogénase

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Gamma GT : Gamma-glutamyl transpeptidase

LRE : Liquide de recouvrement épithélial, équivalent du ELF anglosaxon (epithelial lining fluid)

TNF : Tumor Necrosis Factor

NAC : N Acétyl Cystéine

GST : Glutathion transférases

INTRODUCTION

Les métabolites dérivés de l'oxygène représentent une fraction importante de l'ensemble des oxydants et le caractère ubiquitaire de l'oxygène justifie l'intérêt porté à ces substances. Le fonctionnement normal de l'organisme s'accompagne d'une production physiologique de métabolites dérivés de l'oxygène, mais ces composés interviennent également dans la pathogénie de nombreuses maladies.

Le poumon, organe singulièrement exposé à l'agression des oxydants, dispose d'un large éventail de substances antioxydantes chargées de le défendre. La superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion forment l'essentiel de ce système de protection antioxydante.

Le glutathion a la particularité d'exercer une activité antioxydante de nature enzymatique grâce au cycle redox du glutathion, et de type non enzymatique sous sa forme réduite GSH. Le glutathion suscite beaucoup d'attention en raison de ses nombreuses propriétés et de sa double localisation intracellulaire et extracellulaire dans la lumière alvéolaire. Et plusieurs pathologies pulmonaires comportent des variations du taux de glutathion dans le liquide de recouvrement épithélial.

Le tabagisme est responsable de modifications dans la protection antioxydante pulmonaire. En raison de son rôle carcinogène, il nous a paru intéressant de déterminer le comportement des défenses antioxydantes du poumon profond au cours du cancer bronchique. Notre étude expérimentale a consisté à doser le taux de glutathion et l'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de patients atteints de néoplasie broncho-pulmonaire. Nous avons alors comparé ces résultats à ceux observés dans une population de sujets fumeurs.

CHAPITRE I

SYSTEME OXYDANT-ANTIOXYDANT ET POUMON

II - OXYDANTS

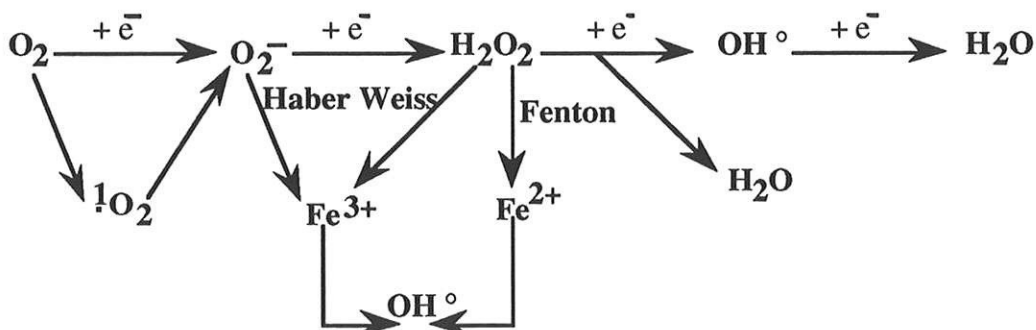
2.1. Nature des oxydants

2.1.1. Métabolites dérivés de l'oxygène (1)

L'oxygène moléculaire O_2 est un biradical caractérisé par la présence de 2 électrons célibataires. L'interaction de la molécule d' O_2 avec certaines molécules organiques dans les systèmes vivants produit des radicaux libres dont la formation est catalysée par des métallo-enzymes.

La plupart des molécules biologiques ne sont pas des radicaux libres et les orbitales de leurs atomes comportent 2 électrons circulant dans des directions opposées. Un radical libre se définit comme toute substance contenant un ou plusieurs électrons non pairés (on entend par électron non pairé, un électron isolé sur une orbitale). Cette caractéristique confère au radical libre des propriétés de réactivité particulière qui le rendent instable : cette molécule a, en effet, une forte tendance à paier l'électron isolé par le prélèvement d'un électron sur une autre molécule qui devient à son tour un radical libre. Ce processus est le point de départ d'une réaction en chaîne.

La réduction complète d'une molécule d'oxygène en deux molécules d'eau nécessite 4 électrons et s'effectue en général de façon tétravalente et simultanée dans la mitochondrie sous l'effet de la cytochrome oxydase. C'est la réduction univalente et séquentielle de l' O_2 moléculaire qui est à l'origine des métabolites dérivés de l'oxygène (MDO).



O_2 : oxygène moléculaire.

O_2^- : anion superoxyde, obtenu par addition d'un électron à l'oxygène moléculaire.

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). Il s'agit d'un métabolite intermédiaire non radicalaire. En l'absence de fer, il se décompose lentement en H_2O et O_2 .

OH° : radical hydroxyl. La formation d' OH° à partir de H_2O_2 est un phénomène contesté du point de vue thermodynamique. OH° résulterait de l'interaction entre H_2O_2 et O_2^- en présence d'un ion métallique,; les métaux de transition tels que le fer (réaction de Haber-Weiss) ou le cuivre joueraient un rôle essentiel.

Fe : le fer catalyse la réaction de Haber-Weiss et de Fenton qui transforment les oxydants O_2^- et H_2O_2 en un radical hydroxyl bien plus toxique. La production d'oxydants dans le poumon est donc potentialisée par le fer qui est présent dans de nombreux agresseurs environnementaux (fumée de cigarette, polluants atmosphériques ...).

$!O_2$: oxygène singulet. C'est une forme excitée de l' O_2 , se distinguant de l'oxygène moléculaire par un réarrangement des électrons. Il est impliqué dans diverses oxydations, enzymatiques ou non, d'une importance certaine.

La durée de vie des MDO est difficile à apprécier car elle est étroitement dépendante de la présence de substances antioxydantes dans l'environnement. H_2O_2 a une demi-vie relativement longue par rapport à O_2^- et encore plus par rapport à OH° . Ainsi H_2O_2 , et à un moindre degré O_2^- , peuvent traverser les membranes cellulaires et exercer un effet toxique à distance de leur lieu de production. La demi-vie d' OH° est très brève (10^{-9} secondes) et témoigne de son extrême réactivité : OH° s'affirme comme le plus toxique des MDO car il réagit immédiatement avec la plupart des substances avoisinantes.

Les MDO peuvent réagir avec certains constituants cellulaires et aboutir à la formation de substances toxiques telles que l'acide hypochloreux, les chloramines et le malondialdéhyde.

2.1.2. Radicaux libres et oxydants non dérivés de l'oxygène

De nombreuses substances possèdent un pouvoir oxydant :

- l'acide hypochloreux HOCl et ses dérivés : les chloramines
- le dioxyde d'azote NO₂, de structure radicalaire
- l'ozone O₃, non radicalaire
- les hydroperoxydes lipidiques et les radicaux lipidiques secondaires.

2.2. Production des radicaux libres

Dans l'organisme vivant, à l'état normal, il existe une production permanente de radicaux libres, en raison du caractère ubiquitaire de l'oxygène et du fer. Cette production se localise au niveau intracellulaire, mais dans certaines conditions pathologiques, elle peut survenir au niveau extracellulaire.

2.2.1. Production intracellulaire des MDO

Elle fait intervenir 3 systèmes enzymatiques :

- Chaîne respiratoire mitochondriale :

Le métabolisme cellulaire normal s'accompagne de la production de MDO. En effet, plus de 95 % de l'oxygène moléculaire consommé par la cellule est réduit de façon tétravalente et simultanée par la cytochrome oxydase mitochondriale (qui utilise le NADH comme donneur d'H⁺ pour réduire O₂) sans formation associée de MDO. Il existe cependant à l'état normal, lors du transport électronique le long de la chaîne respiratoire, une fuite d'électrons pouvant réagir avec l'oxygène moléculaire et conduire à la formation d'O₂⁻. La production mitochondriale de radicaux libres est proportionnelle à la pression partielle en oxygène et peut augmenter dans certaines conditions pathologiques (hyperoxie).

- Système des oxydases à fonction mixte :

Localisé dans les microsomes, il est constitué par une chaîne de transport électronique similaire à celle de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il comprend du NADPH, de la NADPH cytochrome P450 réductase et du cytochrome P450. Ce système intervient dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques, mais on lui reconnaît aussi le pouvoir d'activer certains composés non réactifs qui se transforment en substances toxiques telles que O₂⁻.

- Xanthine oxydase :

Lors de leur fonctionnement normal, certaines activités enzymatiques cytoplasmiques, mitochondriales ou nucléaires (xanthine oxydase, aldéhyde déshydrogénase, peroxydases) catalysent des réactions d'oxydation. Il en résulte une réduction univalente de l'oxygène en O_2^- . La xanthine oxydase semble jouer un rôle déterminant au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion.

2.2.2. Production extracellulaire des MDO

La production de MDO extracellulaire est une fonction essentielle des phagocytes : polynucléaires et macrophages. Elle utilise 2 enzymes :

- la NADPH oxydase

Il s'agit d'un véritable système enzymatique constitué d'une chaîne de transporteurs d'électrons. Localisé dans la membrane cytoplasmique des phagocytes, il est normalement maintenu dans un état quiescent non fonctionnel. Après activation, la NADPH oxydase utilise le NADPH issu du shunt des pentoses et l'oxygène moléculaire pour produire des radicaux O_2^- extracellulaires puis de l' H_2O_2 .

- la myéloperoxydase

Cette enzyme, également libérée par les phagocytes, catalyse la formation de l'acide hypochloreux HOCl à partir de H_2O_2 , en présence de chlore. HOCl est un oxydant qui paraît plus réactif que H_2O_2 : il exerce une toxicité cellulaire directe sur les groupes sulfhydryles membranaires, il réagit avec les amines primaires présentes dans le milieu pour former des chloramines très oxydantes. Les chloramines dont il existe de nombreuses variétés peuvent être considérées comme les dérivés ultimes des MDO.

La production de MDO par les macrophages dépend de multiples facteurs endogènes et exogènes : site de résidence, stade de maturation cellulaire, état d'activation cellulaire. La libération des métabolites oxydants par les macrophages est favorisée par l'interleukine 1, le gamma-interféron, le TNF (tumor necrosis factor), les immuns complexes IgE et IgG. A l'opposé, la prostaglandine E2, l'alpha-interféron et les inhibiteurs synthétiques des protéases tendent à réduire cette production de MDO.

III - EFFETS CELLULAIRES DES OXYDANTS

3.1. Rôle physiologique

In vitro, on a démontré l'importance du rôle des MDO dans le processus de bactéricidie mais la preuve de leur participation in vivo à ce phénomène n'a pu être apportée.

Les oxydants semblent jouer un rôle de médiateur au cours de la réaction inflammatoire.

Le H₂O₂ produit par les macrophages alvéolaires paraît posséder in vitro une activité cytotoxique antitumorale. Mais, à l'opposé, de faibles concentrations de H₂O₂ sont susceptibles d'induire une réplication cellulaire.

A l'état normal, il s'établit un équilibre physiologique entre la production d'oxydants et leur neutralisation par les systèmes protecteurs antioxydants. Cet équilibre est parfois rompu à la faveur d'une surproduction de radicaux libres ou d'une diminution des moyens de défense antioxydante. La toxicité des radicaux libres peut alors se manifester, soit de façon directe sur les constituants cellulaires, soit de façon indirecte par interférence avec les mécanismes de l'inflammation.

3.2. Toxicité directe

La toxicité des oxydants s'exerce sur 3 types de constituants cellulaires :

3.2.1. Lipides polyinsaturés

Les membranes cellulaires sont formées d'une double couche de phospholipides constitués eux-mêmes d'acides gras polyinsaturés. En raison de la présence d'une double liaison, ces lipides cèdent facilement un électron et peuvent se combiner avec l'oxygène pour former des peroxydes lipidiques. Il s'ensuit une réaction en chaîne entre le radical hydroperoxyde produit et une autre molécule lipidique.

On attribue à la peroxydation lipidique un rôle majeur dans la survenue des lésions cellulaires, du fait des profondes perturbations qu'elle entraîne dans la structure et les propriétés physicochimiques membranaires. De plus, la décomposition des hydroperoxydes lipidiques produit des radicaux lipidiques secondaires, dont le métabolisme conduit à des substances telles le malondialdéhyde MDA, molécule toxique à l'origine d'une polymérisation des protéines et des acides nucléiques.

3.2.2. Protéines

La toxicité directe des radicaux libres sur les protéines se traduit par une oxydation des groupements sulfhydryles. Il en résulte une modification de la conformation spatiale et une altération de la fonction protéique.

On peut citer comme exemples l'inactivation de l'alpha 1 antiprotéase par l'oxydation d'un résidu méthionine et la grande sensibilité du glutathion à l'action de l' HOCl .

3.2.3 Acides nucléiques

Les acides nucléiques peuvent être lésés par les radicaux issus de la peroxydation lipidique, mais aussi par les MDO. En particulier H_2O_2 , dont la demi-vie est longue, peut diffuser et atteindre l'ADN nucléaire et mitochondrial. In vitro, l'exposition de l'ADN à H_2O_2 en présence de fer induit une hydroxylation des bases et des cassures chromosomiques (la nécessité de la présence du fer indique que c'est le radical OH° , formé à partir de H_2O_2 par la réaction de Fenton, qui est responsable de ces modifications).

L'altération subie par l'ADN conduit soit à une chute du taux d'ATP et à la mort cellulaire, soit à une transformation maligne dans les cellules survivantes.

HOCl ne semble pas capable de créer de telles lésions de l'ADN.

3.3. Toxicité indirecte

Il existe des relations étroites entre l'action des oxydants et plusieurs des mécanismes de l'inflammation.

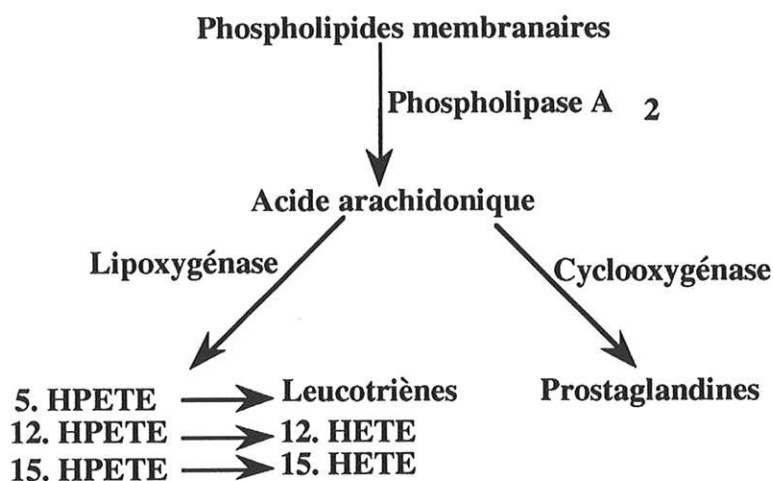
3.3.1. Interactions avec le système protéases-antiprotéases

Le système des protéases intervient dans le processus lésionnel de nombreuses pathologies pulmonaires, en particulier l'emphysème. En effet, la plupart des atteintes conduisant à une destruction du parenchyme pulmonaire se caractérisent par une accumulation de polynucléaires neutrophiles et de macrophages dans les alvéoles pulmonaires. Ces cellules, une fois activées, sécrètent des protéases et des MDO sur le site de l'inflammation. Les lésions du parenchyme pulmonaire survenant au cours d'une atteinte inflammatoire chronique sont essentiellement dues aux protéases leucocytaires. Les oxydants peuvent amplifier l'effet destructeur des protéases soit en inhibant les antiprotéases au rôle protecteur, soit en activant des protéases latentes présentes à la surface des phagocytes.

3.3.2 Interactions avec le système des prostaglandines

Le métabolisme des prostaglandines s'accompagne de la formation de l'anion superoxyde. Le rôle de O_2^- pourrait être d'autoréguler la formation des prostaglandines, par destruction de leur enzyme de synthèse.

Par ailleurs, les relations existant entre la NADPH oxydase et la phospholipase A₂ sont probablement importantes bien que mal connues : ainsi, la peroxydation des lipides membranaires par les oxydants active la phospholipase A₂, provoquant la libération et le métabolisme de l'acide arachidonique. La thromboxane A₂ paraît être un des métabolites les plus nocifs de l'acide arachidonique, au plan pulmonaire : elle participe aux phénomènes de vasoconstriction et de bronchoconstriction.



"Génèse des prostaglandines et leucotriènes"

3.3.3. Interactions avec d'autres médiateurs de l'inflammation

Plusieurs éléments suggèrent l'existence de relations entre les oxydants et certains médiateurs de l'inflammation.

Ainsi, H_2O_2 en concentration élevée est capable d'induire la synthèse de PAF (platelet activating factor) par les cellules endothéliales et favoriser l'adhésion des polynucléaires à l'endothélium.

Il semble exister une sensibilité de l'activité endopeptidase neutre épithéliale à l'agression oxydante : la diminution de cette activité enzymatique augmente les effets pro-inflammatoires de certaines substances peptidiques (substance P, bradykinine).

Diverses cytokines telles que le Tumor Necrosis Factor et l'Interleukine 1, en stimulant le système de défense antioxydant, sont susceptibles de modifier les effets toxiques des MDO.

Citons enfin les travaux de Sacks et Coll. (4) qui ont démontré que l'activation des polynucléaires neutrophiles par la fraction C5 du complément entraîne une atteinte des cellules endothéliales en culture et que ces lésions peuvent être prévenues par l'adjonction d'antioxydants dans le milieu de culture.

IV - INTERVENTION DES OXYDANTS EN PATHOLOGIE PULMONAIRE

Le rôle des oxydants a été mis en cause dans diverses pathologies pulmonaires, sans que leur responsabilité dans la pathogénie des lésions soit toujours clairement établie.

4.1. Toxicité de l'oxygène normobare

L'oxygène, élément indispensable à la vie des eucaryotes, peut être responsable d'une toxicité pulmonaire. Peu d'études ont été menées chez l'homme pour des raisons d'éthique, et il est parfois difficile de généraliser aux êtres humains les résultats observés chez les animaux. La dysplasie broncho-pulmonaire du nouveau-né prématuré constitue un des rares modèles de toxicité de l'oxygène chez l'homme. Des adultes soumis à l'inhalation d'O₂ développent des symptômes (toux, dyspnée, nausées, gêne rétrosternale douloureuse) et des perturbations fonctionnelles qui sont en relation avec la pression partielle d'O₂ et le temps d'exposition. Après 18 heures d'inhalation d'O₂ pur, le liquide de lavage bronchoalvéolaire met en évidence une augmentation de la concentration en albumine et des signes d'activation des macrophages alvéolaires, et sur le plan histologique on observe une atteinte précoce des cellules endothéliales et des pneumocytes I. Il est extrêmement délicat de délimiter un seuil précis de toxicité en raison des variations interindividuelles notables : une exposition à 60 % d'O₂ durant 48 heures est considérée comme dose liminaire.

La physiopathologie de la toxicité de l'oxygène chez l'homme est mal connue, mais il semble acquis qu'elle fait intervenir les MDO. Cette hypothèse est confortée par les études montrant que la consommation totale en oxygène des cellules pulmonaires s'élève en fonction de la PaO₂, et que la fraction du métabolisme de l'O₂ qui génère les MDO augmente aussi avec l'hyperoxie. Ces MDO exercent une toxicité directe sur les membranes cellulaires (par le biais de la peroxydation lipidique qui induit un accroissement non sélectif de la perméabilité membranaire), sur les enzymes comportant des groupes sulfhydryles et sur les structures du cytosquelette des cellules endothéliales. La toxicité

pulmonaire de l'O₂ se manifeste aussi de façon indirecte à travers l'activation des macrophages alvéolaires qui libèrent des facteurs de croissance pour les fibroblastes et des facteurs chimiotactiques pour les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules activées produisent des protéases et des radicaux libres, substances responsables de lésions interstitielles pulmonaires et de fibrose.

Le phénomène de tolérance est un caractère très particulier de la toxicité de l'O₂ normobare, étudié chez le rat : l'exposition de rats adultes à 100 % d'O₂ sous une atmosphère absolue provoque la mort de la plupart des animaux en 3 à 4 jours, mais une préexposition à 85 % d'O₂ durant 5 jours permet aux rats de survivre ensuite à 100 % d'O₂. Cette adaptation est réversible et disparaît après quelques jours en air ambiant. Il a été démontré que ce phénomène de tolérance est lié à une augmentation du contenu pulmonaire en substances antioxydantes.

4.2. Inhalation de gaz oxydants

4.2.1. Ozone

L'ozone O₃ est un constituant naturel de l'atmosphère : sa concentration dans l'air normal est de 0,01 à 0,04 ppm. Son taux s'élève dans l'atmosphère lors des phénomènes de pollution photochimique.

L'ozone possède deux électrons non pairés, ce qui lui permet d'agir soit comme un oxydant direct de substances intracellulaires (en raison d'un fort potentiel redox), soit comme une source de radicaux libres. Du fait de sa faible solubilité et d'une réactivité relativement élevée, l'O₃ affecte plutôt les voies aériennes proximales.

Ses effets toxiques directs portent essentiellement sur les membranes cellulaires qui subissent une peroxydation lipidique ; mais on note également des anomalies dans le fonctionnement des enzymes riches en groupes sulfhydryles, ainsi qu'une activation de la cyclo-oxygénase. L'exposition à l'ozone déclenche une réaction inflammatoire au niveau pulmonaire, avec un afflux de polynucléaires neutrophiles susceptibles eux aussi de libérer des MDO. Enfin, on reconnaît à l'ozone le pouvoir de perturber l'épuration mucociliaire et de dégrader le collagène. Compte tenu de toutes ces caractéristiques, on conçoit donc que l'ozone puisse être incriminé dans la survenue de bronchopathies chroniques en zones urbaines fortement polluées où les gaz oxydants sont composés pour 90 % d'O₃ et pour 10 % de peroxyde et monoxyde d'azote.

4.2.2. Dioxyde d'azote

Le dioxyde d'azote NO₂ est un radical libre présent dans l'atmosphère. Comme l'O₃, ses effets toxiques liés à la formation de radicaux libres, se manifestent sur la partie proximale des voies aériennes. Néanmoins, chez l'animal, l'exposition au NO₂ peut induire une peroxydation lipidique capable d'altérer les propriétés fonctionnelles de l'épithélium et de l'endothélium pulmonaire. On sait que l'exposition de sujets au NO₂ in vivo, entraîne une inactivation significative de l'alpha 1 antiprotéase.

Mais malgré tous ces éléments, la place du NO₂ dans la pathogénie des bronchopathies chroniques reste encore à évaluer.

4.3. Tabac - Emphysème

La fumée de cigarette est constituée d'un mélange complexe de plusieurs milliers de composants, parmi lesquels on distingue habituellement 4 types principaux de substances : la nicotine responsable de l'assuétude tabagique, le monoxyde de carbone, les irritants directement toxiques pour le tapis mucociliaire et les substances cancérogènes. Des radicaux libres (5) ont aussi été identifiés dans les deux phases de la fumée de cigarette, avec une nette prédominance dans la phase gazeuse. Leur présence abondante est évaluée à 10¹¹ - 10¹⁴ radicaux libres par bouffée de fumée de cigarette. La plupart ont une demi-vie courte de 5 minutes au plus, suffisante pour atteindre la surface épithéliale alvéolaire. Depuis que Janoff a décrit l'inactivation oxydative de l'alpha 1 antiprotéase (oxydation d'un résidu méthionine en position 358) par la fumée de cigarette, de nombreuses études ont tenté de préciser l'action des radicaux libres sur l'alpha 1 antiprotéase et d'établir une relation avec la pathogénie de l'emphysème.

En effet l'emphysème (6), qui se définit comme une atteinte pulmonaire chronique caractérisée par une destruction des cloisons alvéolaires et un élargissement anormal de l'espace aérien distal jusqu'aux bronchioles terminales, est associé dans la majorité des cas au tabagisme (hormis les situations d'emphysème constitutionnel lié à un déficit congénital en alpha 1 antiprotéase). Le concept actuel de la pathogénie de l'emphysème fait appel à un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases, au profit d'une activité protéolytique exagérée dans la matrice extracellulaire pulmonaire. L'essentiel de la fonction antiprotéasique pulmonaire est assuré par l'alpha 1 antiprotéase d'origine macrophagique, qui est capable d'inactiver l'élastase leucocytaire humaine, enzyme protéolytique libérée par les polynucléaires neutrophiles.

Il est certain que l'intoxication tabagique se traduit par une agression oxydante au niveau du poumon profond, non seulement en raison de la présence de radicaux libres dans

la fumée de cigarette, mais aussi du fait du développement d'une réaction inflammatoire. L'hypercellularité observée dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de sujets fumeurs sains porte principalement sur les macrophages alvéolaires, et à un degré moindre sur les polynucléaires neutrophiles (7). L'étude du métabolisme oxydatif des macrophages alvéolaires confirme l'activation de ces cellules, qui produisent une quantité significativement plus élevée de H_2O_2 (par comparaison à des sujets non fumeurs) ; l'action toxique de H_2O_2 conduit à une altération des fibroblastes et une lyse des phagocytes avec libération d'enzymes protéolytiques. En comparant un groupe de sujets fumeurs sains et un groupe de sujets fumeurs emphysémateux, Wallaert et Coll. (8) n'ont pas observé de différence quantitative dans la production de MDO par les cellules alvéolaires inflammatoires, cependant seules les cellules alvéolaires des sujets emphysémateux ont la capacité d'inactiver spontanément l'alpha 1 antiprotéase. Cette différence de comportement des cellules vis-à-vis de l'alpha 1 antiprotéase s'explique par la présence d'une quantité exagérée de myéloperoxydase dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire des patients emphysémateux. Des études antérieures ont montré que la myéloperoxydase, enzyme oxydant libéré par les polynucléaires neutrophiles activés, est indispensable à l'inhibition du pouvoir anti-élastasique de l'alpha 1 antiprotéase, ainsi que la présence de H_2O_2 et d'un ion halide Cl^- : il va se former l'anion hypochlorite OCl^- , oxydant extrêmement puissant. Il semble donc bien que le processus oxydatif de l'alpha 1 antiprotéase soit sous la dépendance des macrophages alvéolaires MA, des polynucléaires neutrophiles PN, et des oxydants qu'ils libèrent.

Si l'intervention du tabac dans la pathogénie de l'emphysème est certaine, seule une minorité de fumeurs développe un emphysème sévère. Le tabac n'apparaît donc que comme un co-facteur démasquant une susceptibilité individuelle, et cela nous conduit à relativiser le rôle des radicaux libres.

4.4. Asthme

Le syndrome asthme se définit sur le plan fonctionnel par un trouble obstructif spontanément variable, ainsi que par une hyperréactivité bronchique aux médiateurs cholinergiques. Une bonne cinquantaine de médiateurs chimiques intervenant au cours d'une crise d'asthme ont été décrits. Les médiateurs d'origine mastocytaire semblent jouer le rôle le plus important car ils déclenchent une cascade d'événements comportant notamment un recrutement cellulaire : cet afflux de macrophages alvéolaires, de polynucléaires neutrophiles et de polynucléaires éosinophiles va moduler la réaction inflammatoire initiale. L'inflammation des voies aériennes est étroitement liée à l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme, à tel point que les facteurs qui potentialisent l'inflammation

agissent aussi sur l'hyperréactivité bronchique. Le macrophage remplit un rôle non négligeable (9) dans le processus de sensibilisation aux allergènes : c'est lui qui capte l'antigène et se charge de le présenter au lymphocyte T afin d'amorcer la réponse immune. Plus généralement, il existe au cours de l'asthme une activation des macrophages alvéolaires qui se traduit par une libération accrue de O_2^- .

Des études plus récentes tentent de préciser la place exacte des radicaux libres, et leur responsabilité éventuelle dans l'inflammation des voies aériennes et l'obstruction bronchique. Kanazawa et Coll. (10) ont observé une production significativement plus élevée d'anion O_2^- par les PN du sang périphérique de sujets asthmatiques, par comparaison avec des sujets sains. De plus, à cette libération d' O_2^- par les PN circulants sont associées la sévérité de la maladie et son ancienneté. Cette notion suggère que l'anion superoxyde pourrait jouer un rôle dans le développement du bronchospasme, d'autant qu'on a constaté une majoration de la production d' O_2^- durant une attaque d'asthme.

Les polynucléaires éosinophiles PE sont eux-aussi largement impliqués dans l'inflammation des voies aériennes au cours de l'asthme. Leur action pro-inflammatoire s'exerce à travers la libération de radicaux libres, de la leucotriène C4, du facteur d'activation des plaquettes PAF, et d'autres médiateurs encore. Il existe une intrication étroite entre les PE et le PAF qui peut induire, outre une bronchoconstriction, un effet chimiotactique et surtout une activation des PE. Chez le sujet asthmatique comparé au sujet sain, on note une plus grande réactivité des PE du sang périphérique (11), qui se manifeste par une augmentation de la libération de radicaux libres, spontanément ou après stimulation par le PAF. Ce phénomène pourrait bien représenter un mécanisme important de pérennisation de la réaction inflammatoire dans l'asthme.

Malgré le rôle certain de l'inflammation et des MDO, il faut se garder de restreindre la physiopathologie complexe de l'asthme à la seule intervention des MDO. Ce serait négliger le rôle fondamental des cytokines, des neuromédiateurs et des molécules d'adhésion.

4.5. Fibrose pulmonaire idiopathique

La fibrose pulmonaire idiopathique est une atteinte pulmonaire interstitielle inflammatoire chronique d'évolution souvent fatale ; elle se caractérise par une accumulation de MA et de PN dans le poumon profond, une atteinte des cellules parenchymateuses et une fibrose des cloisons interalvéolaires.

Un des traits marquants de la fibrose pulmonaire idiopathique réside dans les changements notables touchant les cellules épithéliales alvéolaires : diminution des pneumocytes I dans les zones d'inflammation intense suggérant la mort de ces cellules,

hyperplasie des pneumocytes II correspondant à un processus de régénération anormale de la surface épithéliale lésée, modifications morphologiques dans les pneumocytes II (augmentation du nombre des microvillosités et de corps lamellaires). Dans les régions du poumon les plus sévèrement atteintes, les pneumocytes II sont remplacés par des cellules épithéliales cuboïdes d'origine bronchique provenant de la différenciation des pneumocytes II.

Les cellules alvéolaires inflammatoires sont largement dominées par les MA et les PN, deux types de cellules capables d'induire une cytotoxicité cellulaire grâce aux oxydants. Des études expérimentales sur l'animal ont démontré qu'une charge oxydante est responsable de sévères lésions des cellules alvéolaires épithéliales, suivies de l'installation d'une fibrose interstitielle. Au vu de ces arguments, on a émis l'hypothèse que l'atteinte des cellules épithéliales alvéolaires associée à la fibrose pulmonaire idiopathique pourrait être due à la libération d'oxydants par les MA et les PN. Cantin et Coll. (12) ont confirmé que dans cette pathologie, les cellules inflammatoires du poumon profond libèrent spontanément davantage de O_2^- et de H_2O_2 que les cellules de sujets sains. De plus, la myéloperoxydase est présente en quantité élevée dans le liquide de recouvrement épithélial ; elle provient vraisemblablement de la dégranulation des PN. En présence d'un halide, la myéloperoxydase peut convertir H_2O_2 en l'anion hypochlorite OCl^- très toxique pour la surface épithéliale alvéolaire. On a aussi observé que les patients ayant une concentration élevée en myéloperoxydase dans le liquide de recouvrement épithélial, subissent une détérioration plus rapide de leur fonction respiratoire que les autres patients. Compte tenu de tous ces arguments, il est raisonnable de conclure que l'atteinte des cellules épithéliales alvéolaires au cours de la fibrose pulmonaire idiopathique dépend au moins en grande partie de la réaction H_2O_2 -myéloperoxydase-halide survenant dans l'alvéole.

