

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1996



106 024923 2

THESE N° 54/1

**INDUCTION DU CYTOCHROME P450 1A1
DANS LES POUMONS DE RATS EXPOSES AU RADON**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 1996

par

Marc CLAVEL

né le 10 octobre 1965 à Arles (Bouches du Rhône)



EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur BONNAUD	Président
Monsieur le Professeur GASTINNE	Juge
Monsieur le Professeur HABRIOUX	Juge
Monsieur le Professeur MELLONI	Juge
Monsieur le Docteur VERGNENEGRE	Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1996

THESE N° 54

**INDUCTION DU CYTOCHROME P450 1A1
DANS LES POUMONS DE RATS EXPOSES AU RADON**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 1996

par

Marc CLAVEL

né le 10 octobre 1965 à Arles (Bouches du Rhône)



EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur BONNAUD

Président

Monsieur le Professeur GASTINNE

Juge

Monsieur le Professeur HABRIOUX

Juge

Monsieur le Professeur MELLONI

Juge

Monsieur le Docteur VERGNENEGRE

Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur PIVA Claude

ASSESEURS: Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude
Monsieur le Professeur DENIS François

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

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

LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LAUBIE Bernard (C.S)	ENDOCRINOLOGIE ET MALADIES METABOLIQUES
LEGER Jean-Marie (C.S)	PSYCHIATRIE D'ADULTES
LEROUX-ROBERT Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
LIOZON Frédéric	CLINIQUE MEDICALE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MENIER Robert (C.S)	PHYSIOLOGIE
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique	CHIRURGIE INFANTILE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
OUTREQUIN Gérard	ANATOMIE
PECOUT Claude (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
PERDRISOT Rémy	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
PILLEGAND Bernard (C.S)	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
PIVA Claude (C.S)	MEDECINE LEGALE
PRALORAN Vincent (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
RAVON Robert (C.S)	NEUROCHIRURGIE
RIGAUD Michel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
ROUSSEAU Jacques (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
SAUTEREAU Denis	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
TABASTE Jean-Louis (C.S)	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
TREVES Richard (C.S)	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole	CANCEROLOGIE
VALLAT Jean-Michel	NEUROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VANDROUX Jean-Claude (C.S)	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
VIDAL Elisabeth (C.S)	MEDECINE INTERNE
WEINBRECK Pierre (C.S)	MALADIES INFECTIEUSES

PROFESSEUR ASSOCIE A MI-TEMPS

MOULIN Jean-Louis

3ème CYCLE DE MEDECINE GENERALE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

* C.S = Chef de Service

*“Un être qui s’habitue à tout, voilà, je
pense, la meilleure définition que l’on
puisse donner de l’homme”*

Dostoïevski

Souvenirs de la maison des morts.

Pour mes parents,

En souvenir "des côtes en long".

A Vivi,

Ma meilleure moitié.

A Sarah et à l'enfant qui arrive.

A notre Maître et Président de thèse,

Monsieur le Professeur BONNAUD,

Professeur des Universités de Pneumologie

Médecin des Hôpitaux

Chef de Service

Doyen honoraire

*Vous nous avez aidé et guidé dans nos choix tout au long de
notre internat.*

*Votre capacité de travail et votre esprit de synthèse sont pour
nous des exemples.*

Respectueusement vôtre.

A nos juges,

Monsieur le Professeur GASTINNE,

Professeur des Universités de Réanimation Médicale

Médecin des Hôpitaux

Chef de Service

Les semestres passés dans votre service m'ont énormément apportés. Vous avez accepté de juger notre travail, soyez en remercié et veuillez recevoir l'expression de notre profond respect.

Monsieur le Professeur HABRIOUX,

Professeur des Universités de Biochimie

Chef de Service

Vous nous avez accueilli dans votre laboratoire avec gentillesse et compréhension. Ce travail est l'occasion de vous exprimer ma gratitude.

Monsieur le Professeur MELLONI,

Professeur des Universités de Pneumologie

Dès notre arrivée à Limoges, tu m'as aidé aussi bien au plan professionnel que privé. Que cette thèse soit l'expression de notre reconnaissance et de notre amitié.

Monsieur le Docteur VERGNENEGRE,

Pneumologue

Praticien Hospitalier

Maître de Conférence Universitaire

Parce que votre franc parler rime avec franchise nous avons toujours apprécié de travailler à vos côtés. Nous sommes nombreux à apprécier votre souci de formation et du devenir de vos internes. Soyez assuré de ma fidèle reconnaissance.

Ce travail est l'occasion de remercier les personnes qui ont marqué notre internat.

A Monsieur le Docteur CONDOURET,

Pneumologue

Praticien Hospitalier

Chef de Service

Vous êtes le premier à m'avoir donné envie d'apprendre la Pneumologie et la Réanimation. Vous m'avez conseillé et encouragé. Je suis votre obligé à plus d'un titre.

Amicalement vôtre.

A Monsieur le Docteur GOBEAUX,

A Monsieur le Docteur VOULTOURY,

Réanimateurs

Praticiens Hospitaliers

Je suis bien incapable d'exprimer ce que je vous dois en quelques lignes. Vous êtes et vous resterez mes références.

A Monsieur le Docteur TOURAINÉ,

Pneumologue

Praticien Hospitalier

*Tu es un modèle de patience et de compétence. Ton amitié
m'est très chère.*

A Monsieur le Docteur FRANCOIS,

Réanimateur

A mon chef de clinique préféré, pour ta passion de la clinique.

A tous les membres des services de Pneumologie et de
Réanimation, pour leur compétence et leur aide quotidienne.

PLAN

INTRODUCTION

Chapitre I

RAPPELS DE PHYSIQUE ATOMIQUE ET NUCLEAIRE

1. STRUCTURE DE L'ATOME ET DU NOYAU

2. STABILITE NUCLEAIRE

3. LES TRANSFORMATIONS RADIOACTIVES

3.1. Les transformations isobariques

3.1.1. L'émission β^-

3.1.2. L'émission β^+ et la capture électronique

3.2. Les transformations par partition

3.2.1. L'émission α

3.2.2. La fission spontanée

3.3. Les transformations isomériques

3.3.1. L'émission γ

3.3.2. La conversion interne

4. RADIOACTIVITES NATURELLE ET ARTIFICIELLE

4.1. La radioactivité naturelle

4.2. La radioactivité artificielle

5. UNITES DE MESURE ET D'EXPOSITION

5.1. Unités d'activité

5.2. Unités d'exposition

6. EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS

6.1. Les phénomènes moléculaires

6.1.1. Les mécanismes d'altération de type direct

6.1.2. Les mécanismes d'altération de type indirect

6.1.3. L'effet oxygène

6.1.4. Action des radiations ionisantes sur les acides nucléiques

6.1.5. Mécanismes de réparation des acides nucléiques

6.2. Les phénomènes cellulaires

6.2.1. Effets des radiations ionisantes sur les cellules qui se divisent

6.2.2. Effets des radiations ionisantes sur les cellules différenciées

6.3. Influence de la nature du rayonnement

6.4. Effets tissulaires

Chapitre II

LE RADON

1. DONNEES PHYSIQUES

1.1. Origine physique du radon

1.2. Devenir du radon inhalé

2. GEOLOGIE DU RADON

3. RADON ET RADIOACTIVITE NATURELLE

4. RADON ET CANCER

4.1. Etudes épidémiologiques sur les populations de mineurs

4.2. Anatomie pathologique

4.3. Biologie moléculaire

4.4. Modèles expérimentaux

5. RADON ET EXPOSITION DOMESTIQUE

Chapitre III

LES CYTOCHROMES P450

1. CARACTERISTIQUES DES CYTOCHROMES P450

2. INDUCTION DU CYTOCHROME P450 1A1

Chapitre IV

ETUDE EXPERIMENTALE

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Les animaux

1.2. Préparation des microsomes pulmonaires

1.2.1. Principe

1.2.2. Méthode

1.3. Dosage des protéines

1.3.1. La méthode de Bradford

1.3.2. La méthode de Lowry

1.4. Vérification de la contamination croisée

1.4.1. Mesure de l'activité NADPH cytochrome P450 réductase

1.4.2. Mesure de l'activité NADH oxydase

1.5. Mesure des activités éthoxyrésorufine-*O*-déalkylase dépendantes de la sous famille 1A1 du cytochrome P450

1.5.1. Principe

1.5.2. Matériel

1.5.3. Méthode

1.6. Analyse statistique

2. RESULTATS

2.1. Préparation des microsomes

2.2. Dosage des protéines

2.2.1. Concentrations en protéines des microsomes et des fractions intermédiaires

2.2.2. Analyse statistique

2.2.3. Concentrations en protéines dans les microsomes de foie et de poumon

2.3. Vérification de la contamination croisée

2.3.1. Activité NADPH cytochrome P450 réductase

2.3.2. Activité NAD oxydase

2.3.3. Comparaison des activités réductase et oxydase

2.4 . Activité éthoxyrésorufine-*O*-déalkylase dépendante de la sous
famille 1A1 du cytochrome P450

2.4.1. Réalisation de la courbe d'étalonnage

*2.4.2. Mesure des activités éthoxyrésorufine-*O*-déalkylase dans les
différents groupes*

3. DISCUSSION

3.1. Dosage des protéines

3.2. Contamination des microsomes

3.3. Les activités éthoxyrésorufine-*O*-déalkylase

4. CONCLUSIONS-PERSPECTIVES DE L'ETUDE

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABREVIATIONS

ADN	:	acide désoxyribonucléique
AE	:	activité enzymatique
BHT	:	butylhydroxytoluène
β -NF	:	benzo naphthoflavone
CBP	:	cancer broncho-pulmonaire primitif
DMSO	:	diméthylsulfoxyde
EBR	:	efficacité biologique relative
EDTA	:	acide tétraacétique éthylène diamine
ER	:	éthoxyrésorufine
EROD	:	éthoxyrésorufine-O-déalcoylase
G6P	:	glucose 6 phosphate
G6PD	:	glucose 6 phosphate déshydrogénase
HAP	:	hydrocarbures aromatiques polycycliques
MCS	:	microsome
NAD	:	nicotinamide adénosine dinucléotide
NADH	:	nicotinamide adénosine dinucléotide, forme réduite
NADPH	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
OER	:	rapport d'amplification de l'oxygène
PE	:	prise d'essai
R	:	résorufine
SAB	:	albumine sérique bovine
TEL	:	transfert d'énergie linéaire
WL	:	working level
WLM	:	working level month

INTRODUCTION

Le cancer broncho-pulmonaire primitif (CBP) constitue un des problèmes majeurs de santé publique. Dans les pays industrialisés, le CBP est la deuxième cause de mortalité après les maladies cardio-vasculaires. Il représente la première cause de mortalité par cancer chez l'homme, et la deuxième cause de mortalité par cancer chez la femme après le cancer du sein.

La grande majorité des CBP est directement liée au tabagisme.

D'autres carcinogènes inhalés ont été cependant identifiés ; les plus courants sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques, le chrome, le cobalt, le fer, l'amiante, l'arsenic, le nickel et les radiations ionisantes. Au sein de cette dernière catégorie, le radon et ses produits de filiation radioactifs (polonium, plomb, bismuth) connaissent un regain d'intérêt scientifique en raison d'une exposition naturelle ou domestique et de l'émergence d'un grand nombre de CBP chez les mineurs d'uranium suivis étroitement sur le plan épidémiologique depuis cinquante ans (Ménard *et coll.*, 1994).

Perraud *et coll.* (1971) décrivent un protocole d'exposition au radon parfaitement établi et obtiennent de façon constante et répétée des tumeurs pulmonaires malignes chez le rat.

Les cytochromes P450, et plus particulièrement la sous-famille 1A1 qui catalyse les réactions de déalkoylation des résorufines, seraient impliqués dans la carcinogenèse bronchique.

La benzo naphthoflavone (β -NF) induit l'expression du cytochrome P450 1A1 dans le poumon. Lorsqu'elle est injectée de façon répétée à des rats préalablement exposés au radon, des tumeurs bronchiques malignes apparaissent dans 100% des cas en un à trois mois après la fin du traitement (Douriez *et coll.*, 1994).

L'augmentation d'activité éthoxyrésorufine-*O*-déalkylase (EROD) est caractéristique de l'augmentation d'activité des cytochromes P450 1A1.

Après avoir rappelé les phénomènes nucléaires qui régissent les transformations radioactives, nous décriront les effets biologiques des rayonnements ionisants. Le rôle carcinogène du radon et de ses produits de filiation à vie courte est lié à l'émission de particules α , pouvant atteindre le noyau des cellules de l'épithélium bronchique. Nous évoquerons les phénomènes qui, à partir d'anomalies chromosomiques répétées, peuvent conduire à l'émergence de cellules cancéreuses.

L'élimination des composés exogènes nécessite l'action enzymatique des cytochromes P450 ; nous verrons par quel mécanisme une induction du cytochrome P450 1A1 peut aboutir à des liaisons de l'ADN.

Nous proposons d'étudier les activités EROD dans des microsomes de poumons de rats témoins et traités.

Il s'agit d'une étude de faisabilité sur de faibles effectifs, qui a pour objectif de :

- mettre au point le protocole d'isolement de la fraction microsomale,
- vérifier la pureté des microsomes obtenus,
- valider le calcul des concentrations en protéines en utilisant deux méthodes colorimétriques différentes,
- comparer les activités EROD mesurées entre :
 - le lot témoin et les rats exposés au radon ou recevant de la β -NF,
 - le lot exposé au radon et celui traité par des injections répétées de β -NF.

CHAPITRE I

RAPPELS DE PHYSIQUE ATOMIQUE

ET NUCLEAIRE

1. STRUCTURE DE L'ATOME ET DU NOYAU

L'atome est constitué d'un noyau central de charge électrique positive ; autour de ce noyau gravitent des électrons sur des orbites stationnaires. L'ensemble de l'édifice atomique a donc une neutralité électrique.

Le noyau d'un atome X est caractérisé par :

- A nombre de masse, encore appelé nombre de nucléons.
- Z numéro atomique ou nombre de protons.
- N nombre de neutrons.

Le nombre de nucléons est la somme du nombre de protons et de neutrons.



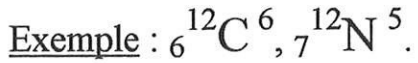
Les propriétés chimiques d'un élément dépendent du nombre d'électrons périphériques.

Les différents isotopes d'un élément chimique sont caractérisés par un nombre de neutrons différent ; ils ont cependant les mêmes propriétés chimiques puisque le nombre d'électrons dans leur cortège électronique reste identique. Certains de ces isotopes sont stables, d'autres radioactifs.

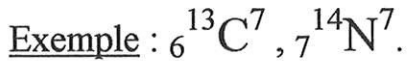
Exemple : ${}_{51}^{127}\text{I}^{76}$, ${}_{51}^{123}\text{I}^{72}$, ${}_{51}^{125}\text{I}^{74}$, ${}_{51}^{131}\text{I}^{80}$.

On définit également,

- les isobares : ce sont des éléments ayant un même nombre de nucléons mais avec un nombre de protons et un nombre de neutrons différents.



- les isotones : éléments ayant un même nombre de neutrons avec un nombre de protons et un nombre de nucléons différents.



- les isomères : éléments ayant des noyaux identiques mais différents par leur énergie.



2. STABILITE NUCLEAIRE

Il n'y a qu'un nombre limité de noyaux stables (274) parmi toutes les combinaisons possibles de neutrons et de protons pour former un noyau.

Tableau I.1. : Noyaux stables en fonction du nombre de protons et de neutrons.

A	Z	N	Nombre de noyaux stables
Impair	I	P	50
	P	I	55
Pair	I	I	4
	P	P	165

La majorité des noyaux est formée par la combinaison de neutrons et de protons pairs (tableau I.1.).

Pour les éléments légers, les noyaux stables ont un nombre égal de neutrons et de protons. Lorsque le nombre de protons augmente, l'effet de répulsion entre éléments chargés positivement, tend à diminuer la stabilité du noyau. Un excès de neutrons est nécessaire pour neutraliser les forces de répulsion électrostatiques créées par les protons et assurer ainsi la cohésion du noyau. Au delà de quatre vingt trois protons, donc du Bismuth (${}_{83}^{209}\text{Bi}^{126}$), l'excès de neutrons ne suffit plus ; l'élément est instable et naturellement radioactif.

Pour un nombre de protons donné , le nombre de neutrons est variable : il existe donc plusieurs isotopes stables.

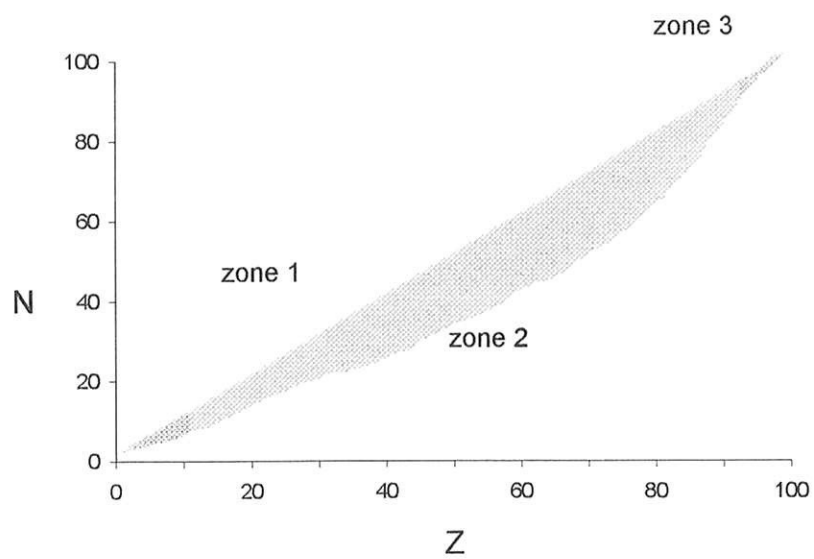
Sur une représentation graphique du nombre de protons en fonction du nombre de neutrons, la zone de stabilité est étroite (Figure 1).

3. LES TRANSFORMATIONS RADIOACTIVES

En dehors de la zone de stabilité, le noyau va se transformer afin de retrouver un état stable. Il existe trois types de transformations.

3.1. Les transformations isobariques

Un noyau trop riche en neutrons ou en protons (zones 1 et 2 de la Figure 1) va revenir vers la zone de stabilité sans modifier son nombre de masse A.



zone 1 : noyaux trop riches en neutrons

zone 2 : noyaux trop riches en protons

zone 3 : noyaux trop riches en protons et en neutrons

Figure 1 : Zone de stabilité des noyaux

3.1.1. L'émission β^-

Elle correspond à la transformation d'un neutron en proton associée à l'émission d'un électron et d'un antineutrino. Pour être possible, la réaction doit libérer de l'énergie, transmise à l'électron et à l'antineutrino sous forme d'énergie cinétique.

3.1.2. L'émission β^+ et la capture électronique

La transformation d'un proton en neutron dans le noyau peut s'effectuer selon deux processus :

- soit par émission β^+ correspondant à l'émission d'un positron et d'un neutrino,
- soit par capture électronique au cours de laquelle un électron périphérique est capté par un proton du noyau. Un neutrino est alors émis.

Un réarrangement du cortège électronique après la capture électronique est obligatoire. En effet, la capture crée une vacance sur une couche électronique périphérique responsable d'une excitation de l'atome. Le retour à un état stable se fait après perte d'énergie de deux manières différentes :

- grâce à l'émission d'un rayonnement X de fluorescence et/ou
- grâce à l'expulsion d'un électron, appelé électron Auger.

L'émission β^+ et la capture électronique sont souvent en compétition. L'émission β^+ demande un seuil énergétique plus élevé que celui de la capture électronique.

Dans le cas où les deux moyens de désintégration sont permis, la capture électronique est favorisée pour les noyaux lourds, la première couche orbitaire (couche K) étant plus proche du noyau.

3.2. Les transformations par partition

Les noyaux possédant un excès de neutrons et de protons (zone 3 de la Figure 1) sont dynamiquement instables. Ils tendent à évoluer vers une plus grande stabilité en se transformant par émission de particules α ou par fission spontanée.