4.6. Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte

Le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (SDRA) est une forme d'atteinte pulmonaire aiguë caractérisée par un oedème pulmonaire à basse pression et une hypoxémie réfractaire. Son pronostic reste sombre avec une mortalité supérieure à 50 %. La pathogénie du SDRA est complexe et implique de multiples mécanismes et médiateurs.

L'oedème pulmonaire est lié à une augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolocapillaire, qui conduit à une inondation des alvéoles par un liquide riche en protéines. Au plan histologique, on constate une perte de pneumocytes I qui sont remplacés par la prolifération de pneumocytes II. Il s'y associe un épaissement des septa-intervalvéolaires, un infiltrat inflammatoire de l'interstitium, des lésions de fibrose et une oblitération des capillaires.

L'importance du rôle des MDO dans la pathogénie du SDRA a été soulignée par plusieurs études expérimentales : création d'un oedème au niveau de poumons de lapin isolés perfusés avec des systèmes générateurs d'oxydants, présence d'une grande quantité d'hydropéroxydes lipidiques dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire prélevé chez les patients atteints d'un SDRA, mise en évidence d'une concentration élevée de H₂O₂ dans l'air expiré par des patients placés sous ventilation assistée en raison d'un SDRA. Le H₂O₂ semble être l'un des oxydants les plus toxiques pour la membrane alvéolocapillaire.

PATHOLOGIE	ROLE DES MDO	REFERENCES
Oxygène normobare gaz oxydants O ₃ , NO ₂	MDO	1
Tabac	H ₂ O ₂ , OCl ⁻	7, 8
Asthme	O ₂ ⁻	9, 10, 11
Fibrose pulmonaire idiopathique	H ₂ O ₂ , OCl ⁻	12
SDRA	H ₂ O ₂ , HOCl, chloramines	13
Pneumoconioses	O ₂ ⁻	14, 15
Xénobiotiques	O ₂ ⁻	1
Radiations ionisantes	MDO	1
Ischémie-Reperfusion	O ₂ ⁻	16
Infection VIH	O ₂ ⁻ -H ₂ O ₂	17

L'étude de Weiland et Coll. (13) sur la pathogénie du SDRA. a mis l'accent sur l'intervention des P.N. : le nombre de P.N. présents dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire laisse augurer la sévérité des anomalies des échanges gazeux et de la perméabilité alvéolocapillaire. Le dosage des médiateurs des P.N. dans le liquide de L.B.A. n'a pas permis de détecter une activité élastase leucocytaire ; en revanche il a été identifié une collagénase neutrophile et surtout une activité myéloperoxydase de haut niveau. L'étude de la cytotoxicité a montré *in vitro* que le liquide de LBA incubé en présence de H₂O₂ et d'un anion halide était capable de détruire les cellules du parenchyme pulmonaire ; mais en l'absence de H₂O₂ et de l'ion halide, on n'observe aucune cytotoxicité. Les résultats suggèrent que la cytotoxicité existant au cours du SDRA. fait intervenir le système H₂O₂-myéloperoxydase-halide. Il faut néanmoins tempérer l'importance du rôle attribué aux P.N. dans la pathogénie du SDRA. : en effet, dans certains modèles expérimentaux d'oedème pulmonaire lésionnel, la déplétion en P.N. ne prévient pas complètement la survenue des lésions. Cette observation nous renvoie à la complexité des mécanismes du SDRA qui ne sauraient être réduits à la seule intervention des oxydants.

4.7. Pathologie professionnelle : asbeste, silice

4.7.1. Asbestose

Le liquide de LBA des patients asbestosiques atteste un recrutement des P.N., et des P.E. à un moindre degré. Les macrophages alvéolaires paraissent activés et tiennent probablement une place de choix dans les mécanismes conduisant à la fibrose pulmonaire : stimulés par l'amiante, les M.A. sont capables de libérer un ou des facteurs favorisant la prolifération des fibroblastes et une synthèse accrue de collagène. Ils peuvent aussi, par le biais de facteurs chimotactiques, recruter des P.N. et stimuler des lymphocytes T (sous l'effet de l'interleukine 1) qui agiront sur la croissance des fibroblastes.

Tous les concepts actuels suggèrent que les cellules inflammatoires pulmonaires activées par l'inhalation de poussières inorganiques conditionnent l'essentiel de l'atteinte parenchymateuse et de la fibrose pulmonaire. Un des mécanismes d'action évoqués incrimine la libération de radicaux libres de l'oxygène. Les travaux de Cantin et Coll. (14) sur des moutons exposés de façon chronique à des faibles doses d'amiante ont confirmé que l'accroissement du nombre de P.N. et de macrophages au niveau alvéolaire s'accompagnait d'une augmentation de leur capacité à libérer O₂⁻, l'anion superoxyde. Le fait qu'on observe la persistance d'une libération de MDO et une fibrose chez de tels animaux malgré une déplétion en P.N. donne à penser que les M.A. activés ont la plus grande part dans la production des MDO. Ces oxydants peuvent induire des modifications

dans le parenchyme pulmonaire habituellement observées au cours des pathologies d'inhalation de poussières inorganiques. De plus, les MDO sont susceptibles de créer des lésions cytogénétiques qui peuvent conduire à des transformations malignes. Ce phénomène expliquerait l'action synergique du tabagisme et de l'exposition à l'amiante dans l'apparition de cancer bronchique.

De tous ces éléments, il faut retenir que l'exposition aux poussières inorganiques active les cellules inflammatoires alvéolaires, ce qui se traduit entre autres par une augmentation de leur métabolisme oxydatif.

4.7.2. Silicose

Chez l'animal soumis à l'inhalation contrôlée de silice, on constate dans un premier temps un afflux non spécifique de P.N. suivi d'une mobilisation des M.A. Il s'y associe une stimulation immunitaire locale s'exprimant par une augmentation des IgG et IgA dans le liquide de LBA, et une activation des M.A. Dans un second temps, on observe le développement de lésions fibrosantes aboutissant au nodule silicotique décrit en pathologie humaine.

Chez l'homme, le dépôt de poussières riches en silice au niveau des lobules conduit à la formation de nodules silicotiques typiques avec centre hyalin pauvre en particules. Il s'agit d'un stade de "pneumoconiose simple" qui se traduit radiologiquement par des opacités micronodulaires ou nodulaires. L'évolution vers le développement de formations pseudotumorales ou de fibrose massive progressive dite "pneumoconiose compliquée", suppose l'intervention d'un facteur surajouté qui n'est pas clairement déterminé : facteur infectieux (en particulier mycobactérien), phénomènes auto-immuns, facteur génétique. L'étude du liquide de LBA, qui montre une hypercellularité mixte lymphocytaire et macrophagique avec prédominance de MA stimulés, a attiré l'attention sur les MA et leurs produits de sécrétion.

Les travaux de Wallaert et Coll. (15) sur les mineurs de charbon non fumeurs atteints de pneumoconiose à poussières mixtes, se sont attachés à distinguer deux groupes : un groupe de patients présentant une pneumoconiose simple, et un de mineurs au stade de pneumoconiose compliquée. L'analyse du liquide de LBA confirme des différences notables entre ces deux populations : chez les patients atteints de fibrose massive progressive, on note une hypercellularité significativement plus élevée et une capacité bien supérieure de ces cellules inflammatoires à libérer O_2^- . Plusieurs arguments plaident pour l'origine macrophagique de cette production accrue d'oxydants. Au vu de cette étude, il semble donc qu'on puisse admettre la responsabilité des oxydants libérés par les M.A. activés, dans l'évolution d'une pneumoconiose simple vers un stade compliqué.

Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que la silice peut générer des radicaux OH° qui vont provoquer une peroxydation lipidique au niveau membranaire. Ce phénomène pourrait expliquer l'accroissement de perméabilité de la membrane alvéolocapillaire observé au cours de la silicose aiguë.

4.8. Xénobiotiques (1)

4.8.1. Paraquat

Le paraquat est un herbicide dont l'ingestion provoque une atteinte rénale, hépatique, et surtout respiratoire - souvent mortelle par fibrose pulmonaire. De nombreux arguments suggèrent l'intervention des MDO dans le développement des lésions pulmonaires : le paraquat subit une réduction par la NADPH cytochrome P450 réductase et se transforme en un radical cationique qui réagit rapidement avec O_2 pour donner O_2^- ; il potentialise la toxicité de l'oxygène ; ses effets toxiques, enfin, sont majorés par la carence en certaines substances antioxydantes. C'est aussi par l'intermédiaire de O_2^- que le paraquat exerce un effet cytotoxique et mutagène sur les pneumocytes II en culture.

4.8.2. Médicaments

Plusieurs médicaments, en particulier des antimétabolites, sont potentiellement toxiques pour le poumon. Le plus souvent, les lésions initiales réalisent un oedème interstitiel associé à des lésions des cellules endothéliales vasculaires : les mécanismes de toxicité évoqués font appel à l'action des MDO. La survenue secondaire d'une fibrose pulmonaire reste encore mal expliquée.

Le mode d'action toxique de la bléomycine est probablement complexe, et régi par plusieurs médiateurs. Cette substance anticancéreuse exerce une toxicité cellulaire directe due pour l'essentiel à des lésions de l'ADN à type de cassures chromosomiques, qui semblent liées à la génération de MDO. Comme arguments, on peut retenir que l'hyperoxie et une radiothérapie antérieure potentialisent la toxicité de la bléomycine, alors que certaines substances antioxydantes diminuent cette toxicité.

La nitrofurantoïne, antiseptique urinaire, est aussi susceptible de provoquer une pneumopathie interstitielle fibrosante. Des éléments indirects font évoquer le rôle des MDO : aggravation des lésions lors de l'administration d'oxygène, action protectrice *in vitro* de certains antioxydants.

4.9. Radiations ionisantes (1)

La toxicité pulmonaire des radiations ionisantes a été principalement étudiée chez les animaux. On distingue trois stades dans l'évolution des lésions pulmonaires : une période latente suivant directement l'irradiation, une phase intermédiaire survenant 1 à 6 mois après la fin de l'irradiation, et une phase tardive après le 6ème mois. L'atteinte initiale est caractérisée par un oedème des parois alvéolaires et une infiltration de la lumière alvéolaire par des cellules inflammatoires (M.A. essentiellement). La période intermédiaire de "Pneumonie radique" correspond à une nécrose des cellules endothéliales capillaires et des pneumocytes I, une prolifération des pneumocytes II, une infiltration de cellules inflammatoires ainsi qu'un épaissement des septa-interalvéolaires. L'évolution peut se faire ensuite vers la fibrose radique.

L'implication des radicaux libres dans la pathogénie des lésions pulmonaires radio-induites est une notion admise depuis de nombreuses années (Gershman-Science 1954). Une particularité des radiations ionisantes est de provoquer une formation ubiquitaire de radicaux libres (surtout OH°), tant au niveau du cytoplasme que du noyau. Ainsi, le mécanisme de peroxydation lipidique en présence d'oxygène entraîne des lésions pouvant conduire à la mort cellulaire (nécrobiose), phénomène qui semble dépendre de la dose d'irradiation reçue. Les radicaux libres peuvent aussi engendrer des lésions des acides nucléiques à type de "cross-link", de réarrangements chromosomiques, voire de rupture d'ADN. De telles lésions sont susceptibles de survenir pour de petites doses d'irradiation. Il peut en résulter pour la cellule atteinte une impossibilité d'entrer en mitose, une aneuploïdie ou des anomalies chromosomiques transmises aux cellules filles. Les mécanismes de défense cellulaire font intervenir, outre les systèmes antioxydants, des enzymes de réparation de l'ADN dont le fonctionnement même peut être perturbé par les radicaux libres. Le pouvoir carcinogène des radiations ionisantes, enfin, est probablement lié aux lésions chromosomiques provoquées par les radicaux libres.

4.10. Ischémie - Reperfusion

Selon l'hypothèse de Mac Cord, les MDO auraient une responsabilité directe sur les lésions cellulaires observées au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion. Durant l'ischémie, il se produit une diminution des réserves cellulaires en énergie (16) : la déplétion en ATP entraîne l'accumulation d'hypoxanthine et une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium. Ce calcium active une protéine kinase qui convertit la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase. La xanthine déshydrogénase représente 90 % de l'activité de la xanthine oxydase dans les tissus sains et ne génère pas

de MDO. La xanthine oxydase, à l'opposé, catalyse la transformation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique en présence d'oxygène, ce qui induit la libération de MDO. Ainsi l'ischémie est-elle responsable d'une élévation de la concentration cellulaire de l'hypoxanthine et de l'activité de la xanthine oxydase, mais c'est la réintroduction brutale de l'oxygène moléculaire lors de la reperfusion qui conduit à une production intense de O_2^- , radical qui participe très probablement aux lésions de reperfusion. Le phénomène d'ischémie-reperfusion a pour conséquence une peroxydation lipidique induite par les MDO.

Il faut toutefois nuancer cette description schématique. En effet, le contenu en xanthine oxydase des tissus est très variable selon les espèces et selon les tissus pour une même espèce ; de plus la vitesse de conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase est variable selon les tissus pour une même durée d'ischémie. D'autres sources de MDO, enfin, sont envisageables au cours de l'ischémie : interruption de la chaîne de transport électronique mitochondriale, PN activés, cytochrome P450 oxydase.

L'importance de ce mécanisme est surtout illustrée par le problème de la conservation d'organes à transplanter. La dysfonction précoce des organes greffés n'est pas due à un rejet immunitaire, mais paraît liée à une altération des tissus par l'ischémie-reperfusion. Le système de la xanthine oxydase entre probablement en jeu, mais l'intervention des PN dans la production locale des MDO n'est pas à négliger : au cours de l'oedème pulmonaire de reperfusion survenant après ischémie par clampage et déclampage de l'aorte, on observe une accumulation dans les capillaires pulmonaires de P.N qui libèrent des MDO. Il a été démontré que la déplétion ou l'inactivation des P.N. prévient en partie ces lésions.

4.11. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (V.I.H.)

L'infection par le V.I.H. est caractérisée par un dysfonctionnement progressif du système immunitaire pouvant conduire au S.I.D.A. (Syndrome d'immunodéficience acquise) caractérisé par la survenue d'infections opportunistes et de néoplasies. Après la contamination par le V.I.H., suit une longue période de latence durant laquelle le patient est asymptomatique, bien que son système immunitaire produise des anticorps dirigés contre le virus. Cependant, cette phase de séropositivité s'accompagne d'anomalies dans le fonctionnement du système immunitaire : dérèglement ou inefficacité de certains processus (17).

Ainsi l'étude du poumon profond de patients séropositifs asymptomatiques par la technique du LBA a permis de déceler une alvéolite à lymphocytes cytotoxiques chez de nombreux sujets. Cette infiltration est attribuée à un recrutement de lymphocytes

cytotoxiques à partir du sang périphérique, et est dirigée contre les diverses cellules infectées par le V.I.H. Le V.I.H., en effet, est capable d'infecter les M.A. qui sont alors détruits par les lymphocytes. L'étude de ces M.A. infectés démontre qu'ils sont activés et libèrent des quantités exagérées d'oxydants.

Il a été suggéré que les MDO libérés pourraient interférer dans le fonctionnement des lymphocytes T. On manque toutefois encore d'arguments pour incriminer les MDO dans la physiopathologie de l'infection par le V.I.H.

V - MECANISMES PULMONAIRES DE DÉFENSE ANTIOXYDANTE

La production d'agents oxydants, qu'elle survienne dans des conditions physiologiques ou pathologiques, nécessite que toutes les cellules métaboliquement actives établissent une stratégie antioxydante afin d'éviter ou de limiter les lésions induites par ces oxydants. Outre la prévention de la formation des radicaux libres, l'organisme a recours à des antioxydants endogènes et exogènes.

5.1. Prévention et compartimentalisation de la formation des radicaux libres

5.1.1 Prévention de la formation des radicaux libres

La prévention d'un excès de production de radicaux libres est une première étape essentielle pour la survie cellulaire, car des MDO potentiellement toxiques sont générés continuellement au cours de la respiration cellulaire normale (18).

Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, la majeure partie de l'oxygène métabolisé est transformée en eau sans libération significative de radicaux libres, grâce à la réduction tétravalente de l'oxygène par la cytochrome oxydase mitochondriale. Des radicaux libres peuvent cependant apparaître au cours de ce processus (en particulier O_2^- à la faveur d'une hyperoxie) ; ils seront alors séquestrés dans des sites actifs de la cytochrome oxydase et resteront séparés des autres compartiments intracellulaires. La cytochrome oxydase mitochondriale se comporte donc comme un "engloutisseur" métabolisant plus de 90 % de l'oxygène des cellules pulmonaires, de façon à éviter une formation significative de radicaux libres. Des conditions pathologiques telles que l'hypoxie sont susceptibles de réduire la cytochrome oxydase, ce qui aboutit à une augmentation de libération de radicaux libres.

Les autres sources cellulaires d'oxydants sont multiples : péroxysomes, microsomes, membranes nucléaires, enzymes liées à la membrane cellulaire, enzymes solubles. Dans certaines conditions, ces sources peuvent contribuer de façon notable à une agression oxydante. En situation de normoxie, les niveaux de base des oxydants dans ces sites dépendent de la présence locale de substrats, de la disponibilité de Fe^{2+} et de la concentration des antioxydants. L'équilibre relatif de ces facteurs détermine le degré de compartimentalisation des oxydants produits à distance des cellules cibles potentielles.

5.1.2. Compartimentalisation des métaux transitionnels

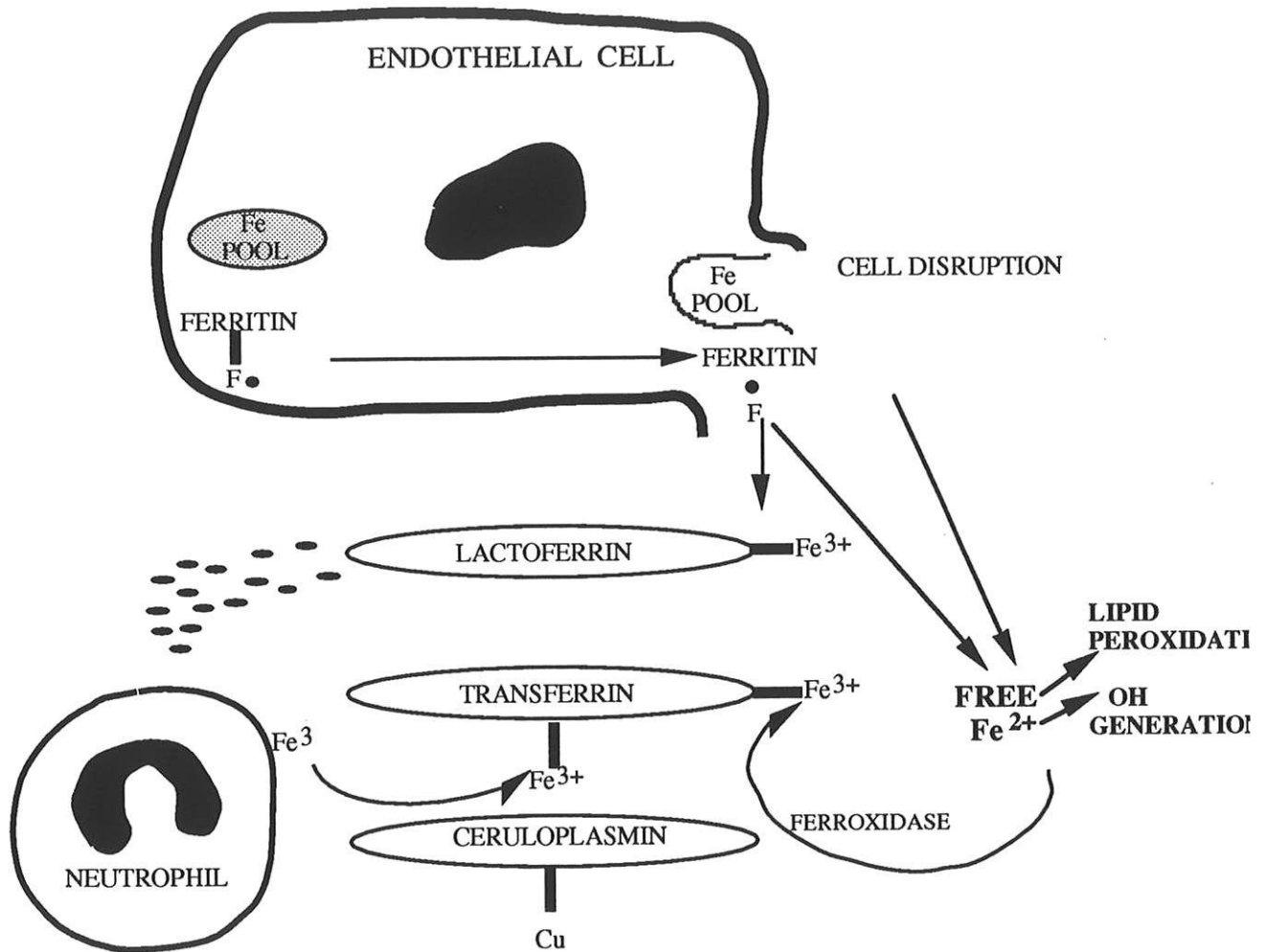
Les ions métalliques transitionnels, tels le fer et le cuivre, jouent un rôle important dans la génération des lésions tissulaires induites par les oxydants. En effet, ils participent aux réactions de Haber-Weiss et de Fenton qui aboutissent au radical OH° ; ils facilitent enfin la peroxydation lipidique avec production d'aldéhydes cytotoxiques.

La réactivité et la toxicité intenses du radical OH° , comparées à celles de O_2^- et de H_2O_2 , font que OH° est considéré comme le métabolite toxique ultime dans de nombreuses réactions à radicaux libres. La prévention de la formation de OH° , par le biais de la limitation de la disponibilité du métal transitionnel, est une défense antioxydante essentielle qui s'exerce dans le secteur extracellulaire. L'espace extracellulaire constitue un lieu important pour le contrôle de la disponibilité du métal transitionnel et la prévention de la formation de OH° : car les phagocytes y libèrent en effet les substrats de la réaction d'Haber Weiss, et il y a un manque relatif de systèmes enzymatiques extracellulaires pour éliminer ces MDO.

La disponibilité du fer libre extracellulaire capable de réagir avec O_2^- et H_2O_2 est limitée par plusieurs mécanismes. L'hémoglobine stockée dans les érythrocytes riches en mécanismes de défense antioxydante libère facilement son fer dans le secteur extracellulaire pour se lier à l'haptoglobine et l'hémopexine. La majorité du fer libre extracellulaire se lie avidement, sous forme d'ion ferrique Fe^{3+} , à la transferrine et à la lactoferrine. Il s'agit de deux glycoprotéines servant de vecteurs de transport pour le fer dans la circulation. Le fer lié est bien sûr indisponible pour participer à la réaction d'Haber-Weiss. La transferrine et la lactoferrine ne sont que partiellement saturées dans des conditions physiologiques, ce qui implique un potentiel antioxydant considérable. La Céruléoplasmine est une autre glycoprotéine plasmatique qui possède un pouvoir antioxydant important dans le milieu extracellulaire, grâce à plusieurs actions : elle prévient la génération non enzymatique de O_2^- ; elle empêche la formation de OH° par sa liaison au cuivre ; c'est un piègeur de O_2^- et OH° ; et surtout, la céruléoplasmine

ferroxydase catalyse l'oxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} et accélère sensiblement la vitesse d'interaction transferrine- Fe^{3+} .

Représentation schématique des mécanismes extracellulaires et intracellulaires prévenant la participation du fer aux réactions oxydantes (18)



Dans la cellule, la plus grande partie du fer est liée à la ferritine, mais il existe aussi une réserve de fer intracellulaire non lié à des protéines, qui participe à la synthèse de protéines ferriques et à des réactions à radicaux libres. Il est donc nécessaire que des systèmes enzymatiques intracellulaires (catalase, SOD superoxyde dismutase) détruisent O_2^- et H_2O_2 avant qu'ils n'atteignent cette réserve de fer libre et ne réagissent pour donner OH^\bullet . A l'intérieur des zones tissulaires inflammatoires, les cellules lésées laissent s'échapper le fer libre et le fer lié à la ferritine, dans le secteur extracellulaire. Le fer lié à la

ferritine se mobilise à partir de la protéine et rejoint le fer libre qui, après interaction avec des radicaux organiques ou O_2^- libérés par les phagocytes, peut promouvoir la peroxydation lipidique et la génération de OH° .

Tous ces éléments permettent d'expliquer que des tissus lésés développent plus facilement que des tissus sains des lésions induites par les oxydants. Ces observations suggèrent un rôle du fer dans la pathogénie de l'emphysème : les macrophages alvéolaires des sujets fumeurs contiennent davantage de fer lié à la ferritine que ceux des sujets non fumeurs, et l'abondance d'ascorbate et de O_2^- dans les poumons des fumeurs peut entraîner la libération de fer et favoriser les lésions dues aux oxydants. Les réactions catalysées par le fer peuvent, elles, être limitées par la présence de la transferrine et de la lactoferrine : l'excès de transferrine dans le secteur plasmatique permettrait d'amener une concentration alvéolaire et tissulaire suffisante dans les zones inflammatoires pour lier rapidement le fer dégagé par les MA ; la libération de lactoferrine par les phagocytes représente un autre moyen de protection contre le fer extracellulaire produit par l'inflammation cellulaire.

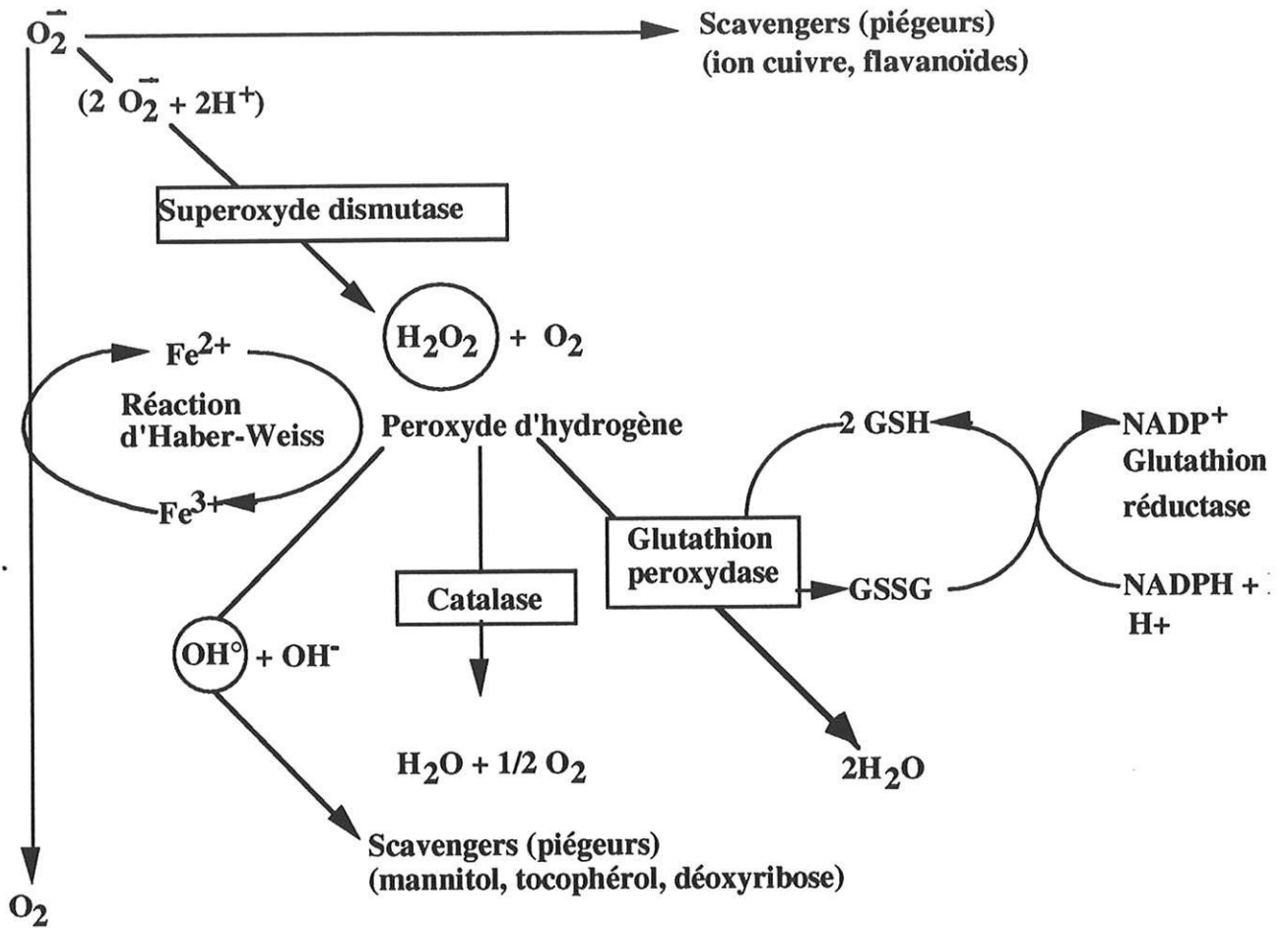
De tous ces éléments, on peut conclure que les métaux transitionnels, et en particulier le fer, tiennent une place importante dans le mécanisme lésionnel des oxydants.

5.2. Antioxydants endogènes

Les antioxydants, qu'ils soient d'origine endogène ou exogène, se comportent comme des piègeurs de radicaux libres : ils se chargent de l'élimination des oxydants ou de la prévention de leur conversion en dérivés plus toxiques.

5.2.1. Antioxydants endogènes enzymatiques

La superoxyde dismutase SOD, la catalase et les enzymes du cycle "redox" du glutathion sont les premiers mécanismes intracellulaires de défense antioxydante à entrer en jeu lors d'une agression oxydante. Ces enzymes permettent l'élimination de O_2^- et des hydroperoxydes susceptibles d'oxyder des substrats cellulaires, et elles préviennent les réactions en chaîne des radicaux libres en diminuant la concentration des radicaux libres disponibles pour engager le processus.



Antioxydants endogènes enzymatiques (1)

- Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase SOD, premier système antioxydant étudié par Mac Cord, catalyse la dismutation de O_2^- en H_2O_2 :



Les enzymes du système SOD sont très efficaces puisqu'elles multiplient le temps spontané de dismutation de O_2^- par le facteur 10^4 . La fonction de ces métalloenzymes est liée à la capacité de leurs sites actifs à vaincre la répulsion électrostatique des ions O_2^- chargés négativement.

Chez les mammifères, il existe plusieurs types d'enzymes SOD :

- une forme de localisation cytoplasmique : la Cupro-Zinc-SOD, qui est la forme prédominante. Le cuivre est essentiel pour l'activité catalytique de l'enzyme et le zinc confère la stabilité à la structure protéique. Les concentrations les plus élevées sont retrouvées dans le foie et le cerveau, et les plus basses dans le poumon, le pancréas et les érythrocytes.

- une forme de localisation mitochondriale : la manganèse-SOD, qui élimine le O_2^- formé durant le transport électronique dans la chaîne mitochondriale.

- une forme extracellulaire, qui est une glycoprotéine hydrophobe contenant du cuivre, présente dans la plupart des tissus humains et en particulier dans le plasma.

Il faut noter que la contribution de la SOD aux mécanismes cellulaires antioxydants peut varier selon les conditions expérimentales : dans certaines préparations, la SOD augmente les peroxydations lipidiques ; dans d'autres, la SOD limite les lésions membranaires. Ces effets opposés paraissent déterminés par les concentrations locales du fer libre et de la catalase. En présence d'un excès de fer, le H_2O_2 généré par l'action de la SOD peut se transformer en radical OH° bien plus toxique, grâce à la réaction d'Haber-Weiss. Si le fer tissulaire est indisponible, la catalase ou les peroxydases réduisent le H_2O_2 formé par la SOD en produits non toxiques, et la SOD a alors un effet protecteur antioxydant par l'élimination de O_2^- . Mais dans le cas d'une activité insuffisante de la catalase pour métaboliser le H_2O_2 , la SOD peut majorer les lésions tissulaires.

Ce sont des arguments indirects qui suggèrent que la SOD est capable de protéger le poumon contre les attaques des oxydants (2) : les lésions pulmonaires dues à l'hyperoxie chez le rat sont potentialisées par un inhibiteur de la Cu-Zn-SOD ; l'augmentation de la concentration pulmonaire en SOD est habituellement associée à un certain niveau de protection contre l'agression des oxydants ; le phénomène de tolérance à l'hyperoxie s'accompagne d'une élévation des enzymes pulmonaires antioxydants comme la SOD, la

catalase et les enzymes du cycle redox du glutathion. Enfin, la SOD semble jouer un rôle capital dans la protection pulmonaire contre les lésions de l'hyperoxie chez les nouveau-nés ; le bas niveau de la SOD pulmonaire chez le fœtus humain pourrait expliquer la fréquence de l'atteinte respiratoire en cas de prématurité.

- Catalase

Cette hémoprotéine dégrade H_2O_2 en eau et O_2 :



Cette enzyme a une activité réductrice appréciable pour les petites molécules comme H_2O_2 , les méthyl ou éthyl hydroperoxydes. Elle ne peut néanmoins métaboliser les grosses molécules peroxydes telles les hydroperoxydes lipidiques issus de la peroxydation lipidique.

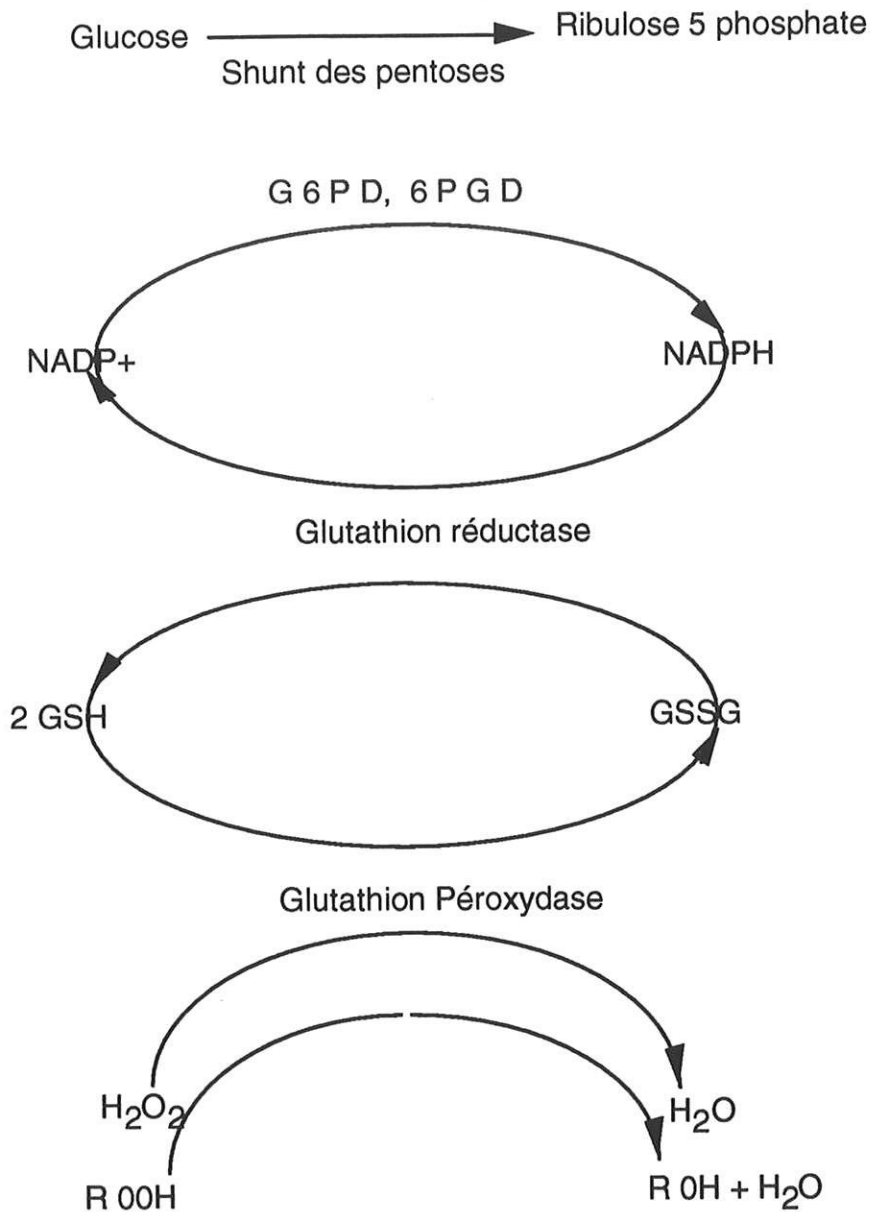
La catalase possède une grande capacité de réaction, mais agit avec une faible affinité pour ses substrats. Son activité augmente de façon linéaire avec la concentration de H_2O_2 : pour de fortes concentrations de H_2O_2 , la catalase exerce une plus grande activité de détoxification que la glutathion peroxydase.

La catalase est principalement localisée dans les peroxyosomes qui contiennent la plupart des enzymes générant H_2O_2 dans les cellules aérobies. Il y a une grande variation de distribution de la catalase dans l'organisme humain, selon les lignées cellulaires : les hépatocytes et les érythrocytes sont les cellules les plus riches en catalase ; à l'opposé, les cellules pancréatiques et pulmonaires ont les plus bas niveaux de catalase.

Des arguments indirects confortent l'hypothèse du rôle protecteur de la catalase pulmonaire : elle protège les cellules pulmonaires contre les lésions induites par l'hyperoxie, et son activité s'élève lors du phénomène de tolérance à l'hyperoxie.

- cycle redox du glutathion

Ce système enzymatique constitue le mécanisme central de réduction des hydroperoxydes intracellulaires. Il complète la catalase dans son rôle de réducteur de H_2O_2 , mais la surpasse par sa capacité à éliminer d'autres variétés d'hydroperoxydes toxiques : les autres substrats métabolisés sont les grosses molécules de peroxydes lipidiques (générés par l'action de radicaux libres sur les lipides membranaires polyinsaturés) et les produits des réactions catalysées par la lipoxygénase.



L'enzyme clé du cycle redox, responsable de la réduction des hydroperoxydes, est la glutathion-Péroxydase GSH-PX : il s'agit d'une protéine tétramérique comportant 4 atomes de Sélénium liés à la cystéine, qui engendrent l'activité catalytique. La GSH-PX utilise le glutathion réduit GSH comme cosubstrat indispensable, et en catalyse la transformation en glutathion oxydé GSSG. Les cellules fonctionnant normalement maintiennent un rapport intracellulaire GSH/GSSG élevé, de façon à garantir la disponibilité du glutathion réduit et promouvoir ainsi la réduction active des

hydroperoxydes par le cycle redox du glutathion. De plus, le maintien d'un rapport élevé permet à des réactions non radicalaires dépendantes de GSH de survenir (sans qu'intervienne le cycle redox), évitant ainsi l'accumulation de GSSG qui peut être cytotoxique. Les cellules ont à leur disposition deux mécanismes pour conserver un rapport GSH/GSSG intracellulaire élevé : le transport transmembranaire de GSSG hors de la cellule, et la réduction de GSSG en GSH par la glutathion réductase (GSSG réductase). La régénération de GSH par la GSSG réductase nécessite la présence d'équivalents réducteurs NADPH qui sont amenés par l'activité de la glucose 6 phosphate déshydrogénase G6PD et de la 6 phosphogluconate déshydrogénase 6PGD dans le shunt des pentose-phosphates.

La distribution cellulaire de la GSH-PX est intimement liée à celle de la GSSG réductase : ces deux enzymes prédominent dans le cytosol, mais la mitochondrie possède aussi une petite activité du cycle redox et le plasma contient une GSH-PX. On observe l'activité la plus élevée du cycle dans les érythrocytes et les hépatocytes, et un niveau d'activité intermédiaire dans le coeur et les poumons.

La catalase et le cycle redox du glutathion ont des capacités qui se chevauchent pour éliminer H_2O_2 . La GSH-PX est la voie privilégiée pour la dégradation de H_2O_2 en faible concentration ; l'action de la catalase devient plus importante au fur et à mesure que la concentration de H_2O_2 augmente, atteignant des niveaux qui nécessitent une constante de vitesse enzymatique élevée. Cependant, le système du glutathion joue un rôle capital parmi les mécanismes antioxydants intracellulaires, bien plus décisif que celui de la catalase, et ce pour plusieurs raisons : les enzymes du cycle redox sont largement distribuées dans le cytosol, ce qui leur confère une plus grande disponibilité et une plus grande probabilité de contact avec les oxydants, par comparaison avec la catalase confinée dans les péroxysomes ; le cycle redox a la capacité supplémentaire de métaboliser des hydroperoxydes toxiques autres que H_2O_2 .

La SOD, le cycle redox du glutathion et la catalase peuvent être considérés comme des systèmes enzymatiques complémentaires qui se combinent pour limiter l'agression oxydante des MDO sur les cellules. Ces systèmes se protègent mutuellement contre l'inactivation par les oxydants, selon des interactions dont la nature est encore imprécise : H_2O_2 est capable d'inactiver la SOD et O_2^- peut inhiber la catalase et la fonction peroxydase ; la SOD est censée prévenir l'inactivation de la catalase et de la GSH-PX, tandis que ces derniers préservent la SOD.

La plupart des cellules possèdent un potentiel peroxydase supplémentaire, grâce au fonctionnement de diverses GSH-PX non selenium dépendantes, telles les GSH transférases. Ces enzymes permettent de compenser partiellement la déficience de la protection antioxydante liée à une carence en selenium. Mais à la différence de la GSH-PX selenium dépendante, ces enzymes ne métabolisent pas H_2O_2 et agissent spécifiquement

sur les hydroperoxydes organiques de bas poids moléculaire. Enfin, une activité peroxydase additionnelle est disponible par l'intermédiaire de la lactoperoxydase, la myéloperoxydase, de la prostaglandine synthétase et du cytochrome P450 (bien que ces systèmes ne fonctionnent pas comme des antioxydants mais activent les xénobiotiques en pro-oxydants).

5.2.2. Antioxydants endogènes non enzymatiques

De nombreuses substances non enzymatiques peuvent bloquer la propagation de la réaction en chaîne des radicaux libres. Ces substances ont la particularité de céder un électron et donc d'acquérir une structure radicalaire, sans pour autant devenir biologiquement réactives. La plupart sont régénérées sous l'action d'enzymes réducteurs. Certaines de ces substances neutralisent un seul radical libre par molécule : ce sont des piègeurs dits stoechiométriques qui n'agissent généralement qu'à des concentrations élevées et semblent jouer un rôle négligeable par rapport aux enzymes antioxydants (1).

- Antioxydants intracellulaires

Le glutathion réduit GSH, substrat de la GSH-PX, est une petite molécule (gamma glutamine-cystéine-glycine) qui représente le composé thiol (SH) le plus abondant de l'organisme. GSH est essentiellement localisé dans le secteur intracellulaire, mais il en existe aussi dans les alvéoles pulmonaires. Ce GSH libre assure une fonction d'antioxydant hydrosoluble, sans lien avec son rôle dans le cycle redox du glutathion : il interagit directement avec des radicaux libres dans des réactions non enzymatiques. Les radicaux libres cibles de GSH regroupent les MDO tels O_2^- et OH° , ainsi que les radicaux libres organiques produisant GS° et éventuellement GSSG (obtenu par un processus de transfert de radical). Le deuxième chapitre précisera les propriétés du glutathion et son implication dans diverses pathologies pulmonaires.

La taurine est un béta-acide aminé présent dans l'espace extracellulaire et intracellulaire de la plupart des organes. Il s'accumule de préférence dans les cellules qui libèrent de grandes quantités de radicaux libres. En plus de son rôle indiscutable dans les réactions de conjugaison avec les xénobiotiques, il a aussi la propriété de protéger les cellules contre la toxicité des MDO, en réagissant directement avec des oxydants comme HOCl pour former des produits moins réactifs.

ANTIOXYDANTS ENDOGENES

NATURE	LOCALISATION	ACTIONS-CIBLES
<u>ENZYMES</u>		
SOD	Cytosol, mitochondrie, plasma	$O_2 \longrightarrow H_2O_2$
Catalase	Péroxyosomes	$H_2O_2 \longrightarrow$ éthyl, méthyl hydropéroxydes
Cycle du glutathion	Cytosol, mitochondrie	Réduction de H_2O_2 , autres hydropéroxydes
<u>NON ENZYMATIQUES</u>		
GSH	Intracellulaire, alvéole	Réduction de \bar{O}_2 , OH° , radicaux libres organiques
Taurine	Intracellulaire	Conjugaison des xéno- biotiques, action sur HOCl
Céruleoplasmine	Plasma	Piégeur de \bar{O}_2 , OH° Métaux transitionnels
Acide urique	Ubiquitaire	Piégeur de \bar{O}_2 , OH° - radicaux péroxyl - Métaux transitionnels
Glucose	Ubiquitaire	Piégeur de OH°
Cystéine, cystéamine	Ubiquitaire	Réduction de divers composés organiques
Mucus trachéo-bronchique	Voies aériennes supérieures	Piégeur des oxydants inhalés
Albumine	Ubiquitaire	Métaux transitionnels - Réaction avec oxydants

- Antioxydants extracellulaires

On désigne ainsi des substances qui ont une large distribution dans l'organisme, aussi bien dans le secteur extracellulaire qu'intracellulaire, mais dont l'activité antioxydante s'exerce dans le milieu extracellulaire.

La céruléoplasmine dont nous avons détaillé les actions (paragraphe 4.1.2) a entre autres la propriété de réduire O_2^- en H_2O_2 de façon stoechiométrique en présence de cuivre. Elle remplit donc le même rôle que la SOD.

L'acide urique, protéine issue du catabolisme des purines, possède des propriétés antioxydantes puissantes pour des concentrations plasmatiques habituelles : prévention de l'oxydation de la vitamine C, liaison aux métaux transitionnels qui ne peuvent ainsi stimuler les réactions à radicaux libres, piégeage direct de divers oxydants (O_2^- , OH° , radicaux péroxyl provenant de la peroxydation lipidique). L'acide urique se comporte comme un antioxydant sacrificiel car il subit une dégradation irréversible lors de sa participation aux réactions d'oxydo-réduction.

Le glucose, largement répandu dans l'organisme, a la capacité de piéger les radicaux OH° .

La cystéine et la cystéamine sont des acides aminés susceptibles de réduire divers composés organiques, en donnant un électron à partir des groupes sulfhydryles.

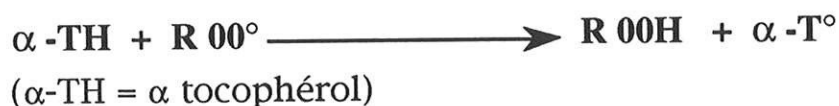
Certaines molécules de poids moléculaire élevé, présentes en quantité excessive ou exerçant des fonctions non vitales pour l'organisme, peuvent servir de cible aux radicaux libres et devenir des "antioxydants sacrificiels". Ainsi, le mucus trachéobronchique contient des substances protéiques et glycoprotéiques capables de piéger les oxydants de la fumée de cigarette. L'albumine a le pouvoir de se lier au fer et au cuivre, tout en permettant à ces métaux de participer à la réaction d'Haber-Weiss ; mais tout radical OH° généré réagit immédiatement avec l'albumine et est ainsi piégé. Les radicaux libres sont donc rapidement inactivés avant de réagir avec d'autres structures protéiques plus vitales. Le rôle de ces molécules de haut poids moléculaire reste cependant limité, car elles n'ont pas la capacité de réduire une grosse quantité de MDO, en comparaison des systèmes de protection majeurs comme les enzymes antioxydants.

5.3. Antioxydants exogènes

5.3.1 Vitamines

- Vitamine E : Alpha-Tocophérol

Cet antioxydant liposoluble représente la principale défense contre l'action toxique des oxydants sur les membranes cellulaires dans les tissus humains. La vitamine E convertit O_2^- , OH° et les radicaux peroxy lipidiques en formes moins réactives :



Le radical α tocophéryle αT° est suffisamment stable pour interrompre la réaction en chaîne des radicaux libres. αT° peut être recyclé en sa forme réduite a TH grâce à l'action de l'ascorbate, et probablement aussi grâce à l'activité du couple ascorbate-cycle redox du glutathion.

Si la vitamine E est particulièrement efficace pour rompre la chaîne des réactions de peroxydation, son activité antioxydante se localise essentiellement à la membrane cellulaire, et elle ne contribue que de façon marginale à la capacité antioxydante du serum. Au plan pulmonaire, on sait que le déficit systémique en vitamine E entraîne une exacerbation des lésions induites par l'hyperoxie ou l'ozone ; mais la majoration des taux de vitamine E ne protège pas contre l'atteinte pulmonaire due aux oxydants (2).

En plus de son rôle antioxydant, la vitamine E peut moduler une série de fonctions membranaires de la cellule endothéliale par altération de l'état physique de la membrane lipidique : transport de la 5 hydroxytryptamine, production des eicosaenoïdes, stabilisation des structures membranaires, maintien de la perméabilité membranaire. Par ailleurs, la vitamine E inhibe l'activité de la 5 lipoxygénase et supprime le chimiotactisme des P.N.

- Béta carotène

Le bêta carotène est un précurseur métabolique caroténoïde de la vitamine A. Sa liposolubilité lui permet de s'accumuler en forte concentration dans les membranes de certains tissus.

Il se comporte comme un piègeur non stoechiométrique de O_2^- et réagit aussi directement avec les radicaux libres peroxydes.

La carence en vitamine A entraîne une diminution du taux de glutathion et de l'activité de la glutathion S-transférase dans les poumons de rats exposés à l'oxygène à

pression normale. Mais dans des conditions d'hyperoxie, il semble que le β carotène ait des propriétés prooxydantes.

- Vitamine C : acide ascorbique

L'acide ascorbique, du fait de son hydrosolubilité, est disponible dans les milieux extracellulaire et intracellulaire de la plupart des systèmes biologiques. Il peut ainsi participer aux réactions d'oxydoréduction.

On lui prête une activité antioxydante qui repose sur plusieurs mécanismes :

- réaction avec le radical alpha Tocopheryle qui permet la régénération de la vitamine E, avec formation du radical ascorbyle très stable.

- piégeage direct de O_2^- et OH° avec production d'un radical libre semi-déhydroascorbate qui est ensuite réduit par le glutathion.

- suppression de l'inactivation des antiprotéases suscitée par les oxydants provenant du système halide-myélopéroxydase neutrophile, et neutralisation dose dépendante des oxydants extracellulaires libérés par les P.N stimulés.

Cependant, la vitamine C n'est habituellement pas considérée comme un antioxydant majeur, car elle possède des propriétés pro-oxydantes additionnelles : c'est probablement le seul agent réducteur cellulaire qui, additionné à O_2^- , est capable de convertir Fe^{3+} en Fe^{2+} ensuite disponible pour la réaction d'Haber-Weiss. La prévalence de la propriété antioxydante ou pro-oxydante dans un tissu dépend de l'importance des réserves de fer utilisables, dans des conditions favorisant une production excessive d'oxydants.

- Vitamine P = Flavanoïdes

La vitamine P jouerait également un rôle antioxygène stoechiométrique. Elle peut être régénérée grâce à l'action de la vitamine C (1).

5.3.2. Minéraux

Le Selenium constitue un élément important de la GSH-Péroxydase : la GSH-PX possède un atome de Selenium dans chacune de ses 4 sous unités représentant le site actif. Le tiers de l'activité de la GSH-PX pulmonaire seulement est non selenium dépendante.

La carence en selenium chez le rat conduit à une diminution d'activité de la GSH-PX pulmonaire et à une réduction de la survie en hyperoxie.

5.3.3. Lipides (2)

Les conséquences d'un régime riche en graisses saturées ou insaturées sur l'atteinte pulmonaire induite par les oxydants demeurent imprécises. Les rats soumis à un régime riche en graisses saturées sont davantage susceptibles de développer des lésions pulmonaires dues à l'hyperoxie, que les rats suivant un régime standard. Les résultats sont contradictoires dans des conditions associant déficit en vitamine E et toxicité pulmonaire de la Nitrafurantoïne : les rats absorbant un régime riche en graisses saturées survivent en hyperoxie, alors que les rats consommant davantage de graisses polyinsaturées ont une survie plus faible.

5.3.4. Protéines

L'apport protéique alimentaire fournit des précurseurs de structure pour les systèmes antioxydants pulmonaires. Cela a été mis en évidence par des études menées dans des conditions d'hyperoxie : un régime pauvre en protéines chez les rats s'accompagne d'une diminution du taux de survie par comparaison avec des rats recevant une ration protéique adéquate ; le contenu pulmonaire en glutathion total (GSH + GSSG) augmente chez les rats absorbant un régime protéique adapté, mais n'augmente pas dans le cas d'un régime déficient en protéines ; l'addition d'acides aminés soufrés (cystéine, cystine, méthionine) au régime pauvre en protéines prévient la baisse de survie des rats et entraîne une augmentation des taux de glutathion pulmonaire.

Il est donc logique d'envisager qu'un régime contenant des acides aminés soufrés puisse apporter des précurseurs du glutathion pulmonaire et participer de façon non négligeable à l'optimisation des défenses pulmonaires antioxydantes. Ces résultats suggèrent que les effets délétères additionnels d'une carence en protéines ou en calories peuvent se manifester au cours d'une agression pulmonaire oxydante.

5.4. Compartimentalisation des antioxydants

La plupart de ces mécanismes antioxydants disponibles dans l'organisme participent très certainement au maintien d'un équilibre redox physiologique dans le poumon. Ces divers systèmes, notamment enzymatiques, sont complémentaires mais situés dans des compartiments cellulaires différents.

Les enzymes antioxydants (SOD, catalase, cycle redox du glutathion) se localisent essentiellement dans les cellules pulmonaires, et éliminent les MDO et les hydroperoxydes générés de façon physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal. Leur rôle

protecteur lors d'une agression oxydante au niveau pulmonaire a été suggéré par l'étude du phénomène de tolérance à l'hyperoxie, qui semble dépendre d'une élévation des taux pulmonaires d'enzymes antioxydants et de facteurs sériques (interleukine 1, Tumor necrosis factor).

En raison de la particularité anatomique du poumon qui comporte une très grande surface de contact avec le milieu extérieur et ses oxydants, on conçoit bien la nécessité d'une protection antioxydante au niveau extracellulaire chargée de seconder les systèmes intracellulaires. Les voies aériennes principales contiennent des glycoprotéines mucopolypeptides de poids moléculaire élevé synthétisées par les cellules épithéliales bordantes, qui fonctionnent comme des piègeurs sacrificiels. L'espace alvéolaire est capable de recruter une activité antioxydante additionnelle à partir du liquide de recouvrement épithélial qui contient de grandes quantités de GSH et de catalase, et des concentrations plus modestes d'antioxydants variés, tels la céruléoplasmine, la transferrine, la vitamine C, la vitamine E.

Enfin, l'analyse histologique des lésions pulmonaires induites par les radicaux libres, met en évidence une séquestration d'érythrocytes et de plaquettes dans la microvascularisation pulmonaire. Ces cellules sont susceptibles de participer à la pathogénie des lésions induites par les oxydants : libération de fer après hémolyse des érythrocytes, production de substances pro-inflammatoires et d'endopéroxydes par les plaquettes. A l'inverse, ces cellules exercent un rôle protecteur, grâce à l'apport de substances antioxydantes intracellulaires à la microcirculation pulmonaire : les érythrocytes et les plaquettes sont particulièrement riches en catalase et en activité GSH-PX, et des études *in vitro* ont confirmé leur capacité à prévenir les lésions induites par les oxydants.

CHAPITRE II

GLUTATHION : PROPRIETES ET ROLES EN PATHOLOGIE PULMONAIRE

L'acide glutamique $\text{H}_2\text{N} - \overset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ joue un rôle fondamental dans les réactions de transamination et désamination oxydative - amination réductrice, et intervient en presque tous les points du métabolisme intermédiaire azoté.

La cystéine $\text{H}_2\text{N} - \overset{\text{SH}}{\underset{\text{CH}_2}{|}}{\text{CH}} - \text{COOH}$ est un acide aminé essentiel dont la fonction thiol SH explique plusieurs des propriétés du glutathion.

Enfin, la glycine ou glycofolle $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ est un intermédiaire du métabolisme glucidique et une des principales sources de radicaux monocarbonés indispensables à la biosynthèse des groupes méthyle et formyle des bases puriques.

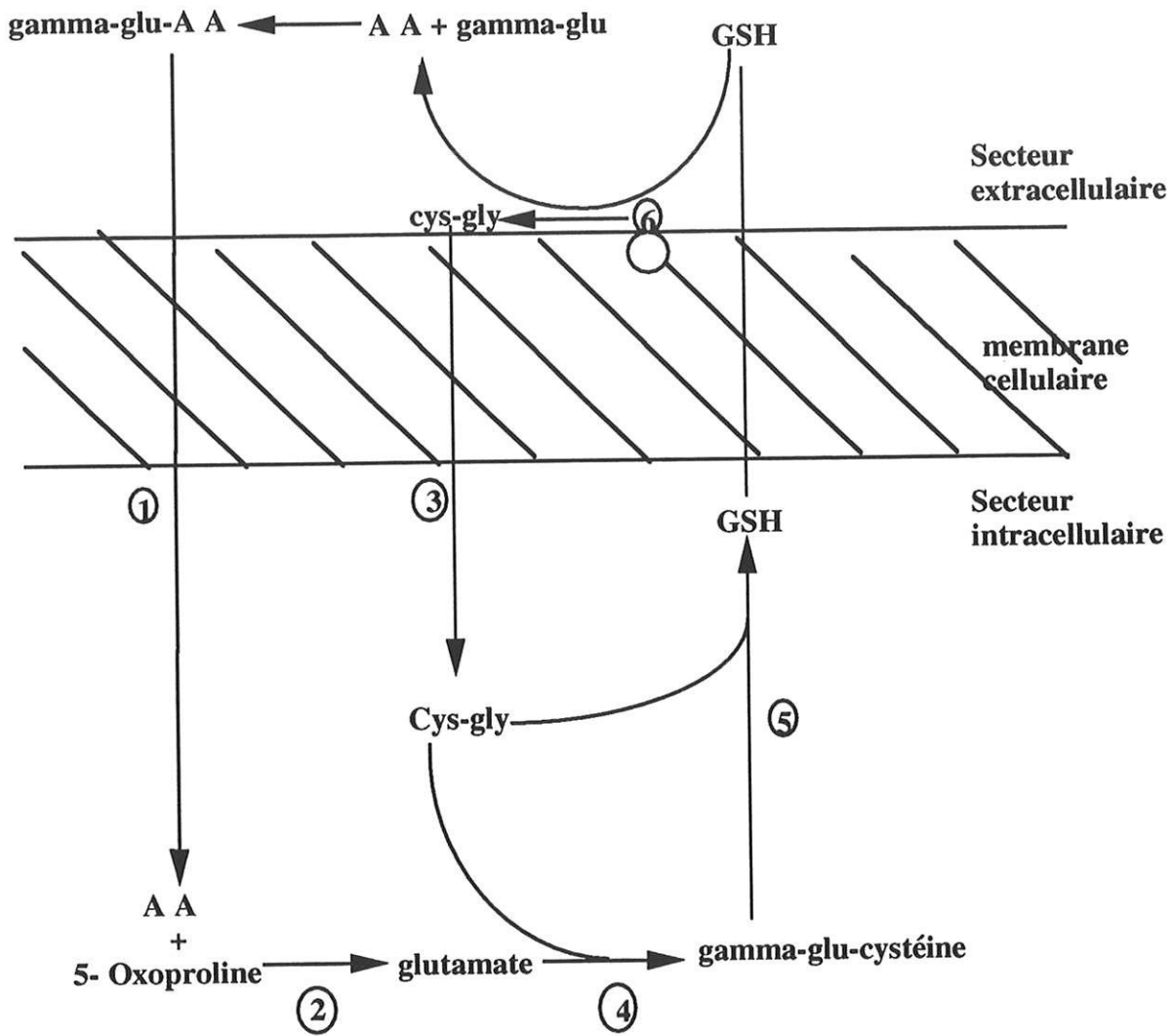
2.2. Synthèse du glutathion

La synthèse et le catabolisme du glutathion dépendent du fonctionnement du cycle gamma-glutamyl.

La synthèse s'effectue dans le milieu intracellulaire par le biais d'une réaction qui utilise successivement deux enzymes : la gamma-glutamyl-cystéine synthétase transforme le glutamate en gamma glutamyl cystéine ; et la glutathion synthétase permet la liaison du glycofolle à cette molécule.

Horton a démontré que la synthèse du glutathion peut se produire dans les macrophages pulmonaires, les pneumocytes II et les cellules de Clara. Il a été mis en évidence également une synthèse du glutathion dans la lignée cellulaire tumorale humaine A549, dérivée des pneumocytes II (20).