3.2.1. L'émission α

Deux neutrons et deux protons se réunissent à l'intérieur du noyau pour former une particule α qui est émise par le noyau.

Lors de la désintégration d'un élément avec émission α , l'énergie de la réaction correspond à l'énergie cinétique des particules α .

3.2.2. La fission spontanée

Certains noyaux lourds peuvent se fragmenter en noyaux plus légers, définissant la fission qui s'accompagne d'une émission de neutrons.

Par exemple, un gramme d'Uranium 238 présente vingt fissions par heure.

3.3. Les transformations isomériques

Elles constituent le mode de désexcitation électromagnétique des noyaux.

3.3.1. *L'émission γ*

Après une transformation radioactive α , β ou capture électronique, le noyau final peut se trouver dans un état excité. Il va perdre son excès d'énergie par émission d'un ou plusieurs photons γ (onde électromagnétique).

3.3.2. *La conversion interne*

Le noyau peut transférer son excès d'énergie à un électron de l'atome qui sera alors expulsé. La conversion interne sera suivie d'un réarrangement du cortège électronique avec émission de rayonnements X caractéristiques et d'électrons Auger.

4. RADIOACTIVITES NATURELLE ET ARTIFICIELLE

4.1 . La radioactivité naturelle

Dans la nature, seuls restent des éléments stables et des éléments instables dont la désintégration radioactive est très lente. Cependant, leurs descendants radioactifs peuvent posséder des périodes courtes.

La plupart des éléments radioactifs naturels possèdent un excès de neutrons et de protons (zone 3 de la Figure 1). Les trois substances mères sont :

- le thorium (${}_{90}^{232}\text{Th}$) dont la période radioactive est de $1,4 \cdot 10^{10}$ ans,
- l'uranium 235 (${}_{92}^{235}\text{U}$) dont la période radioactive est de $7,1 \cdot 10^8$ ans,
- l'uranium 238 (${}_{92}^{238}\text{U}$) dont la période radioactive est de $4,5 \cdot 10^9$ ans.

Après transformations, ces substances donnent des descendants radioactifs à leur tour émetteurs α ou β et permettent d'établir des familles radioactives.

4.2. La radioactivité artificielle

Elle consiste à créer des radioéléments artificiels par des réactions nucléaires ou par fission des noyaux lourds. Le principe est de bombarder des éléments cibles par des particules radioactives, seules capables de fournir une énergie suffisante pour briser les forces de cohésion du noyau.

5. UNITES DE MESURE ET D'EXPOSITION

5.1. Unités d'activité

L'unité historique est le curie (Ci), $1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10}$ désintégrations par seconde. L'unité standard internationale est le becquerel (Bq), $1 \text{ Bq} = 1$ désintégration par seconde.

$$1 \text{ pCi/l} = 37 \text{ Bq/m}^3$$

5.2. Unités d'exposition

Les unités d'exposition permettent de quantifier les effets des radiations ionisantes sur les organismes biologiques. L'unité traditionnelle est le rad (rd).

L'unité actuelle est le gray (Gy) définie par le dégagement d'énergie d'un joule (J) par kilogramme de matière.

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rd}$$

L'**électron-volt (eV)** est l'énergie acquise par un électron qui se déplace dans un champ électrique et qui subit une variation de potentiel de 1 volt.

$$1 \text{ eV} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$$

Le **working level (WL)** est l'unité historique anglo-saxonne correspondant à tout mélange de radon et de ses descendants à vie courte dont la décroissance libre libère $1,3 \cdot 10^5$ MeV d'énergie α par litre d'air.

$$1 \text{ WL} = 1,3 \cdot 10^5 \text{ MeV/l} = 20,8 \cdot 10^{-6} \text{ J/m}^3$$

Le **working level month (WLM)** ou niveau de travail mensuel équivaut à 1 WL pendant 170 heures (moyenne de travail mensuel).

6. EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS

Lors de l'absorption d'un rayonnement ionisant par la matière se produisent des phénomènes moléculaires, cellulaires et tissulaires, qui peuvent altérer soit des structures reproductives, aboutissant à des conséquences tardives mais fatales, soit des structures non reproductives, ayant des conséquences immédiates et généralement transitoires.

6.1. Les phénomènes moléculaires

6.1.1. Les mécanismes d'altération de type direct

Soit M une molécule d'intérêt biologique (acide nucléique, enzymes, protéines de structure) qui reçoit un rayonnement incident. L'énergie transférée à la molécule M est responsable de l'apparition d'un état ionisé ou excité M* traduisant un excès d'énergie. Le retour à l'état fondamental se fait :

- soit par émission de photons,



- soit par rupture d'une liaison de covalence de M,

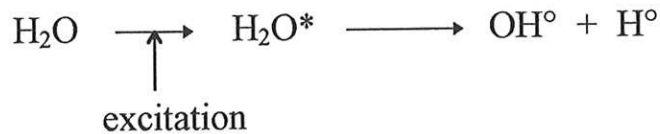


La molécule M rompue ne peut plus assurer sa fonction, chacun des produits de rupture (R₁ et R₂) emporte un des électrons appariés qui formait la liaison de covalence.

R_1 et R_2 sont appelés radicaux libres car ils possèdent chacun un électron célibataire ce qui leur donne une très grande réactivité chimique. Les radicaux libres tendent à appairer leur électron célibataire en capturant un électron situé sur une autre molécule. Cette molécule deviendra à son tour un radical libre. Ce processus est le point de départ d'une réaction en chaîne.

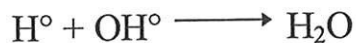
6.1.2. Les mécanismes d'altération de type indirect

La molécule M peut être altérée de façon indirecte par les radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau.



OH° est le radical hydroxyle.

Les radicaux libres de l'eau sont chimiquement très actifs mais leur durée de vie est très brève. Ils peuvent se recombinaison et donner des composés inertes.



Ils peuvent aussi, par diffusion, altérer certaines fonctions chimiques de la molécule M. Enfin, ils peuvent donner naissance à des radicaux peroxydes (ROOH), oxydants puissants dont les effets perdurent après l'arrêt de l'irradiation.

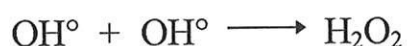
Le taux de formation de ces oxydants dépend de l'énergie apportée par le rayonnement ionisant et de la quantité d'oxygène dissous dans le milieu.

De façon plus précise, on définit pour chaque rayonnement la quantité d'énergie transférée de façon linéaire. Le transfert d'énergie linéaire (TEL) varie selon le type d'émission (Tableau I.2.).

Tableau I.2. : Transfert d'énergie linéaire en fonction du rayonnement

RAYONNEMENT	TRAJET	TEL
α protons, neutrons	court, rectiligne	fort
β et γ électrons, photons	long, pénétrant	faible

Quand le TEL est élevé, les radicaux hydroxyles sont proches les uns des autres et leur probabilité de recombinaison est forte,



Le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) ainsi formé ne dépend pas de la présence d'oxygène.

Quand le TEL est faible, la probabilité de rencontre de deux radicaux hydroxyles est faible. En l'absence d'oxygène, il ne se forme pratiquement pas de peroxyde.

La formation de peroxyde est liée à la concentration en oxygène dissous.

6.1.3. L'effet oxygène

L'oxygène augmente les effets des rayonnements ionisants s'il est présent au moment de l'irradiation.

Le rapport d'amplification de l'oxygène (OER) est le rapport entre la dose fournie à une préparation en anoxie (D_1) et la dose apportée dans des conditions de bonne oxygénation (D_2) pour obtenir le même effet.

$$\text{OER} = D_1 / D_2$$

L'effet oxygène est lié à la formation des métabolites dérivés de l'oxygène et dépend du TEL. Lorsque le TEL est élevé, le rapport d'amplification de l'oxygène est voisin de 1. L'effet oxygène est gênant en radiothérapie car la plupart des tumeurs cancéreuses contiennent un contingent de cellules anoxiques donc moins radiosensibles.

6.1.4. Action des radiations ionisantes sur les acides nucléiques

Trois types d'effets peuvent être observés :

- une altération des bases pouvant aboutir à des erreurs de traduction du code génétique,
- une rupture simple des chaînes de l'ADN,
- une rupture double des chaînes de l'ADN.

Une dose de 0,1 Gy sur des cellules de mammifères produit :

- cent ruptures simples,
- dix ruptures doubles,
- cent altérations de bases.

6.1.5. Mécanismes de réparations des acides nucléiques

Plusieurs processus enzymatiques vont agir pour permettre une réparation des acides nucléiques.

Les exonucléases réalisent une hydrolyse des bords de la brèche de la chaîne d'ADN lésée. L'ADN polymérase synthétise le segment manquant, complémentaire du brin d'ADN intact. La fermeture de la chaîne réparée est assurée par des ligases.

Les altérations des bases sans rupture de chaîne sont restaurées grâce à l'endonucléase qui reconnaît l'altération et coupe la chaîne à ce niveau.

Le taux de réparation est variable, en fonction du contenu enzymatique de la cellule : il ne dépasse jamais 90%.

Les modifications restantes sont presque toujours des mutations chromosomiques identifiables au microscope. Les particules α induisent préférentiellement des délétions terminales alors que les rayons X favorisent l'émergence de chromosomes dicentriques (Durante *et coll.*, 1995).

Les différentes altérations aboutissent à un changement de structure secondaire et tertiaire des protéines. Dans le cas des enzymes, il en résulte une diminution ou une perte d'activité.

6.2. Les phénomènes cellulaires

Les effets cellulaires d'une irradiation dépendent de la population cellulaire atteinte. On distingue les cellules susceptibles de se diviser et les cellules différenciées.

6.2.1. Effets des radiations ionisantes sur les cellules qui se divisent

Deux types d'événements peuvent survenir :

- un retard de mitose
- la mort cellulaire

Le retard de mitose apparaît pour des doses de quelques centigrays et croît avec la dose administrée. Ce retard ne dépasse pas une dizaine d'heures. Il peut correspondre à un blocage temporaire en phase G2 ou à un allongement de la phase S par diminution de la synthèse d'ADN (Figure 2).

Ce retard permet de synchroniser partiellement les mitoses des cellules irradiées. La radiosensibilité des cellules est maximale en phase G2 et pendant la mitose ; elle est minimale en phase G1.

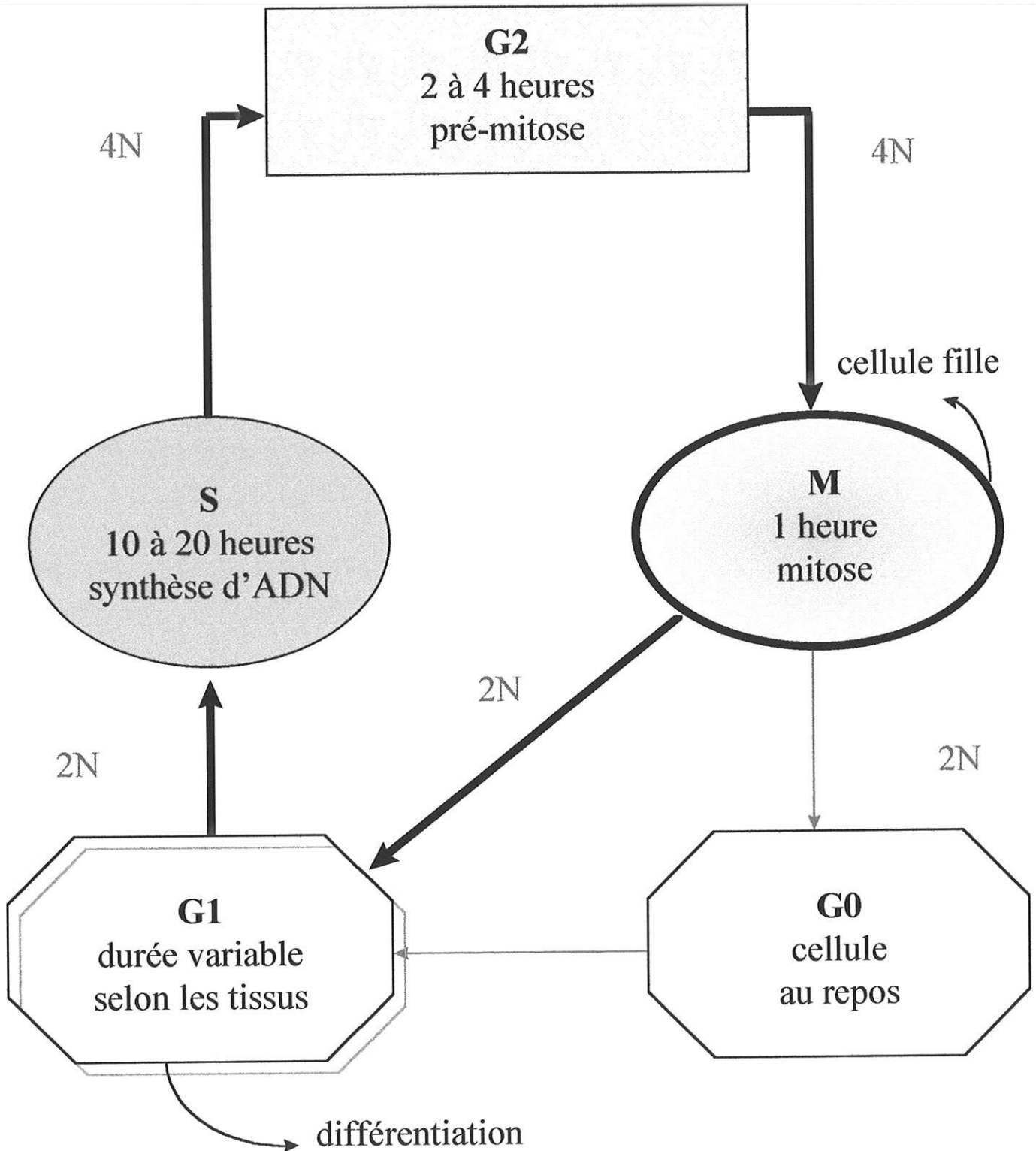


Figure 2 : Les différentes étapes du cycle mitotique

La mort cellulaire est la perte de la capacité de prolifération. Pour des doses de 1 à 2 Gy, la mort immédiate correspond aux cellules qui meurent lors de la mitose ; la mort différée désigne les cellules qui vont disparaître après trois ou quatre mitoses.

La mort différée des cellules irradiées est due aux conséquences d'aberrations chromosomiques radio-induites. La cellule est incapable de synthétiser les enzymes nécessaires à sa survie ou à sa division. Elle doit vivre sur les réserves non renouvelables synthétisées avant l'irradiation.

6.2.2. Effets des radiations ionisantes sur les cellules différenciées

La mort cellulaire pour les cellules différenciées, qui ne se divisent plus, est définie comme la perte de leur fonction spécifique. Cet effet ne survient que pour des doses atteignant plusieurs centaines de grays.

La mort fonctionnelle des cellules différenciées résulte de l'accumulation de métabolites toxiques et de la rupture des membranes des organites cellulaires, qui perturbent le fonctionnement de la cellule.

Les doses nécessaires à cette mort cellulaire étant importantes, les cellules différenciées sont plus radiorésistantes que les cellules souches (Loi de Bergonié et Tribondeau).

6.3. Influence de la nature du rayonnement

Pour comparer deux rayonnements, on utilise le rapport des doses nécessaires dans chaque cas pour obtenir le même effet biologique. Ce rapport est appelé Efficacité Biologique Relative (EBR).

L'efficacité biologique des différentes radiations (α , β ou γ) se traduit par la relation :

$$H = D \times \text{EBR}$$

D est la dose équivalente en Gray.

EBR est un facteur de pondération pour le rayonnement (EBR= 20 pour α , EBR= 1 pour β et γ).

L'EBR est le rapport entre la dose D du rayonnement et la dose D_0 du rayonnement de référence (rayonnement X avec un TEL =3 keV/ μm et un débit de dose de 0,1 gray/min).

H est l'équivalent de dose en Sievert (Sv) si D est en Gray. H s'exprime en rem "rad equivalent to man" si D est en rad. 1 Gy d' α a donc une efficacité biologique 20 fois supérieure à 1 Gy de γ (Renoux et Tymen, 1988).

1 Sv = 100 rem

6.4. Effets tissulaires

Lors d'une irradiation aiguë, pour des doses qui n'excèdent pas quelques dizaines de grays, les radiations ionisantes sont sans effet sur les cellules différenciées. Une partie des cellules souches sera détruite. Les cellules souches survivantes gardent la possibilité de proliférer, mais l'équilibre de renouvellement des cellules est rompu.

Le devenir du tissu dépend du nombre de cellules souches survivantes, de la durée moyenne de vie des cellules différenciées, de la mise en œuvre de processus de réparation tissulaire.

Trois phénomènes permettent une reconstruction rapide du tissu :

- une réduction de la longueur du cycle mitotique,
- une augmentation du compartiment des cellules souches,
- une augmentation de la prolifération de ces cellules.

Les phénomènes de réparation tissulaire permettent de comprendre la tolérance de l'organisme à des doses importantes mais fractionnées ou administrées à faible débit.

Ces mécanismes sont moins efficaces dans les tissus tumoraux.

CHAPITRE II

LE RADON

1. DONNEES PHYSIQUES

1.1 Origine physique du radon

Le radon est un gaz rare naturel, incolore, inodore, sans effets physiopathologiques autres que ceux liés à l'irradiation. Les trois isotopes naturels sont :

- le radon 219 ou actinon,
- le radon 220 ou thoron,
- le radon 222 ou radon.

Les filiations du radon et du thoron sont résumées dans les Figures 3 et 4.

Ces trois isotopes sont issus des trois familles radioactives naturelles :

- l'uranium 235 pour l'actinon (période radioactive de 4 secondes),
- le thorium pour le thoron (période radioactive de 55 secondes),
- l'uranium 238 pour le radon (période radioactive de 3,8 jours).

Le radon et ses produits de filiation immédiats sont essentiellement des émetteurs α . L'énergie fournie sera donc forte sur un faible trajet (cf. chapitre I).