CYCLE GAMMA-GLUTAMYL (19)



- ① gamma glutamylcyclotransférase
- ② 5-Oxoprolinase
- ③ Dipeptidase
- ④ gamma glutamyl cystéine synthétase
- ⑤ glutathion synthétase
- ⑥ gamma glutamyl transpeptidase

2.3. Transport extracellulaire

Le glutathion synthétisé dans les cellules est soit utilisé dans divers métabolismes, soit exporté à l'extérieur de la cellule. Le transport du glutathion s'effectue essentiellement sous la forme réduite GSH dans des conditions physiologiques, mais en réponse à une agression oxydante le glutathion quitte la cellule sous la forme di-sulfide GSSG.

On observe ce transport de GSH dans le milieu extracellulaire, à partir de plusieurs types de cellules : fibroblaste, cellule épithéliale, macrophage, lymphocyte. Cependant, on constate des taux plasmatiques de GSH relativement bas, environ 3 fois plus faibles que la concentration cellulaire de GSH qui est évaluée à 0,5 - 10 mM : ce résultat reflète davantage un catabolisme extracellulaire efficace de GSH, plutôt qu'un bas niveau de transport de GSH.

2.4. Catabolisme du glutathion

La demi-vie plasmatique du GSH est très brève, de l'ordre de 1,6 minute. La majeure partie du GSH plasmatique est catabolisée par la gamma-glutamyl transpeptidase gamma GT dans le rein et le poumon, et à un moindre degré dans les autres tissus.

La gamma GT est une enzyme présente dans la membrane cytoplasmique des cellules de l'épithélium sécrétoire essentiellement, mais aussi d'autres cellules comme les M.A, les lymphocytes, les pneumocytes I, les cellules endothéliales des artères pulmonaires et les cellules bronchiques. La gamma GT se compose d'une sous-unité lourde liée à la membrane lipidique et d'une sous-unité légère contenant le site actif qui est dirigé vers le milieu extracellulaire. Elle catalyse la transpeptidation du groupement gamma glutamyl du GSH sur un accepteur approprié : certains acides aminés, des dipeptides, d'autres composés gamma glutamyl, le glutathion lui-même. Le complexe acide aminé-gamma glutamyl peut ensuite pénétrer dans la cellule et y subir des réactions enzymatiques qui le transforment en substrat pour la synthèse du GSH. Quant au dipeptide L.cystéinyl.glycine libéré dans le milieu extracellulaire, il peut soit s'oxyder spontanément et rapidement (surtout en présence de traces de métaux), soit regagner le secteur intracellulaire où une dipeptidase cytosolique le clive en cystéine et glycine qui participent à la synthèse du GSH.

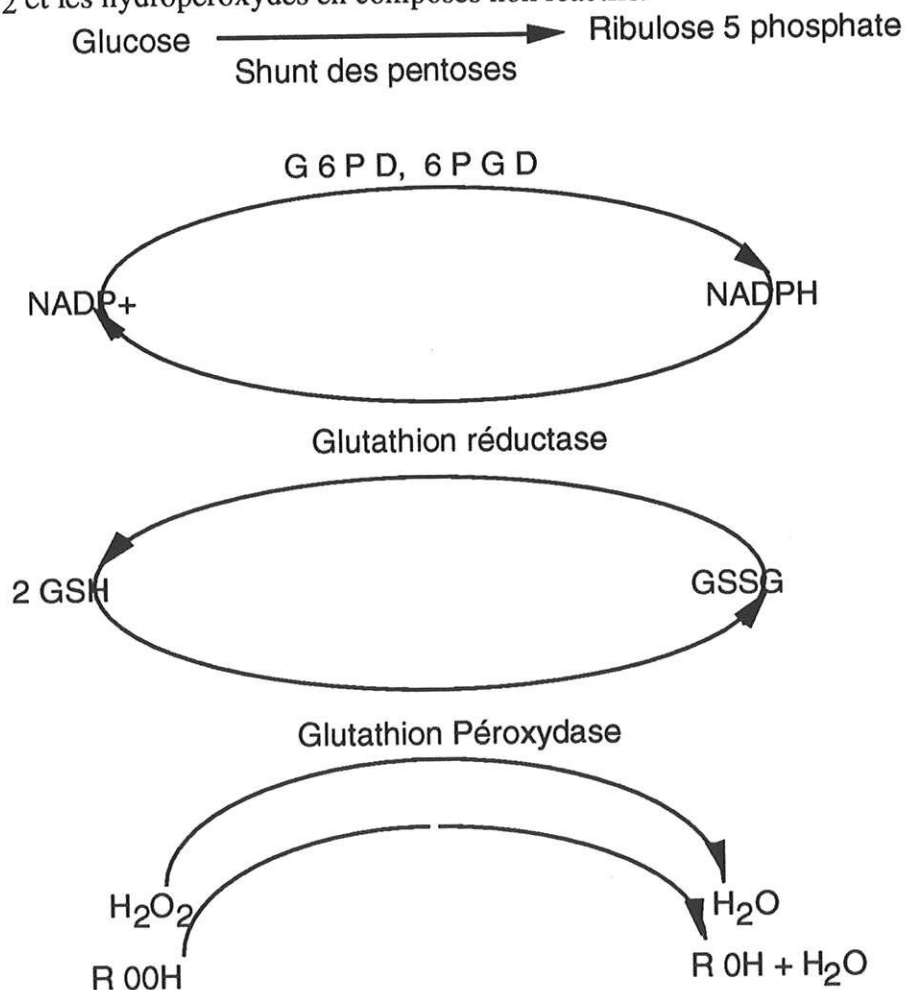
III - FONCTIONS DU GLUTATHION

Au fur et à mesure que s'approfondit la connaissance de ce tripeptide, on constate que la liste de ses fonctions intracellulaires et extracellulaires s'enrichit. Afin de mieux mesurer l'importance des propriétés du glutathion, il faut rappeler que cette molécule représente le composé thiol (-SH) le plus abondant de l'organisme et que le groupement SH est à l'origine de plusieurs des fonctions du GSH.

3.1. Rôle antioxydant

Cette activité antioxydante est certainement l'une des propriétés les mieux connues du glutathion.

Le métabolisme cellulaire normal s'accompagne d'une production de MDO et l'organisme prévient leur action toxique par la mise en place de systèmes protecteurs antioxydants. Dans des conditions physiologiques, le glutathion veille à l'intégrité de la cellule grâce à l'activité de son cycle redox qui, dans le milieu intracellulaire, se charge de convertir H_2O_2 et les hydroperoxydes en composés non réactifs.



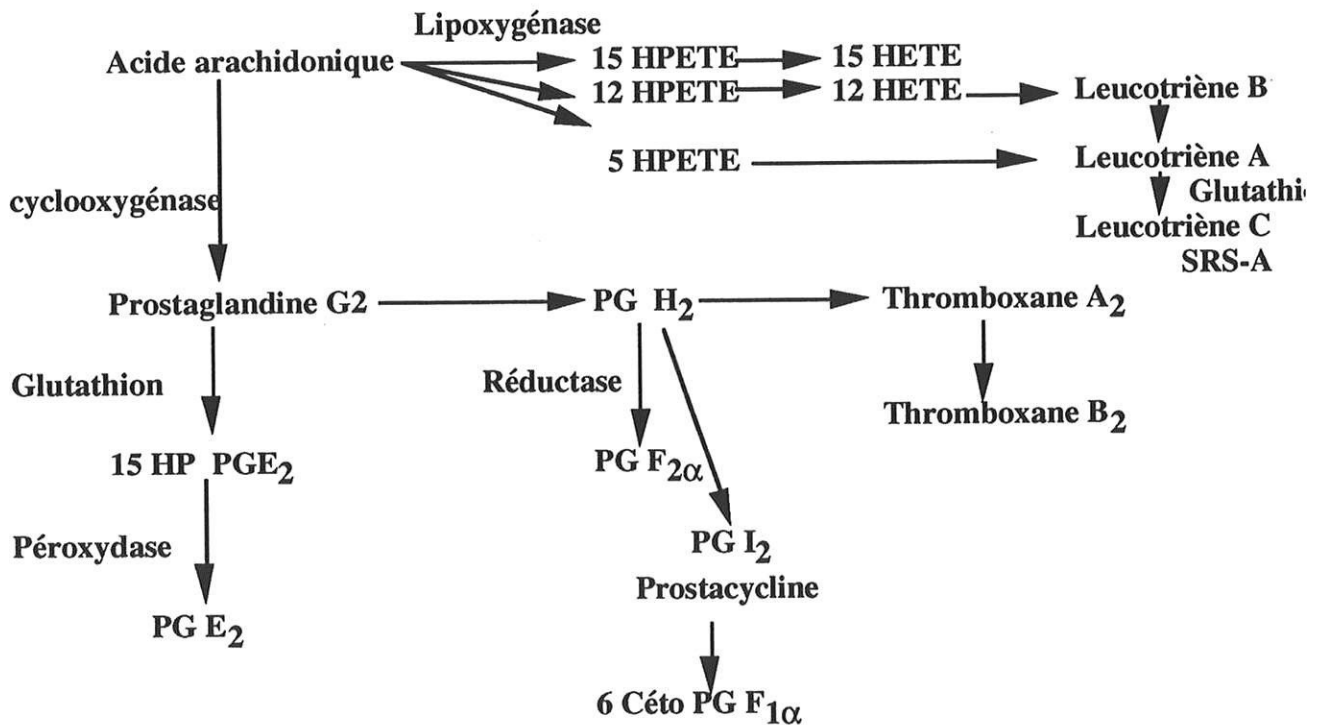
De plus, le glutathion est présent dans le milieu extracellulaire de l'alvéole pulmonaire où il se comporte comme un antioxydant hydrosoluble non enzymatique. Il interagit directement avec des radicaux libres tels O_2^- , OH° et les composés organiques produisant le radical GS° .

3.2. Conjugaison du glutathion

Cette deuxième propriété est importante car elle permet au glutathion d'interférer dans d'autres métabolismes cellulaires et d'assurer un rôle de détoxification.

3.2.1. Conjugaison du GSH avec des molécules endogènes

Le glutathion intervient dans le métabolisme des acides gras insaturés à plusieurs niveaux :



Il faut surtout retenir que la conjugaison du GSH avec la leucotriène A₄ permet d'obtenir la leucotriène C₄ qui, sous l'action de la gamma glutamyl transpeptidase, se transforme en leucotriène D₄. Les leucotriènes C₄ et D₄ agissent comme des

bronchoconstricteurs potentiels et exercent également des effets pro-inflammatoires, tels l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

3.2.2. Conjugaison du GSH avec des molécules exogènes

La conjugaison du GSH avec des molécules exogènes électrophiles peut se produire spontanément ou être catalysée par l'action de GSH transférases. Le foie représente le principal site de conjugaison du GSH mais cette activité a également été détectée dans le poumon. A ce niveau d'ailleurs, on a constaté que la pénétration intracellulaire du GSH présent dans la lumière alvéolaire (au moyen du cycle gamma glutamyl) augmente notablement la vitesse de conjugaison du GSH cellulaire.

L'intérêt fondamental de la conjugaison du GSH avec des molécules électrophiles exogènes (21) réside dans la production de substances non toxiques pour l'ADN, ce qui permet de protéger l'ADN contre l'effet mutagène des radicaux libres. Les GSH transférases accélèrent ce processus de détoxification et réduisent encore davantage la génotoxicité et la cytotoxicité de ces substrats. De plus, ces enzymes exercent une activité GSH-péroxydase sur des molécules électrophiles endogènes résultant de l'action toxique des radicaux libres sur les lipides membranaires et l'ADN.

3.3. Système de transport ATP dépendant

La démonstration a été faite que les substances conjuguées au GSH traversent la membrane cellulaire grâce à un système de transport ATP dépendant. Cette molécule de transport ATP dépendant possède une grande affinité pour la leucotriène C4 et une affinité nette (bien que plus faible) pour GSSG et les leucotriènes D4 et E4. Malgré les différences existant entre la P glycoprotéine résultant du gène MDR de la multirésistance aux médicaments et cette molécule de transport, on peut considérer qu'elle appartient au super groupe ABC (ATP-binding cassette) des systèmes de transport, qui comporte déjà les molécules provenant de l'expression du gène MDR et du gène de la mucoviscidose. Ce super groupe apparaît comme un mécanisme majeur de transport cellulaire des substances conjuguées au GSH, que ce soient des métabolites physiologiques ou des composés toxiques.

3.4. Transport des acides aminés

Le glutathion extracellulaire contribue au transport transmembranaire des acides aminés grâce au cycle gamma glutamyl : sous l'action de la gamma GT, le GSH libre dans

le milieu extracellulaire une fraction gamma glutamyl qui peut se lier à un acide aminé ; le complexe gamma glutamyl - acide aminé est facilement absorbé par la cellule et utilisé dans des voies de métabolisme et biosynthèse variées. Les acides aminés les plus aisément transportés par ce système sont la L-cystine et la L-glutamine, mais d'autres acides aminés sont susceptibles de suivre le même processus pour pénétrer dans la cellule.

Le transport des acides aminés précurseurs du GSH par ce système est très certainement le mécanisme essentiel de transfert du GSH extracellulaire vers le cytoplasme de la cellule.

3.5. Modulation de la réponse immunitaire (22)

On a acquis la certitude que les réponses immunes sont régulées par des peptides "hormones-like" tels les lymphokines et les cytokines. Plus récemment, il a été démontré que les fonctions lymphocytaires subissent aussi l'influence de métabolites de bas poids moléculaire comme la cystéine, libérés par les macrophages et d'autres cellules immunologiquement compétentes. La complexité du processus immunitaire tient en partie au fait que l'activation et la prolifération des cellules T nécessitent l'intervention savamment orchestrée de substances oxydantes comme O_2^- et H_2O_2 , et de substances réductrices telles la cystéine et son dérivé le glutathion.

La cystéine joue un rôle régulateur dans l'expression de certaines gènes immunologiquement compétents et dépendant du facteur de transcription NF κ B : le NF κ B est impliqué dans la transcription entre autres du gène codant pour le récepteur de l'interleukine 2 et on sait que l'ADN du provirus VIH-1 contient deux sites de liaison pour le NF κ B. L'administration exogène de GSH ou de cystéine inhibe l'activité du NF κ B ce qui se traduit entre autres par une inhibition de la production d'interleukine 2 et un ralentissement de la réplication du VIH-1.

Certaines fonctions lymphocytaires importantes sont corrélées de façon positive avec la concentration intracellulaire de GSH : le GSH active la synthèse d'ADN dans des clones de cellules T, active les lymphocytes T cytotoxiques et favorise la prolifération dépendante de l'interleukine 2.

Enfin, les macrophages qui participent à la réponse immunitaire des lymphocytes T en tant que stimulateurs et cellules accessoires, libèrent en permanence de la cystéine au contact des cellules T. La cystéine contribue à la régulation de l'activité des lymphocytes T, de la même façon que les cytokines. Ainsi il a été démontré que les macrophages peuvent entraîner une augmentation du contenu en GSH et de l'activité de synthèse de l'ADN dans des lymphocytes stimulés par des mitogènes.

Toutes ces observations suggèrent qu'une manipulation pharmacologique de la synthèse du GSH ou de sa dégradation pourrait contribuer à une nouvelle approche des thérapeutiques immunosuppressives et immunostimulantes.

3.6. Maintien de l'intégrité des corps lamellaires des pneumocytes II

Une des fonctions décrites pour le GSH se rapporte spécifiquement à un composant essentiel du poumon : le surfactant.

En effet, chez des souris soumises à une déplétion en GSH, on observe une franche diminution et une désintégration des corps lamellaires des pneumocytes II. L'administration intrapéritonéale de glutathion monoester (et non pas celle de GSH) entraîne une augmentation des taux de GSH pulmonaire et prévient l'altération des corps lamellaires des cellules de type II. Ces corps lamellaires constituent l'activité sécrétoire des pneumocytes II qui participent à l'élaboration du surfactant pulmonaire.

Ces observations sont d'un intérêt fondamental si on les rapproche de la pathogénie du SDRA qui s'accompagne d'une agression oxydante, d'une déplétion en GSH (cf infra) et d'anomalies du surfactant.

3.7. Autres fonctions du GSH

Le GSH prend part à bien d'autres fonctions métaboliques essentielles pour la cellule : il sert de coenzyme pour de nombreuses réactions ; il participe aux échanges thiol-disulfides qui interviennent dans la synthèse et la dégradation des protéines et de l'ADN ; il contrôle la formation des microtubules dans les cellules.

IV - GLUTATHION ET POUMON NORMAL

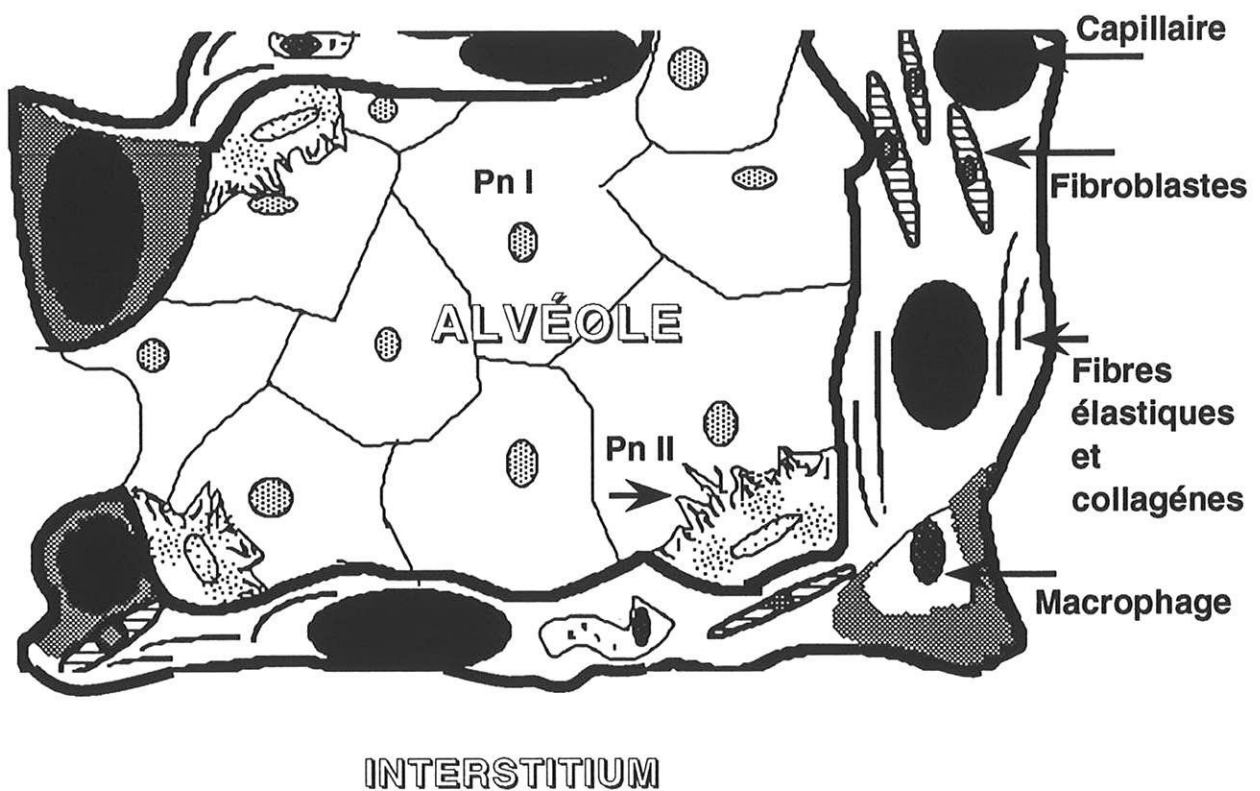
4.1. Système surfactant du poumon

Le poumon est l'organe qui présente la plus grande zone de contact avec le monde extérieur grâce à la surface totale des alvéoles pulmonaires : 80 m² en phase expiratoire, 120 m² en phase inspiratoire. On conçoit donc qu'il ait organisé un système de défense contre les effets néfastes des substances toxiques contenues dans l'air inhalé : fumée de cigarette, dioxyde de soufre, dioxyde d'azote. De plus, le poumon doit se protéger contre les oxydants libérés par les cellules inflammatoires alvéolaires au cours de certaines

pathologies. Le principal moyen de défense du poumon est représenté par le système du surfactant.

4.1.1. Synthèse du surfactant (23)

Représentation schématique de l'alvéole pulmonaire



La surface épithéliale alvéolaire comporte deux types de cellules : les pneumocytes I et les pneumocytes II. Les pneumocytes I recouvrent environ 95 % de la surface totale de l'alvéole et semblent avoir peu d'activité métabolique hormis leur participation à la constitution de la membrane alvéolocapillaire. Leur renouvellement est assuré par les pneumocytes II qui concentrent toutes les activités métaboliques. Le cytoplasme du pneumocyte II, riche en organites, se caractérise par la présence de corps lamellaires qui représentent le substrat de l'activité sécrétoire de ces cellules et sont assimilés aux

substances actives de surface. Le pneumocyte II fonctionne sur le mode mérocrine, en libérant directement dans la lumière alvéolaire le contenu des corps lamellaires, qui vont ainsi constituer le surfactant. Dans les bronchioles distales, la sécrétion du surfactant est assurée par les cellules de Clara.

4.1.2. Composition du surfactant

La quantité totale de surfactant dans le poumon est très faible : on estime que le surfactant réparti en une couche de 500 angström d'épaisseur représente 3% de la barrière air-sang, ce qui correspond à environ 50 mm³ de surfactant par m² de surface alvéolaire.

Le surfactant est une émulsion très riche en lipides (90 %), comportant également des protéines (8 %) et des hydrates de carbone (2 %). Les lipides sont représentés essentiellement par des phospholipides, parmi lesquels le plus important qualitativement et quantitativement est la phosphatidyl-choline.

4.1.3. Rôle du surfactant

Le surfactant pulmonaire assure un rôle majeur en physiologie respiratoire : il abaisse de façon dynamique la tension superficielle au niveau de la barrière air-tissu pariétal lors des mouvements respiratoires. L'effet des agents actifs de surface diminue lors de l'inspiration, mais s'accroît nettement au cours de la rétraction pulmonaire de manière à réduire la tension superficielle et à éviter le collapsus alvéolaire à l'expiration (la tension superficielle a tendance à diminuer la surface de contact air-alvéole). Cet effet tensioactif est attribué à la présence de la phosphatidyl choline et du phosphatidyl glycérol.

Le surfactant participe, dans une mesure probablement appréciable, aux mécanismes de défense locale du poumon face à l'agression permanente des alvéoles par les substances toxiques et les agents infectieux contenus dans l'air inhalé ou amenés par les capillaires sanguins. L'efficacité protectrice du surfactant pulmonaire fait intervenir plusieurs processus : le surfactant empêche le contact direct entre les particules exogènes inhalées et l'épithélium alvéolaire et s'oppose ainsi au phénomène d'adhésion indispensable à l'action pathogène des particules ; les variations cycliques de la tension superficielle entretiennent un mécanisme de clairance qui permet d'entraîner les particules étrangères avec le flux sécrétoire vers le système bronchique ; dans la lumière alvéolaire on détecte des immunoglobulines dont au moins une fraction est produite localement ; le surfactant a le pouvoir d'opsoniser certains agents pathogènes (bactéries, poussières inorganiques) et il a enfin la capacité de réguler le nombre de MA et de les stimuler par un procédé encore

mal élucidé. La présence de substances antioxydantes dans le surfactant pulmonaire pourrait contribuer à enrichir son rôle protecteur.

4.2. Etude du glutathion dans le liquide de recouvrement épithélial

L'étude du surfactant pulmonaire passe par l'analyse du liquide de recouvrement épithélial LRE (équivalent du ELF anglosaxon : epithelial lining fluid) qui est obtenu par la technique du lavage broncho-alvéolaire. Le LRE se compose de surfactant, de petites molécules et protéines produites localement ou diffusées à partir du secteur vasculaire, et d'une population cellulaire inflammatoire normalement constituée d'une majorité de MA, de lymphocytes T et de PN (pour moins de 2 %). Une activité antioxydante a été détectée dans le LRE, liée essentiellement aux grandes quantités de catalase et de GSH ; on y décèle également de la céruléoplasmine, de la lactoferrine, de la transferrine et de la vitamine E et C, mais en faible concentration.

Chez le sujet sain non fumeur, Cantin et Coll. (24) sont parvenus à déterminer la concentration du glutathion total (GSH + GSSG) dans le LRE : elle s'élève en moyenne à 430 micromoles, valeur 140 fois supérieure à la concentration plasmatique habituellement observée (3 micromoles). L'origine du glutathion extracellulaire identifié dans le LRE n'est pas clairement établie et les résultats des travaux restent contradictoires : certains concluent à un rôle prépondérant des MA, d'autres attribuent un rôle essentiel aux pneumocytes II dans la production du GSH. L'accumulation du GSH dans l'espace alvéolaire s'explique de plusieurs façons : le GSH ne diffuse que difficilement à travers la barrière alvéolocapillaire pour gagner la circulation pulmonaire, mais surtout il existe une déficience relative en gamma GT (enzyme participant au catabolisme du GSH) au niveau pulmonaire. Plus de 90 % du glutathion présent dans le LRE se trouve sous la forme réduite GSH qui est impliquée dans la plupart des fonctions métaboliques du glutathion. La très faible quantité de GSSG décelée dans le LRE peut surprendre en raison de la charge oxydante pulmonaire potentiellement importante. Cela suppose un mécanisme efficace, soit de réduction de GSSG, soit de dégradation de GSSG : les concentrations de la GSSG réductase et du NADPH dans le LRE ne semblent pas suffisantes pour prévenir l'accumulation de GSSG ; il paraît bien plus probable que le cycle gamma Glutamyl se charge de dégrader le GSSG en acides aminés qui vont pénétrer dans la cellule pour servir à la synthèse du GSH secondairement exporté dans le milieu extracellulaire.

Dans des conditions physiologique, on estime que la grande quantité de GSH contenue dans le LRE normal et que la capacité du GSH à inactiver les oxydants présents à la surface alvéolaire font du glutathion un élément essentiel des défenses antioxydantes pulmonaires. L'étude du GSH dans le LRE au cours des pathologies pulmonaires qui

s'accompagnent de lésions induites par les oxydants doit permettre de progresser dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques et dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

V - PATHOLOGIES PULMONAIRES ASSOCIEES A UNE ELEVATION DU GLUTATHION DANS LE LIQUIDE DE RECOUVREMENT EPITHELIAL

5.1. Exposition à l'hyperoxie

Les études portant sur la toxicité pulmonaire de l'oxygène et les taux pulmonaires des antioxydants n'ont pu être conduites que sur des modèles animaux pour d'évidentes raisons d'éthique. Il existe d'importantes variations selon les espèces animales, qui rendent difficiles l'extension des résultats à l'homme.

On sait que l'hyperoxie normobare est responsable de lésions pulmonaires induites par les MDO. Et le phénomène de tolérance à l'hyperoxie observée chez certaines espèces animales comme le rat a fait suspecter une adaptation des systèmes antioxydants pulmonaires (1). L'exposition de rats à des doses sublétales d'oxygène (85 %) durant 5 à 7 jours protège de la létalité d'une exposition à 100 % d'oxygène normobare, et cet effet protecteur est lié à l'augmentation de l'activité intracellulaire de la SOD. Il s'y associe une élévation de l'activité de la catalase, de la G6PD, de la GSH PX et du taux de GSH au niveau pulmonaire.

La prééminence du rôle protecteur du glutathion par rapport aux autres antioxydants a été soulignée par les travaux de Smith (25) : des souris exposées à 100 % d'oxygène et soumises simultanément au jeûne développent des lésions pulmonaires plus précocément que des souris exposées à 100 % d'oxygène et nourries normalement. Les dosages d'antioxydants dans le liquide du LBA, réalisés chez les souris des deux groupes n'attestent pas de différence pour les taux de SOD et de catalase. Par contre, le jeûne entraîne une déplétion en GSH pulmonaire par carence d'apport en acides aminés soufrés (méthionine, cystéine) nécessaires à la synthèse du glutathion, et par interférence avec la conversion de GSSG en GSH (la déplétion des stocks de glucose liée au jeûne ralentit en effet le shunt des pentose-phosphates et réduit le taux de NADPH indispensable au processus de conversion). Ces résultats suggèrent donc que le déficit en glutathion joue un rôle essentiel dans l'augmentation de sensibilité des souris à l'atteinte pulmonaire induite par l'hyperoxie.

L'élévation des taux pulmonaires du GSH et des autres antioxydants lors de l'exposition à l'hyperoxie est assimilée à un facteur protecteur autorisant le phénomène de tolérance, mais il faut nuancer cette notion en rappelant que cette adaptation s'accompagne d'une progression des lésions histologiques de l'épithélium alvéolaire.

5.2. Asthme

L'inflammation bronchique observée au cours de la maladie asthmatique s'associe à une production d'oxydants pulmonaires dont l'intensité semble liée au degré d'obstruction bronchique. L'exploration des défenses antioxydantes a mis en évidence une diminution de l'activité de la GSH PX et de la concentration en sélénium dans le sang circulant ; ce résultat suggère que les patients asthmatiques deviennent plus sensibles à l'action des MDO en raison de la réduction de leurs capacités antioxydantes.

Les travaux de Smith et Coll. (26) ont porté sur l'étude des défenses antioxydantes locales chez des patients atteints d'un asthme léger par comparaison à des sujets sains. L'activité de la SOD et de la catalase ne varie pas dans les deux groupes, tant au niveau bronchique qu'alvéolaire. A l'opposé, les taux de GSH pulmonaire sont augmentés chez les patients asthmatiques : de façon significative au niveau bronchique et de façon non significative dans le secteur alvéolaire. L'origine de cette production accentuée de GSH n'est pas encore précisée (pneumocytes II, M.A ?), mais une diffusion du GSH à partir du secteur vasculaire paraît très improbable. Il existe une corrélation entre l'élévation de la concentration alvéolaire du GSH et un moindre degré de réactivité bronchique à la métacholine chez ces patients asthmatiques. Si on parvenait à vérifier l'hypothèse selon laquelle les patients atteints d'un asthme léger avec réactivité bronchique modeste présentent des taux élevés du GSH alvéolaire, on pourrait orienter les recherches vers de nouvelles thérapeutiques visant à augmenter les défenses antioxydantes locales chez les asthmatiques sévères.

5.3. Intoxication tabagique

La fumée de cigarette constitue une source d'oxydants sur le plan local pulmonaire, mais aussi sur le plan systémique. Il a en effet été détecté, chez le sujet fumeur, une élévation de la concentration plasmatique du Malondialéhyde. En réponse à cette charge systémique en oxydants, l'organisme adapte ses capacités antioxydantes : les érythrocytes circulants des sujets fumeurs contiennent davantage de catalase et de GSH, que les érythrocytes des sujets non fumeurs (27). Les travaux de Toth démontrent bien le rôle protecteur de ces antioxydants : les globules rouges circulants des fumeurs préservent les

cellules endothéliales de l'action toxique de H₂O₂ plus efficacement que les globules rouges des non fumeurs. En revanche, au niveau plasmatique, on ne décèle pas de différence dans les taux d'antioxydants ; en particulier, la concentration du GSH reste basse, que les sujets soient fumeurs ou non fumeurs.