1.2. Devenir du radon inhalé

La vraie cause d'exposition n'est pas due au radon gazeux lui-même mais à ses dérivés à vie courte, atomes solides radioactifs, qui vont se fixer à la surface

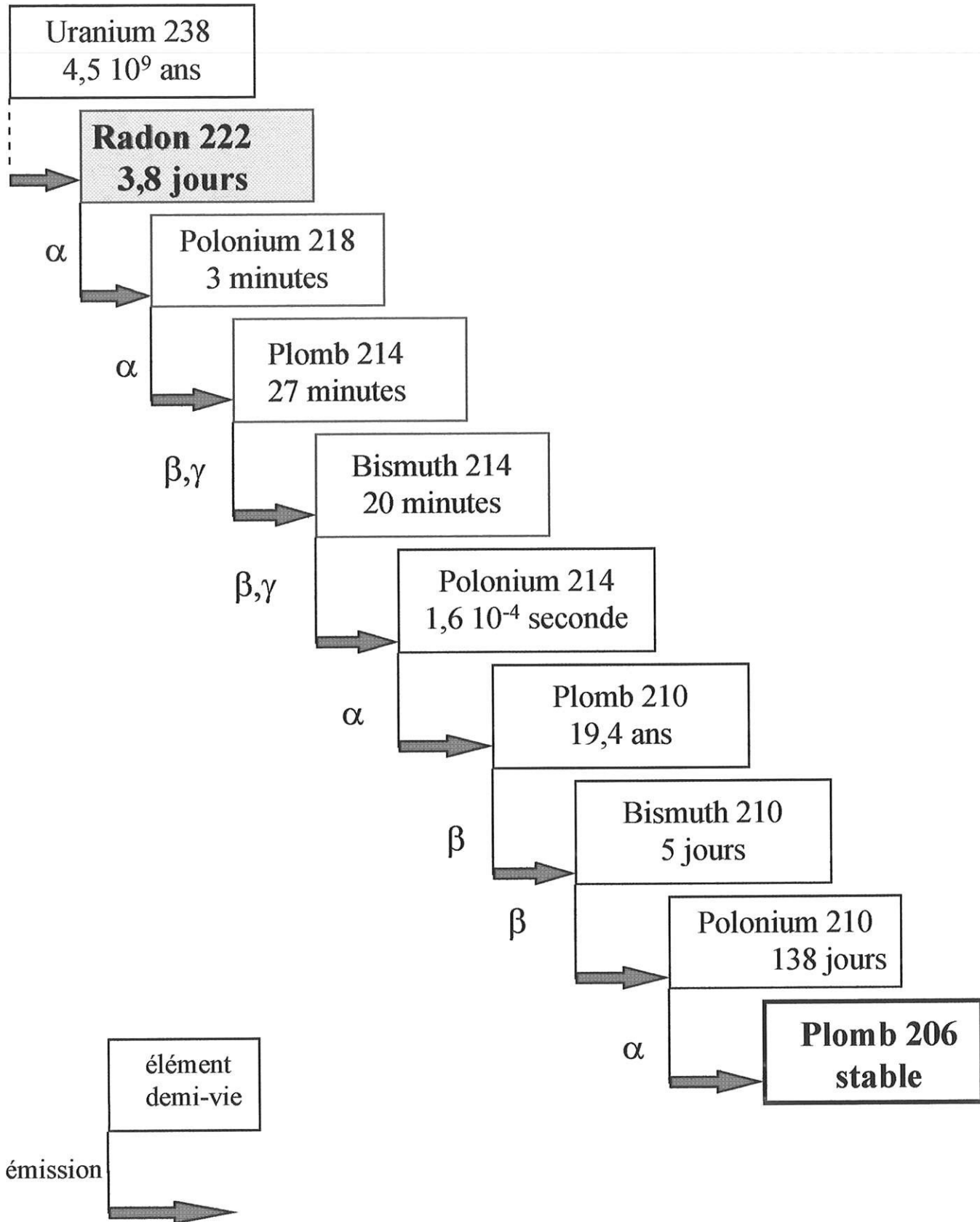


Figure 3 : Filiation radioactive du radon
(d'après Hart, 1989)

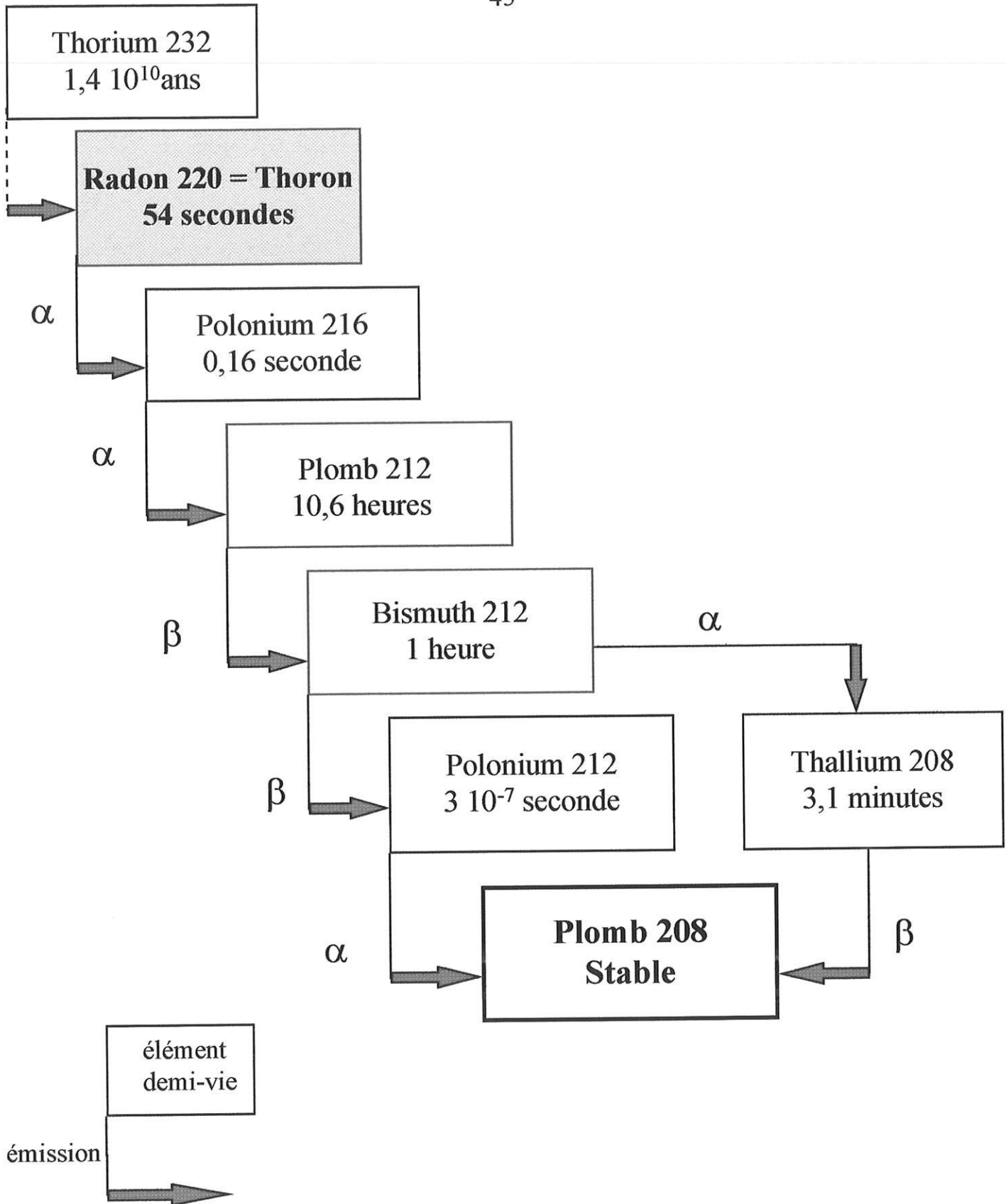


Figure 4 : Filiation radioactive du thoron
(d'après Ménard, 1994)

des particules présentes dans l'air ambiant. Les atomes de polonium, de plomb, et de bismuth vont former l'aérosol radioactif naturel.

Les particules radioactives ainsi créées se déposent et s'accumulent dans l'arbre respiratoire au cours du processus d'inhalation, entraînant une exposition interne du poumon à des doses élevées par rapport aux autres organes. Le poumon est donc l'organe cible.

Ces atomes solides réagissent très rapidement avec les gaz en trace et les vapeurs de l'air pour former des petites particules appelées "clusters". Cette composante particulaire est appelée fraction "libre" ou "non attachée". Elle est habituellement chargée électriquement et est de petit diamètre (0,5 à 5 nm). Dans un second temps, cette composante ultra-fine va se fixer sur les particules naturelles préexistantes pour former la fraction "attachée", dont la granulométrie moyenne est de 150 nm (Reineking *et coll.*, 1988).

Il est classique de considérer que les plus grosses particules sont filtrées au niveau des voies aériennes supérieures et qu'en aval, les particules se déposent à un niveau d'autant plus distal que leur diamètre aérodynamique est faible (Weibel, 1983). La fraction "attachée" va se déposer entre la troisième et la septième génération bronchique.

Le faible diamètre des particules de la fraction "libre" peut leur permettre d'atteindre les alvéoles mais leur coefficient de diffusion élevé explique qu'une

partie non négligeable se dépose dès les premières générations de l'arbre bronchique.

Le risque de cancer broncho-pulmonaire résultant de l'exposition aux dérivés du radon peut être évalué à partir de la dose de radiations délivrées aux tissus cibles que sont les cellules de l'épithélium bronchique. La fraction "libre" représente une proportion importante de la dose absorbée par ces cellules. Son importance dépend de la quantité de particules présentes dans l'air. Elle diminue si la concentration en particules augmente.

Outre les proportions respectives de chacune des fractions, les caractéristiques de l'aérosol radioactif sont déterminées par le degré d'empoussiérage et le degré d'humidité. Des paramètres biologiques interviennent également :

- la composition et l'épaisseur du mucus,
- la clairance muco-ciliaire,
- l'épaisseur de la paroi bronchique,
- l'existence d'une inflammation bronchique antérieure,
- la diffusion alvéolo-interstitielle et le transfert alvéolo-capillaire.

L'interaction de tous ces paramètres va déterminer la dosimétrie individuelle et la topographie des cellules cibles alvéolaires et bronchiques.

Les déterminants ventilatoires liés au sujet sont principalement le volume courant, la fréquence respiratoire, la morphologie et la respiration nasale ou buccale (Samet, 1989).

La dosimétrie est basée sur un paramètre fondamental, l'énergie potentielle α (EPA), caractérisant physiquement l'exposition dérivée du radon.

Cette énergie est la somme des énergies délivrées par toutes les particules α émises lorsque tous les produits de filiation à vie courte se sont désintégrés dans un volume d'air donné.

Les particules α du radon ont un trajet moyen de 55 μm (Bowie, 1991). L'étude de Baldwin (Baldwin *et coll.*, 1991) retrouve sur 29 pièces anatomiques une distance comprise entre 17 et 38 μm du mucus au noyau des cellules basales. Les particules α peuvent donc toucher le noyau des cellules cibles.

2. GEOLOGIE DU RADON

Les trois familles radioactives naturelles sont présentes de façon ubiquitaire dans la croûte terrestre mais leur distribution est variable selon la nature des roches. Le radon est surtout retrouvé dans les terrains granitiques et s'accumule facilement dans les cavités naturelles et les fissures.

La grande solubilité du radon, en particulier dans les eaux froides, explique qu'une activité importante soit retrouvée dans les nappes et les puits des régions uranifères. Les principaux sites français sont la Vendée, le Limousin, le Massif Central et l'Hérault. Les deux minerais extraits des gisements d'uranium sont l'autunite (phosphate d'uranium et de calcium) et la pechblende (oxyde d'uranium). L'autunite est située en surface sous la forme de paillettes jaunes

vertes ; la pechblende, de couleur noire et métallique, est située en profondeur (COGEMA, 1991).

3. RADON ET RADIOACTIVITE NATURELLE

La radioactivité naturelle de l'air est essentiellement due au radon et au thoron en raison de la courte période de l'actinon. Dans la croûte terrestre, qui contient environ 12 g de thorium et 3 g d'uranium par tonne, le radon et ses produits de filiation radioactifs sont responsables de la moitié de la radioactivité naturelle. En fait, malgré sa moindre abondance, c'est le radon 222 qui est la principale source en raison d'une période radioactive plus longue. La valeur moyenne d'exposition due au seul radon est de 1 mSv par an et par individu. L'exposition naturelle aux radionucléides est estimée à 2 mSv par an mais est très variable selon les zones géographiques considérées (Tableau II.1.).

Tableau II.1. : Exposition naturelle selon les zones géographiques

(Renoux et Tymen, 1990)

LIEU	EXPOSITION ANNUELLE*(mSv)
Région parisienne	0,22 à 1,84
Limousin	0,22 à 52
Bretagne	0,06 à 5,4
Suède	0,25 à 37
Canada	0,25 à 5,7
USA	0,25 à 12

*induite par la teneur en radon de l'air atmosphérique

4. RADON ET CANCER

Au XVI^e siècle, le physicien Agricola décrit une pathologie pulmonaire rencontrée parmi les mineurs. Trente ans plus tôt (en 1567), il aurait été précédé par Paracelse qui, dans un ouvrage intitulé « De la peste et des autres maladies des mineurs », décrivait les maladies pulmonaires observées chez les travailleurs des mines et des fonderies (Schüttmann, 1993). On décrit ensuite la “maladie de la montagne” des mineurs de L’Erzgebirge, région située entre l’ex-Tchécoslovaquie et l’ex-Allemagne de l’Est. Ce n’est qu’au XIX^e siècle que les décès observés sont attribués au cancer du poumon (Harting et Hesse, 1879). Il

faut attendre 1935 pour que le rapport entre cancer et radioactivité minière soit établi (Samet, 1989).

4.1. Etudes épidémiologiques sur les populations de mineurs

Pour l'Erzgebirge, l'analyse des archives des industries minières de l'ex-RDA à partir de 1980, a permis de mesurer l'ampleur et la gravité des conséquences de l'exposition radioactive. Sur 450 000 mineurs exposés de 1945 à 1980, 15 000 sont atteints ou décédés de silicose pulmonaire, 6 000 de cancer broncho-pulmonaire. Cette étude constitue le plus grand modèle épidémiologique connu sur l'exposition radioactive à faibles doses et à long terme. L'autre modèle étant constitué par les explosions atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki : il s'agit dans ce cas d'une exposition à fortes doses et à court terme.

Plusieurs études complémentaires sont venues confirmer l'augmentation du risque de cancer bronchique primitif chez les mineurs d'uranium (Tableau II.2.).

Tableau II.2. : Principales études épidémiologiques sur l'exposition au radon
en milieu minier.

LIEU	POPULATION	AUTEURS
Erzgebirge (Allemagne)	450 000	Kahn, 1993
Jachymov, Slavkov (Tchécoslovaquie)	4320	Tomasek et coll., 1994
Plateau du Colorado (USA)	18 000*	Hornung et coll., 1987
Ontario (Canada)	54 128	Kusiak et coll., 1991
Ontario (Canada)	1772	Morrison et coll., 1988
Beaverlodge (Canada)	11 000	L'Abbé et coll., 1991
Province d'Yunnan (Chine)	17 143	Zhen et coll., 1993
Malmberget, Koskoskulle (Suède)	1415	Radford et coll., 1984
Radium Hill (Australie)	2574	Woodward et coll., 1991
Massif Central, Vendée (France)	1785	Tirmarche et coll., 1993

*somme de huit études américaines entre 1959 et 1977.

Les méthodes épidémiologiques utilisées sont soit des études de cohorte, soit des études cas-témoins. L'évaluation rétrospective de la dosimétrie individuelle est la principale difficulté.

L'excès relatif de cancer broncho-pulmonaire est déduit de la comparaison du taux de mortalité des populations de mineurs au taux de mortalité standardisé pour la région ou le pays considéré, en incluant l'âge et le sexe.

Un risque supérieur est isolé en mine souterraine peu ventilée.

Le rôle du tabagisme associé est bien sûr capital ; le risque relatif chez les non fumeurs reste cependant élevé (Roscoe *et coll.*, 1989) mais le délai d'apparition des tumeurs induites est plus long.

Les imprécisions sont le plus souvent, l'âge de la première exposition, l'existence d'exposition à d'autres carcinogènes et les détails des doses reçues.

4.2. Anatomie pathologique

Les trois principaux types histologiques rencontrés chez le fumeur, à savoir le carcinome épidermoïde, le carcinome à petites cellules et l'adénocarcinome, se retrouvent dans les cancers pulmonaires radon-induits. Toutefois leur fréquence respective est différente : il existe une forte prédominance des carcinomes à petites cellules (Archer *et coll.*, 1974).

4.3. Biologie moléculaire

En termes moléculaires, le cancer bronchique est le résultat de multiples aberrations génétiques (Figure 5) qui activent les gènes de prolifération (oncogènes), inactivent les gènes de fonction antiproliférative (gènes suppresseurs), et permettent aux cellules d'échapper à la mort cellulaire programmée (apoptose).

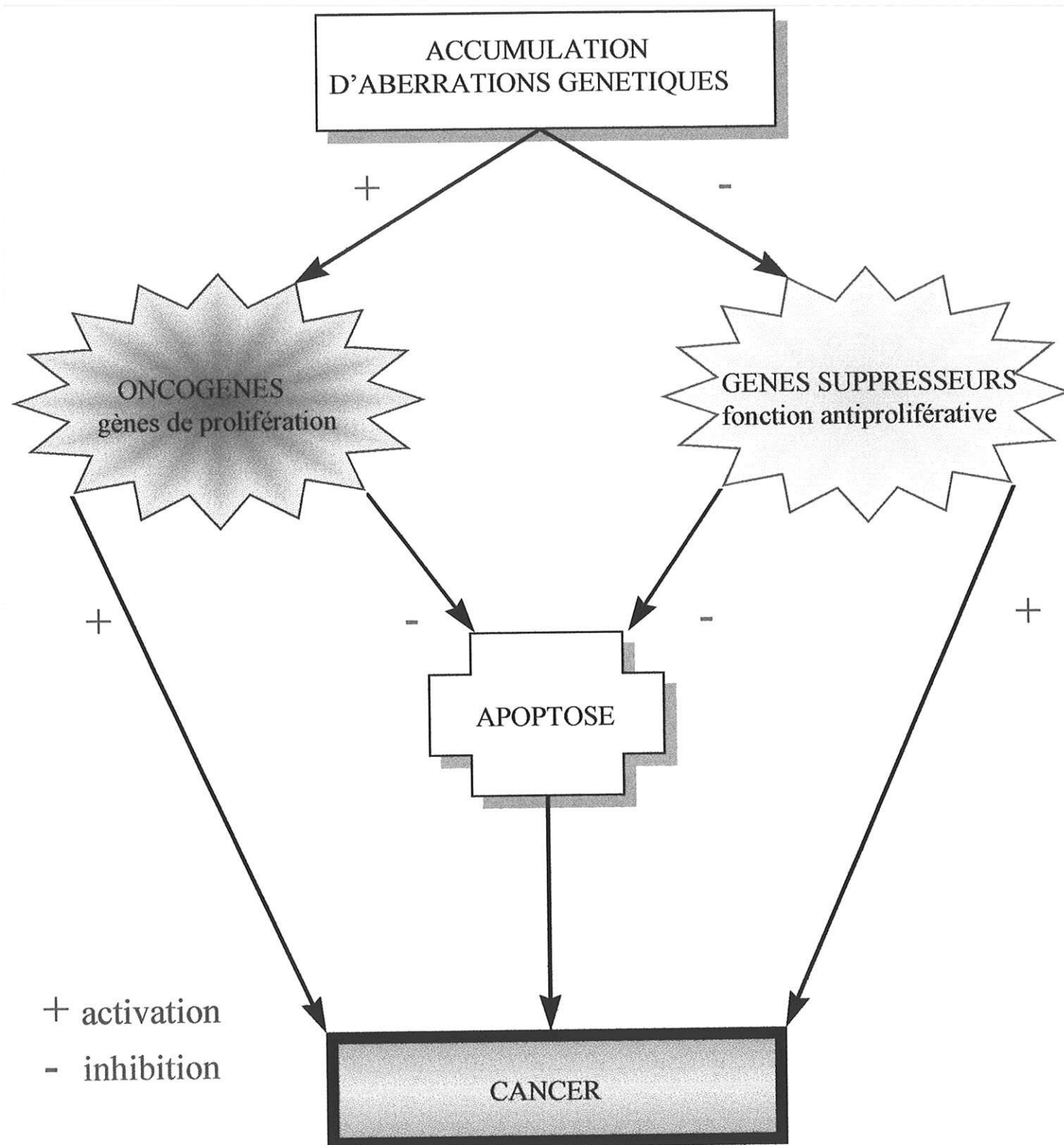


Figure 5 : Mécanismes de la carcinogenèse bronchique
(d'après Brambilla, 1996)

L'étude de Vähäkangas (Vähäkangas *et coll.*, 1992) comporte dix-neuf malades, fumeurs, mineurs d'uranium, atteints de cancer bronchique primitif.

Les mutations les plus souvent observées dans les tumeurs induites par le tabagisme seul sont situées au niveau des exons 5 à 9 du gène de la protéine p53 (gène suppresseur) et des codons 12-13 de l'oncogène K-ras.

Dans cette étude, aucune mutation de K-ras n'est retrouvée ; neuf mutations du gène p53 sont observées chez sept patients, aboutissant à des délétions ou des substitutions d'acides aminés et des codons « stop ».

L'intérêt de ce travail est de montrer, dans une population de mineurs fumeurs, des mutations différentes par rapport à celles rencontrées chez le cancer du fumeur. Il faut cependant remarquer le faible effectif de la population étudiée, l'absence d'information concernant le pourcentage d'adénocarcinomes, type histologique où sont décrites les mutations du gène K-ras (Rodenhuis et Slebos, 1992).

Dans une population de cinquante deux mineurs du plateau du Colorado atteints de cancer bronchique, Taylor (Taylor *et coll.*, 1994) observe une mutation (transversion ACG → ATG) du codon 249 chez vingt-neuf malades. Cette anomalie, très rare dans les autres cancers bronchiques, pourrait être un marqueur génétique des tumeurs pulmonaires radon-induites.

4.4. Modèles expérimentaux

Les problèmes de radioprotection, issus de la relation de cause à effet entre le cancer broncho-pulmonaire et l'exposition au radon, expliquent les nombreuses études basées sur l'expérimentation animale.

En 1971, Perraud et coll. obtiennent des cancers pulmonaires chez tous les rats exposés onze mois plus tôt au radon. Les tumeurs obtenues sont toujours multiples à prédominance distales. Il s'agit de carcinomes épidermoïdes ou d'adénocarcinomes. Contrairement aux mineurs d'uranium, aucun carcinome à petites cellules n'est diagnostiqué. La constance d'apparition des tumeurs est d'autant plus remarquable que les tumeurs malignes pulmonaires chez le rat sont exceptionnelles (Mac Coy, 1909).

De nombreuses études complémentaires, réalisées à Razès, ont permis de vérifier l'obtention des tumeurs, d'améliorer le protocole d'exposition et de moderniser les chambres d'exposition au radon (Figure 6).

L'inhalation de radon chez le rat induit des tumeurs bronchiques selon une courbe dose-réponse avec un pic pour 3000 WLM.

Les effets létaux à court terme sont observés pour des doses cumulées supérieures à 5000 WLM. L'incidence maximale des tumeurs malignes est observée pour des expositions de l'ordre de 1000 WLM. Le délai de survenue des tumeurs après exposition au radon seul est d'environ douze mois.

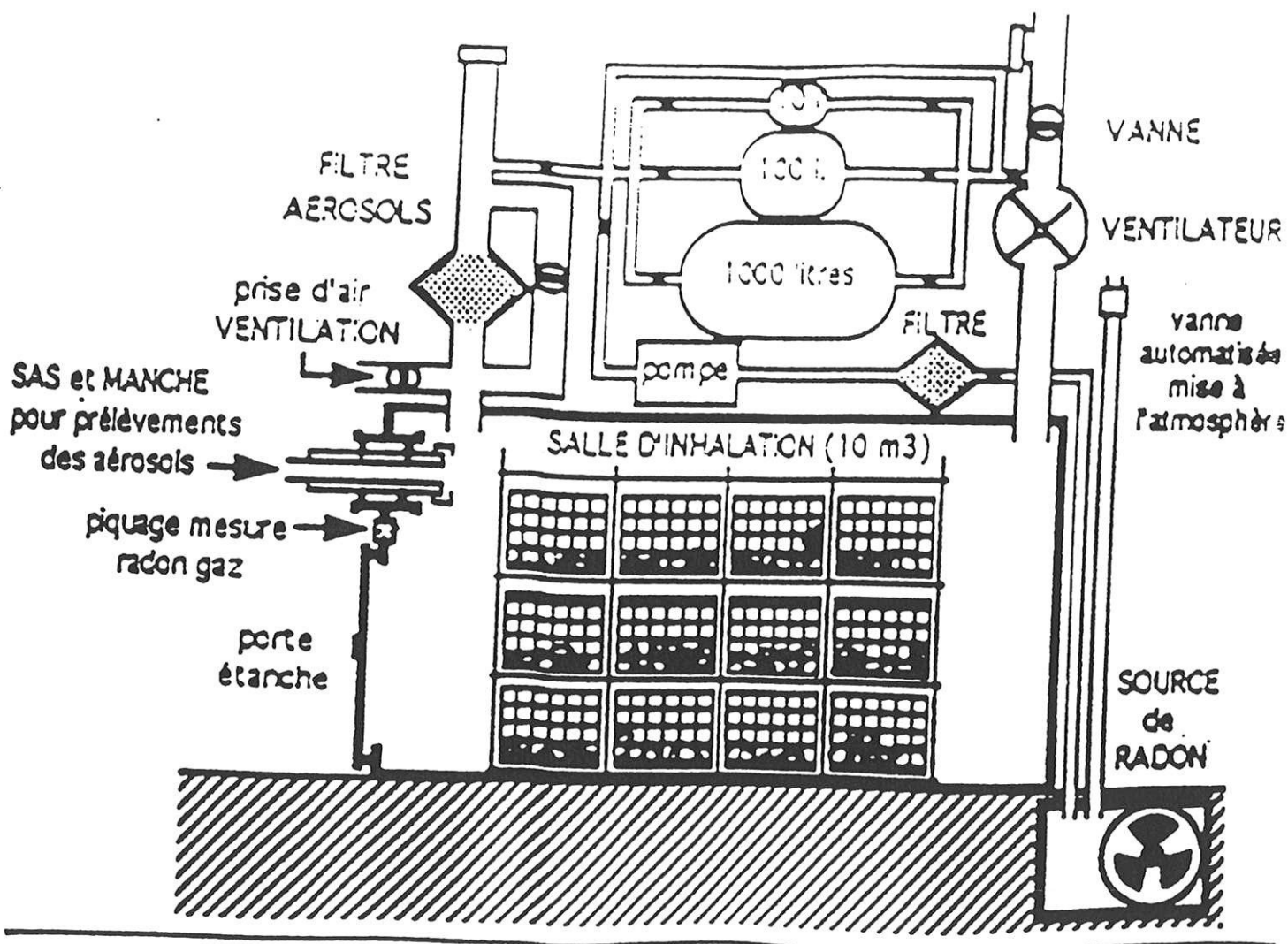


Figure 6 : Chambre d'inhalation de radon

Le débit de dose joue un rôle important dans l'apparition des tumeurs (Masse *et coll.*, 1992). Pour une dose totale de 25 WLM, l'incidence des tumeurs augmente uniquement si le débit de dose est fort.

L'exposition au radon et à la fumée de tabac semble avoir un effet synergique.

Chez les rats exposés au radon et recevant des injections répétées de β -NF, les tumeurs apparaissent dans les trois mois suivant l'arrêt du traitement.

5. RADON ET EXPOSITION DOMESTIQUE

L'origine de l'exposition domestique et environnementale au radon réside dans les sols sur lesquels sont construits les bâtiments, le ruissellement hydrique et la ventilation des habitations. Les constructions en roche naturelle granitique peuvent aussi être une source d'exposition domestique.

Le radon est considéré comme étant un facteur de qualité de l'air susceptible d'induire un risque pour la santé. La concentration en radon est faible à l'extérieur grâce à un processus naturel de transport en altitude. Dans les ambiances confinées, il y a risque d'accumulation.

Dans les pays industrialisés, les mesures dosimétriques domestiques donnent une moyenne de 20 à 60 Bq/m³ mais dans les régions à sous-sols riches en éléments naturels, les taux peuvent atteindre quelques milliers de Bq/m³. La valeur moyenne en France est de 44 Bq/m³, celle enregistrée en Limousin est de 100 Bq/m³ (Renoux et Tymen, 1988).

Les études épidémiologiques descriptives qui ont tenté d'évaluer les relations entre mortalité par cancer broncho-pulmonaire et estimation globale de l'exposition au radon sont contradictoires (Samet, 1989).

L'exposition au radon domestique entraîne-t-elle des tumeurs pulmonaires ?

La réponse à cette question ne sera possible qu'après études épidémiologiques sur un plus grand nombre de sujets et avec des mesures d'exposition plus précises, en prenant en compte les différentes habitations de chaque individu sur une longue période précédant la survenue du cancer broncho-pulmonaire.

CHAPITRE III

CYTOCHROMES P450 ET POUMON

De nombreuses substances étrangères s'avèrent toxiques pour le poumon parce qu'elles subissent un processus d'activation métabolique au niveau du tissu pulmonaire lui-même. La métabolisation des xénobiotiques n'entraîne pas seulement une détoxification ; les réactions de la biotransformation peuvent conduire à l'apparition de métabolites toxiques.

Ces métabolites réactifs réagissent de façon irréversible avec les macromolécules cellulaires en perturbant leur fonctionnement. Ceci est la base de l'apparition de nombreux phénomènes de toxicité (Figure 7).

On isole deux classes d'activation métabolique conduisant à des effets toxiques :

- l'oxydation métabolique conduit à des entités électrophiles capables de liaisons covalentes avec des sites nucléophiles sur des constituants essentiels de la cellule. Les altérations fonctionnelles ou structurelles résultant de ces interactions peuvent entraîner la nécrose cellulaire ou conduire au développement de cellules cancéreuses.

- la réduction métabolique mono-électronique qui permet aux composés exogènes concernés de donner leur électron à l'oxygène. Ils catalysent l'apparition des radicaux libres de l'oxygène susceptibles de déclencher des réactions d'oxydation en chaîne et d'aboutir à la dégradation de nombreuses macromolécules cellulaires.

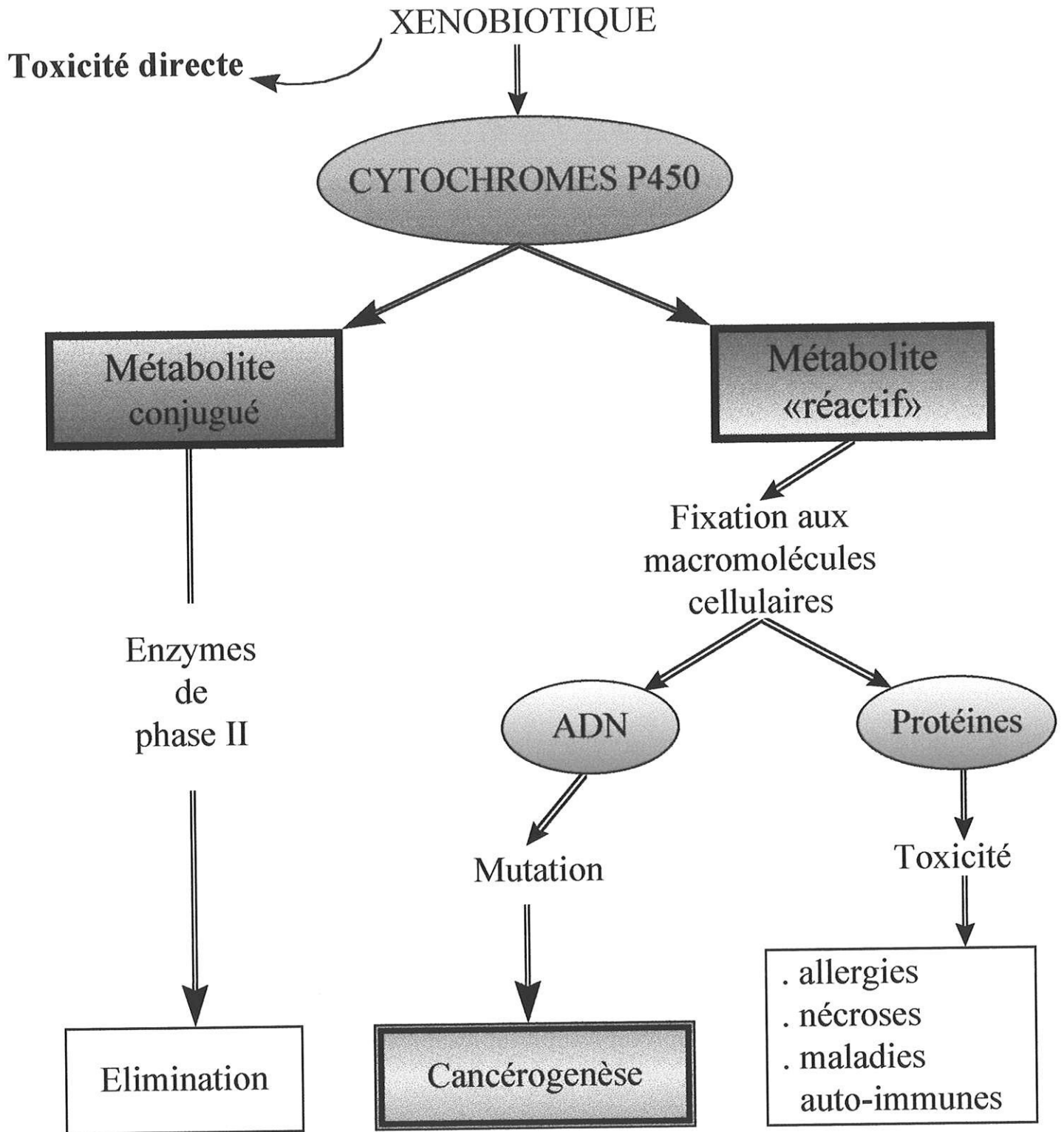


Figure 7 : Métabolisation des xénobiotiques par les cytochromes P450

1. CARACTERISTIQUES DES CYTOCHROMES P450

Les cytochromes P450 jouent un rôle déterminant dans le mécanisme de détoxification des xénobiotiques.

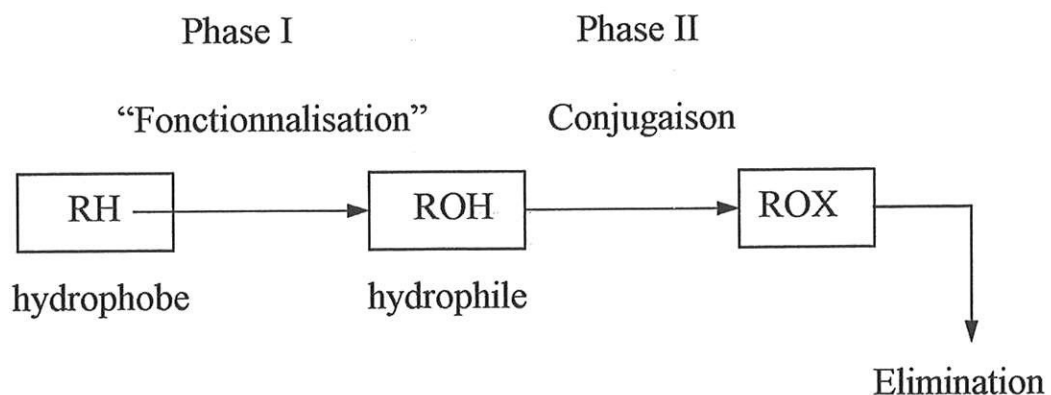
Situé dans le réticulum endoplasmique des cellules, le système cytochrome P450 est composé d'une enzyme contenant un groupement hémique couplée à une réductase dépendante de la nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduite (NADPH, H⁺).

La détoxification a pour but de transformer les composés lipophiles en métabolites hydrosolubles qui pourront subir une élimination hépatique ou rénale.

Les principales étapes sont les suivantes :

- fixation des composés sur le cytochrome P450,
- hydroxylation du composé,
- conjugaison permettant l'élimination.

Le système du cytochrome P450 appartient aux enzymes de "fonctionnalisation", dites de phase I. L'élimination nécessite l'action complémentaire d'enzymes de conjugaison appelées enzymes de phase II.



L'ensemble des réactions chimiques nécessaires au fonctionnement du cytochrome P450 est résumé sur un cycle catalytique (Figure 8). Lorsque le composé lipophile se fixe sur le cytochrome P450, le NADPH fournit grâce à la NADPH cytochrome réductase, un électron qui va permettre une réduction du fer contenu dans le groupement héminique. Le fer, se trouvant sous la forme d'ion ferreux (Fe^{++}), va être capable de fixer une molécule d'oxygène. Une deuxième réduction permettra à la molécule d'oxygène de devenir réactive et de s'insérer dans le composé exogène pour le rendre hydrophile. Il s'agit donc d'une mono-oxygénation.

En dehors de leur rôle "physiologique", les cytochromes P450 sont les principaux lieux de production potentielle de métabolites électrophiles alkylants.

Il existe de nombreuses formes de cytochrome P450, toutes codées par des gènes différents (Nelson, 1993).

Ces formes varient par :

- leur séquence d'acides aminés,
- leur sélectivité vis à vis de substrats différents,
- leur susceptibilité aux agents inducteurs ou inhibiteurs.

Par exemple, les sous familles 1A catalysent la déalcoolation des résorufines.

Certaines formes dépendent de l'espèce animale, et à l'intérieur d'une espèce, la distribution des cytochromes P450 varie selon l'organe et le type de cellule. Les quantités relatives de ces différentes formes peuvent varier sous l'influence de

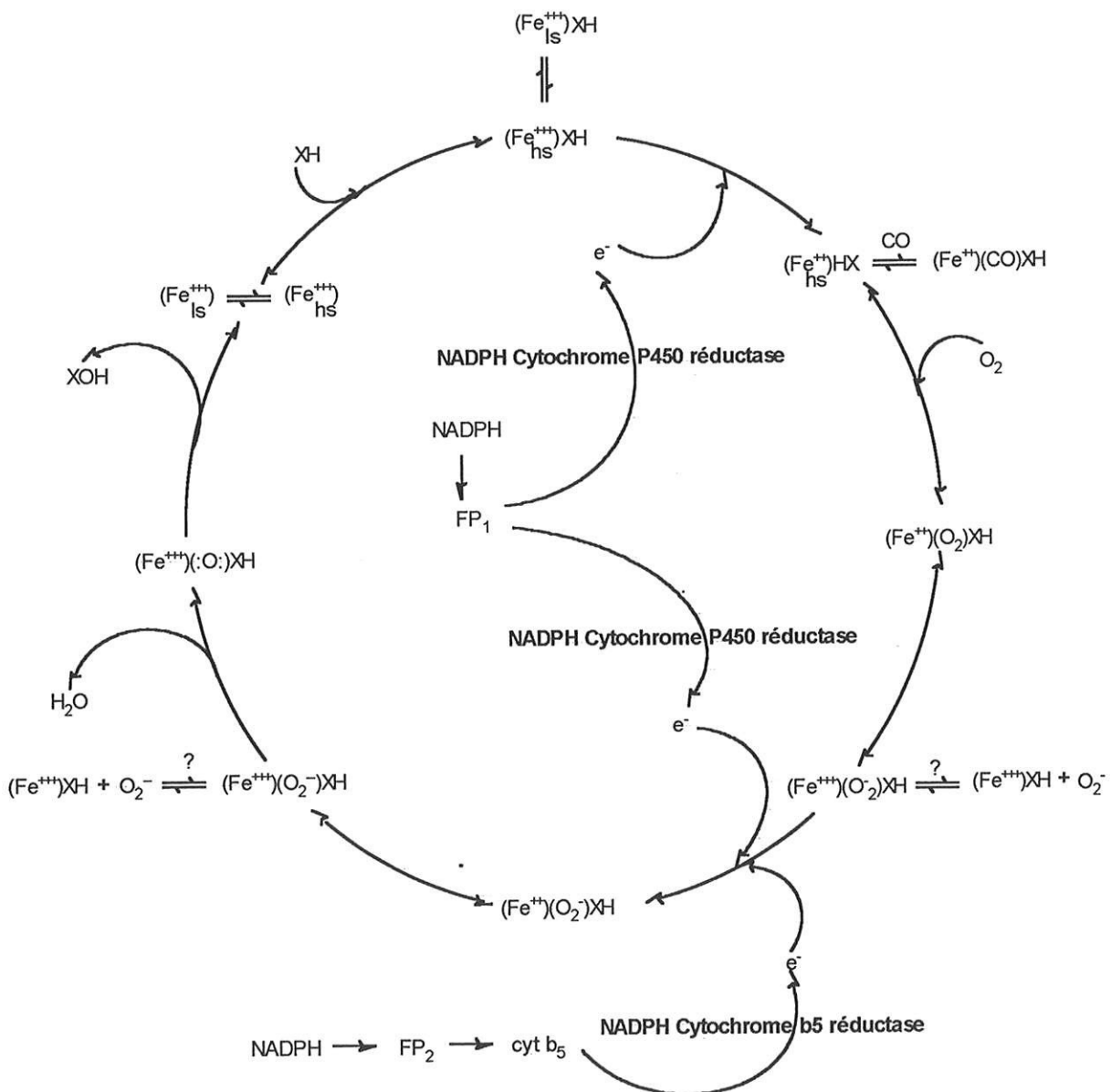


Figure 8 : Cycle catalytique du cytochrome P450
(d'après Guengerich, 1987)

facteurs physiologiques, tels que l'âge ou la gestation, ou de facteurs de l'environnement, en particulier l'exposition aux agents inducteurs ou inhibiteurs du cytochrome P450.