La réponse pulmonaire à l'agression oxydante de la fumée de cigarette se manifeste tout d'abord par une augmentation de l'activité antioxydante dans les MA : élévation de la SOD et de la catalase, mais absence de modification de l'activité de la GSH PX. Après arrêt de l'exposition, les taux intramacrophagiques d'antioxydants se normalisent. Une expérience menée chez des hamsters montre que l'exposition à la fumée de cigarette entraîne la même majoration d'activité antioxydante dans les MA, et que cette modification est associée à une réduction de la mortalité lors d'une exposition ultérieure à 100 % d'oxygène. Tous ces arguments confortent l'hypothèse d'un mécanisme d'adaptation protectrice des systèmes antioxydants.

S'il n'y a pas de variation dans l'activité intramacrophagique de la GSH PX, on observe à l'opposé une élévation significative du taux de GSH dans le liquide de recouvrement épithélial chez des sujets fumeurs par comparaison à un groupe de non fumeurs (24). L'origine possible de cette accumulation de GSH réside dans l'altération du métabolisme du GSH dans les MA des fumeurs : ces MA phagocytent activement les particules contenues dans la fumée de cigarette, stimulent la synthèse du GSH et son transport dans le secteur extracellulaire et n'expriment pas la gamma glutamyl transpeptidase. L'accumulation de glutathion dans le LRE se fait sous la forme réduite GSH et le rapport GSH/GSSG n'y est pas altéré, comme si le transport extracellulaire du GSH l'emportait sur la vitesse de formation du GSSG extracellulaire. In vitro, la concentration du GSH dans le LRE de sujets fumeurs et non fumeurs atteint des taux suffisants pour protéger les fibroblastes pulmonaires et les cellules épithéliales alvéolaires contre les lésions induites par H₂O₂. Par extrapolation in vivo, il est raisonnable d'attribuer un rôle antioxydant protecteur au GSH présent à la surface des alvéoles. Et, compte tenu des relations physiopathologiques unissant tabagisme et emphysème, il est tentant de supposer qu'une thérapie antioxydante pourrait prévenir l'évolution vers l'emphysème.

VI - PATHOLOGIES PULMONAIRES ASSOCIEES A UNE DIMINUTION DU GLUTATHION DANS LE LIQUIDE DE RECOUVREMENT EPITHELIAL

6.1. Fibrose pulmonaire idiopathique

La fibrose pulmonaire idiopathique se caractérise par un afflux de cellules inflammatoires dans le poumon profond, et par des lésions tissulaires progressives dont la pathogénie fait intervenir au moins en partie, l'action des MDO.

L'étude du glutathion chez des patients présentant une telle pathologie montre que la concentration plasmatique du GSH et que les taux de GSH contenus dans les MA sont identiques à ceux observés auprès d'une population normale (29).

On note en revanche une diminution significative de la concentration en glutathion total dans le LRE, sans qu'il y ait de corrélation entre ce taux de glutathion et la sévérité de la fibrose pulmonaire évaluée sur des critères fonctionnels. Le glutathion présent dans le LRE se trouve presque entièrement sous sa forme réduite GSH malgré la charge en oxydants, ce qui laisse supposer que le LRE contient des molécules capables de réduire le glutathion à une vitesse suffisante pour empêcher la formation excessive de GSSG. Le mécanisme de cette déficience en GSH dans le LRE reste encore imprécis. On sait que cette carence ne résulte pas d'une diminution de la concentration tissulaire en GSH puisque les MA conservent des taux normaux de GSH. On peut concevoir qu'il se produise une dilution du GSH dans le LRE à la faveur d'une augmentation de perméabilité de la barrière alvéolocapillaire telle qu'on peut l'observer au cours de la fibrose pulmonaire idiopathique, mais cette hypothèse reste insuffisante. Il semble plutôt que cette déficience en GSH soit imputable aux cellules épithéliales alvéolaires : une agression oxydante est susceptible d'altérer la capacité de ces cellules à synthétiser et à sécréter le GSH, et les modifications subies par ces cellules au cours de la fibrose pulmonaire idiopathique comportent une augmentation d'activité de la gamma glutamyl transpeptidase.

Cette carence en GSH dans le LRE a une implication certaine dans la pathogénie de la fibrose pulmonaire idiopathique, car elle contribue à accentuer le déséquilibre de la balance oxydant-antioxydant au profit des oxydants. Il paraît donc logique de proposer une nouvelle approche thérapeutique qui s'appuierait sur l'administration de GSH exogène afin de restaurer l'écran protecteur antioxydant du poumon profond.

6.2. Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte

La pathogénie du SDRA est complexe et fait certainement intervenir plusieurs mécanismes et médiateurs. De nombreuses études soulignent l'importance du rôle des PN, dont l'influence au niveau pulmonaire s'exerce en partie grâce à la libération de MDO.

Pacht et Coll. (30) ont mis en évidence une déficience en glutathion total dans le LRE de patients atteints de SDRA, sans préciser le rapport GSH/GSSG. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour éclaircir le mécanisme de ce déficit en glutathion : dilution du GSH présent dans le LRE par l'afflux du liquide d'œdème dans les alvéoles, diminution de la sécrétion du GSH, captation du glutathion oxydé du LRE par les cellules alvéolaires qui le convertissent en GSH, captation du GSH du LRE par les cellules alvéolaires qui assurent ainsi leur propre protection antioxydante. Cette dernière supposition paraît recevable car les pneumocytes II développent effectivement une résistance relative aux oxydants, en partie grâce à une élévation de leurs taux intracellulaires d'antioxydants (SOD, GSH-PX, ascorbate). On peut donc concevoir que ces cellules utilisent le GSH présent dans le LRE comme source de GSH intracellulaire.

Il est difficile de mesurer complètement le retentissement de ce déficit en glutathion total dans le LRE. Comparé au LRE prélevé chez des patients sains, le LRE provenant de patients atteints de SDRA est plus puissant pour inhiber la peroxydation lipidique *in vitro*, et ce en raison de sa richesse en céruléoplasmine et surtout en transferrine. Mais la carence du LRE en GSH rend les cellules alvéolaires plus sensibles à l'agression de H₂O₂ et HOCl. Il est probable que ce déficit en GSH contribue à l'aggravation des lésions pulmonaires au cours du SDRA. Cela soulève bien sûr l'intérêt éventuel d'un traitement comportant du GSH exogène.

6.3. Mucoviscidose

La mucoviscidose, maladie héréditaire, résulte de la mutation du gène régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique CFPR, situé sur le chromosome 7 (31). Cette anomalie se traduit par un trouble du transport transmembranaire du chlore qui, au niveau respiratoire, est responsable d'un épaissement du mucus. Cette modification de consistance du mucus favorise les infections et le développement d'une inflammation chronique dominée par les PN et les MA. Le nombre de PN dans le LRE est de 100 à 1000 fois supérieur aux valeurs normales et il s'y associe une surcharge franche en produits dérivés des PN, notamment les oxydants. On estime actuellement que l'atteinte des voies respiratoires provient de la toxicité des oxydants libérés par les cellules inflammatoires à la surface épithéliale.

Le déséquilibre de la balance oxydant-antioxydant s'affirme bien en faveur des oxydants car on observe un effondrement du taux de glutathion total et du GSH dans le LRE de patients atteints de mucoviscidose (32). La cause de ce déficit du LRE en GSH reste encore à élucider. Au cours de la mucoviscidose, la concentration plasmatique du GSH demeure normale.

Afin de protéger l'épithélium respiratoire contre l'agression des oxydants, le renforcement des défenses antioxydantes de la surface épithéliale par l'administration de GSH paraît représenter une possibilité thérapeutique intéressante.

6.4. Infection par le VIH

La déplétion en lymphocytes CD4 joue un rôle majeur dans la pathogénie du SIDA. Cependant, plusieurs des anomalies de fonction des lymphocytes T, lymphocytes B et macrophages observées chez des patients séropositifs asymptomatiques laissent supposer que d'autres mécanismes contribuent au développement précoce d'un dysfonctionnement immunitaire au cours de l'infection VIH. Le glutathion paraît capable de participer à ce processus, car cette substance tient une place importante dans le déclenchement et la progression de l'activation des lymphocytes T.

L'étude menée par Buhl et Coll. (33) a démontré un déficit systémique en glutathion chez des patients asymptomatiques HIV positifs. Ce déficit systémique se traduit par une diminution de la concentration plasmatique en GSH d'environ 30 % des valeurs normales. Il s'y associe une réduction du taux de GSH dans le LRE (60 % des valeurs normales), alors même que se développe une alvéolite à lymphocytes cytotoxiques totalement silencieuse chez la plupart de ces patients. Cette carence de l'organisme en GSH pourrait donc constituer un des facteurs responsables du déficit immunitaire survenant lors de l'infection par le VIH, puisque le glutathion joue un rôle appréciable dans les défenses de l'hôte et que le défaut de GSH est susceptible d'exacerber les effets toxiques du Tumor Necrosis Factor impliqués dans cette pathologie. Le manque de GSH au niveau pulmonaire est peut être à l'origine de la fréquence des infections opportunistes touchant l'appareil respiratoire au cours du SIDA. La cause de ce déficit systémique en glutathion reste encore inconnue et les différentes hypothèses soulevées n'ont pu être vérifiées : sélection de cellules exprimant peu le GSH à l'état normal, anomalies de recirculation sanguine du GSH, malnutrition associée.

	G.S.H. L.R.E.	G.S.H. plasma
Sujet normal non fumeur	N	N
Sujet normal fumeur	↗	N
Hyperoxie (tolérance)	↗	
Asthme léger	↗	
Fibrose pulmonaire idiopathique	↘	N
S.D.R.A.	↘	
Mucoviscidose	↘	N
Infection VIH	↘	↘

Pathologies pulmonaires s'accompagnant de modifications des taux de G.S.H.

VII - IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES

Le glutathion réduit assure des fonctions essentielles dans l'organisme, et son déficit au niveau pulmonaire au cours de certaines pathologies favorise l'action toxique des oxydants. Il paraît donc rationnel de chercher à renforcer l'activité antioxydante afin de prévenir les lésions tissulaires. Plusieurs stratégies visant à corriger la carence en GSH dans le LRE ont été proposées.

7.1. Apport de GSH

Différentes études confirment que l'incorporation de GSH exogène améliore la capacité antioxydante des cellules pulmonaires (18). Cette amélioration semble davantage provenir de l'activité antioxydante extracellulaire de GSH que de l'augmentation du contenu intracellulaire de GSH, car le GSH peut réagir directement avec les radicaux libres.

Une autre approche intéressante est représentée par l'administration parentérale de méthyle ester de GSH (19). Ce composé, dont le groupe carboxyl de la glycine est estérifié, pénètre facilement dans la cellule où l'activité d'une estérase cellulaire le transforme en GSH et éthanol. Une telle administration de méthyle ester de GSH permet d'augmenter efficacement le contenu en GSH des cellules pulmonaires. Et la réplétion de ces cellules en GSH entraîne la restauration des taux de GSH dans le LRE.

La proposition la plus récente concerne l'apport direct de GSH dans les voies aériennes inférieures par nébulisation. Il a été démontré que ce procédé sans danger permet d'élever la concentration du GSH dans le LRE, de façon plus efficace et plus prolongée qu'une injection intraveineuse de GSH. Cette technique a été testée chez des patients présentant une atteinte pulmonaire avec carence en GSH dans le LRE. L'étude réalisée chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique est prometteuse (31) : un aérosol unique de 600 mg de GSH est responsable d'une élévation significative du GSH dans le LRE une heure après ; un tel traitement répété durant trois jours entraîne un retour à la normale du taux de GSH dans le LRE et une augmentation du taux de glutathion oxydé, ce qui suggère que le GSH administré a été utilisé comme un antioxydant local. On observe des résultats similaires chez des patients HIV positifs recevant ce même traitement durant trois jours. Ces résultats font supposer qu'il est possible d'utiliser le GSH dans une perspective thérapeutique pour contrebalancer l'action des oxydants.

7.2. Apport de précurseurs du GSH

L'administration de précurseurs métaboliques qui subiront une transformation dans l'organisme pour donner du GSH paraît être un moyen logique d'augmenter le GSH pulmonaire.

La cystéine (2) est un acide aminé précurseur du GSH. Elle est susceptible d'être incorporée par la cellule pour la synthèse du GSH. Cependant, deux obstacles limitent son utilisation : sa demi-vie plasmatique est courte et la perfusion de cystéine chez l'animal est responsable d'une toxicité neurologique. La préférence va donc à des composés, comme la L 2 oxothiazolidine 4 carboxylate, qui délivrent de la cystéine aux cellules pour synthétiser

du GSH. Ces composés ont fait expérimentalement la preuve de leur rôle protecteur sur les cellules endothéliales des artères pulmonaires exposées à H₂O₂ et à l'hyperoxie.

La supplémentation en N acétyl cystéine semble pouvoir assurer la réplétion en glutathion (18). Cette substance, grâce à la présence d'un groupe thiol libre, exerce une activité antioxydante directe vis-à-vis des MDO dans le milieu extracellulaire. Elle possède également une activité antioxydante indirecte qui paraît liée à une augmentation du GSH : en effet, dans de nombreux tissus et cellules, la N acétyl cystéine subit une déacétylation qui la transforme en cystéine. Un traitement par injections intraveineuses de N acétyl cystéine a été réalisé sur une série de 20 patients atteints de SDRA(34) : sous l'influence de ce médicament, leur état radioclinique s'est amélioré et le taux en GSH des érythrocytes, comparé à celui de patients recevant un placebo, s'est significativement élevé. L'effet de ce traitement sur le taux de GSH dans le LRE n'a pas été exploré au cours de cette étude. L'administration par voie orale de la N acétyl cystéine semble intéressante (35) : un apport quotidien de 600 mg en monoprise suffit à déterminer une augmentation significative mais temporaire de la concentration du GSH dans le plasma et le liquide de LBA. Une ingestion plus fréquente de ce médicament doit pouvoir induire une élévation prolongée des taux de glutathion réduit dans le plasma et le LRE.

L'apport protéique alimentaire n'est pas à négliger car un régime comportant des acides aminés soufrés est capable d'amener des précurseurs du glutathion pulmonaire.

Le glutathion apparaît bien comme un tripeptide essentiel assurant plusieurs fonctions dominées par l'activité antioxydante dans l'organisme.

L'étude du GSH dans le poumon normal et au cours de certaines maladies a permis une meilleure compréhension des processus pathogènes et a stimulé les recherches de nouvelles thérapeutiques visant à optimiser les défenses antioxydantes pulmonaires. Les procédés thérapeutiques les plus prometteurs semblent être l'apport de GSH par nébulisation et l'administration par voie orale de N acétyl cystéine. Mais si on a acquis la certitude de l'innocuité de ces techniques et de leur capacité à augmenter les taux de GSH pulmonaire, l'efficacité de tels traitements sur l'évolution des pathologies inflammatoires pulmonaires reste encore à évaluer.

Les oxydants et antioxydants interviennent dans de nombreuses pathologies pulmonaires ; mais il reste un domaine où le rôle de ces substances n'a été abordé que récemment : le cancer bronchique.

CHAPITRE III

CANCER BRONCHIQUE ET SYSTEME OXYDANT-ANTIOXYDANT

I - NOTIONS GENERALES SUR LA CANCEROGENESE

Le cancer broncho-pulmonaire constitue un réel problème en cancérologie, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il représente la première cause de mortalité par cancer chez l'homme adulte (34 % des décès par cancer) et son incidence est en progression dans la population féminine. Les progrès thérapeutiques sont encore modestes et n'ont pas transformé le mauvais pronostic du cancer bronchique. Bien que la recherche fondamentale ait permis de préciser certains des mécanismes régissant le développement des cellules tumorales bronchiques, il paraît indispensable d'en mieux cerner la physiopathologie. A ce titre, l'étude des oxydants et antioxydants peut présenter un intérêt non négligeable.

1.1. Etapes de la carcinogénèse (36)

1.1.1. Rôle des carcinogènes

L'étude des mécanismes physiopathologiques qui entraînent une dérégulation de l'homéostasie cellulaire à l'origine du développement anarchique des cellules cancéreuses est loin d'être complète. Le caractère multifactoriel de la maladie néoplasique broncho-pulmonaire explique les difficultés que l'on a à préciser sa physiopathologie. L'intervention de substances carcinogènes dans la survenue des lésions cancéreuses a cependant pu être confirmée.

Les différents carcinogènes identifiés en pathologie humaine (carcinogènes chimiques, métaux, radiations ionisantes) ont la caractéristique commune d'être ou de produire dans l'organisme des substances électrophiles comportant des atomes déficients en électrons. Ces substances électrophiles issues du métabolisme des carcinogènes vont établir des liaisons covalentes irréversibles avec des atomes "riches en électrons". Elles vont ainsi se fixer sur diverses substances intracellulaires, en particulier sur les protéines des acides nucléiques. Cette fixation entraîne une dénaturation localisée du code génétique.

Plusieurs mécanismes existent pour réparer les lésions de l'ADN induites par les carcinogènes :

- la photoréactivation agit après la création de dimères de thymidine par les ultraviolets et élimine 95 % des mutations grâce à l'action d'une enzyme photoréactivante qui clive le dimère.

- la réparation par excision met en jeu une endonucléase et une exonucléase chargées d'exclure le fragment lésé, puis une polymérase qui resynthétise une séquence correcte, et en dernier lieu une ligase qui lie ce fragment à l'ADN.

- la réparation post-réplivative se caractérise par une réplication modifiée qui ne concerne que l'ADN normal et laisse un "trou" à la place de la zone lésée (elle sera ultérieurement réparée par la translocation du fragment manquant à partir du brin d'ADN parental homologue).

- le système SOS intervient enfin quand l'altération du code génétique touche une même zone sur les deux brins d'ADN, empêchant la reconstitution du code génétique initial par un des trois mécanismes précédents. L'action du système de réparation SOS se traduit par l'adjonction de bases au hasard.

Les conséquences des lésions de l'ADN vont dépendre du bilan de l'action de ces systèmes de réparation. Si les lésions sont trop nombreuses et dépassent la capacité de réparation de ces mécanismes, il y a mort cellulaire (cytotoxicité). Si les lésions sont en nombre limité, les processus de réparation peuvent entraîner une restitution *ad integrum* du capital génétique. Dans une situation intermédiaire, la réparation est incomplète et le système SOS entre en action, déterminant la persistance de certaines lésions et la création de mutations. L'importance relative de l'effet cytotoxique et de l'effet mutagène apparaît donc comme une simple question d'ordre quantitatif.

Il semble ainsi que les carcinogènes présentent en majorité une certaine affinité pour l'ADN, et que les lésions induites puissent aboutir à des mutations dues à "l'insuffisance" des systèmes de réparation et à la mise en jeu du système SOS. Aucune donnée expérimentale ne permet néanmoins de lier formellement la carcinogénicité d'une substance à la nécessité d'une lésion de l'ADN et d'une mutation à ce niveau, ou à l'inefficacité des systèmes de réparation. On ne peut résumer la carcinogenèse à une lésion unique survenant sur une seule structure et entraînant à elle seule la transformation maligne. Bien au contraire, la carcinogenèse se présente comme un processus complexe associant plusieurs étapes successives.

1.1.2. Individualisation de plusieurs étapes dans la carcinogenèse⁽³⁷⁾

La carcinogenèse expérimentale se développe selon au moins 3 phases distinctes :

- Première étape : Initiation

Il s'agit d'une étape préalable obligatoire qui correspond à l'action même du carcinogène sur le matériel génétique d'une cellule : il y a création d'une lésion irréversible, localisée, non létale de l'ADN. Une seule exposition à la substance initiatrice suffit pour produire cette mutation, et la "mémoire" de la lésion semble de très longue durée.

Cette mutation peut porter sur les zones sensibles de la séquence ADN que sont les gènes suppresseurs de tumeur et les proto-oncogènes. Parmi les gènes suppresseurs de tumeur, le gène p53 (situé sur le bras court du chromosome 17) est le plus connu : il exerce un rôle de régulation dans la transcription de l'ADN, et contrôle vraisemblablement le déroulement du cycle cellulaire en bloquant la cellule en phase G1. Dans un certain nombre de tumeurs bronchiques, on observe une modification de ce gène, responsable de son inactivation. Les proto-oncogènes, notamment ceux de la famille myc et ras, interviennent dans la différenciation et la multiplication cellulaire anormale. Leur mutation aboutit à l'amplification de leur expression.

En fait, l'initiation apporte des changements phénotypiques dans les cellules transformées, qui les préparent à répondre différemment des cellules normales à l'action des promoteurs tumoraux.

- Deuxième étape : Promotion

La promotion contribue à réaliser un environnement favorable à l'expression de la cellule transformée. L'intervalle entre les 2 étapes est parfois long, mais l'initiation doit obligatoirement précéder la promotion.

La promotion tumorale comporte une série complexe d'événements moléculaires qui ne sont pas tous élucidés. L'action du promoteur stimule la prolifération des cellules transformées, alors que la population cellulaire normale réagit autrement : elle évolue vers une différenciation terminale, ou bien elle subit l'effet toxique du promoteur. La promotion induit donc une multiplication clonale des cellules transformées, comme s'il s'agissait de compenser la disparition des cellules normales.

- Troisième étape : Conversion maligne

En modifiant de façon sélective le mode d'expression des gènes dans les cellules transformées, les promoteurs autorisent la croissance clonale bénigne de ces cellules. S'il survient une lésion supplémentaire de l'ADN, ces tumeurs peuvent être converties en néoplasmes malins de croissance rapide.

Cette conception de la carcinogenèse constitue une des théories les plus récentes. Elle est séduisante mais de nombreux points demandent à être confirmés.

1.2. Histogenèse des tumeurs malignes pulmonaires

Quatre types principaux de carcinomes bronchiques sont reconnus au plan histologique : carcinome malpighien, adénocarcinome, carcinome à grandes cellules et carcinome à petites cellules. On les répartit habituellement selon deux catégories, séparation qui sous-entend une origine histogénétique différente pour chacun de ces groupes : origine neuroectodermique pour les carcinomes à petites cellules, et origine endodermique pour les carcinomes non à petites cellules.

Des résultats récents remettent en cause cette théorie. En effet, la découverte de tumeurs composites associant un contingent de carcinome à petites cellules et un contingent non à petites cellules, ainsi que l'utilisation de nouvelles méthodes diagnostiques (la microscopie électronique et l'immunohistochimie), apportent la preuve de la multidifférenciation de ces tumeurs bronchiques. On met ainsi en évidence une grande hétérogénéité intratumorale, imprévisible au vu du seul aspect histologique.

Tous ces éléments suggèrent que l'ensemble des cancers bronchiques dérivent d'une même cellule souche endodermique, quel qu'en soit le type histologique-même neuroendocrine. Cette théorie permet d'expliquer la coexistence de différenciations multiples dans une même tumeur et le recoupement de leur profil antigénique.

La cellule souche multipotentielle capable d'exprimer simultanément ou successivement une différenciation épidermoïde, adénocarcinomateuse et neuroendocrine, n'est pas formellement identifiée. La cellule de Clara présente de grandes potentialités qui pourraient lui faire tenir ce rôle de cellule souche : elle est considérée comme la cellule progénitrice de l'épithélium bronchique ; elle est également à l'origine des pneumocytes II, et on la sait capable de se transformer en cellule à mucus lors des processus d'irritation par un agent pathogène.

On s'oriente donc vers une théorie uniciste des cancers bronchiques qui dériveraient d'une même cellule souche endodermique subissant l'influence de divers éléments.

II - IMMUNOLOGIE DU CANCER BRONCHIQUE

L'approche immunologique présente un intérêt certain pour mieux cerner le processus de cancérogenèse. L'essentiel des travaux de recherche porte sur l'étude locale des macrophages alvéolaires et des lymphocytes, recueillis par la technique du L.B.A.

2.1. Rôle des macrophages alvéolaires

2.1.1. Notions générales (38)

Les macrophages appartiennent au système réticuloendothélial et sont présents dans de nombreux organes. Les macrophages pulmonaires proviennent des monocytes sanguins, mais il existe également une prolifération locale de macrophages dans l'alvéole. Plusieurs variétés de macrophages pulmonaires ont été identifiées : les macrophages résidant dans le tissu interstitiel, les macrophages adhérant aux cellules endothéliales des structures vasculaires pulmonaires et enfin les macrophages alvéolaires. Seuls les MA sont accessibles par la méthode du LBA, ce qui en fait un sujet privilégié de recherche.

Les MA possèdent à leur surface membranaire de nombreux récepteurs spécifiques susceptibles de fixer des molécules appelées "ligands". Ces ligands sont très variés puisqu'il peut s'agir de protéines (immunoglobulines, transferrine, fragments C3a et C5a du complément par exemple), d'hormones (glucocorticoïdes, interleukine 2, tumor necrosis factor), d'enzymes comme l'élastase leucocytaire, ou de lipides tels la leucotriène B4. La liaison des ligands aux récepteurs de surface entraîne une série de processus d'activation intracellulaire dans le MA. Le MA ainsi activé devient capable de sécréter une bonne centaine de molécules différentes. Les plus importants de ces médiateurs sont représentés par les MDO, des protéases et des antiprotéases, des cytokines (tels que l'interleukine 1 et le tumor necrosis factor TNF qui sont largement impliqués dans les processus infectieux inflammatoires et tumoraux), et enfin des lipides dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique-avec surtout la thromboxane A2. le MA peut ainsi, par le biais de ses produits de sécrétion, exercer une influence notable sur son environnement.

On attribue aux MA un rôle essentiel dans la défense pulmonaire au cours des processus inflammatoires et immuns. In vitro, plusieurs études ont démontré la fonction bactéricide des MA qui dépend de la phagocytose, de la production de protéases et de MDO. Parmi les oxydants, le radical OH° et l'acide hypochloreux HOCl participent le plus activement à cette fonction. Toujours in vitro, les MA activés sont capables de développer une cytotoxicité (liée à la production de H_2O_2) à l'encontre de lignées cellulaires tumorales humaines. Cependant, en dépit de ces résultats expérimentaux, la contribution relative des MDO et des enzymes au rôle bactéricide et tumoricide des MA in vivo reste mal connue.

A l'opposé, les produits libérés par les MA activés peuvent intervenir dans la pathogénie des lésions pulmonaires. De nombreuses maladies pulmonaires s'accompagnent d'une alvéolite macrophagique et d'une élévation des taux de substances produites par les MA dans le liquide de LBA : des MDO, des collagénases, des métabolites de l'acide arachidonique... etc La libération de MDO se fait surtout sous la forme du radical OH° .

Ce radical est d'ailleurs impliqué, *in vitro*, dans l'activité suppressive des MA sur les lymphocytes et dans la cytotoxicité des MA à l'égard des fibroblastes. Tous ces composés dérivant des MA sont susceptibles de participer directement aux mécanismes lésionnels pulmonaires. De plus, certaines de ces substances ont la faculté d'exercer un effet chimiotactique sur les PN qui peuvent aussi coopérer pour aggraver les lésions pulmonaires.

2.1.2. Macrophages alvéolaires et cancer bronchique

Le LBA constitue une méthode simple pour aborder l'environnement immunitaire cellulaire d'une tumeur bronchique. La formule cellulaire ne diffère pas de celle du sujet sain, bien que les cancers bronchiques soient associés anatomiquement à un infiltrat inflammatoire local dont l'intensité et la composition sont liées au type histologique et au degré de différenciation (39) : cet infiltrat est plus important dans les carcinomes épidermoïdes que dans les cancers à petites cellules, et dans les tumeurs bien différenciées que dans les lésions indifférenciées. L'importance des macrophages est soulignée par le fait qu'ils représentent plus de 90 % des cellules recueillies par le LBA, et jusqu'à 35 % de la population cellulaire totale des tumeurs bronchiques.

D'une façon générale, on prête aux macrophages un rôle majeur dans l'immunité antitumorale, bien que les MA contiennent aussi des enzymes (comme l'aryl hydrocarbure hydroxylase) capables d'augmenter la carcinogénicité de certains composés aromatiques. Les MA disposent de deux types de substances pour exercer une activité cytotoxique sur les cellules tumorales (40) : les MDO et un groupe de substances indépendantes de l'oxygène. Ce deuxième groupe comprend des protéases, des fragments de compléments (C3a), et surtout des protéines lytiques comme le TNF. Le TNF joue un rôle considérable dans les processus inflammatoires et cette cytokine semble être un des plus puissants effecteurs de la cytotoxicité des MA sur les cellules tumorales : le TNF se lie à un récepteur spécifique situé à la surface de la cellule cancéreuse et la lyse cellulaire survient après internalisation du complexe ligant-récepteur. De plus, le TNF régule la libération d'autres médiateurs importants, tels les MDO et l'interleukine 1. L'action du TNF dans la défense antitumorale assurée par les MA paraît complexe, et implique probablement d'autres cellules effectrices.

Les investigations ont porté sur l'étude des capacités fonctionnelles des MA à la recherche d'un déficit fonctionnel, soit intrinsèque, soit causé par le microenvironnement tumoral, afin d'établir si un éventuel défaut d'activité des MA pourrait contribuer à l'émergence d'une tumeur bronchique. L'étude du chimiotactisme des MA (39) montre une

diminution significative au niveau du poumon atteint par le cancer, ce qui suggère un déficit intrinsèque des MA aggravé par des facteurs suppresseurs libérés par les cellules tumorales. L'analyse des MDO (41) indique que les MA de patients atteints de cancer bronchique libèrent significativement davantage d'anion superoxyde O_2^- que les MA de sujets sains fumeurs. Cependant l'activité cytotoxique des MA de patients cancéreux est nettement plus faible que celle des MA de sujets fumeurs, comme si ces MA étaient devenus incapables de détruire les cellules tumorales, alors que les monocytes sanguins des mêmes patients ont conservé cette faculté.

Les résultats portant sur l'activité fonctionnelle des MA au cours du cancer bronchique sont contradictoires. Il semble que malgré l'existence d'un état d'activation, le rôle antitumoral des MA soit affaibli.

Mais il faut nuancer cette conclusion en précisant que d'autres substances probablement impliquées dans l'activité antitumorale des MA n'ont pas été étudiées, et que les MA pourraient fonctionner plutôt comme des cellules accessoires des lymphocytes.

2.2. Rôle des lymphocytes

L'étude locale des défenses immunitaires anti-tumorales s'est principalement intéressée aux lymphocytes T cytotoxiques. On divise ces cellules en deux grandes classes. Le premier groupe rassemble les lymphocytes T spécifiques d'antigènes, qui nécessitent l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH II) pour reconnaître les cellules cibles. Le deuxième groupe réunit une population hétérogène de cellules cytotoxiques capables de lyser des cibles (cellule tumorale, cellule infectée par des virus) sans restriction au complexe majeur d'histocompatibilité et en l'absence de sensibilisation préalable. La population dominante de ce deuxième groupe est constituée par les cellules NK (Natural Killer) ; viennent ensuite les lymphocytes T NK like et surtout les cellules LAK (Lymphokine Activated Killer).