La concentration totale en cytochrome P450 dans le poumon est faible lorsqu'on la compare à celle du foie, organe principal de l'élimination des xénobiotiques.

Toutes les cellules du poumon ne possèdent pas un tel système enzymatique. Les pneumocytes II, dans l'alvéole, et les cellules de Clara, au niveau bronchiolaire, sont les plus riches en mono-oxygénase cytochrome P450 et en NADPH cytochrome P450 réductase associée (Nemery, 1994).

Ces cellules, possédant l'appareil enzymatique nécessaire à la transformation, peuvent donc bio-activer les procancérogènes. Une hypothèse logique est de considérer que les cellules de Clara et les pneumocytes II peuvent être le départ de cancers pulmonaires induits (Hayashi *et coll.*, 1991).

La survenue d'un cancer bronchique dépend certainement de la manière dont les individus vont métaboliser les cancérogènes auxquels ils sont exposés. Certains, sous l'influence de facteurs génétiques ou environnementaux, produiront plus volontiers des métabolites réactifs.

La sous famille 1A1 est majoritaire dans le poumon. Les sous familles 2D6 et 2E1 pourrait également être impliquées dans les cancers bronchiques.

2. INDUCTION DU CYTOCHROME P450 1A1

L'induction des cytochromes fait partie de leurs caractéristiques. Seules certaines formes peuvent être induites.

Un inducteur donné agira spécifiquement sur une sous famille (Tableau III.1.)

Tableau III.1. : Cibles des principaux inducteurs (d'après Okey, 1990)

INDUCTEURS	SOUS FAMILLES CONCERNEES
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	CYP P450 1A1 et CYP P450 1A2
Phénobarbital	CYP P450 2B1 et CYP P450 2B2
Ethanol	CYP P450 2E1
Glucocorticoïdes	CYP P450 3A1

Beaucoup d'inducteurs sont aussi les substrats des sous familles qu'ils induisent. Ils stimulent donc leur propre métabolisme. De plus, leur action sur le système du cytochrome P450 s'accompagne, de façon modérée, d'une augmentation de travail des enzymes de phase II.

La différence d'activité entre les enzymes de chaque phase est source d'un déséquilibre potentiel pouvant conduire à la formation de métabolites réactifs (Figure 7).

Le mécanisme d'induction le plus étudié est celui des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur le cytochrome P450 1A1. La benzo-naphthoflavone (β -NF), utilisée dans notre étude expérimentale agit comme une substance "HAP-like".

Dès 1968, Wattenberg émet l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme de reconnaissance à l'intérieur de la cellule permettant de cibler la réponse à l'induction. L'emploi d'inducteurs radio-marqués a permis de découvrir un récepteur cytosolique : le récepteur Ah.

L'inducteur pénètre dans la cellule par diffusion et va se fixer sur le récepteur Ah dans le cytosol. L'affinité entre le substrat et le récepteur est corrélée au potentiel inducteur. Il existe donc une relation étroite entre structure et activité. Le complexe inducteur-récepteur Ah ainsi formé subit un processus de transformation, lui permettant d'acquérir une forme pouvant s'associer à des séquences d'ADN spécifiques. A l'intérieur du noyau, le complexe inducteur-récepteur Ah permet de promouvoir la transcription des gènes codant pour le cytochrome P450 1A1 (Figure 9).

L'augmentation de la synthèse des protéines spécifiques au cytochrome P450 est donc la conséquence d'une augmentation de la transcription génétique (Nebert et Gonzalez, 1987).

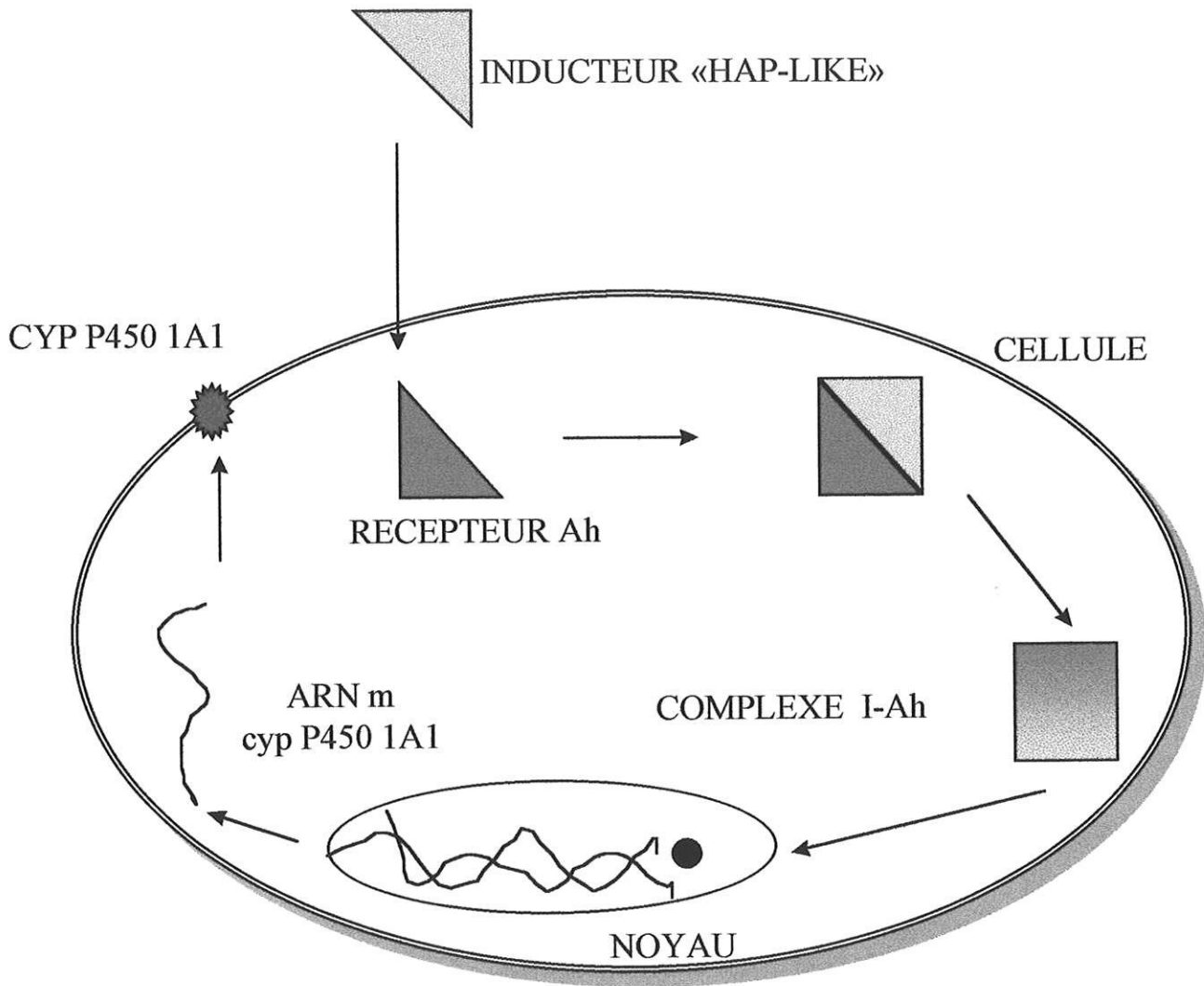


Figure 9 : Induction du cytochrome P450 1A1
par les substances «HAP-like»
(d'après Nebert et Gonzalez, 1987)

L'induction est responsable de la fabrication de nouvelles enzymes et non pas de l'activation d'enzymes au repos. Ces mécanismes ont été mis en évidence dans les cellules hépatiques de rats et de souris.

L'augmentation des cytochromes P450 1A1 n'est pas synonyme d'effet néfaste ; ils peuvent également accélérer l'élimination de substances potentiellement toxiques. Autre exemple, le cyclophosphamide doit subir une biotransformation avant d'exercer son rôle antimétabolique. Dès lors, l'induction intervient dans le métabolisme et l'efficacité du médicament.

Outre les enzymes dépendant du cytochrome P450, il existe au niveau du tissu pulmonaire d'autres systèmes effectuant des réactions de phase I du métabolisme des xénobiotiques. Les cellules de Clara et les pneumocytes II contiennent également une mono-oxygénase flavine dépendante capable de catalyser l'oxydation de nombreux composés aminés et soufrés.

Le poumon possède aussi des enzymes de la conjugaison des xénobiotiques : glucurono transférase, sulfo transférase et glutathion transférase.

CHAPITRE IV

ETUDE EXPERIMENTALE

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Les animaux

Le rat est l'animal d'expérience choisi en raison de son faible volume et car il ne développe que très rarement des cancers du poumon (Mac Coy, 1909).

Notre étude comprend des rats mâles Sprague Dawley (OFA, Iffa Credo, France), peu sensibles aux infections bronchiques, âgés de cinq mois et pesant environ 400g. Les femelles, présentant un pourcentage non négligeable de tumeurs mammaires spontanées, sont écartées.

Le groupe I est constitué d'un lot de cinq rats témoins.

Le groupe II est constitué d'un lot de six rats exposés au radon.

La dose totale délivrée est voisine de 1000 WLM en vingt séances. Les animaux sont exposés cinq jours par semaine. Chaque séance représente une exposition de six heures en chambre d'inhalation (Figure 6).

Trois rats sont sacrifiés le jour de la fin d'exposition.

Le groupe III est constitué d'un lot de six rats ayant reçu trois injections intramusculaires de β -NF (25 mg/kg) avec un intervalle de quinze jours entre chaque injection.

Trois rats sont sacrifiés huit jours après la dernière injection.

Les animaux sont élevés dans la même animalerie à des conditions de température, d'exposition à la lumière et de nourriture standardisées.

1.2. Préparation des microsomes pulmonaires

1.2.1. Principe

Dans la cellule, le système du cytochrome P450 est situé dans le réticulum endoplasmique lisse qui, après homogénéisation du tissu et ultracentrifugation se retrouve dans la fraction précipitée, dite microsomale, d'où le terme d'enzymes microsomales, par opposition aux enzymes solubles de la fraction cytosolique.

Les homogénats de tissus obtenus sont centrifugés plusieurs fois à des vitesses croissantes afin d'éliminer les débris cellulaires et les mitochondries (Van der Hoeven, 1974).

1.2.2. Méthode

➤ Les solutions tampons

L'isolement des microsomes nécessite plusieurs solutions tampon comprenant, un tampon d'isolement (tampon A), un tampon de lavage (tampon B) et un tampon de conservation (tampon C).

Le tampon A est un tampon Tris (0,1 M) contenant 0,1 M de chlorure de potassium (KCl), 1 mM d'EDTA, 0,1 % de butylhydroxytoluène (BHT), dont le pH est ajusté à 7,4 par de l'acide acétique glacial.

Le tampon B est un tampon pyrophosphate de potassium (0,1 M) contenant 1 mM d'EDTA et 0,1 % de BHT, dont le pH est ajusté à 7,4 par de l'acide chlorhydrique.

Le tampon C est un tampon phosphate (0,1 M) contenant 1 mM d'EDTA et 20 % de glycérol, dont le pH est ajusté à 7,4 par de la soude.

Ces trois tampons sont conservés à 4 °C après filtration (0,22µm).

➤ Isolement des microsomes

Les fractions microsomales sont préparées à partir de poumons entiers, issus de rats sacrifiés le jour même (Figure 10).

L'échantillon est pesé puis placé dans un bécher contenant un volume de tampon A correspondant à trois fois le poids de l'échantillon. Le bécher est maintenu à 4 °C pendant toutes les manipulations.

L'échantillon est découpé et broyé à l'aide d'un Ultraturax (Bioblock).

Le broyat de poumon est placé dans un homogénéisateur en verre ("Potter Elvehjem") de 50 ml. L'homogénéisation est obtenue après cinq aller-retours de haut en bas grâce à un piston en téflon monté sur un moteur Leybold-heraeus (modèle 6 T 221) et porté à la vitesse de 1500 t/min.

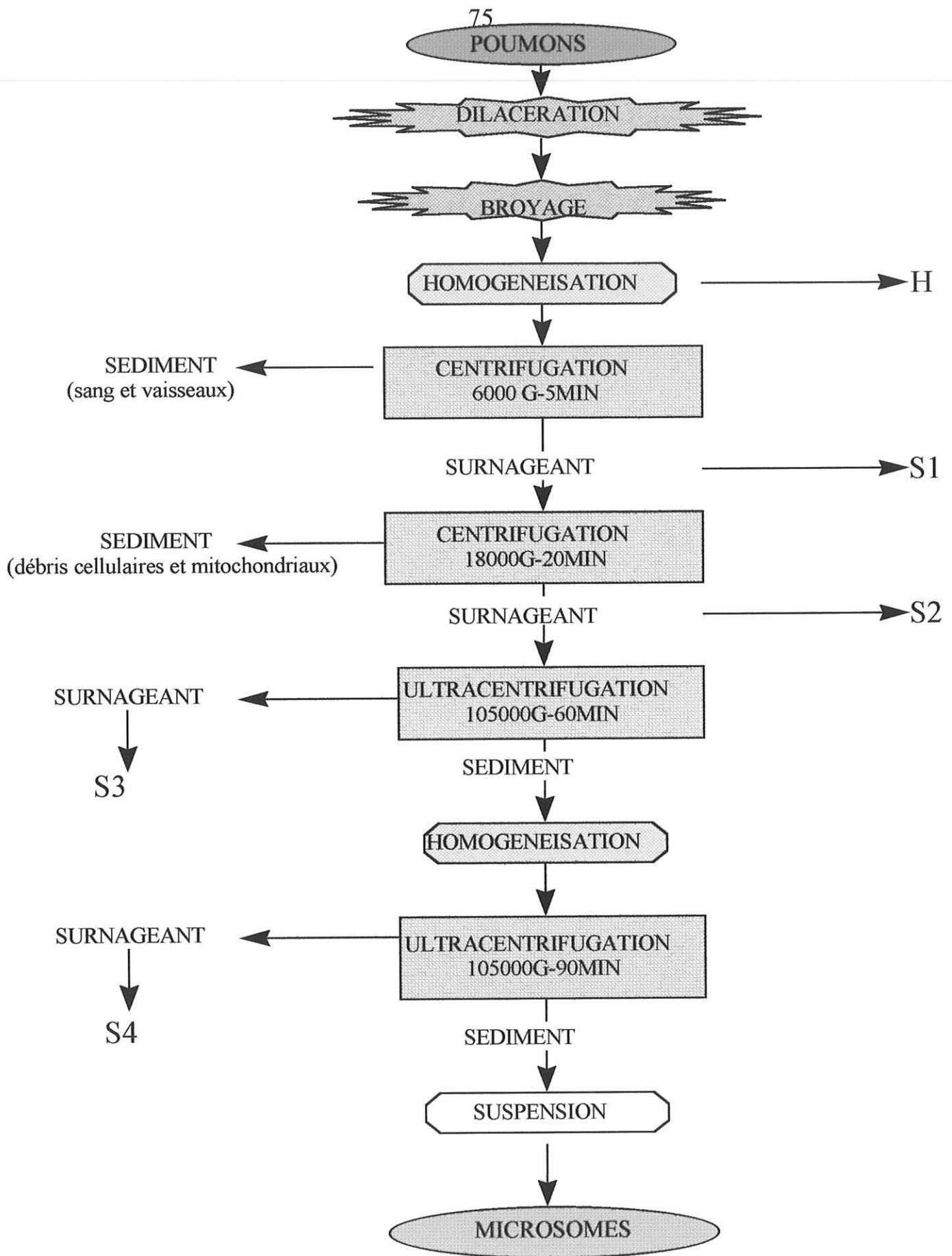


Figure 10 : Préparation des microsomes

L'homogénat est centrifugé à 6000 G pendant cinq minutes (Beckman Model J 21 B Centrifuge). Le surnageant est récupéré et centrifugé une nouvelle fois à 18000 G pendant vingt minutes.

Le deuxième surnageant ainsi obtenu est ultracentrifugé à 105000 G durant soixante minutes (Beckman L5 50 B Ultracentrifugeuse).

Au sortir de l'ultracentrifugeuse, le surnageant est éliminé et le sédiment est récupéré dans un volume de tampon B correspondant à une fois et demi le poids de l'échantillon.

Une nouvelle homogénéisation est réalisée dans un "potter" en verre de 20 ml. L'échantillon est ultracentrifugé à 105000 G pendant quatre-vingt dix minutes. Le surnageant est éliminé.

Le sédiment correspondant à la fraction microsomale est remis en suspension dans un volume de tampon C égal à un dixième du poids des poumons.

La suspension microsomale est homogénéisée dans un "potter" de 10 ml. Les microsomes sont ensuite aliquotés en fractions de 300 μ l et conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

Avant l'obtention des microsomes, plusieurs fractions intermédiaires de 500 μ l sont prélevées (Tableau IV.1.).

Tableau IV.1. : Origine des fractions intermédiaires

ECHANTILLONS	PROVENANCE
H	première homogénéisation
S1	première centrifugation
S2	deuxième centrifugation
S3	première ultracentrifugation
S4	deuxième ultracentrifugation

1.3. Dosage des protéines

Les microsomes de poumon possèdent, d'après la littérature, de faibles quantités de protéines. Il nous paraît donc intéressant de calculer ces concentrations par la méthode de Bradford et par la méthode de Lowry (méthode de référence) afin de confirmer nos résultats.

L'hypothèse de départ étant que la méthode de Bradford reste fiable pour de faibles concentrations en protéines par rapport à la méthode de référence.

Dans chaque groupe, les deux méthodes sont réalisées le même jour, la même préparation de l'échantillon servant aux deux séries de mesures.

1.3.1. La méthode de Bradford

➤ Principe :

Le Bleu Brillant de Coomassie G-250 se présente sous deux formes colorées, l'une rouge l'autre bleue. Lorsqu'il se fixe aux protéines la coloration rouge devient bleue et provoque un déplacement de la longueur d'onde de 465 nm à 595 nm.

➤ Méthode :

Préparation de l'échantillon : Chaque échantillon est décongelé à température ambiante ; les fractions H, S1, S2, S3 sont diluées au 50^{ème}, S4 et les microsomes sont dilués au 5^{ème} dans de la soude (1 N). Le volume total préparé pour chaque fraction est de 500 µl. Les solutions diluées sont placées dans des tubes à hémolyse en verre. La dénaturation des protéines est obtenue après incubation à 60°C pendant trente minutes. Les tubes sont, au préalable, recouverts d'un film plastique pour éviter l'évaporation.

Dosage des protéines : La gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution stock à 1mg/ml d'albumine sérique bovine (SAB).

Tableau IV.2. : Gamme d'étalonnage selon la méthode de Bradford

Quantité de protéines (μg)	Volume de SAB (μl)	Volume de réactif (ml)
0	0	5
5	5	5
10	10	5
20	20	5
40	40	5
60	60	5
80	80	5

Le réactif coloré est dilué au 5^{ème} dans de l'eau.

L'absorbance à 595 nm est déterminée à température ambiante pour trois dilutions différentes de chaque lot. Les mesures sont réalisées sur un spectrophotomètre de biochimie clinique (ABC).

La représentation graphique de la densité optique (DO) en fonction de la quantité de protéines contenue dans la prise d'essai (PE) permet de tracer une droite d'équation ,

$$y = a.x + b$$

- y est la DO, x est la quantité de protéines (mg) par prise d'essai,
- a est la pente, b est l'ordonnée.

L'équation de la droite d'étalonnage permet de calculer à partir de la DO mesurée la concentration en protéines dans chaque échantillon testé en tenant compte du facteur de dilution (D) et du volume de la prise d'essai.

La concentration en protéines [P] (mg/ml) recherchée dans les différents échantillons est donc :

$$[P] = \frac{(y-b/a) \cdot D}{PE(ml)}$$

1.3.2. La méthode de Lowry

➤ Principe :

Les protéines en présence de sel cuivrique et en milieu alcalin donnent un complexe coloré en mauve utilisable pour leur dosage colorimétrique. L'addition du réactif phosphotungstomolybdique de Folin (réactif des phénols) permet d'augmenter la sensibilité de la réaction.