Les cellules NK (40) ont été présentées comme la première ligne de défense contre la croissance tumorale, car elles peuvent exercer une activité lytique sur les cellules cancéreuses in vitro. Chez les patients atteints de cancer bronchique, on détecte bien la présence de cellules NK dans le liquide de LBA. Toutefois, ces cellules ont perdu toute activité lytique sur les cellules tumorales pulmonaires. Cette inhibition des capacités fonctionnelles des cellules NK présentes dans la lumière alvéolaire semble imputable à des substances libérées par les MA. Les cellules NK de l'interstitium pulmonaire subissent la même perte d'activité, et cette suppression est directement liée au nombre de macrophages infiltrant le tissu interstitiel. Il faut noter que l'activité lytique des cellules NK du sang périphérique reste intacte. La grande quantité de prostaglandine PG E2 produite par les

MA de patients atteints de cancer bronchique (42) pourrait agir comme un facteur suppresseur vis-à-vis des cellules NK : la PG E2 est capable d'empêcher la génération de cellules LAK et de supprimer la cytotoxicité des lymphocytes T et des cellules NK.

La formation des cellules LAK est induite par l'incubation de lymphocytes avec de l'interleukine 2 (43). Ces cellules sont efficaces dans le contrôle de la croissance tumorale chez les animaux ; et l'administration systémique de cellules LAK et d'interleukine 2 à des patients atteints de cancer évolué a permis d'obtenir une réponse antitumorale partielle. Les cellules LAK assurent donc un rôle important d'immunosurveillance au cours de la progression tumorale. La régulation *in vivo* du développement et des fonctions des cellules LAK est mal connue, hormis le fait qu'elle nécessite de l'interleukine 2. Certains patients atteints de cancer bronchique possèdent une activité LAK dans le liquide de LBA, et cette activité est associée à la présence d'interleukine 2 dans le même prélèvement ; il semble donc que les cellules LAK puissent apparaître *in situ* au niveau pulmonaire, sous l'influence de cette lymphokine. Tous ces éléments ont orienté les recherches thérapeutiques vers de nouvelles stratégies comme l'immunothérapie dont l'intérêt paraît cependant limité.

Les interactions entre MA et lymphocytes, qui tiennent très certainement une place importante au cours de la cancérogenèse bronchique, sont complexes et font intervenir de nombreux médiateurs. La connaissance de ces phénomènes est encore difficile à appréhender.

III - OXYDANTS ET CANCER

3.1. Participation des oxydants à la création de lésion de l'ADN

Cochrane et Coll. (3) se sont attachés à identifier les oxydants responsables de lésions de l'ADN cellulaire. Leur étude menée sur les oxydants produits par des PN activés implique essentiellement l'action de H₂O₂ et du radical OH°.

3.1.1. Rôle de H₂O₂

Le H₂O₂ présent dans le milieu extracellulaire a la capacité de pénétrer rapidement dans la cellule et d'inhiber la synthèse d'ATP, mettant ainsi en jeu la viabilité cellulaire.

Plusieurs constatations expérimentales (3) ont amené à considérer H₂O₂ comme le principal oxydant à l'origine des lésions de l'ADN cellulaire. L'exposition de cellules P 388 D1 à l'action de H₂O₂ entraîne l'apparition d'une atteinte de l'ADN dans les 20 secondes,

avec un effet maximal en quelques minutes. Il existe une forte corrélation entre la concentration d' H_2O_2 et le nombre de cassures dans le brin d'ADN. Après l'élimination de H_2O_2 du milieu extracellulaire, la réparation de l'ADN survient en quelques heures. Enfin, l'addition de catalase au milieu contenant du H_2O_2 prévient complètement l'apparition de lésions de l'ADN, alors que la SOD n'a pas cet effet protecteur.

Il faut noter cependant que le H_2O_2 seul, même en concentration élevée, n'est pas capable de créer un nombre significatif de cassures dans l'ADN isolé PM2. L'addition de fer Fe^{2+} permet la survenue d'un grand nombre de lésions à la faveur de la formation du radical OH° , par la réaction d'Haber-Weiss. Il semble donc en réalité que l'action de H_2O_2 sur l'ADN cellulaire s'exerce de façon indirecte, grâce à la génération du radical OH° .

3.1.2. Rôle de OH°

Le rôle prépondérant de OH° dans l'induction de lésions de l'ADN a été démontré par l'étude de Jackson et Coll. (44) sur l'action synergique du tabagisme et de l'exposition à l'amiante dans l'atteinte de l'ADN cellulaire. L'amiante est capable d'augmenter le nombre de cassures dans le brin d'ADN, grâce à la stimulation de la production de OH° à partir des oxydants amenés par la fumée de cigarette. En effet, l'amiante fournit le fer qui permet aux oxydants H_2O_2 et O_2^- contenus dans la fumée de cigarette d'être transformés en radical OH° . L'addition de piègeurs de OH° ou de chélateurs du fer prévient l'apparition des cassures dans le brin d'ADN, ce qui confirme bien la responsabilité de OH° .

Le mode d'action de OH° mérite d'être précisé. Le radical OH° produit dans le cytoplasme des cellules (à partir de H_2O_2 et O_2^-) à proximité du noyau, peut agir directement sur l'ADN. Mais en raison de sa grande instabilité qui le fait réagir dès qu'il est formé, le radical OH° présent dans le milieu extracellulaire n'a que peu de chance d'atteindre l'ADN. Et pourtant le mannitol (un piègeur spécifique de OH° d'action extracellulaire) est capable d'inhiber des lésions de l'ADN induites par les oxydants (45). Il faut donc évoquer un mécanisme d'action indirecte de OH° sur l'ADN : OH° peut déclencher la peroxydation des lipides membranaires qui aboutit à la formation de radicaux secondaires. Ces radicaux, dont la durée de vie est supérieure à celle de OH° , sont susceptibles de parvenir jusqu'au noyau et d'agir sur l'ADN. Il faut rappeler, en faveur de cette hypothèse que la vitamine E chargée de protéger le matériel lipidique de l'organisme contre l'oxydation joue un rôle certain dans la diminution du nombre de mutations dans quelques systèmes bactériens.

Au total, l'action des oxydants sur l'ADN cellulaire se résume à l'intervention directe ou indirecte du radical OH° sur l'ADN. Les oxydants sont capables de créer

plusieurs sortes de lésions dans l'ADN : des cassures de brin d'ADN, une hydroxylation des bases, des échanges de chromatides soeurs.

3.2. Conséquence des lésions de l'ADN par les oxydants : carcinogénèse

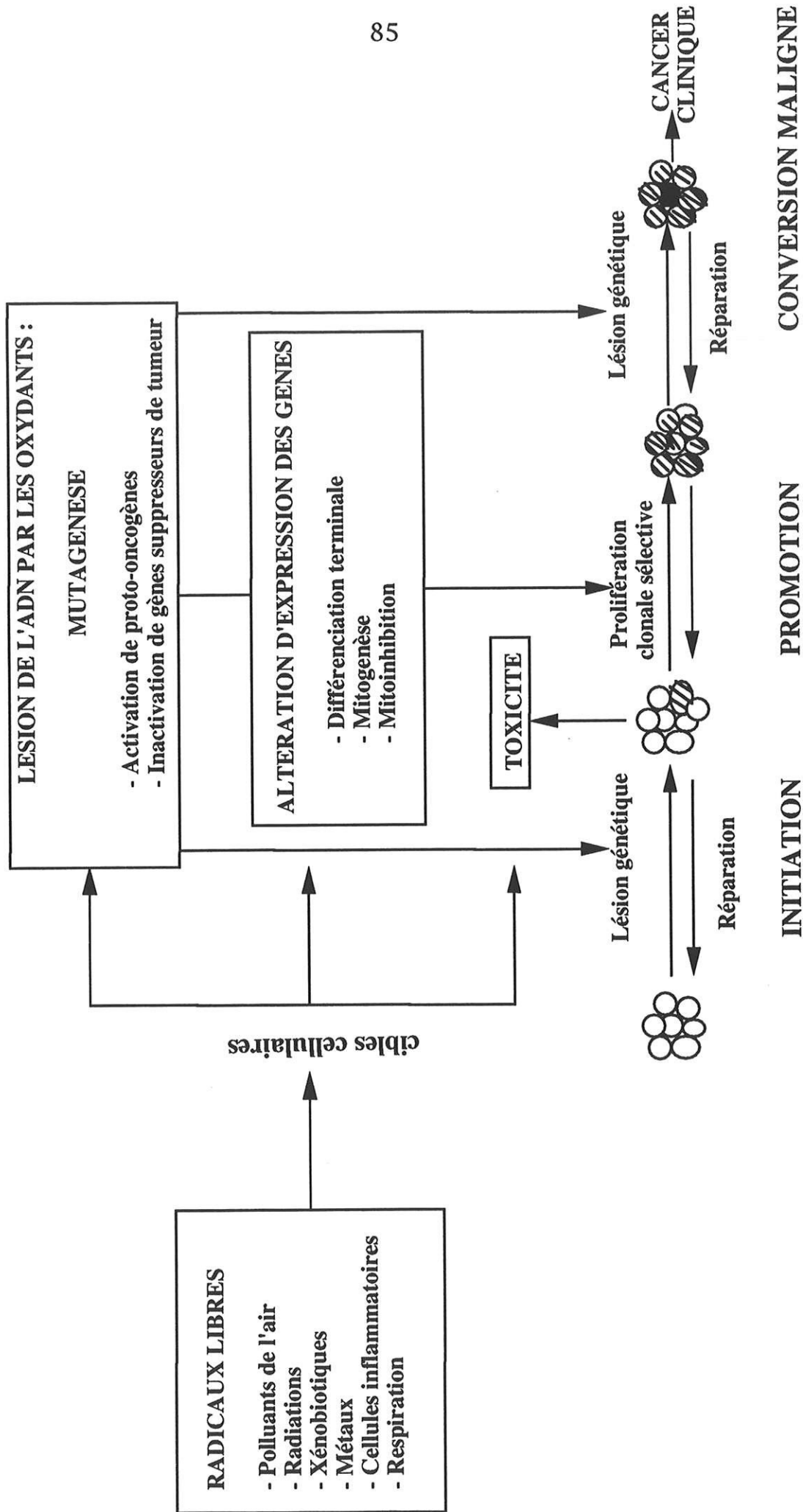
Les lésions subies par l'ADN peuvent conduire soit à une chute du taux d'ATP et à la mort cellulaire, soit à une transformation maligne dans les cellules survivantes.

Les oxydants ont démontré leur capacité à participer à chacune des étapes de la carcinogénèse (37). Cette notion les fait considérer comme le probable terme ultime du métabolisme des substances carcinogènes.

A la phase d'initiation, l'intervention des oxydants implique l'action du radical OH° sur l'ADN cellulaire. La responsabilité des oxydants dans le déclenchement de l'initiation semble résulter essentiellement de l'induction de changements dans la séquence ADN des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur. Ces mutations concernent de façon privilégiée les paires de bases G-C (guanine-cytosine). OH° est le plus souvent responsable de l'oxydation de la base G qui se transforme en 8-oxo-G (46). Cette oxydation des bases comporte un potentiel mutagène non négligeable. Dans la famille de l'oncogène ras, les sites de mutation les plus fréquents sont les paires de bases G-C situées sur les codons 12 et 13.

Plusieurs arguments plaident pour le rôle des oxydants au cours de la phase de promotion : les radicaux libres générant des peroxydes et des hydroperoxydes ont démontré une activité de promoteur tumoral ; les promoteurs tumoraux sont susceptibles de provoquer une agression oxydante. Ainsi, l'application locale de phorbol ester (47) sur la peau de souris rend les cellules épidermiques capables de produire des MDO, et il s'y associe une altération de l'ADN dans ces cellules. L'action des oxydants à la phase de promotion s'exerce sur les deux populations cellulaires par un double signal : les oxydants induisent un effet cytotoxique et cytostatique sur les cellules normales, et un effet mitogène sur les cellules transformées (à la phase d'initiation). Cette mitogénèse est sous la dépendance d'une classe de gènes (c-fos, c-jun, c-myc) dont l'expression est amplifiée par les oxydants. La capacité des oxydants à moduler l'expression des gènes est confortée par le fait que la régulation d'un grand nombre de gènes dépend de mécanismes d'oxydoréduction.

Les oxydants peuvent également intervenir à la phase de conversion maligne. L'illustration en est faite par l'exemple du papillome cutané multiple : cette tumeur bénigne est engendrée par les étapes d'initiation et de promotion. La transformation maligne est obtenue par l'action additionnelle d'une substance initiatrice oxydante qui crée une seconde atteinte du code génétique, responsable de la croissance anarchique de la tumeur.



ROLE DES OXYDANTS DANS LES ETAPES DE LA CARCINOGENESE (schéma adapté de la référence 37)

Les oxydants sont étroitement associés au processus de carcinogénèse, puisqu'ils interviennent dans le déroulement de chacune des étapes.

3.3. Activité antitumorale des oxydants

Si le pouvoir carcinogène des oxydants est largement démontré, seuls quelques travaux expérimentaux ont mis en évidence une lyse de cellules tumorales sous l'action de fortes concentrations de H₂O₂. On possède peu de renseignements sur une telle activité antitumorale des oxydants in vivo.

IV - ANTIOXYDANTS ET CANCER

La place des antioxydants, notamment celle du glutathion, est très ambiguë en cancérologie. En raison de l'implication évidente des oxydants dans le processus de cancérogenèse, il serait tentant de limiter le rôle des antioxydants à une fonction de défense antitumorale de l'organisme. Mais de nombreux arguments viennent nuancer cette hypothèse, car il apparaît que le glutathion participe au développement des cellules cancéreuses et les protège de différentes agressions.

4.1. Rôle anticancéreux des antioxydants

Dans la stratégie de prévention du cancer, la limitation de l'exposition aux substances mutagènes représente la solution idéale. Mais sa mise en pratique pose souvent des problèmes délicats. Dans le cas où cette exposition est inévitable, on peut tenter de rendre l'organisme hôte plus résistant aux effets pathologiques des substances nocives, durant la période de latence précédant l'apparition clinique du cancer. Certains composés sont réputés fournir une protection efficace contre de nombreux agents mutagènes et carcinogènes. Les composés aminothiols, naturels comme le GSH ou synthétiques comme la N-Acétyl-Cystéine NAC, possèdent des propriétés anticarcinogènes qui ont été étudiées expérimentalement.

4.1.1. Résultats en carcinogénèse expérimentale

Ce rôle des composés thiols dans la prévention de l'apparition des cancers résulte de plusieurs mécanismes d'action (48).

La présence de l'agent carcinogène dans l'organisme provient soit directement d'une source exogène, soit d'une synthèse endogène à partir de précurseurs inactifs. Le premier système de défense de l'organisme consiste à empêcher les substances nocives d'atteindre les cellules cibles, par divers moyens mis en oeuvre dans l'espace extracellulaire : inhibition de la formation endogène de l'agent carcinogène, blocage de sa pénétration dans la cellule, facilitation de son élimination de l'organisme, modification du métabolisme des xénobiotiques. L'inhibition de la synthèse endogène de substances agressives constitue un procédé essentiel dans ce système de défense - que les composés thiols sont à même d'assurer. Le GSH et le NAC sont ainsi capables d'interférer dans la réaction d'azotation de deux drogues anti-ulcéreuses (la famotidine et la ranitidine) et d'empêcher leur transformation en composés mutagènes.

Une autre façon de faire obstacle à l'atteinte des cellules cibles est de moduler le métabolisme des substances carcinogènes telles que les MDO, c'est-à-dire de réaliser une détoxification. Mais les processus de détoxification et d'activation métabolique sont en équilibre fragile, et il est difficile d'influencer ces mécanismes sans perturber l'homéostasie intracellulaire. Par exemple, l'apport de doses moyennes de NAC peut provoquer une induction de l'activité aryl hydrocarbure hydroxylase et donc intensifier l'action mutagène de certains composés. A doses élevées, le NAC augmente le taux de la GSSG réductase qui favorise la régénération du GSH. On observe alors une majoration de l'activité antioxydante, qui vient bloquer l'activation métabolique de l'agent mutagène provoquée par le NAC. La détoxification de l'agent mutagène se produit grâce à l'activité du cycle redox du GSH, mais aussi grâce à la capacité de conjugaison du GSH avec les substances électrophiles.

Si les MDO parviennent cependant à pénétrer dans la cellule, ils vont pouvoir y exercer leur effet mutagène. Des études réalisées sur des systèmes bactériens ont démontré que l'addition de NAC et de GSH inhibe, de façon dose-dépendante, la génotoxicité de H_2O_2 .

L'effet protecteur des thiols peut encore se manifester après la constitution des lésions de l'ADN. Cet effet repose sur la modulation de la réplication de l'ADN et des processus de réparation. C'est une opération délicate, puisqu'il s'agit de ralentir la prolifération cellulaire (qui est sous la dépendance de l'enzyme poly ADP-ribose polymérase pADPRP) afin de permettre à la réparation de s'effectuer, tout en inhibant les systèmes de réparation prédisposant à des erreurs dans la reconstitution du code génétique. Le NAC est capable de diminuer temporairement l'activité de la pADPRP dans une cellule exposée à l'action d'une substance carcinogène.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux démontre formellement le rôle antimutagène du GSH et du NAC in vitro. En raison des propriétés antioxydantes de ces

substances, on peut admettre qu'elles sont également susceptibles de s'opposer aux effets des MDO lors de la phase de promotion tumorale.

L'évaluation *in vivo* du pouvoir anticarcinogène des antioxydants, et plus particulièrement du GSH, a été réalisée sur des modèles animaux.

4.1.2. Résultats expérimentaux *in vivo*

Parmi les antioxydants testés, le béta-carotène et l'alpha-tocophérol ont prouvé leur aptitude à inhiber la carcinogénèse dans le modèle de cancer buccal du hamster (49). L'application locale de l'une ou l'autre de ces substances peut bloquer le processus carcinogène en agissant aux phases d'initiation et de promotion. L'injection locale d'antioxydant à proximité de la lésion permet de faire régresser un carcinome épidermoïde buccal. L'administration par voie orale d'un mélange de béta-carotène et d'alpha-tocophérol entraîne la régression du carcinome, attestant l'activité anticancéreuse synergique de ces deux produits.

Le rôle du glutathion a été abordé au cours de l'étude du modèle de carcinogénèse au niveau de la peau de souris : l'application locale de GSH exogène sur des papillomes cutanés diminue l'incidence de la transformation en carcinome épidermoïde, et cette activité préventive du GSH semble dose dépendante. La déplétion en GSH favorise la progression tumorale, suggérant qu'un taux adéquat de GSH pourrait jouer un rôle important dans la prévention de la formation du cancer. Dans le modèle du cancer buccal du hamster, l'apport par voie orale de GSH inhibe significativement le développement de tumeur maligne : c'est la première démonstration de l'activité anticancéreuse du GSH administré par voie systémique. Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle des taux élevés de GSH majorent la résistance de la muqueuse buccale aux substances carcinogènes.

4.2. Rôle du glutathion dans le développement du cancer

Bien que de nombreux arguments plaident en faveur du rôle anticarcinogène du glutathion, divers éléments suggèrent que le glutathion pourrait favoriser la progression tumorale : le GSH intervient dans la croissance des cellules cancéreuses, les protège contre les MDO et contribue à leur chimiorésistance.

4.2.1. Glutathion et croissance cellulaire tumorale

La lignée cellulaire de cancer pulmonaire humain A 549 possède des caractéristiques qui la rapprochent du pneumocyte II (20) : elle contient des corps

multilamellaires et a la propriété de synthétiser la lécithine. Comparée aux autres cellules néoplasiques, la cellule A 549 présente une concentration élevée en GSH. L'étude du métabolisme du GSH fait appel au DEM (diéthylmaléate), qui entraîne une déplétion des cellules en GSH. En présence des acides aminés précurseurs appropriés, la cellule A 549 démontre qu'elle est effectivement capable de resynthétiser du GSH. Si la déplétion en GSH est réalisée par la BSO (buthionine sulfoximine), inactivateur spécifique de la gamma-glutamyl cystéine synthétase, la resynthèse du GSH par la cellule A549 devient impossible car le BSO inhibe également l'entrée de la cystine dans la cellule.

L'étude du développement de cellules A 549 en culture montre des variations du taux de GSH en fonction du stade de la croissance cellulaire (50) : le taux de GSH s'élève précocément durant la phase exponentielle de croissance et s'abaisse au niveau le plus bas lors de la phase de plateau. La déplétion en GSH liée au BSO se traduit par une inhibition de la croissance cellulaire. Il semble donc que le GSH soit impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire et qu'un certain taux de GSH soit nécessaire au développement des cellules A549.

L'étude *in vivo* du GSH dans les tumeurs pulmonaires humaines et dans le tissu sain pulmonaire (51) apporte des résultats plus mitigés : les taux moyens de GSH diffèrent peu dans les deux groupes, mais sont toutefois plus élevés dans les lésions cancéreuses épidermoïdes. Il est possible d'expliquer le nivellement des résultats par le fait que les prélèvements histologiques contiennent des populations cellulaires hétérogènes. Une étude plus précise révèle que plusieurs des sous-populations cellulaires des carcinomes épidermoïdes ont des concentrations cellulaires de GSH significativement plus élevées que les cellules du tissu pulmonaire sain : ces cellules n'ont cependant pu être identifiées. En raison de la diversité des sous-populations cellulaires, il existe une variation marquée des taux cellulaires de GSH à l'intérieur des tumeurs pulmonaires.

4.2.2. Glutathion et défense antioxydante des cellules cancéreuses

La production des MDO, et notamment celle de H_2O_2 , est impliquée dans la cytotoxicité exercée par les macrophages activés (52). Pour détruire les cellules tumorales, les macrophages peuvent donc sécréter de grandes quantités de H_2O_2 . La sensibilité des cellules cancéreuses à l'action toxique de H_2O_2 varie considérablement, et paraît inversement proportionnelle à la concentration cellulaire du GSH. L'inhibition de l'activité du cycle redox du glutathion se traduit par une nette fragilisation des lignées cellulaires tumorales vis-à-vis de H_2O_2 .

Le GSH semble donc capable de participer aux mécanismes de défense de la cellule cancéreuse.

4.2.3. Glutathion, glutathion transférases et chimiorésistance

La résistance aux drogues constitue un problème important dans le traitement du cancer. L'étude de lignées cellulaires résistantes à différents agents anticancéreux *in vitro* a permis de mettre à jour plusieurs mécanismes de résistance (53). La résistance multiple aux médicaments (*multidrug resistance* ou MDR) résulte de l'association de 3 mécanismes : la P-glycoprotéine membranaire expulse le médicament du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule ; le glutathion agit comme une molécule détoxifiante dans le cytoplasme ; et enfin la cellule cancéreuse peut engager un mécanisme nucléaire qui protège les topoisomérases.

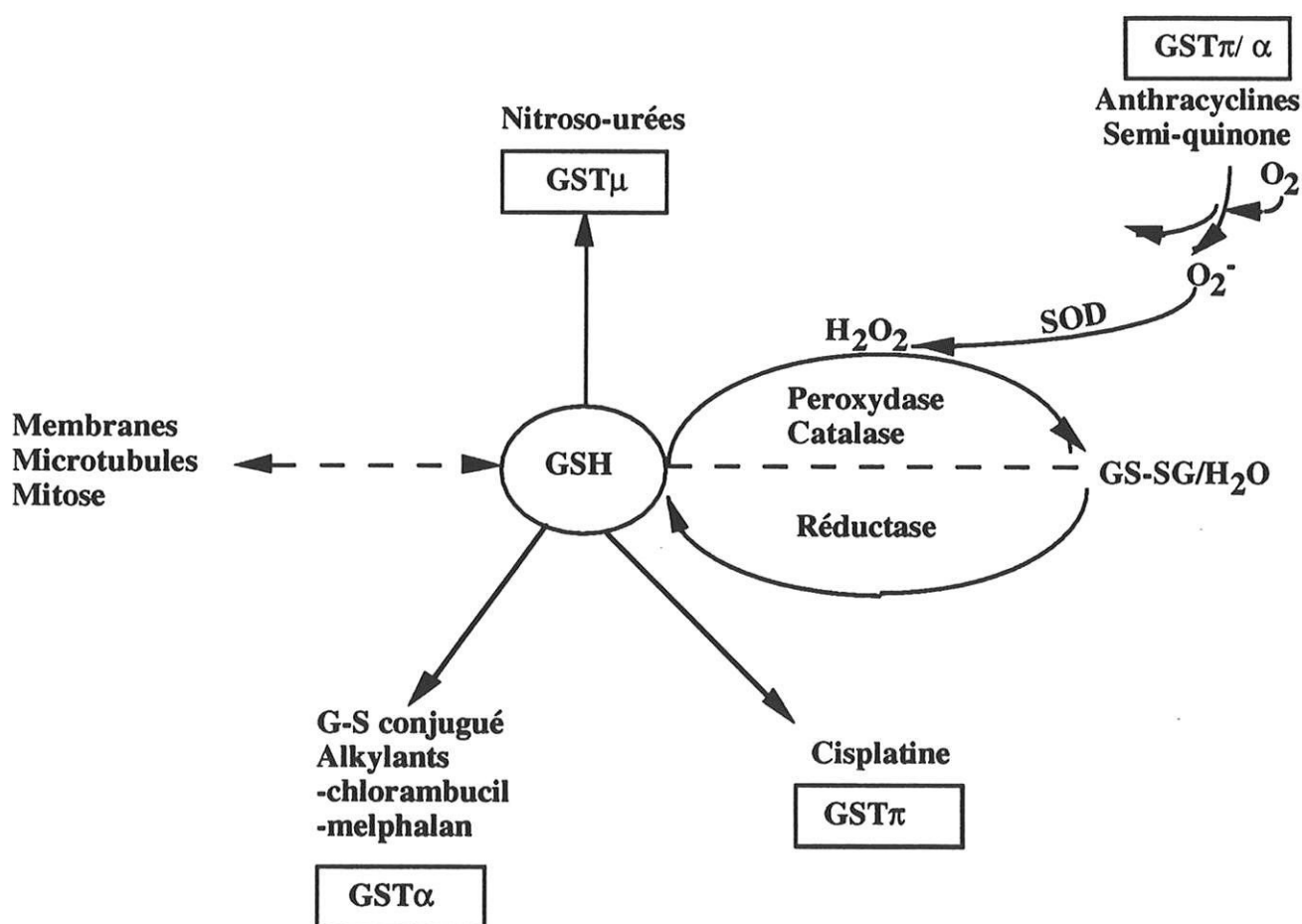
Le glutathion, grâce à sa propriété de conjugaison, participe à la détoxification des xénobiotiques potentiellement nocifs. Il réagit donc avec les radicaux libres et les peroxydes générés par les médicaments anticancéreux et diminue ainsi les lésions au niveau de l'ADN. Dans les cellules cancéreuses résistantes aux alkylants et au cisplatine, on observe un taux de glutathion intracellulaire élevé, et une diminution de ce taux restaure la sensibilité des cellules à ces drogues. Le glutathion intervient donc apparemment dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses. On conçoit l'importance des enzymes participant à l'activité détoxifiante du glutathion, les glutathion transférases ou GST.

Dans les cellules cancéreuses humaines, on dénombre trois familles d'enzymes GST dénommées : α , μ et π . Les GST, qui catalysent la conjugaison du GSH et possèdent une activité GSH-PX indépendante du selenium, assurent essentiellement une fonction de détoxification à l'égard de substances très diverses. Ces enzymes sont largement distribuées dans les organes. La GST π , enzyme ubiquitaire, est présente à des taux élevés dans de nombreux tissus tumoraux humains. Il semble que l'équipement en GST (et plus particulièrement en GST π) d'un tissu tumoral contribue à la résistance intrinsèque que manifestent certaines tumeurs. Chaque famille d'enzymes a une certaine spécificité vis-à-vis des agents antitumoraux : la GST α est plus directement impliquée dans la résistance aux agents alkylants, la GST μ dans celle aux nitroso-urées et la GST π dans celle au cisplatine.

La compréhension des mécanismes intervenant dans la carcinogenèse est loin d'être satisfaisante, et suscite toujours d'intenses recherches. Des conceptions récentes considèrent les MDO comme le terme ultime du métabolisme des substances carcinogènes, et impliquent le radical OH° dans le processus de carcinogenèse.

Les données relatives au glutathion sont beaucoup moins univoques. Des arguments expérimentaux démontrent que le GSH est capable de défendre la cellule hôte contre l'action carcinogène des MDO. Et quelques études cliniques réalisées sur des animaux confirment le rôle protecteur antitumoral du GSH. A l'opposé, la présence de glutathion paraît bénéfique au développement des cellules cancéreuses, en favorisant leur prolifération et en les protégeant contre diverses agressions. Le GSH et les GST participent notamment au phénomène de chimiorésistance des tissus cancéreux.

Il est vraisemblable qu'une meilleure connaissance du système GSH-GST dans les cancers débouchera sur des stratégies permettant de moduler l'activité du GSH et du GST, dans les cellules cancéreuses et dans les cellules saines de l'organisme hôte.



ACTIVITE DE DETOXIFICATION CELLULAIRE DU GSH ET DES GST

(53)

CHAPITRE IV

ETUDE EXPERIMENTALE

I - INTRODUCTION : BUT DE L'ETUDE

De nombreuses pathologies pulmonaires font intervenir les MDO dans leur pathogénie, même si l'importance de leur rôle est parfois difficile à affirmer. L'intoxication tabagique s'accompagne en particulier d'une augmentation de production de MDO dans le poumon profond. Et les oxydants sont également impliqués dans les processus de mutagenèse et carcinogénèse. En réponse à une libération exagérée d'oxydants, le poumon dispose d'un large éventail de substances antioxydantes chargées de le protéger.

L'objectif de cette étude est de quantifier le fonctionnement des systèmes de défense antioxydante du poumon profond chez des patients fumeurs présentant ou non un cancer bronchique primitif. Nous avons donc comparé les concentrations du GSH, de la SOD et de la catalase dans le liquide du LBA, au sein de deux populations : un groupe de sujets fumeurs et un groupe de sujets fumeurs atteints d'un cancer bronchique. L'étude a été complétée par le dosage du GSH et de la SOD intracellulaires dans les MA, et par l'évaluation de la production d'anion superoxyde par les MA.

Les données de la littérature (24) montrent que les sujets fumeurs développent une majoration de l'activité des défenses antioxydantes pulmonaires, en réaction à l'agression oxydante de la fumée de cigarette. Cette étude expérimentale va chercher à déterminer si les patients atteints d'une néoplasie broncho-pulmonaire présentent eux aussi une exacerbation de l'activité antioxydante, ou bien si au contraire il existe une déficience des systèmes de protection antioxydante pulmonaires.

II - METHODES

2.1. Populations étudiées

Notre étude a été conduite à distance d'un épisode infectieux, chez des patients ayant un état respiratoire stable et recevant un traitement bronchodilatateur éventuel (mais pas de corticoïdes ni de N-acétyl-cystéine).

Nous avons distingué deux populations : un premier groupe de 10 sujets fumeurs et un deuxième groupe composé de 10 patients fumeurs atteints d'un cancer bronchique primitif. Nous n'avons pu inclure dans notre travail de recherche un groupe témoin de sujets sains non tabagiques, en raison de la loi Huriet qui n'autorise plus la réalisation d'examens invasifs chez des sujets dont l'état de santé ne le justifie pas, même après consentement éclairé.

2.2. Technique du lavage broncho-alvéolaire

Le LBA représente un bon moyen d'exploration du poumon profond, qui permet le recueil d'un matériel cellulaire et acellulaire présent dans l'alvéole.

Le LBA est réalisé au cours d'une fibroscopie bronchique, chez des patients perfusés et prémédiqués (1/2 mg d'atropine en injection sous-cutanée + 1 ampoule de Silomat en injection intraveineuse + 20 mg de Valium en perfusion dans 250 cl de glucosé à 5 %), recevant une oxygénothérapie par sonde nasale avec un débit de 1,5 l/mn (avec une surveillance par oxymètre de pouls).

Après une anesthésie locale par pulvérisation de lidocaïne à 2 %, le fibroscope est introduit dans l'arbre respiratoire et positionné dans une bronche sous-segmentaire du lobe moyen ou de la lingula. Chez les patients présentant une tumeur bronchique, le LBA est réalisé systématiquement dans le poumon controlatéral à la lésion, afin d'étudier le comportement du poumon profond globalement, et non pas seulement au voisinage de la tumeur.

Après le blocage de l'extrémité du fibroscope dans le territoire choisi, on procède à l'instillation de 200 à 300 ml de sérum physiologique isotonique par fractions de 50 ml avec recueil séquentiel par aspiration douce entre chaque instillation. La première seringue ainsi récupérée est écartée ; le reste du liquide de LBA recueilli est aussitôt versé dans des flacons siliconés maintenus à une température de + 4° C.

2.3. Colorations cellulaires

Le liquide du LBA recueilli est tout d'abord filtré à travers trois épaisseurs de compresses stériles. Puis il est soumis à une centrifugation (450 G, durant 10 minutes, à +4° C), de manière à séparer les cellules et le surnageant.

Le surnageant est aliquote en vue du dosage de l'urée, du GSH, de la SOD et de la catalase.

Le culot cellulaire est suspendu dans 3 ml de solution tampon HBSS (*Hank's balanced salt solution*) : une coloration au bleu trypan permet de déterminer la vitalité cellulaire et le compte cellulaire total (lecture sur cellule de Malassez) ; la formule cellulaire différentielle est établie grâce à la technique de coloration du *Diff-Quick* réalisée sur une goutte de la solution étalée sur une lame et séchée à l'air.

Le mélange culot cellulaire-HBSS subit une nouvelle centrifugation (450 G, durant 10 minutes, à +4° C). Après élimination du surnageant, on resuspend le culot cellulaire dans un milieu de culture : du RPMI 1640 sans serum, additionné de L.glutamine. La quantité de RPMI ajoutée au culot cellulaire est calculée de façon à obtenir une

concentration de 2×10^6 cellules/ml de solution. On dépose ensuite 500 microlitres de ce mélange dans chaque puits d'une plaque de culture de 24 puits. Cette plaque est placée dans un incubateur dont l'atmosphère maintenue à 37°C contient 5 % de CO_2 . Après une heure d'incubation, on élimine le RPMI et on lave chaque puits à 3 reprises avec de l'HBSS, ce qui permet de ne conserver que les macrophages ayant adhéré au fond des puits et d'éliminer les autres cellules résiduelles.

2.4. Dosage de l'urée dans le liquide de LBA et dans le plasma

La réalisation du LBA, par sa technique même, implique nécessairement une dilution du volume du liquide de recouvrement épithélial LRE prélevé. Afin d'estimer la concentration réelle des cellules et molécules présentes *in situ* dans le LRE à partir des dosages pratiqués dans le liquide de LBA, il est indispensable de déterminer le facteur de dilution de l'échantillon de LRE. L'urée a été proposée comme marqueur endogène de dilution et l'étude de Rennard et Coll. (54) a confirmé l'intérêt présenté par cette molécule.

L'utilisation de l'urée pour quantifier le volume de LRE obtenu par le LBA se justifie par le fait qu'il s'agit d'une molécule de bas poids moléculaire (60 daltons), qui diffuse facilement dans le poumon de façon à s'équilibrer avec la concentration plasmatique de l'urée. Ainsi, on admet que :

$$[\text{urée}]_{\text{LRE}} = [\text{urée}]_{\text{plasma}}$$

La concentration de l'urée dans le liquide de LBA reste élevée malgré la dilution, ce qui en fait un dosage simple à effectuer. On peut donc déterminer le volume de LRE récupéré par le LBA :

$$\text{Volume LRE obtenu} = \frac{\text{quantité totale d'urée dans le liquide de LBA récupéré (mg)}}{\text{concentration plasmatique de l'urée (mg/ml)}}$$

En comparant le volume du LRE et celui du LBA, on déduit le facteur de dilution. Ce volume de LRE, en réalité, devrait être appelé "volume apparent" : bien que plus de 80 % de l'urée détectée dans le liquide de LBA provienne de l'urée présente *in situ* dans le LRE, une fraction de l'urée dosée (moins de 20 %) dérive d'autres sources. Cependant, on considère que cette "erreur" est négligeable et que l'évaluation du volume de LRE demeure suffisante.

La détermination de la concentration de l'urée dans le plasma et le liquide de LBA utilise la méthode à l'uréase U.V cinétique (dosage réalisé par le service de chimie biologique de Monsieur le Professeur BRETON, CHU Dupuytren) : l'urée est clivée en CO_2 et NH_4 sous l'action d'une uréase ; le NH_4 réagit avec de l'alpha céto-glutarate en présence de NADH (sous l'effet de la glutamate déshydrogénase) pour donner du glutamate, de l'eau et du NAD. C'est la mesure spectrophotométrique de la diminution du

NADH transformé en NAD, à la longueur d'onde de 340 nm, qui permet de quantifier l'urée.

2.5. Dosage de l'anion superoxyde

On utilise le ferricytochrome C pour détecter l'anion superoxyde produit par les MA adhérant au fond des puits de la plaque de culture. Après lavage avec de l'HBSS, 9 puits reçoivent chacun 80 μ M de ferricytochrome C (sigma C 2506). Dans trois de ces puits, on ajoute du phorbol myristate acétate (PMA, sigma P 8139) pour stimuler la production d'O₂⁻. Dans trois autres de ces puits, on dépose de la SOD (SOD, sigma S 2515), ce qui constituera un contrôle négatif.

Les cellules sont placées dans une étuve ne contenant pas de CO₂, à 37° C durant 1 heure. Le surnageant de chaque puits est ensuite prélevé et centrifugé pendant 2 minutes. L'absorbance des surnageants est déterminée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 550 nm.

La quantité de O₂⁻ libérée dans les surnageants est déterminée en soustrayant les valeurs d'absorbance obtenues en présence de SOD de celles obtenues en l'absence de SOD. La production de O₂⁻ est exprimée en quantité (nano M) de ferricytochrome C réduit/10⁶ cellules, calculée en utilisant un coefficient d'extinction de 21,1 mM⁻¹ cm⁻¹ par 10⁶ cellules par heure. De la quantité de cytochrome C réduit, on déduit ainsi la quantité de O₂⁻ libérée.

2.6. Dosage de l'activité de la SOD

Ce dosage est réalisé selon la méthode spectrophotométrique SOD-525 (Bioxytech SA) fondée sur la propriété que possède tout catalyseur pourvu d'une activité SOD, d'accélérer à pH alcalin l'auto-oxydation d'un réactif R₁ en un chromophore absorbant la lumière visible. On considère que ce chromophore absorbant à 525 nm est parfaitement stable pendant le temps de la mesure, bien que sa stabilité n'excède pas quelques minutes. La méthode SOD-525 exploite également un second réactif R₂, qui permet d'éliminer les interférences majeures dues aux mercaptans (le glutathion par exemple) présents dans l'échantillon, grâce à une réaction d'alkylation très rapide.

Le dosage de l'activité SOD est effectué :

- dans le liquide de LBA : à 250 μ l d'échantillon, on ajoute 400 μ l d'un mélange éthanol absolu/chloroforme. Après centrifugation (1250 G à +4° C durant 5 minutes), le surnageant obtenu est soumis à l'action de R₁ et R₂. Cette procédure est appliquée sur trois échantillons de liquide de LBA et on retient comme résultat la moyenne

des trois mesures. Ce principe a été appliqué pour tous les dosages réalisés au cours de cette étude.

- dans les macrophages alvéolaires : après le lavage avec de l'HBSS, les cellules de 3 puits de la plaque sont récupérées à l'aide d'un grattoir et suspendues dans de l'eau stérile refroidie à +4° C. Les échantillons subissent le même traitement que précédemment avec le mélange éthanol absolu/chloroforme et le kit de dosage SOD-525.

Pour chaque échantillon ainsi préparé, le spectrophotomètre dont la longueur d'onde d'absorption est fixée à 525 nm, permet de définir une vitesse de réaction qui est déterminée par la pente du décours temporel d'absorbance. On calcule le rapport de la vitesse de réaction de l'échantillon V_s sur celle du contrôle V_c (eau distillée), et on en déduit l'activité SOD grâce à l'équation :

$$\frac{V_s}{V_c} = 1 + \frac{[SOD]}{a[SOD] + b} \quad \text{avec } a = 0,073 \text{ et } b = 0,93$$

Les résultats s'expriment en unités d'activité SOD 525 par ml d'échantillon.

2.7. Dosage de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase dans le liquide de LBA est mesurée spectrophotométriquement à l'absorbance de 240 nm, en utilisant la technique de dosage AEBI (55). On procède à un mélange contenant deux solutions tampons KH_2PO_4 et Na_2HPO_4 , du H_2O_2 en faible concentration et l'échantillon. La décomposition de H_2O_2 est suivie directement par la diminution de l'absorbance au spectrophotomètre. La différence dans l'absorbance par unité de temps (ΔA_{240}) constitue la mesure de l'activité de la catalase. Les résultats sont exprimés en unités/ml.

2.8. Dosage du glutathion réduit GSH

La mesure est réalisée à l'aide d'un essai colorimétrique selon la méthode GSH-400 (Bioxytech S.A). La méthode GSH-400 exploite une réaction chimique qui a lieu selon deux étapes : la première conduit à la formation de produits de substitution (thioethers) entre un réactif R_1 et tous les mercaptans (RSH) présents dans l'échantillon étudié ; la seconde étape est fondée sur une réaction de bêta-élimination alcaline spécifique du produit de substitution obtenu avec GSH, et qui conduit à la formation d'une thione chromophorique dont la longueur d'onde d'absorbance maximale est égale à 400 nm.

Le dosage du GSH est effectué :

- dans le liquide de LBA : à 100 µl d'échantillon, on ajoute 400 µl de MPA à 6 % (acide métaphosphorique). Après centrifugation du mélange (1700 G à +4° C durant 8 minutes), on prélève le surnageant auquel on applique la méthode GSH-400.

- dans les macrophages alvéolaires : après le lavage avec de l'HBSS; on ajoute 100 µl de MPA à 6 % (le MPA est destiné à faire éclater les cellules) dans trois puits de la plaque. Les cellules sont récupérées à l'aide d'un grattoir. Et dans chacun des trois échantillons, on ajoute encore 300 µl de MPA à 6 % et 100 ml d'eau stérile. On procède à une centrifugation rapide (1700 G) et le surnageant est prélevé pour le dosage du GSH.

Pour chaque échantillon, le spectrophotomètre permet de mesurer l'absorbance finale A , à 400 nm. Le calcul de la concentration en GSH est établi à partir de l'équation suivante :

$$[\text{GSH}] = \frac{A - A_0}{\sum x I} \times D$$

A et A_0 sont les absorbances mesurées respectivement en présence et en l'absence d'échantillon.

\sum est le coefficient d'extinction molaire apparent du produit mesuré à 400 nm.

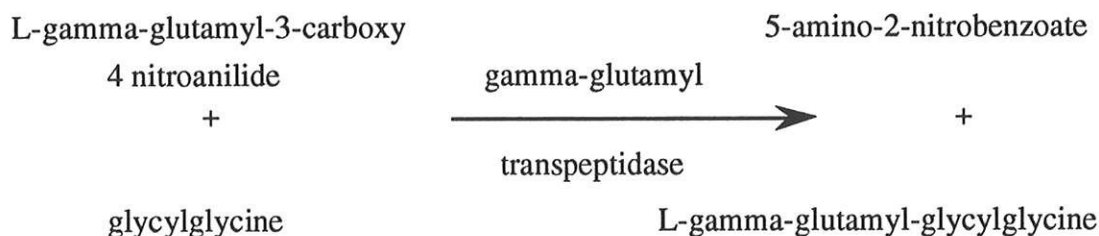
I est la longueur du trajet optique (cm).

D est le facteur de dilution de l'échantillon.

La concentration en GSH est exprimée en mole/litre.

2.9. Dosage de l'activité de la gamma-glutamyl transpeptidase

Le laboratoire de chimie biologique (Service de Monsieur le Professeur Breton, CHU Dupuytren) a utilisé la méthode Technicon Chem 1 pour déterminer l'activité de la gamma-glutamyl transpeptidase dans le liquide de LBA. Cette enzyme, qui catalyse le transfert de groupements gamma-glutamyl à d'autres peptides, régit le catabolisme du GSH dans le secteur extracellulaire. L'activité de la gamma-glutamyl transpeptidase est directement proportionnelle à la quantité de 5-amino-2-nitrobenzoate produit selon la réaction suivante :



Le taux de production du 5-amino-2-nitrobenzoate est suivi spectrophotométriquement par la mesure de l'absorption à 405 nm.

2.10. Méthode statistique

Pour chaque donnée numérique, on établit une moyenne \pm un écart type, dans les deux groupes de patients.

Comme il s'agit de comparer des données non appariées, on utilise le test T de Student. Une différence est tenue pour significative quand $p < 0,05$.

III - RESULTATS

3.1. Caractéristiques des populations étudiées

3.1.1. Premier groupe : sujets fumeurs

Ce groupe est constitué de 10 sujets fumeurs, de sexe masculin. L'intoxication tabagique est évaluée en moyenne à 37 paquets-années et persiste chez 4 des 10 sujets.

L'exploration fonctionnelle respiratoire atteste un syndrome obstructif avec une diminution du VEMS à 68 % de la valeur théorique prédictive (voir tableau I page suivante).

Des arguments cliniques variés (altération de l'état général, aggravation de la toux ou de la dyspnée, épisodes infectieux broncho-pulmonaires récidivants, expectoration hémoptoïque) ont conduit à la réalisation d'une fibroscopie bronchique afin d'éliminer une affection néoplasique sous-jacente. La fibroscopie a été effectuée après stabilisation de l'état respiratoire, et à distance d'un processus infectieux éventuel.

3.1.2. Second groupe : patients atteints d'un cancer bronchique

Ce groupe comporte 10 patients fumeurs, de sexe masculin, présentant un cancer bronchique primitif non traité. Le tabagisme, poursuivi par 6 des 10 sujets, est estimé à 42 paquets-années en moyenne.

L'exploration fonctionnelle respiratoire met en évidence un trouble obstructif, avec un ralentissement du VEMS à 69 % de la valeur théorique prédictive (voir tableau I page suivante).

TABLEAU 1: CARACTERISTIQUES DES POPULATIONS ETUDIEES

	FUMEURS	CANCERS
Nombre	10	10
Age	53,8 ± 3,8	58 ± 3,1
Tabagisme (Paquets/Années)	37 ± 7	42 ± 4
VEMS (% de valeur prédictive)	68,12 ± 8,6	69,33 ± 4,7

Chez ces patients, les signes révélateurs du cancer bronchique ont été très divers : amaigrissement, hippocratisme digital d'apparition récente, douleur thoracique, hémoptysie, localisation métastatique. Le cliché thoracique était anormal dans tous les cas.

La lésion tumorale n'était accessible par la fibroscopie bronchique que dans 50 % des cas.

La nature histologique de ces tumeurs est variée, mais on observe une prédominance de carcinomes épidermoïdes (voir tableau II page suivante).

PATIENT	AGE	SEXE	HISTOLOGIE	TNM
1	53	Masculin	Epidermoïde	T3 N1 M0
2	49	M	Adénocarcinome	T4 N3 M1
3	67	M	Adénocarcinome	T1 N0 M0
4	74	M	Composite : Epidermoïde Adénocarcinome	T2 N0 M0
5	40	M	Carcinome à grandes cellules	T4 N3 M1
6	51	M	Epidermoïde	T2 N0 M0
7	59	M	Epidermoïde	T4 N2 M0
8	59	M	Epidermoïde	T2 N0 M0
9	62	M	Epidermoïde	T2 N2 M0
10	66	M	Epidermoïde	T4 N3 M0

Tableau II : CARACTERISTIQUES DES PATIENTS CANCEREUX

3.2. Résultats de l'étude du LBA

3.2.1. Pourcentage de liquide de LBA recueilli

La récupération du liquide de LBA est significativement meilleure dans le groupe de sujets fumeurs ($59 \% \pm 3,5$), par rapport au groupe de patients atteints de cancer ($47 \% \pm 3$, $p = 0,0055$).

3.2.2. Analyse cytologique du liquide de LBA

Le compte cellulaire total objective une hypercellularité plus marquée dans le groupe des patients atteints de cancer ($68 \cdot 10^4 \pm 10,2$ cellules/mm³), comparativement aux sujets fumeurs ($47,5 \cdot 10^4 \pm 5,2$) mais la différence n'est pas significative ($p = 0,0699$).

La formule cellulaire varie peu d'une population à l'autre, hormis un pourcentage discrètement plus élevé de MA chez les fumeurs (85 % contre 80 %) et de lymphocytes chez les patients atteints de cancer (voir tableau III ci-après).

TABLEAU 3 : RESULTATS DU LAVAGE BRONCHOALVEOLAIRE

	FUMEURS	CANCERS
n	10	10
Age	53,8 ± 3,8	58 ± 3,1
Paquets/Années	37 ± 7	42 ± 4
LBA récupéré %	59 % ± 3,5	47 % ± 3*
Compte cellulaire total 10 ⁴ cellules	47,5 ± 5,2	68 ± 10,2
Macrophages alvéolaires %	85,2 ± 3	80,2 ± 2
Lymphocytes %	11,8 ± 2	16,8 ± 3
Polynucléaires %	3,3 ± 0,7	3 ± 0,5
Urée LBA mM/l	0,9 ± 0,02	0,94 ± 0,04

* $p < 0,05$ par comparaison avec les fumeurs

3.2.3. Dosage de l'urée dans le liquide de LBA

La mesure de l'urée dans le liquide de LBA retrouve des valeurs similaires dans les deux groupes, aux environs de 0,9 mM/l.

3.2.4. Dosage du GSH dans le liquide de LBA

On observe des valeurs très élevées chez les patients atteints de cancer ($1485,5 \pm 208$ microM/l) par rapport aux sujets fumeurs (544 ± 97 microM/l). La différence est particulièrement significative, puisque $p = 0,0003$.

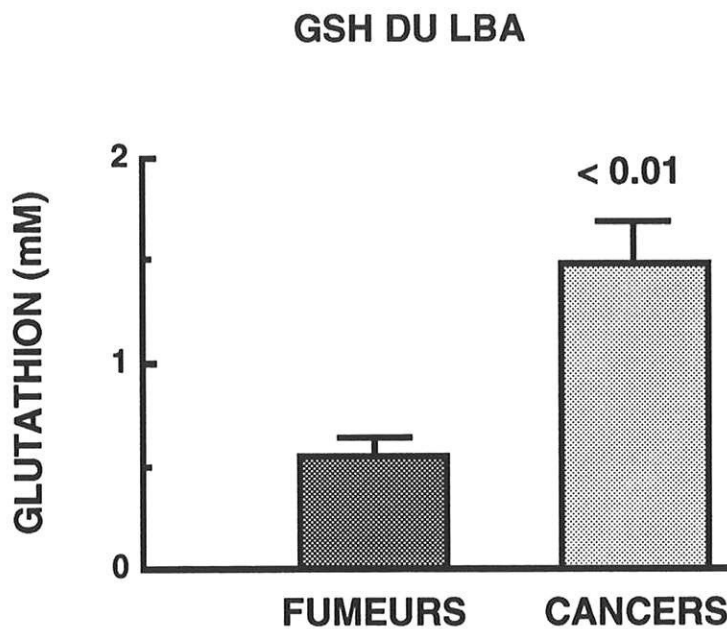


Figure 1: Concentration du glutathion réduit (GSH) dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de patients fumeurs et atteints de cancers bronchiques primitifs. Les résultats sont présentés comme des moyennes \pm SEM et exprimés en μ M.

3.2.5. Dosage de l'activité de la gamma-glutamyl transpeptidase dans le liquide de LBA

Ce dosage retrouve des valeurs très basses dans le liquide de LBA des deux catégories de patients, sans que l'on détecte de différence significative.

3.2.6. Dosage de l'activité de la SOD dans le liquide de LBA

Le dosage met en évidence des taux effondrés chez les patients atteints de cancer ($28,1 \pm 5$ unités SOD/ml), par comparaison aux sujets fumeurs ($124,3 \pm 48$ unités SOD/ml). La différence est significative, puisque $p = 0,0314$ (voir figure 2 ci-après).

3.2.7. Dosage de l'activité de la catalase dans le liquide de LBA

On n'observe qu'une faible variation de l'activité de la catalase entre les deux groupes de patients : $0,327 \pm 0,14$ unités/ml chez les patients atteints de cancer, et $0,329 \pm 0,12$ unités/ml chez les sujets fumeurs ($p = 0,446$) (voir figure 2 ci-après).

ACTIVITES ANTIOXYDANTES DANS LE LBA

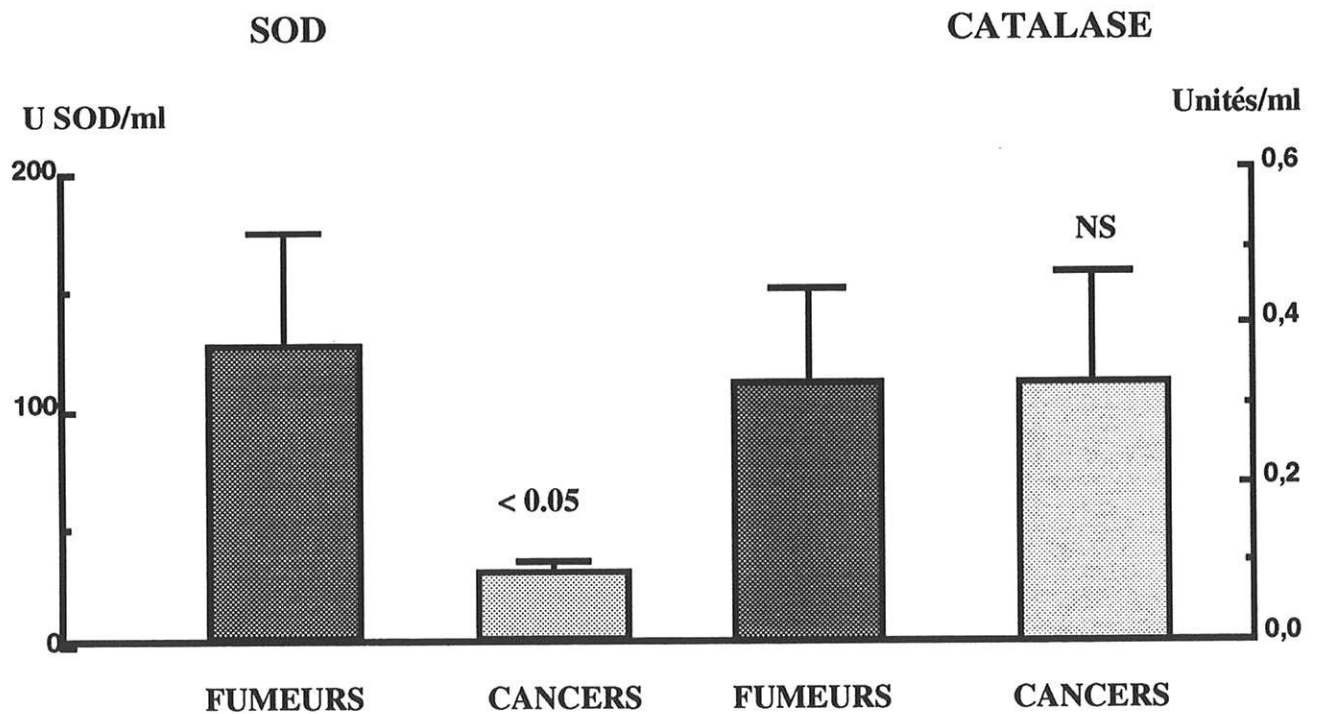


Figure2: Activités antioxydantes présentes dans le LBA des patients fumeurs versus les patients atteints de cancers bronchiques primitifs. L'activité superoxyde dismutase (SOD) est exprimée en Unités SOD/ml et l'activité Catalase en Unités/ml. Les données sont présentées en moyenne \pm SEM.

3.3. Résultats de l'étude des macrophages alvéolaires

3.3.1. Dosage des oxydants libérés par les MA

La production spontanée de O_2^- par les MA est plus élevée dans le groupe de patients atteints de cancer ($2,49 \pm 0,58$ nM cyt-c/ 10^6 cellules en une heure) que dans le groupe de sujets fumeurs ($1,59 \pm 0,38$ nM cyt-c/ 10^6 cellules en une heure), mais de façon non significative ($p = 0,1057$)(voir figure 3 ci-après).

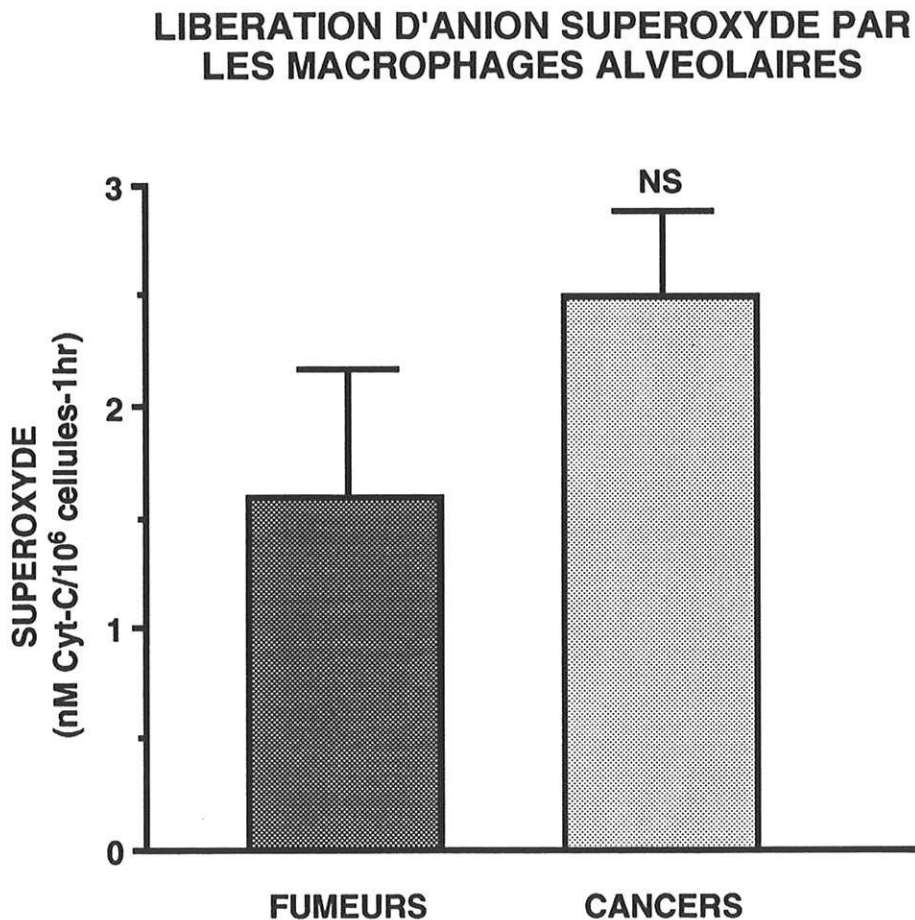


Figure 3: Libération spontanée d'anion superoxyde par les macrophages alvéolaires. La mesure est déterminée par la réduction du Cytochrome-C et exprimée en nM Cyt-C pour 10^6 cellules en une heure.

La production stimulée de O_2^- par les MA est supérieure dans le groupe de patients atteints de cancer. La différence par rapport aux sujets fumeurs n'est pas significative.

3.3.2. Dosage du GSH dans les MA

Le dosage du GSH dans les MA retrouve des valeurs plus élevées chez les patients atteints de cancer ($14,4 \pm 3,2$ nM/ 10^6 cellules) que chez les sujets fumeurs ($10,8 \pm 3,1$ nM/ 10^6 cellules). Mais la différence n'est pas significative ($p = 0,2227$)(voir figure n°4 page suivante).

3.3.3. Dosage de l'activité de la SOD dans les MA

Chez les patients atteints de cancer ($25,2 \pm 4,6$ unités SOD/ 10^6 cellules), on retrouve des valeurs plus basses que chez les sujets fumeurs ($48,8 \pm 3,1$ unités SOD/ 10^6 cellules), sans que la différence ait un caractère significatif ($p = 0,201$) (voir figure n°4 page suivante).

ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES

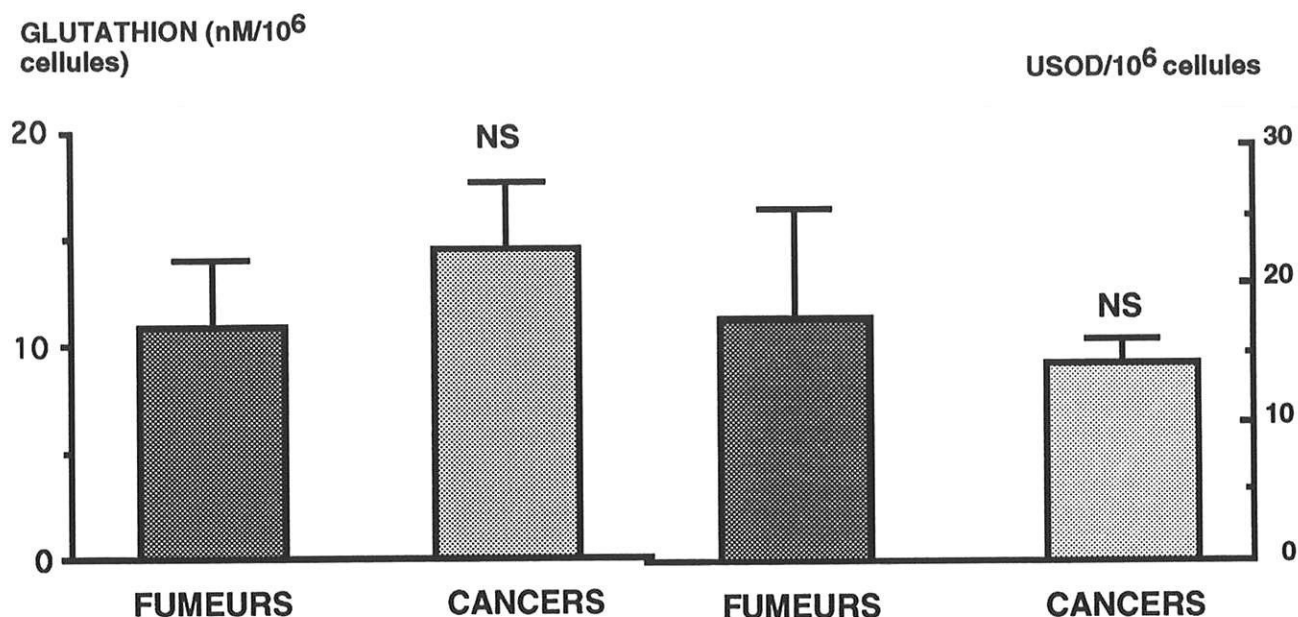


Figure 4: Activités antioxydantes des macrophages alvéolaires. Les activités GSH et SOD contenus dans les macrophages alvéolaires des sujets fumeurs sont comparées à celles des cellules des sujets atteints de cancers bronchiques. Les activités sont exprimées en nM de GSH pour 10⁶ cellules et en Unités SOD pour 10⁶ cellules.