➤ Méthode :

La préparation de l'échantillon est la même que pour la méthode précédente.

La gamme d'étalonnage est également réalisée à partir d'une solution stock de SAB diluée dans du sérum physiologique afin d'obtenir un volume final de 300 µl.

Dix minutes après l'ajout du réactif cuivrique, 300 μ l du réactif de Folin sont rajoutés, et les tubes placés dans l'obscurité pendant trente minutes.

Tableau IV.3. : Gamme d'étalonnage selon la méthode de Lowry

SAB (μ l)	sérum physiologique (μ l)	réactif cuivrique (ml)	réactif de Folin (μ l)
0	300	3	300
5	295	3	300
10	290	3	300
20	280	3	300
40	260	3	300
60	240	3	300
80	220	3	300

L'absorbance à 660 nm est déterminée à température ambiante pour trois dilutions différentes de chaque lot de microsomes et des fractions intermédiaires.

La concentration en protéines de chaque échantillon est déduite à partir de la droite d'étalonnage selon le même procédé que celui énoncé dans la méthode de Bradford.

1.4. Vérification de la contamination croisée

Lors de l'homogénéisation des tissus, les mitochondries ainsi que des fragments mitochondriaux sont libérés par les cellules éclatées. Pour nous assurer de la pureté de la fraction microsomale obtenue, les activités NADPH cytochrome P450 réductase et NADH oxydase, respectivement caractéristiques des fractions microsomales et mitochondriales, sont mesurées.

Le rapport de ces activités enzymatiques correspond à la contamination croisée des microsomes par les mitochondries. La contamination est non significative si l'activité NADPH cytochrome P450 est au moins quatre fois plus élevée que l'activité NADH oxydase.

Les activités enzymatiques utilisées pour déterminer la contamination croisée sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre équipé d'un double faisceau optique.

1.4.1. Mesure de l'activité NADPH cytochrome P450 réductase

➤ Principe :

Le **cytochrome c** réduit par la NADPH cytochrome P450 réductase est détectable à 550 nm (Strobel, 1980). La cinétique de réduction du substrat permet de déterminer l'activité de la NADPH cytochrome P450 réductase.

➤ Méthode :

La mesure spectrophotométrique de l'activité NADPH cytochrome P450 réductase s'effectue à une température de 25°C dans un tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (330 mM), EDTA (0,1 mM), pH 7,7 en présence de cytochrome c (10 mM).

Les échantillons sont dilués afin d'obtenir une concentration en protéine de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour un volume final de 2 ml ; 900 μl de cette dilution sont placés dans deux cuves en quartz de 1 ml. La première cuve sert de référence, la deuxième est la cuve de mesure. Après une période de mise en température, la réaction est déclenchée par l'ajout de 100 μl de NADPH (1mM) dans la cuve de mesure.

L'activité enzymatique (AE) est la différence des absorbances mesurées (ΔA) par unité de temps (Δt), corrigée par le coefficient d'extinction molaire (ϵ).

$$AE = \Delta A / \Delta t \times 1/\epsilon$$

Le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

L'AE est exprimée en Katal/mg de protéines. Le Katal correspond à l'activité enzymatique susceptible de transformer 1 mole de substrat par seconde. L'ancienne unité (UI) est l'activité enzymatique susceptible de transformer 1 micromole de substrat par minute.

$$1 \text{ UI} = 16,67 \text{ nanoKatal}$$

1.4.2. Mesure des activités NADH oxydase

➤ Principe :

La cinétique de disparition du NADH, cofacteur caractéristique de la NADH oxydase enregistrée à 340 nm, permet de déterminer l'activité de cette enzyme caractéristique de la membrane interne des mitochondries (Mikani, 1976).

➤ Méthode :

La mesure spectrophotométrique de l'activité NADH oxydase s'effectue à une température de 37°C dans un tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (40 mM), pH 7,4 contenant 20 ml de NADH (1 mM).

Les échantillons sont dilués afin d'obtenir une concentration en protéines de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour un volume final de 2 ml ; 980 μl de cette dilution sont placés dans deux cuves en quartz (1 ml). La première cuve sert de référence, la deuxième est la cuve d'essai. Après une période de mise en température, la réaction est déclenchée par l'ajout de 20 μl de NADH dans la cuve d'essai. Les mesures sont effectuées toutes les dix secondes pendant cinq minutes.

Le coefficient d'extinction molaire est de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Les résultats sont exprimés en Katal/mg de protéines.

1.5. Mesure des activités éthoxyrésorufine-*O*-déalkoylase dépendantes de la sous famille 1A1 du cytochrome P450

1.5.1. Principe

Certaines molécules, soumises à l'action d'un rayonnement lumineux ou ultraviolets dits d'excitation de longueur d'onde λ_1 , émettent des rayonnements lumineux secondaires caractéristiques de la molécule de longueur d'onde λ_2 . Ce phénomène est appelé photoluminescence.

L'émission de fluorescence correspond à la réémission de l'énergie sous forme d'une radiation lumineuse de plus grande longueur d'onde, avec retour à l'état fondamental.

L'activité EROD est mesurée en fluorimétrie selon la méthode de Lubet (Lubet *et coll*, 1985). Au cours de la déalkoylation, l'éthoxyrésorufine est transformée en résorufine (fluorescente). La longueur d'onde d'excitation est de 550 nm. La lumière émise est mesurée à 586 nm.

1.5.2. Matériel

Les mesures sont effectuées sur un spectrofluorimètre non thermostaté JY 3 (Jobin/Yvon Division). L'échantillon est placé dans une cuve en quartz de 3 ml dont les quatre faces sont transparentes (Figure 11).

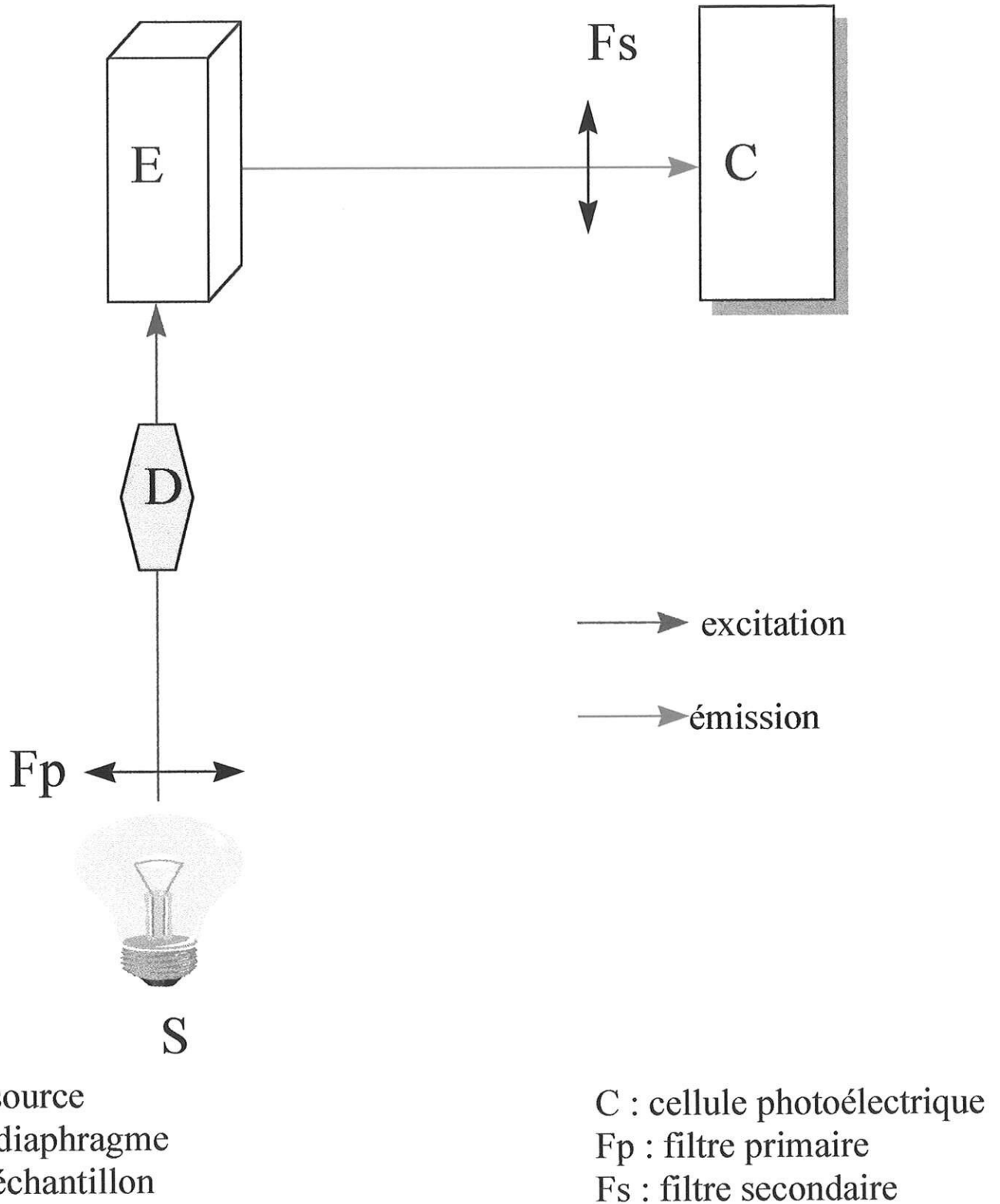


Figure 11 : Principe du spectrofluorimètre

1.5.3. Méthode

La solution stock de résorufine (80 μM) est préparée à l'abri de la lumière dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), aliquotée (100 μl) et conservée à -20°C .

Les quantités de résorufine formées au cours des réactions de déalcoylation dépendantes du cytochrome P450, sont déterminées à l'aide d'une gamme étalon réalisée à partir de la solution stock de résorufine (Tableau IV.4.).

Tableau IV.4. : Gamme étalon utilisée pour le calcul des activités EROD

Résorufine (μl)	0	15	30	45	60	150	300	450	600	800	1000
DMSO (μl)	3000	2985	2970	2955	2940	2850	2700	2550	2400	2200	2000

La solution stock d'ER à 2,5 mM est préparée à l'abri de la lumière dans du DMSO et conservée à -20°C .

Les microsomes sont dilués dans un tampon TRIS-HCl (0,1M) contenant 5 mM de MgCl_2 , 0,06% de SAB dont le pH est ajusté à 7,8 par de la soude (1N). Le volume des microsomes est calculé afin d'obtenir une concentration en protéines de 0,5 mg/ml. Le tampon d'incubation est composé de :

- 982 μl de tampon cyp contenant 30 mM de glucose 6 phosphate (G6P) et 5 mM de NADP
- 10 μl de Dicoumérol (100 μM)
- 8 μl d'ER.

Le système régénérateur du NADPH se compose du glucose 6 phosphate (G6P), du glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PDH) et du NADP.

La réaction est déclenchée par l'ajout de 3 μ l de G6PDH (100 U/ml). Sept mesures de trente secondes sont réalisées en trente minutes pour chaque lot de microsome. Entre chaque mesure, l'échantillon est maintenu à 37°C.

L'activité EROD est déterminée graphiquement à partir de l'évolution linéaire de la production de résorufine.

1.6. Analyse statistique

Les moyennes des concentrations en protéines obtenues par la méthode de Bradford et la méthode de Lowry sur les fractions intermédiaires (H, S1, ...) et sur les microsomes sont comparées entre elles grâce à la loi de Student.

Cette loi s'applique à de petits échantillons (n inférieur à trente) pour des séries appariées.

On forme pour chaque paire la différence des deux mesures et on compare la moyenne des différences à 0 par le rapport,

$$t = \frac{m}{s/\sqrt{n}}$$

m désigne la moyenne,

s correspond à l'écart type,

n est égal au nombre d'échantillons.

Si $|t|$ est inférieur à la valeur lue dans la table de t pour le nombre de degrés de liberté $(n-1)$ et le risque 5%, les moyennes ne diffèrent pas significativement.

2. RESULTATS

2.1. Préparation des microsomes

Tableau IV.5. : Poids des poumons dans les groupes étudiés

	GROUPE I	GROUPE II	GROUPE III
Poids total des poumons (g)	14	13,5	14,5

2.2. Dosage des protéines

2.2.1. Concentrations en protéines des microsomes et des fractions intermédiaires

Tableau IV.6. : Concentrations en protéines (mg/ml) dans les trois groupes

	ECHANTILLONS	METHODE	
		BRADFORD	LOWRY
GROUPE I	H	13,7 ± 3,3	27,8 ± 2,8
	S1	30,6 ± 5,9	51,2 ± 7,8
	S2	30 ± 2,7	66,4 ± 2,7
	S3	27,1 ± 2	27,1 ± 2,5
	S4	1,7 ± 0,5	2,9 ± 0,6
	MCS	5,4 ± 0,6	7 ± 0,9
	GROUPE II	H	42,7 ± 11,7
S1		40,8 ± 7,6	39 ± 2,4
S2		46,7 ± 10,2	48,4 ± 7,9
S3		37,9 ± 9,6	40,6 ± 2,3
S4		2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,1
MCS		8,9 ± 1,1	9,4 ± 0,9
GROUPE III	H	28,1 ± 5,7	33 ± 4,7
	S1	27,7 ± 8	29 ± 0,9
	S2	25,8 ± 4,4	30 ± 5,7
	S3	22,9 ± 3,7	24 ± 3,4
	S4	1,9 ± 0,4	1 ± 0,2
	MCS	5,4 ± 0,5	9,2 ± 1,8

Quelle que soit la méthode utilisée, une gamme d'étalonnage est réalisée pour les microsomes et les fractions intermédiaires de chaque groupe (Figure 12 et 13).

Les concentrations en protéines présentées dans le tableau IV.6. sont une moyenne calculée à partir de trois mesures réalisées pour trois dilutions différentes (10, 20 et 30 μ l) de chaque échantillon.

Les concentrations en protéines diminuent de l'homogénat (H) vers les microsomes (MCS). Cela témoigne de la perte de matériel cellulaire et de l'isolement d'une fraction subcellulaire. Le surnageant S4 issu de la dernière ultracentrifugation présente une concentration très faible en protéines, le sédiment correspondant constituant la fraction microsomale.

2.2.2. Analyse statistique

Les deux méthodes sont comparées statistiquement par le test de Student, applicable aux séries appariées pour de petits échantillons (n inférieur ou égal à trente). L'hypothèse étant que les résultats obtenus par les méthodes de Bradford et de Lowry ne sont pas statistiquement différents.

$$m = T_1/n = 85,86/18 = 4,77$$

T_1 est la somme des différences pour chaque échantillon,

n est le nombre d'échantillons,

m est la moyenne estimée sur l'échantillon des n différences.

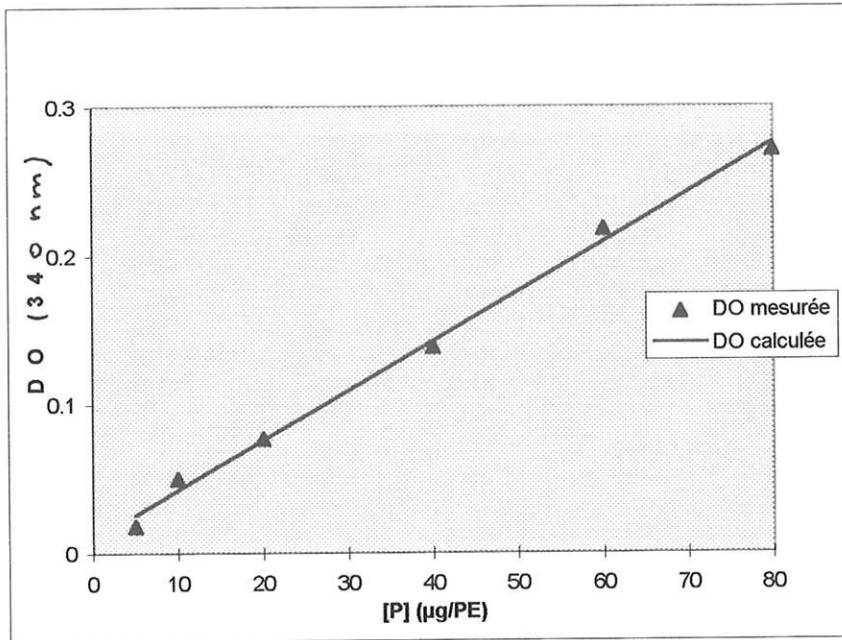


Figure 12 : Gamme d'étalonnage pour la méthode Lowry

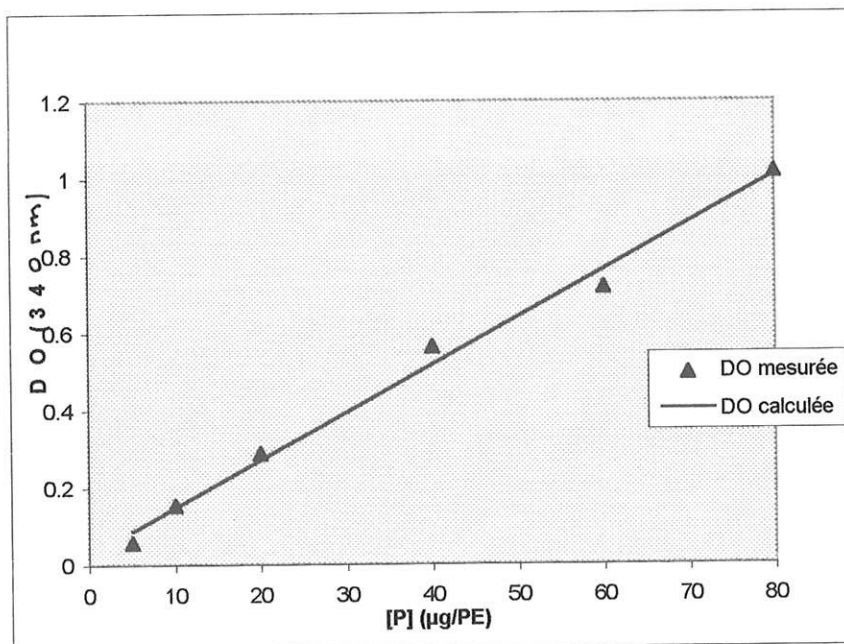


Figure 13 : Gamme d'étalonnage pour la méthode Bradford

$$s^2 = 1/(n-1) \times (T_2 - T_1^2/n) = 1/17 \times [2052,62 - (7371,93/18)]$$

$$= 96,65$$

T_2 est la somme du carré de chaque différence,

$n-1$ représente le degré de liberté (d.d.l),

s^2 est la variance estimée sur l'échantillon des n différences.

$$s^2/n = 96,65/18 = 5,37$$

$$s/\sqrt{n} = 2,32$$

s est l'écart type estimé sur l'échantillon des n différences.

$$t = \frac{m}{s/\sqrt{n}} = \frac{4,77}{2,32} = 2,056$$

t est inférieur à 2,110, valeur lue dans la table de t pour 17 d.d.l et le risque 5%.

Les résultats obtenus pour chaque échantillon ne diffèrent donc pas significativement.

Les concentrations en protéines utilisées pour la suite de notre étude sont celles calculées par la méthode de Bradford.

2.2.3. Concentrations en protéines dans les microsomes de foie
et de poumon

Tableau IV.7. : Concentrations en protéines (mg/ml) dans les microsomes de foie
et de poumon

ORGANES	GROUPES		
	I	II	III
POUMONS	5,4 ± 0,6	8,9 ± 1,1	5,4 ± 0,5
FOIE*	26,4 ± 4,3	27,3 ± 1,5	18,2 ± 1,1

*les microsomes de foie sont issus de trois groupes de rats témoins.

Les concentrations en protéines dans les microsomes de foie, organe principal dans la métabolisation des xénobiotiques, sont bien supérieures à celles mesurées dans les microsomes de poumons.

2.3. Vérification de la contamination croisée

Le degré de contamination de la fraction microsomale est estimé en mesurant les activités :

- NADPH cytochrome P450 réductase localisée spécifiquement dans le réticulum endoplasmique,

- NADH oxydase localisée spécifiquement dans la membrane interne des mitochondries.

2.3.1. *Activité NADPH cytochrome P450 réductase*

Les activités NADPH cytochrome P450 réductase ont été mesurées dans les fractions intermédiaires et les microsomes.

Ces activités sont faibles dans l'homogénat et les surnageants comparées à celles retrouvées dans les microsomes des trois groupes étudiés (Figure 14).

Les sédiments, après les deux ultracentrifugations, sont enrichis en NADPH cytochrome P450 réductase ce qui nous permet de conclure qu'il s'agit bien de microsomes.

Tableau IV.8. : Activité NADPH cytochrome P450 réductase dans les organes de rats témoins

AE	MICROSOMES		
	POUMON	FOIE	CERVEAU*
NADPH cytochrome P450 réductase	0,57 ± 0,23	1,66 ± 0,10	0,27 ± 0,05

*D'après Lagrange, 1996

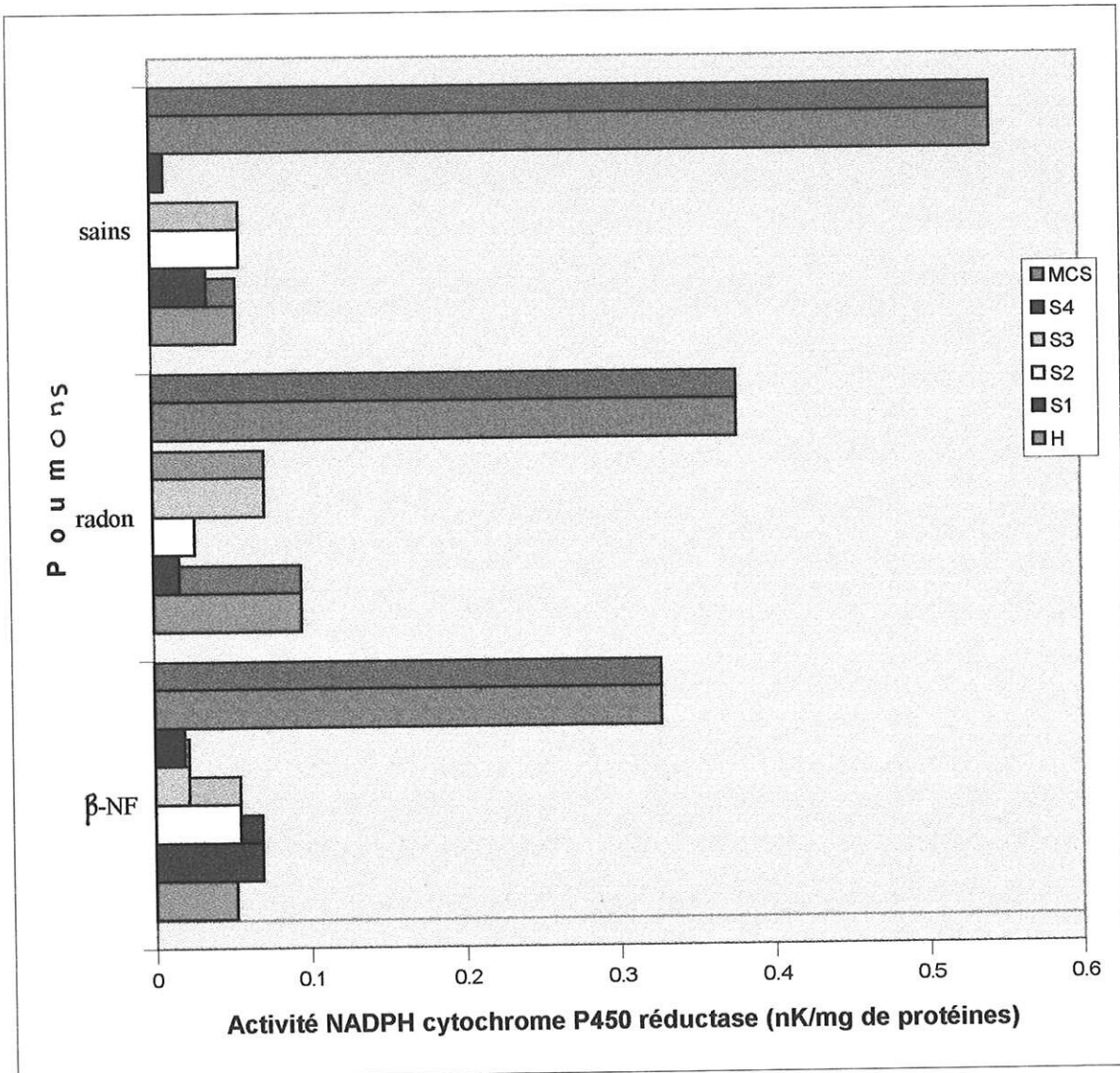


Figure 14 : Activité NADPH cytochrome P450 réductase dans les groupes étudiés

L'activité NADPH cytochrome P450 dans les microsomes de poumon est donc trois fois plus faible que celle mesurée dans les microsomes de foie, ce qui peut s'expliquer par le rôle important du foie dans la détoxification. Elle est deux fois plus importante que celle enregistrée dans le cerveau, organe protégé par la barrière hémato-encéphalique.

2.3.2. Activité NADH oxydase

Les courbes obtenues pour l'homogénat et les quatre surnageants ne correspondent pas à une cinétique d'enzymes interprétable ; le calcul d'une activité enzymatique n'est donc pas possible (Figure 15).

Les activités NADH oxydase sont donc uniquement mesurées dans les trois groupes de microsomes. Le calcul s'effectue dans la partie linéaire de la courbe (Figure 16).

2.3.3. Comparaison des activités réductase et oxydase

Les résultats obtenus dans les trois groupes sont présentés dans le tableau IV.9.

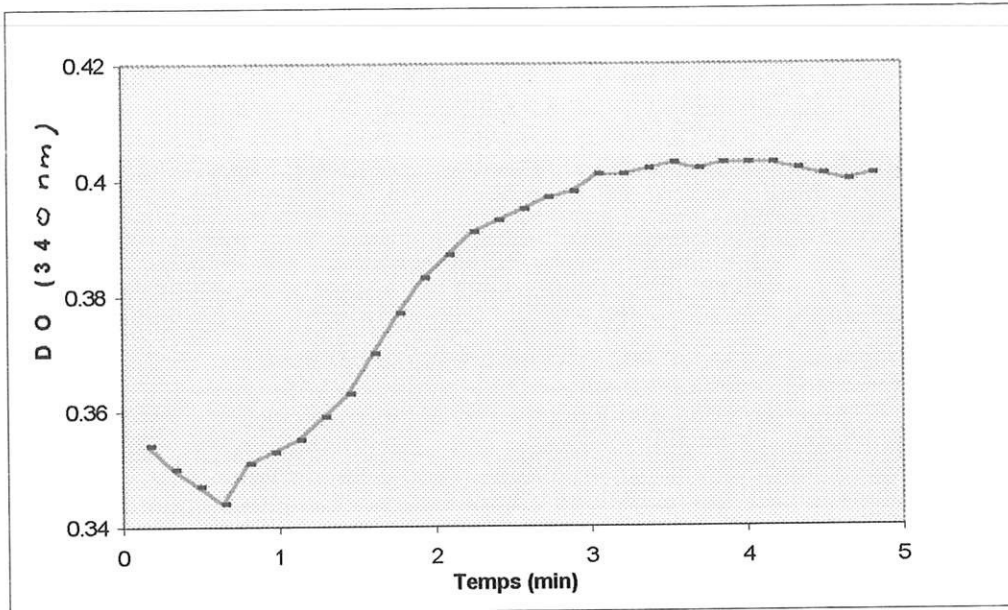


Figure 15 : Activité NADH oxydase dans la fraction S2 du groupe II

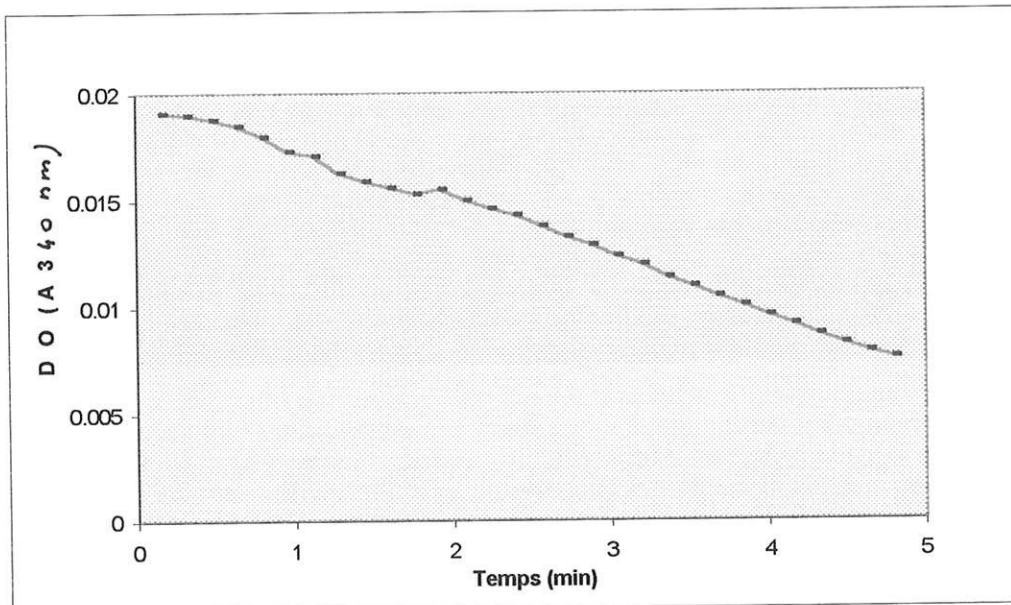


Figure 16 : Activité NADH oxydase dans les microsomes de poumons sains

Tableau IV.9. : Activités enzymatiques (nK/mg de P) des fractions microsomales

MICROSOMES DE POUMONS		
	Activité de la NADH oxydase	Activité de la NADPH cytochrome P450 réductase
Groupe I	0,073 ± 0,015	0,543 ± 0,230
Groupe II	0,054 ± 0,011	0,327 ± 0,100
Groupe III	0,088 ± 0,021	0,377 ± 0,006

Les rapports des activités enzymatiques montrent une très faible activité NADH oxydase (Figure 17).

L'activité NADPH cytochrome P450 est sept fois et demi plus importante que l'activité NADH oxydase dans le Groupe I, six fois plus forte dans le Groupe II et quatre fois plus élevée dans les microsomes du Groupe III.

La contamination croisée dans les microsomes des trois groupes étudiés est donc acceptable.

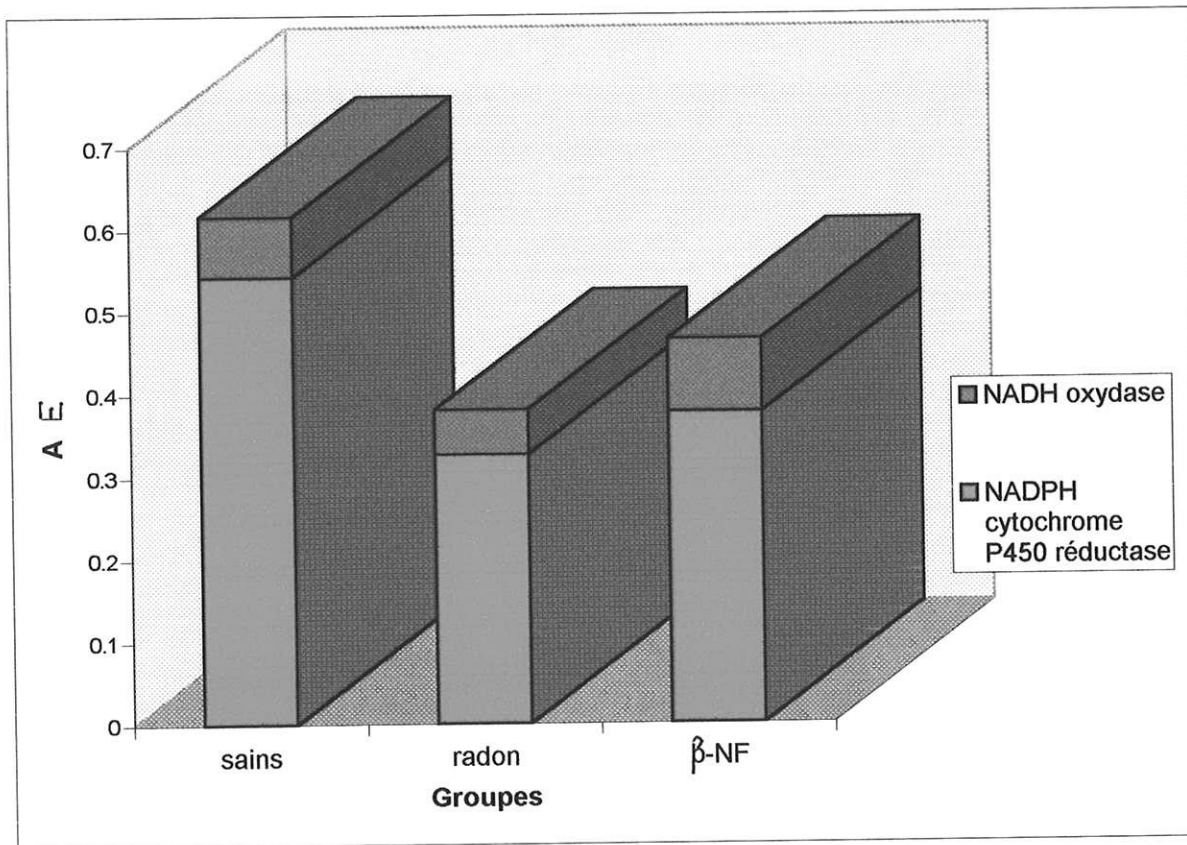


Figure 17 : Comparaison des activités oxydase et réductase dans les trois groupes d'animaux

2.4. Activité éthoxyrésorufine-*O*-déalkylase dépendante de la sous famille 1A1 du cytochrome P450

2.4.1. Réalisation de la courbe d'étalonnage

Pour des concentrations en résorufine inférieures à 1,2 nmol/l aucune fluorescence n'est détectable (Tableau IV.10.). Cette valeur constitue donc la limite inférieure de détection du spectrofluorimètre.

Lorsque la concentration en résorufine devient supérieure à 21,3 nmol/l le pourcentage de fluorescence n'augmente plus. Cette concentration indique donc la limite supérieure de détection de l'appareil.

Tableau IV.10. : Détermination des valeurs seuils de détection du spectrofluorimètre

Résorufine (nM)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	4	8	12	16	21,3	26,6	32
% fluorescence	0	0	0	0	0,5	3	6,5	9,5	11,5	14,5	14,5	14,5

La gamme étalon a donc été réalisée à partir de la solution de résorufine pour des concentrations comprises entre 1,2 et 21,3 nM (Figure 18).

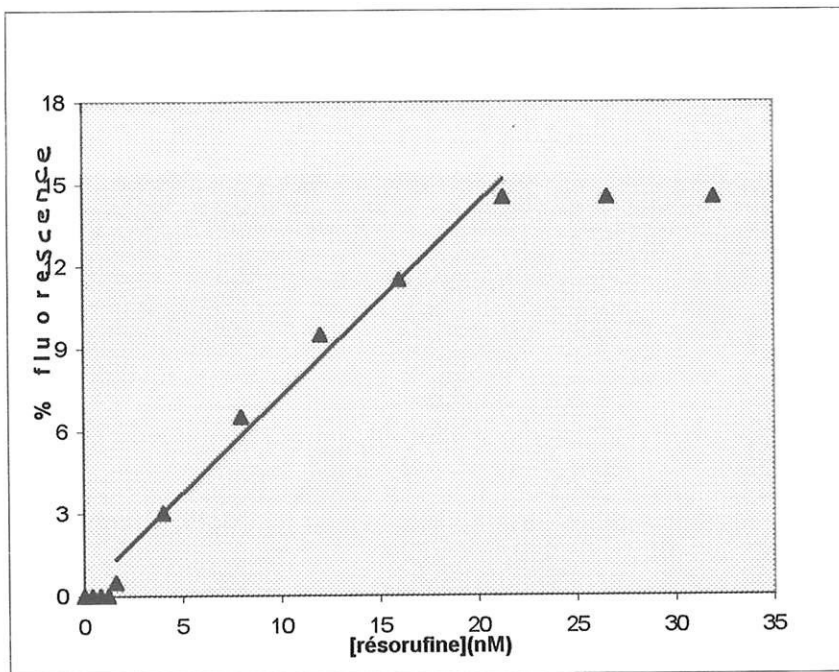


Figure 18 : Gamme étalon de la résorufine

*2.4.2. Mesure des activités éthoxyrésorufine-O-déalkylase dans
les différents groupes*

Les activités EROD sont caractéristiques de la sous famille 1A1 du cytochrome P450 (Burke et Mayer, 1974).

Les activités EROD sont calculées en convertissant la fluorescence détectée au cours de la réaction enzymatique en concentration de résorufine à l'aide de la droite d'étalonnage.

Aucune activité EROD (Figure 19) n'a pu être détectée dans le Groupe I (poumons sains) ni dans le Groupe II (poumons radon).

Dans le groupe III, une importante activité EROD est enregistrée (Figure 20).

Après vingt cinq minutes de mesure, la limite supérieure de détection est atteinte . La poursuite de l'enregistrement est donc inutile. Les activités EROD sont calculées à partir des quantités de résorufine détectées aux temps 0, 5, 10, 15 et 20 minutes après le déclenchement de la réaction.

L'activité EROD mesurée dans les microsomes du Groupe III est de 51,1 pK/mg de protéines.