IV - DISCUSSION

Le poumon, en raison de son organisation anatomique, est spécialement exposé à l'agression des oxydants contenus dans l'environnement. Par ailleurs, de nombreuses maladies pulmonaires inflammatoires comportent une alvéolite à MA, et l'activation de ces cellules se traduit par une libération accrue d'oxydants. On conçoit donc que le poumon ait établi un système de protection antioxydante, présent dans les cellules pulmonaires mais également dans le liquide de recouvrement épithélial, qui constitue sa première barrière de défense. Chez les sujets sains, on constate une certaine richesse du LRE en antioxydants avec de grandes quantités de glutathion et de catalase, et des concentrations moindres de céruléoplasmine, de lactoferrine, de vitamine C et E. L'intoxication tabagique représente

une agression oxydante importante, puisqu'on estime à 10^{14} le nombre de radicaux libres contenus dans chaque bouffée de fumée de cigarette. Chez le sujet normal fumeur, la réponse antioxydante de l'organisme se manifeste par une élévation de l'activité de la SOD et de la catalase dans les MA, et par une augmentation du taux de GSH dans le LRE.

Au cours de différentes maladies dont l'atteinte pulmonaire fait intervenir les oxydants (fibrose pulmonaire idiopathique, SDRA, mucoviscidose, infection par le VIH), on observe une diminution du taux de GSH dans le LRE, ce qui suggère l'intérêt d'un traitement renforçant les défenses antioxydantes. En cancérologie, la situation est bien plus complexe : de nombreux arguments permettent d'affirmer l'action nocive des oxydants lors des différentes étapes de la carcinogenèse, mais à l'opposé le rôle des antioxydants (et notamment du GSH) est très controversé.

Nous nous sommes efforcés d'évaluer le niveau des défenses antioxydantes du poumon profond au cours du cancer bronchique, en dosant l'activité de la SOD et de la catalase, ainsi que le taux de glutathion réduit dans le liquide de LBA. La comparaison des résultats entre un groupe de sujets fumeurs atteints de cancer bronchique et un groupe de sujets tabagiques montre plusieurs différences : chez les sujets présentant une néoplasie bronchique on observe une élévation significative du taux de GSH et une baisse tout aussi sensible de l'activité de la SOD dans le liquide de LBA, alors que l'activité de la catalase varie peu d'un groupe à l'autre. La production de l'anion superoxyde O_2^- par les MA est plus importante chez les sujets fumeurs, sans pour autant atteindre un seuil significatif. Le commentaire de ces résultats est délicat, car il soulève plusieurs problèmes.

L'élévation du taux de GSH dans le liquide de LBA correspond bien à une hyperproduction de GSH, et non pas à un défaut de son catabolisme : l'activité de la gamma GT dans le liquide de LBA est en effet pratiquement identique dans les deux groupes de patients. L'identification des cellules productrices de GSH est difficile car le GSH peut provenir de plusieurs types de cellules : les macrophages pulmonaires, les cellules tumorales, les pneumocytes II. Les MA représentent la source la plus évidente de GSH, car ils constituent l'essentiel de la population cellulaire dans l'alvéole. Il faut cependant remarquer qu'entre les deux groupes de patients, il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne le nombre absolu de MA recueilli par le LBA, et leur contenu en GSH. Cela nous amène à suspecter une autre origine de la présence du GSH. Les travaux de Cook et Coll. (51) sur le dosage du GSH dans les tumeurs pulmonaires humaines ont montré une élévation du taux de GSH dans les lésions épidermoïdes,

comparativement au tissu sain et aux tumeurs histologiquement différentes. Cette étude, du fait de la grande hétérogénéité des populations cellulaires présentes, n'a malheureusement pu préciser quel type de cellule était en cause pour expliquer la teneur en GSH. Les macrophages de l'interstitium pulmonaire peuvent infiltrer la zone tumorale et sécréter du GSH en réponse à une stimulation, mais nous avons peu de renseignements sur cette catégorie de macrophages inaccessibles à l'étude par la méthode du LBA. Enfin, le GSH pourrait résulter d'une sécrétion par les cellules cancéreuses. Cette hypothèse repose sur la capacité de certaines lignées cellulaires de cancer pulmonaire humain (en particulier la lignée A549) à synthétiser du GSH. Si une telle supposition se vérifiait, elle nous renverrait à l'ambiguïté du rôle du GSH au cours de la cancérogenèse.

La diminution de l'activité de la SOD dans le liquide de LBA de patients atteints de cancer est tout aussi difficile à interpréter : il faut d'abord préciser que la SOD est une enzyme de localisation principalement intracellulaire et que son étude dans du LBA non concentré rend plus délicate encore l'explication des résultats. De plus, nous n'avons que peu de précision sur l'activité de la SOD dans le LRE normal et dans le LRE de sujets fumeurs, car les travaux portent le plus souvent sur les taux intramacrophagiques de la SOD. Les résultats que nous observons dans les deux groupes de patients peuvent se formuler de plusieurs façons : dans le groupe de patients atteints de cancer, l'activité de la SOD correspond soit à des valeurs subnormales soit à des valeurs faibles (par défaut de synthèse de la SOD ou par excès de sa dégradation). Et dans la population de sujets fumeurs, l'activité de la SOD mesurée est susceptible de refléter des taux normaux, ou des taux élevés résultant d'une exacerbation des défenses antioxydantes. Nous n'avons pas d'argument formel pour retenir l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Le dosage de l'activité de la catalase dans le liquide de LBA est peu contributif. On retrouve des valeurs faibles pratiquement similaires chez les deux types de sujets. La catalase est, elle aussi, une enzyme localisée essentiellement dans le secteur intracellulaire, ce qui rend son étude aléatoire dans du LBA non concentré.

La synthèse de tous ces résultats ne permet d'élaborer que des hypothèses.

Chez les patients atteints de cancer bronchique, la concentration élevée de GSH dans le liquide de LBA peut provenir des MA, suggérant ainsi une stimulation des défenses antioxydantes pulmonaires. Mais paradoxalement, le taux d'activité de la SOD est bas, ou du moins très nettement inférieur à celui observé chez les sujets fumeurs. Et il est permis de supposer que les sujets fumeurs présentent, eux, une activation des systèmes de protection antioxydante locale : cette activation se traduirait donc par une forte activité de la SOD et par des taux de GSH qui se rapprochent des valeurs observées par Cantin (24).

On est ainsi tenté d'attribuer cette production de GSH à d'autres cellules que les MA, et notamment aux cellules cancéreuses. Différentes études ont démontré la capacité des cellules tumorales à synthétiser du GSH qui est destiné à les protéger, en favorisant leur développement et en participant au phénomène de chimiorésistance. La présence marquée du GSH dans le liquide de LBA n'exprimerait donc pas une stimulation des défenses antioxydantes pulmonaires, ce qui est davantage compatible avec les résultats du dosage d'activité de la SOD, qui suggèrent plutôt une déficience des défenses antioxydantes locales. Cette idée est confortée par le travail d'une équipe chinoise (56), qui a relevé une diminution de l'activité de la SOD et de la catalase dans le liquide de LBA chez des patients atteints de cancer bronchique.

C'est pourquoi nous en arrivons à formuler une hypothèse assez séduisante : les sujets fumeurs se protègent de l'agression oxydante de la fumée de cigarette par une exacerbation des défenses antioxydantes locales, et c'est la défaillance de ces systèmes de protection antioxydante qui favoriserait l'émergence de tumeur bronchique. D'autres investigations sont nécessaires pour valider ou invalider cette théorie.

On conçoit l'intérêt porté à de nouvelles stratégies thérapeutiques qui visent à renforcer le système antioxydant. Des études cliniques menées in vivo chez l'animal ont démontré une certaine efficacité antitumorale du GSH (49). Mais en raison de l'implication du GSH dans le processus de chimiorésistance, les tentatives expérimentales s'orientent vers une modulation de l'apport du GSH aux différentes cellules : elles essaient d'augmenter le taux de GSH et l'activité des GST dans les tissus hôtes pour les protéger, et à l'inverse de diminuer le taux de GSH et l'activité de ces enzymes dans les tissus cancéreux (57).



CONCLUSION

La recherche s'intéresse aujourd'hui de plus en plus aux oxydants. Ces composés surtout représentés par les MDO ont une distribution ubiquitaire dans l'environnement ; et l'organisme en produit de petites quantités de façon physiologique. L'excès de MDO est responsable d'une atteinte cellulaire par toxicité directe et indirecte. Plusieurs études physiopathologiques ont démontré la participation des MDO à la création de lésions pulmonaires au cours de différentes maladies.

Pour répondre à l'agression oxydante, le poumon dispose d'un système de défense antioxydante qui englobe des substances très variées. La SOD, la catalase et le glutathion assure l'essentiel de cette protection. Lors d'une exposition exagérée à des MDO, le poumon stimule ses défenses antioxydantes afin de rétablir un équilibre oxydant-antioxydant. L'intoxication tabagique est une bonne illustration de ce phénomène : la charge en oxydants est compensée par une augmentation de l'activité intramacrophagique de la SOD et de la catalase, et par une élévation du taux de GSH dans le LRE. Le tabac est le facteur carcinogène le plus fréquemment impliqué dans la survenue du cancer bronchique. Il nous a paru intéressant d'étudier le niveau des défenses antioxydantes du poumon profond chez des patients présentant une néoplasie broncho-pulmonaire, car la littérature fournit peu de données sur cette question.

Notre étude expérimentale a consisté à doser l'activité de la SOD et de la catalase, ainsi que le taux de glutathion réduit dans le liquide de LBA, chez des patients fumeurs atteints de cancer bronchique. Nous avons comparé ces valeurs à celles observées dans une population de sujets fumeurs. Nous obtenons des résultats discordants : une élévation significative du taux de GSH et un abaissement notable de l'activité de la SOD chez les patients qui présentent une néoplasie bronchique ; on ne constate que de faibles variations de l'activité de la catalase dans les deux groupes de patients. L'interprétation de ces résultats est délicate. Plusieurs arguments sont en faveur d'une production du GSH par les cellules cancéreuses pulmonaires, ce qui retire au GSH son rôle protecteur antioxydant. La diminution de l'activité de la SOD laisse plutôt apparaître une défaillance des systèmes antioxydants.

Ces observations permettent d'avancer une hypothèse selon nous intéressante : l'intoxication tabagique stimule les défenses antioxydantes pulmonaires et l'apparition du cancer bronchique s'accompagne d'une défaillance de ces mêmes systèmes. Les recherches thérapeutiques s'orientent vers l'optimisation des défenses antioxydantes pulmonaires. Malgré son rôle ambigu en cancérologie, l'apport sélectif de GSH aux cellules saine du tissu hôte devrait améliorer cette protection.

BIBLIOGRAPHIE

1. Urban T., Housset B.,
Système Oxydant-antioxydant.
Editions techniques - Encycl Méd Chir (Paris-France) Pneumologie 6 000 B²⁰
1992; 9p
2. White C., Repine J.E.
Pulmonary antioxidant defense mechanisms
Minireview Experimental Lung Research 1985; 8 : 81-96
3. Cochrane C. G.,
Cellular injury by oxidants
The American Journal of Medicine 1991 september 30; vol 91 (suppl 3 C) : 23S-30S
4. Housset B., Junod A.
Toxicité pulmonaire des radicaux libres de l'oxygène
Revue française des maladies respiratoires 1983; 11 : 3-17
5. Mangione S., Kueppers F., Puglia C., Greenspon L.W.
Erythrocytes prevent inactivation of alpha 1-antitrypsin by cigarette smoke
Eur Respir J 1991, 4 : 26-30
6. Cantin A., Crystal R.G.
Oxidants, antioxidants and the pathogenesis of emphysema
Eur J Respir Dis 1985 suppl 139; 66 : 7-17
7. Hoidal J.R., Fox R.B., Lemarbe PA, Perri R, Repine J.E.
Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers
Am Rev Respir Dis 1981; 123 : 85-89
8. Wallaert B., Gressier B., Marquette Ch.
Inactivation of alpha 1 protéinase inhibitor by alveolar inflammatory cells from smoking patients with or without emphysema
Am Rev Respir Dis 1993; vol 147 : 1537-1543

9. Calhoun W.J., Salisbury S.M., Bush R.K., Busse W.W.
Increased superoxide release from alveolar macrophages in symptomatic asthma
Am Rev Respir Dis 1987; A 224
10. Kanazawa H., Kurihara N, Hirata K., Takeda T.
The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients
Chest 1991,100 : 1319-22
11. Chanez P., Dent G., Yukawa T., Barnes P.J., Chung K.F.
Generation of oxygen free radicals from blood eosinophils from asthma patients
after stimulation with PAF or phorbol ester.
Eur. Respir. J 1990,3 : 1002-7
12. Cantin A., North S.L., Fells G.A., Hubbard R.C., Crystal R.G.
Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis
The journal of clinical investigation, inc;vol 79,june 1987 : 1665-73
13. Weiland J.E., Davis W.B., Holter J.F., Mohammed J.R., Dorinsky P.M., Gadek J.E.
Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome
Am Rev Respir Dis 1986;133 : 218-25
14. Cantin A., Dubois F., Begin R.
Lung exposure to mineral dusts enhances the capacity of lung inflammatory cells to
release superoxide
Journal of leukocyte biology 1988;43 : 299-303
15. Wallaert B., Lasalle P., Fortin F., Aerts C., Bart F., Fournier E., Voisin C.
Superoxide anion generation by alveolar inflammatory cells in simple
pneumoconiosis and in progressive massive fibrosis of non smoking coal workers
Am rev respir Dis 1990;141,129-33
16. Grisham M.B., Granger N.
Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and
ischemia with reperfusion
Clinics in chest medicine march 1989 (vol 10,n°1) : 71-81

17. Halliwell B., Cross C.E.
Reactive oxygen species, antioxidants, and acquired immunodeficiency syndrome
Arch intern med vol January 1991;151 : 29-31
18. Heffner J.E., Repine J.E.
Pulmonary strategies of antioxidant defense
Am Rev Respir Dis. 1989;140 : 531-54
19. Cantin A.M., Begin R.
Glutathione and inflammatory disorders of the lung
Lung 1991;169:123-38
20. Brodie A.E., Reed D.J.
Buthionine sulfoximine inhibition of cystine uptake and glutathione biosynthesis in human lung carcinoma cells
Toxicology and applied pharmacology 1985;77 : 381-387
21. Ketterer B.
Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis
Mutation Research 1988;202:343-361 Elsevier
22. Dröge W., Eck H.P., Gmünder H., Mihn S.
Modulation of lymphocyte functions and immune responses by cysteine and cysteine derivatives
The american Journal of Medicine 1991 september 30,;vol 91 (suppl 3 C) : 140S-4S
23. Morgenroth K.
Le système surfactant du poumon
Walter de gruyter, Berlin-New York 1988
24. Cantin A.M., North S.L., Hubbard R.C., Crystal R.G.
Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione
J Appl Physiol 1987;63 (1) :152-7

25. Smith L.J., Anderson J., Shamsuddin M., Hsueh W.
Effect of fasting on hyperoxic lung injury in mice, the role of glutathione
Am Rev Respir Dis 1990;141:141-9
26. Smith L.J., Houston M., Anderson J.
Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with
asthma
Am Rev Respir Dis 1993;vol 147 : 1461-64
27. Toth K.M., Berger E.M., Beehler C.J., Repine J.E.
Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase, and
protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from
non smokers
Am Rev Respir Dis 1986;134:281-4
28. Mccusker K., Hoidal J.
Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from
cigarette smokers and smoke-exposed hamsters
Am Rev Respir Dis 1990;141:678-82
29. Cantin A.M., Hubbard R.C., Crystal R.G.
Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in
idiopathic pulmonary fibrosis
Am Rev Respir Dis 1989;139:370-72
30. Pacht E.R., Timerman A.P., Lykens M.G., Merola A.J.
Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult
respiratory distress syndrome
Chest 1991;100:1397-403
31. Crystal R.G.
Oxidants and respiratory tract epithelial injury : pathogenesis and strategies for
therapeutic intervention
The american journal of medicine 1991 september 30 ; vol 91 (suppl 3 C) : 39S-44S

32. Roum J.M., Buhl R., Mc Elvaney N.G., Borok Z., Hubbard R.C., Chernick M., Cantin A.M., Crystal R.G.
Cystic fibrosis is characterized by a marked reduction in glutathione levels in pulmonary epithelial lining fluid
Am Rev Respir Dis 1990;141 : A87
33. Buhl R., Holroyd K.J., Mastrangeli A., Cantin A.M., Jaffe H.A., Wells F.B., Saltini C., Crystal R.G.
Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV-seropositive individuals
The Lancet 1989 ; december 2 : 1294-7
34. Bernard G.R., Swindell B.B., Meredith M.J., Carroll F.E., Higgins S.B.
GSH repletion by N-acetyl cysteine in patients with the adult respiratory distress syndrome
Am rev Respir Dis 1989;139 : A221
35. Bridgeman M.M.E., Marsden M., Macnee W., Flenley D.C., Ryle A.P.
Cysteine and glutathione concentrations in plasma and broncho-alveolar lavage fluid after treatment with N-acetyl cysteine
Thorax 1991 ; 46 : 39-42
36. Kouzan S., Bignon J.
Introduction à la cancérogenèse respiratoire
Encycl. Med. Chir. (Paris, France), Poumon 6002 G¹⁰, 2-1987 : 9p
37. Guyton K.Z., Kensler T.W.
Oxidative mechanisms in carcinogenesis
British Medical Bulletin (1993) vol 49 ; n°3 : pp 523-44
38. Sibille Y., Reynolds H.Y.
Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury
Am Rev Respir Dis 1990;141 : 471-501
39. Lemarie E., Renoux M.
Données immunologiques fournies par le lavage alvéolaire en pathologie tumorale bronchopulmonaire
Rev Mal Resp 1987;4 : 11-6

40. Semenzato G., Spatafora M., Feruglio C., Pace E., Dipietro V.
Bronchoalveolar lavage and the immunology of lung cancer
Lung 1990;suppl : 1041-9
41. Ching-Chi Lin, Wen-Chu Huang, Ching-Yuang Lin
Chemiluminescence and antibody-dependent, cell mediated cytotoxicity between
human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in smokers, non
smokers, and lung cancer patients
Chest 1989;95 : 553-7
42. Le Fever A., Funahashi A.
Elevated prostaglandin E₂ levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with
bronchogenic carcinoma
Chest 1990;98 : 1397-402
43. Le Fever A., Funahashi A.
Lymphokine - activated killer cell activity in lung cancer
Chest 1991;99 : 292-7
44. Jackson J.H., Schraufstatter I.U., Hyslop P.A., Vosbeck K., Sauerhebert R., Weitzman
S.A., Cochrane C.G.
Role of oxidants in DNA damage
J Clin Invest october 1987;volume 80 : 1090-5
45. Weitberg A.B., Weitzman S.A., Clark E.P., Stossel T.P
Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation
J Clin Invest juin 1985;vol 75 : 1835-41
46. Chaudiere J.
Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in living cells
In Free radical damage and its control, (1994) C.A. Rice-Evans and R.H. Burdon
Eds;Elsevier Science B.V : pp23-64
47. Witz G.
Active oxygen species as factors in multistage carcinogenesis
P.S.E.B.M. 1991;vol 198 : 675-82

48. De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F., Cesarone C.F.
Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer
The American journal of medicine 1991, september 30;vol 91 (suppl 3C) : 122S-30S
49. Trickler D., Shklar G., Schwartz J.
Inhibition of oral carcinogenesis by glutathione
Nutr cancer 1993;20 : 139-44
50. Kang Y.J., Enger M.D.
Glutathione content and growth in A 549 human lung carcinoma cells
Experimental cell research 1990;187 : 177-9
51. Cook J.A., Pass H.I., Iype S.N., Friedman N., Degraff W., Russo A.
Cellular glutathione and thiol measurements from surgically resected human lung tumor and normal lung tissue
Cancer research 1991 august 15;51 : 4287-94
52. Nathan C.F., Arrick B.A., Murray H.W., Desantis N.M., Cohn Z.A.
Tumor cell anti-oxidant defenses - Inhibition of the glutathione redox cycle enhances macrophage-mediated cytotoxicity
J Exp Med 1980 april;vol 153 : 766-82
53. Benard J.
Glutathion transférases et chimiorésistance
Oncologica 1993;n°5 : 23-8
54. Rennard S.I., Basset G., Lecossier D., O'Donnell K.M., Pinkston P., Martin P.G., Crystal R.G.
Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution
J Appl Physiol 1986;60(2) : 532-8
55. Aebi H.,
Catalase in vitro
Methods in enzymology vol 105 : 121-6

56. Tang Z.P.,

Observation on the activity of superoxide dismutase and catalase of alveolar
macrophage in patients with lung cancer

Publication year 1991;abstract

57. Dieras V.

Bases moléculaires de la résistance aux drogues antitumorales

Cahiers d'oncologie 1993;2 : 207-15

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE I - SYSTEME OXYDANT-ANTIOXYDANT ET POUMON

I. RAPPELS BIOCHIMIQUES	16
II. OXYDANTS	17
2.1. Nature des oxydants	17
2.1.1. Métabolites dérivés de l'oxygène	
2.1.2. Radicaux libres et oxydants non dérivés de l'oxygène	
2.2. Production des radicaux libres	19
2.2.1. Production intracellulaire des M.D.O.	
2.2.2. Production extracellulaire des M.D.O.	
III. EFFETS CELLULAIRES DES OXYDANTS	21
3.1. Rôle physiologique	21
3.2. Toxicité directe	21
3.2.1. Lipides polyinsaturés	
3.2.2. Protéines	
3.2.3. Acides nucléiques	
3.3. Toxicité indirecte	22
3.3.1. Interactions avec le système protéases-antiprotéases	
3.3.2. Interactions avec le système des prostaglandines	
3.3.3. Interactions avec d'autres médiateurs de l'inflammation	
IV. INTERVENTION DES OXYDANTS EN PATHOLOGIE PULMONAIRE	24
4.1. Toxicité de l'oxygène normobare	24
4.2. Inhalation de gaz oxydants	25
4.2.1. Ozone	
4.2.2. Dioxyde d'azote	
4.3. Tabac-Emphysème	26
4.4. Asthme	27
4.5. Fibrose pulmonaire idiopathique	28
4.6. Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte	29

4.7. Pathologie professionnelle : asbeste, silice	31
4.7.1. Asbeste	
4.7.2. Silicose	
4.8. Xénobiotiques	33
4.8.1. Paraquat	
4.8.2. Médicaments	
4.9. Radiations ionisantes	34
4.10. Ischémie-reperfusion	34
4.11. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (V.I.H.)	35
V. MECANISMES PULMONAIRES DE DEFENSE ANTI-OXYDANTE	36
5.1. Prévention et compartimentalisation de la formation des radicaux libres	36
5.1.1. Prévention de la formation de radicaux libres	
5.1.2. Compartimentalisation des métaux transitionnels	
5.2. Antioxydants endogènes	39
5.2.1. Antioxydants endogènes enzymatiques	39
5.2.2. Antioxydants endogènes non enzymatiques	45
5.3. Antioxydants exogènes	48
5.3.1. Vitamines	
* Vitamine E : alpha-Tocophérol	
* Béta carotène	
* Vitamine C : acide ascorbique	
5.3.2. Minéraux	
5.3.3. Lipides	
5.3.4. Protéines	
5.4. Compartimentalisation des antioxydants	50
CHAPITRE II - GLUTATHION : PROPRIETES ET ROLES EN PATHOLOGIE PULMONAIRE	
I. INTRODUCTION	53
II. ASPECTS BIOCHIMIQUES	53
2.1. Structure biochimique du glutathion	53
2.2. Synthèse du glutathion	54
2.3. Transport extracellulaire	56

2.4. Catabolisme du glutathion	56
III. FONCTIONS DU GLUTATHION	57
3.1. Rôle antioxydant	57
3.2. Conjugaison du glutathion	58
3.2.1. Conjugaison du GSH avec des molécules endogènes	
3.2.2. Conjugaison du GSH avec des molécules exogènes	
3.3. Système de transport ATP dépendant	59
3.4. Transport des acides aminés	59
3.5. Modulation de la réponse immunitaire	60
3.6. Maintien de l'intégrité des corps lamellaires des pneumocytes II	61
3.7. Autres fonctions du GSH	61
IV. GLUTATHION ET POU MON NORMAL	61
4.1. Système surfactant du poumon	61
4.1.1. Synthèse du surfactant	
4.1.2. Composition du surfactant	
4.1.3. Rôle du surfactant	
4.2. Etude du glutathion dans le liquide de recouvrement épithélial	64
V. PATHOLOGIES PULMONAIRES ASSOCIEES A UNE ELEVATION DU GLUTATHION DANS LE LIQUIDE DE RECOUVREMENT EPITHELIAL	65
5.1. Exposition à l'hyperoxie	65
5.2. Asthme	66
5.3. Intoxication tabagique	66
VI. PATHOLOGIES PULMONAIRES ASSOCIEES A UNE DIMINUTION DU GLUTATHION DANS LE LIQUIDE DE RECOUVREMENT EPITHELIAL	
6.1. Fibrose pulmonaire idiopathique	68
6.2. Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte	69
6.3. Mucoviscidose	69
6.4. Infection par le VIH	70
VII. IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES	71
7.1. Apport de GSH	72
7.2. Apport de précurseurs du GSH	72

CHAPITRE III

I. NOTIONS GENERALES SUR LA CANCEROGENESE	75
1.1. Etapes de la carcinogènèse	75
1.1.1. Rôle des carcinogènes	
1.1.2. Individualisation de plusieurs étapes dans la carcinogènèse	
1.2. Histogènèse des tumeurs malignes pulmonaires	78
II. IMMUNOLOGIE DU CANCER BRONCHIQUE	78
2.1. Rôle des macrophages alvéolaires	79
2.1.1. Notions générales	
2.1.2. Macrophages alvéolaires et cancer bronchique	
2.2. Rôle des lymphocytes	81
III. OXYDANTS ET CANCER	82
3.1. Participation des oxydants à la création de lésion de l'ADN	82
3.1.1. Rôle de H ₂ O ₂	
3.1.2. Rôle de OH°	
3.2. Conséquence des lésions de l'ADN par les oxydants : carcinogènèse	84
3.3. Activité antitumorale des oxydants	86
IV. ANTIOXYDANTS ET CANCER	86
4.1. Rôle anticancéreux des antioxydants	86
4.1.1. Résultats en carcinogènèse expérimentale	
4.1.2. Résultats expérimentaux in vivo	
4.2. Rôle du glutathion dans le développement du cancer	88
4.2.1. Glutathion et croissance cellulaire tumorale	
4.2.2. Glutathion et défense antioxydante des cellules cancéreuses	
4.2.3. Glutathion, glutathion transférases et chimiorésistance	

CHAPITRE IV : ETUDE EXPERIMENTALE

I. INTRODUCTION : BUT DE L'ETUDE	93
II. METHODES	93
2.1. Populations étudiées	93

2.2. Technique du lavage broncho-alvéolaire	94
2.3. Colorations cellulaires	94
2.4. Dosage de l'urée dans le liquide de LBA et dans le plasma	95
2.5. Dosage de l'anion superoxyde	96
2.6. Dosage de l'activité SOD	96
2.7. Dosage de l'activité de la catalase	97
2.8. Dosage du glutathion réduit GSH	97
2.9. Dosage de l'activité de la gamma-glutamyl transpeptidase	98
2.10. Méthode statistique	99
III. RESULTATS	99
3.1. Caractéristiques des populations étudiées	99
3.1.1. Premier groupe : sujets fumeurs	
3.1.2. Second groupe : patients atteint d'un cancer bronchique	
3.2. Résultats de l'étude du LBA	101
3.2.1. Pourcentage de liquide de LBA recueilli	
3.2.2. Analyse cytologique du liquide de LBA	
3.2.3. Dosage de l'urée dans le liquide de LBA	
3.2.4. Dosage de GSH dans le liquide de LBA	
3.2.5. Dosage de l'activité de la gamma-glutamyl transpeptidase dans le liquide de LBA	
3.2.6. Dosage de l'activité de la SOD dans le liquide de LBA	
3.2.7. Dosage de l'activité de la catalase dans le liquide de LBA	
3.3. Résultats de l'étude des macrophages alvéolaires	105
3.3.1. Dosage des oxydants libérés par les MA	
3.3.2. Dosage du GSH dans les MA	
3.3.3. Dosage de l'activité de la SOD dans les MA	
IV. DISCUSSION	107
CONCLUSION	112
BIBLIOGRAPHIE	114



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères et s'ils devaient entreprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné à jamais de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole, et que je me parjure, puissè-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 7

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

Le poumon est un organe particulièrement exposé aux oxydants, qu'ils soient d'origine extrinsèque dans l'environnement ou d'origine intrinsèque lorsqu'ils résultent d'un processus inflammatoire local.

Le tabagisme induit une production exagérée de radicaux libres au niveau du poumon profond. L'augmentation locale d'agents antioxydants comme le glutathion neutralise l'effet des oxydants.

L'objet de notre travail était d'étudier la présence de trois agents antioxydants dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire chez des patients fumeurs atteints de cancer bronchique, comparativement à des sujets fumeurs : la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion. On observe, chez les sujets atteints de cancer, un effondrement de l'activité de la superoxyde dismutase, une élévation significative du taux de glutathion et une faible variation de la catalase.

Ces données suggèrent que les défenses antioxydantes sont modifiées chez de tels patients. L'hyperproduction de glutathion pourrait provenir des cellules pulmonaires normales ou des cellules tumorales. Ces perturbations des systèmes antioxydants sont-elles une adaptation de l'organisme ou une conséquence du processus tumoral ? L'hyperproduction de glutathion intervient-elle dans les mécanismes de la chimiorésistance observée chez l'homme ?

D'autres investigations sont nécessaires pour approfondir le sujet.

MOTS-CLEFS : - Cancer bronchique
 - Tabagisme
 - Oxydants
 - Glutathion
 - Lavage bronchoalvéolaire