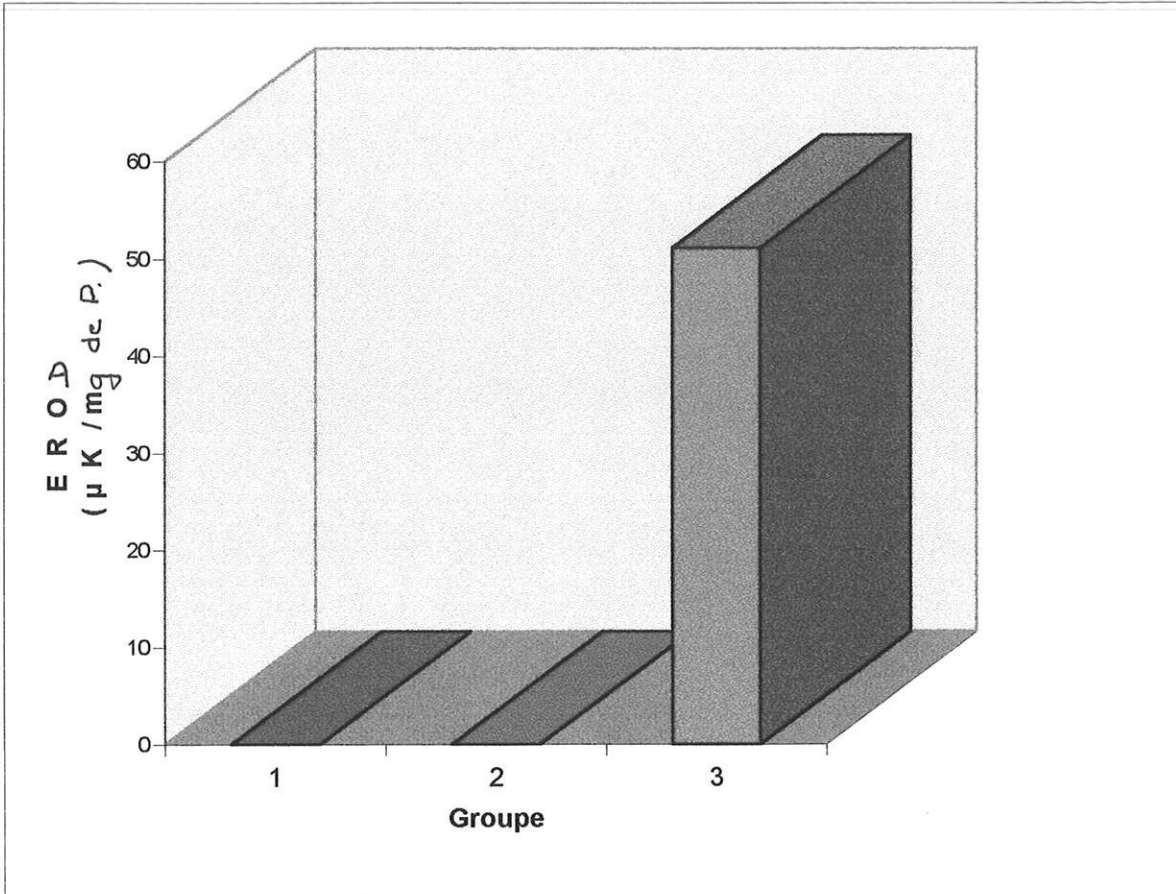


Figure 19 : Activité EROD dans les trois groupes étudiés

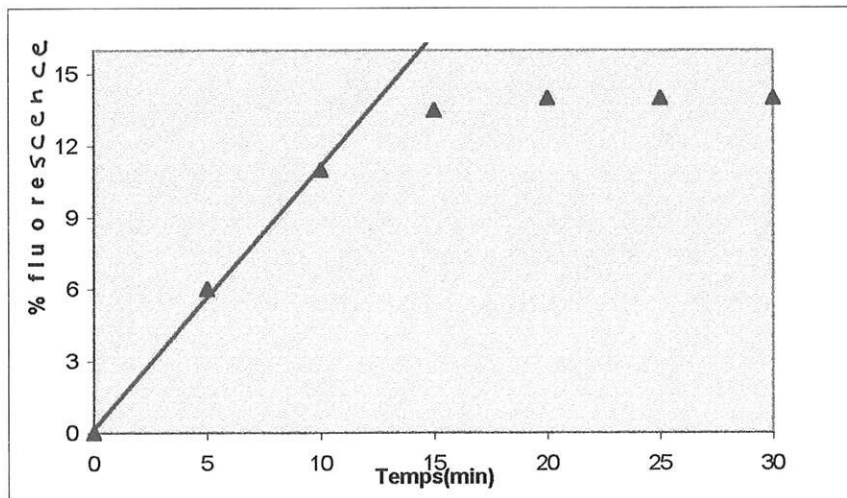


Figure 20 : Activité EROD dans les microsomes du groupe III

3. DISCUSSION

3.1. Dosage des protéines

La méthode décrite par Bradford est adaptée à la détermination des faibles concentrations en protéines dans les microsomes de poumon. Elle a pour avantage d'être simple et rapide en n'utilisant qu'un seul réactif et peu de microsomes.

Les concentrations en protéines dans les microsomes de foie ont été déterminées pour des rats sains à titre de témoins.

Les résultats obtenus dans les microsomes de foie et de poumons sont comparables à ceux publiés par Mettler (Mettler *et coll.*, 1987) dans son groupe contrôle.

3.2. Contamination des microsomes

L'activité NADPH cytochrome P450 réductase est plus élevée que l'activité NADH oxydase dans les trois groupes.

L'adaptation de la méthode de préparation des microsomes de foie de lapin, initialement décrite par Van der Hoeven et Coon (1974), est validée pour le tissu pulmonaire car nous avons bien obtenu des microsomes dans les derniers sédiments.

Toutefois, l'isolement de la fraction mitochondriale, à partir des sédiments éliminés au cours des deux premières centrifugations, aurait permis de

mesurer le pourcentage d'activité de la NADH oxydase mitochondriale dans la fraction microsomale et d'affiner ainsi la comparaison.

Les activités NADH oxydase mesurées varient d'un groupe de microsomes à l'autre mais cette activité reste faible en comparaison des activités NADPH cytochrome P450 réductase. Les fractions mitochondriales contaminant les microsomes ne peuvent donc pas faire varier significativement l'activité EROD.

Les activités NADH oxydase et NADPH cytochrome P450 réductase ne sont modifiées ni par l'exposition au radon ni par l'administration de β -NF.

3.3. Les activités éthoxyrésorufine-*O*-déalkylase

L'absence d'une activité EROD dans le Groupe II indique qu'il n'existe probablement pas d'augmentation des activités dépendantes de la sous famille 1A1 du cytochrome P450 immédiatement après l'exposition à une dose cumulée de radon d'environ 1000 WLM.

Le radon seul n'est donc pas un inducteur de ces hémoprotéines ce qui confirme les travaux de Douriez et coll. (1994).

Toutefois, une activité enzymatique produisant des quantités de résorufine faibles (inférieures à la limite de détection de l'appareil) peut exister. Le confinement des animaux en animalerie (faible exposition aux inducteurs naturels) pourrait expliquer cette faible activité.

Les résultats enregistrés dans le Groupe III (poumons β -NF) montrent une activité EROD importante, témoignant de l'induction des cytochromes P450 impliqués.

L'activité EROD mesurée dans le groupe III (51,1 pK/mg de protéine) est supérieure à celle enregistrée par Douriez et coll. (1994) qui est de 1,4 pK/mg de protéine. Cependant les animaux ont été sacrifiés par ces auteurs quatre semaines après la fin du traitement, alors que nos microsomes ont été réalisés une semaine après la dernière injection. L'effet inducteur de la β -NF pourrait donc diminuer dans le temps.

L'étude des activités EROD aurait du être entreprise après avoir déterminé la quantité totale de cytochrome P450 dans les microsomes, afin de déterminer si l'augmentation des activités EROD est due à une augmentation d'activité enzymatique ou à une synthèse accrue de cytochrome P450. Cette quantité est déduite du spectre tracé entre 350 et 550 nm après la formation du complexe oxyde de carbone (CO)-P450 et sa réduction par le dithionite de sodium.

4. CONCLUSIONS-PERSPECTIVES DE L'ETUDE

Au cours de ces travaux nous avons adapté la méthode d'isolement des fractions microsomales au tissu pulmonaire. Les microsomes obtenus sont peu contaminés par les fragments mitochondriaux.

La méthode de Bradford est adaptée au dosage des protéines dans ces fractions subcellulaires.

Les activités EROD sont probablement très faibles dans les lots témoins. Cependant, ces activités sont fortement augmentées chez les animaux traités par la β -NF et cette induction diminue dans le temps dès la fin du traitement. Enfin, le radon seul n'est pas un inducteur de l'isoforme 1A1 du cytochrome P450.

Ce travail sera complété par une recherche de l'apparition de tumeurs bronchiques dans tous les groupes d'animaux utilisés (étude histologique). Un groupe supplémentaire d'animaux exposés au radon puis traités par la β -NF sera inclus afin d'étudier les variations des activités EROD et la rapidité d'apparition des tumeurs bronchiques dans ces conditions.

Enfin, l'effet des inducteurs de l'activité EROD sera complétée par une étude de la quantité de cytochrome P450 1A1 à l'aide d'anticorps spécifiques.

CONCLUSION

Si le rôle carcinogène du radon est désormais parfaitement établi, la cible exacte des particules α n'est toujours pas connue avec précision. Le radon seul n'induit pas le cytochrome P450 1A1 mais les rats traités par un inducteur spécifique font des tumeurs pulmonaires de façon précoce après leur exposition. Le cytochrome P450 1A1 aurait donc un effet cocarcinogène.

Les anomalies génétiques répétées issues de la transformation des xénobiotiques ou provenant de l'action des rayonnements ionisants conduisent à la cancérogenèse.

La séquence d'intervention des différents événements génétiques, en corrélation avec les stades morphologiques précoces de la transformation maligne, reste à découvrir.

Même si des progrès significatifs ont été accomplis dans la description des mécanismes génétiques conduisant à l'apparition du cancer du poumon chez l'animal, une meilleure connaissance des cibles spécifiques de chaque carcinogène semble indispensable avant que l'on puisse espérer que la "thérapie génique" améliore la survie des malades.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abelson P.H.

Uncertainties about health effects of Radon.

Science 1990 ; 250 :353.

2. Abelson P.H.

Mineral dusts and radon in uranium mines.

Science 1991 ; 254 : editorial 777.

3. Agricola G.

De Re Metallica.

Bâle, 1597 , traduit par Hoover

Dover publications , New York, 1950.

4. Andersson M, Wallin H, Jönsson M, Nielsen L.L, Visfeldt J, Vyberg M, Bennett W.P, De Benedetti V.M.G, Travis L.B et Storm H.H.

Lung carcinoma and malignant mesothelioma in patients exposed to thorotrast : incidence, histology and p53 status.

Int.J.Cancer 1995 ; 63 : 330-336.

5. Archer V.E, Saccomanno G et Jones J.H.

Frequency of different histologic types of bronchogenic carcinoma as related to radiations exposure.

Cancer 1974 ; 34 : 2056-2060.

6. Archer V.E.

Enhancement of lung cancer by cigarette smoking in uranium and other miners.

Carcinogenesis 1985 ; 8 : 23-37.

7. Baldwin F, Hovey A, McEwen T, O'Connor, Unruh H et Bowden D.H.

Surface to nuclear distances in human bronchial epithelium : relationships to penetration by Rn daughters.

Health Physics 1991 ; 60 : 155-162.

8. Bonnaud F.

Tumeurs expérimentales. Modifications anatomopathologiques pulmonaires et lymphoïdes engendrées chez le rat par des inhalations de radon 222 et ses produits de filiation.

Thèse de doctorat en Médecine. Limoges 1976 n°26 ; 60 p.

9. Bowie C et Bowie S.H.U.

Radon and health.

Lancet 1991 ; 337 : 409-413.

10. Bradford M.M.

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding.

Analytical biochemistry. 1976 ; 72 : 248-254.

11. Brambilla E, Gouyer V, Gazzeri S, Bolon I et Brambilla C.

Mécanismes de la carcinogenèse bronchique.

Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Pneumologie, 6-002-G-25, 1996, 12 p.

12. Brenner D.J, Miller R.C, Huang Y et Hall .

The biological effectiveness of Radon-progeny alpha particles. III. Quality factors.

Radiation Research 1995 ; 142 : 61-69.

13. Burke M D et Mayer R.T.

Ethoxyresorufin : Direct fluorimetric assay of a microsomal *O*-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene.

Drug Metab Dispos. 1974 ;2 : 583-588.

14. Chmelevsky D, Barclay D, Kellerer A.M, Tomasek L, Kunz E et Placek V.

Probability of causation for lung cancer after exposure to radon progeny : a comparison of models and data.

Health Physics 1994 ;67 : 15-23.

15. Clarke R.H et Southwood T.R.E.

Risks from ionizing radiations.

Nature 1989 ;338 : 197-198.

16. COGEMA

Dossier d'informations : sites miniers COGEMA et stockages des résidus.
1991.

17. Council of scientific affairs.

Radon in homes.

JAMA 1987 ;258 : 668-672.

**18. Douriez E, Kermanac'h P, Fritsch P, Bisson M, Morlier J.P,
Monchaux G et Laurent P.**

Cocarcinogenic effect of cytochrome P450 1A1 inducers for epidermoid lung tumor induction in rats previously exposed to radon.

Radiation protection dosimetry. 1994 ;56 : 105-108.

19. Dupree E.A, Watkins J.P, Ingle J.N, Wallace P.W, West C.M et Tankersley W.G.

Uranium dust exposure and lung cancer risk in four uranium processing operations.

Epidemiology 1995 ; 6 : 370-375.

20. Durante M, Grossi G.F, Gialanella G, Pugliese M, Nappo M et Yang T.C.

Effects of alpha particles on survival and chromosomal aberrations in human mammary epithelial cells.

Radiat. Environ. Biophys 1995 ; 34 : 195-204.

21. Eichler B.

Tumeurs expérimentales. Incidence pulmonaire, ganglionnaire et splénique du radon 222 et de ses produits de filiation chez le rat. Corrélation immun-anatomo-pathologiques.

Thèse de doctorat en Médecine. Limoges 1980 ; 134 p.

22. Eisenbud M.

Environmental radioactivity : from natural, industrial, and military sources.

3rd ed. (Academic Press, 1987).

23. Elkind M.M.

Radon-induced cancer : a cell-based model of tumorigenesis due to protracted exposures.

Int.J.Radiat.Biol. 1994 ; 66 : 649-653.

24. Godden P.M.M., Kass G., Mayer R.T. et Burke M. D.

The effects of cigarette smoke compared to 3-methylcholanthrene and phenobarbitone on alkoxyresorufin metabolism by lung and liver micosomes from rats.

Biochemical Pharmacology.1987 ; 36 : 3393-3398

25. Guengerich F.P.

Analysis and characterization of enzymes.

Principles and methods of toxicology. Edited by Wallace Hayes. New York. 1994

26. Hart B.L, Mettler F.A et Harley N H.

Radon : is it a problem ?

Radiology 1989 ; 172 : 593-599.

27. Harting F.H et Hesse W.

Der lungenkrebs, die bergkrankheit in der schneeberger gruben.

Vischr. Geriche. Med. Offen Sanitäts, 1879 ; 30 : 269

28. Hayashi S, Watanabe J, Nakashi K et Kawajiri K.

Genetic linkage of lung cancer associated Mspl polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450 1A1 gene.

J. Biochem., 1991 ; 110 : 407-411.

29. Hofmann W, Katz R et Chunxiang Z.

Lung cancer risk at low doses of alpha particles.

Health Physics 1986 ; 51 : 457-468.

30. Holaday D.A.

History of the exposure of miners to radon.

Health Physics 1969 ; 16 : 547-552.

31. Hornung R.W, Deddens J et Roscoe R.

Modifiers of exposure-response estimates for lung cancer among miners exposed to radon progeny.

Environmental Health Perspectives 1995 ; 103 : 49-53.

32. Hornung R.W et Meinhardt T.J.

Quantitative risk assessment of lung cancer in U.S uranium miners.

Health Physics 1987 ; 52 : 417-430.

33. Ishikawa Y, Mori T, Kato Y, Tsuchiya E, Machinami R, Sugano H et Kitagawa T.

Lung cancers associated with thorotrast exposure : high incidence of small-cell carcinoma and implications for estimation for radon risk.

Int.J.Cancer 1992 ; 52 : 570-574.

34. Jenks S.

Researchers open a molecular window on radon damage in lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1992 ; 84 : 473-474.

35. Kelly G, Stegelmeier B.L et Hahn F.F.

p53 alterations in plutonium-induced F344 rat lung tumors.

Radiation Research 1995 ; 142 : 263-269.

36. Kendall G.M, Muirhead C.R, MacGibbon B.H, O'Hagan J.A, Conquest A.J, Goodill A.A, Butland B.K, Fell T.P, Jackson D.A, Webb M.A, Haylock R.G.E, Thomas J.M et Silk T.J.

Mortality and occupational exposure to radiation : first analysis of the National Registry for Radiation Workers.

BMJ 1992 ; 304 : 220-225.

37. Kerr R.A.

Indoor radon : the deadliest pollutant.

Science 1988 ; 240 : 606-608.

38. Kohn H.I et Fry R.J.M.

Radiation carcinogenesis.

The New England Journal of Medicine 1984 ; 310 :504-509.

39. Kusiak R.A, Ritchie A.C, Muller J et Springer J.

Mortality from lung cancer in Ontario uranium miners.

British Journal of Industrial Medicine 1993 ; 50 : 920-928.

40. Kusiak R.A, Springer J, Ritchie A.C et Muller J.

Carcinoma of the lung in Ontario gold miners : possible aetiological factors.

British Journal of Industrial Medicine 1991 ; 48 : 808-817.

41. L'Abbé K.A, Howe G.R, Burch J.D, Miller A.B, Abbatt J, Band P, Choi W, Du J, Feather J, Gallagher R, Hill G et Matthews V.

Radon exposure, cigarette smoking, and other mining experience in the beaverlodge uranium miners cohort.

Health Physics 1991 ; 60 : 489-495.

42. Lagrange P.

Production de superoxydes en présence de xénobiotiques par les préparations de cerveau de rats et conséquences.

Thèse de doctorat Université Nancy (1996).

43. Land C.E, Shimosato Y, Saccomanno G, Tokuoka S, Auerbach O, Tateishi R, Greenberg S.D, Nambu S, Carter D, Akiba S, Keehn R, Madigan P, Mason T.J et Tokunaga M.

Radiation-associated lung cancer : a comparison of the histology of lung cancers in uranium miners and survivors of the atomic bombings of Hiroshima and Nagasaki.

Radiation Research 1993 ; 134 : 234-243.

44. Little J.B.

Low-dose radiation effects : interactions and synergism.

Health Physics 1990 ; 59 : 49-55.

45. Lowder W.M.

The effects of human activities on natural radiation exposure : health and regulatory implications.

The Science of the Total Environment 1985 ; 45 : 579-583.

46. Lubet R.A., Mayer R.T., Cameron J. W, Nims R. W., Burke M.D, Wolff T. et Guengerich F.P.

Dealkylation of pentoxyresorufin : a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat.

Archives of Biochemistry and Biophysics. 1985 ; 238 : 43-48.

47. Mac Coy G.W.

Rapport préliminaire sur les tumeurs trouvées chez les rats sauvages.

J. Med. Research. 1909 ; 21 : 285.

48. Maitre B et Housset B

Métabolisme des cellules épithéliales trachéobronchiques.

Encycl Méd Chir (Elsevier , Paris), Pneumologie, 6-000-A-62 , 1996, 4p.

49. Masse R, Morlier J.P, Morin M, Chameaud J, Bredon P et Lafuma J.

Animals exposed to radon .

Radiation protection dosimetry. 1992 ; 45 : 603-610.

50. Mays C.W.

Alpha-particle-induced cancer in humans.

Health Physics 1988 ; 55 : 637-652.

51. Menard O, Scheid P, Anthoine D et Martinet Y.

Radon et cancer bronchique primitif.

Rev.Mal.Resp. 1994 ; 11 : 531-545.

52. Mettler N.R., Yano S. et Kikkawa Y.

Effects of poly I : poly C on rat pulmonary and hepatic cytochromes P-450 and b_5

Biochemical Pharmacology. 1987 ; 36 : 3873-3878.

53. Mikani S, Ringler R.L et Singer T.P.

Studies of the respiratory-chain-linked dihydrodiphospho-NADH oxydase pyridine nucleotide deshydrogenase.

J. Biol. Chem. 1976 ; 237 : 55-61.

54. Miller R.C, Marino S.A, Brenner D.J, Martin S.G, Richards M, Randers-Pehrson G et Hall E.J.

The biological effectiveness of radon-progeny alpha particles. II. Oncogenic transformation as a function of linear energy transfer.

Radiation Research 1995 ; 142 : 54-60.

55. Moolgavkar S.H, Luebeck E.G, Krewski D et Zielinski J.M.

Radon, cigarette smoke, and lung cancer : a re-analysis of the Colorado plateau uranium miners' data.

Epidemiology 1993 ; 4 : 204-217.

56. Morrison H.I, Semenciw R.M, Mao Y et Wigle D.T.

Cancer mortality among a group of fluorspar miners exposed to Radon progeny.

Am. J. of Epidemiol 1988 ; 128 : 1266-1275.

57. Nebert D.W et Gonzalez F.J.

P450 genes : Structure, evolution, and regulation.

Ann. Rev. Biochem. 1987 ; 56 : 945-993.

58. Nelson D.R, Kamataki T, Waxman D.J, Guengerich F.P, Estabrook R.W, Feyereisen R, Gonzalez F.J, Coon M.J, Gunsalus I.C, Gotoh O, Okuda K et Nebert D W.

The P-450 superfamily : Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature.
DNA and Cell Biology.1993 ; 12 : 1-51.

59. Nemery B.

Principles de toxicologie pulmonaire.
Encycl. Med. Chir. 1994 Pneumologie, 6-019-A-38, 8p.

60. Okey A.B.

Enzyme induction in the cytochrome P-450 system.
*Pharmac. Ther.*1990 ; 45 : 241-298.

61. Perraud R, Chameaud J, Lafuma J, Masse R et Chrétien J.

Cancer broncho-pulmonaire expérimental du rat par inhalation de radon.
Comparaison avec les aspects histologiques humain.
J Franç. Méd Chir Thorac. 1972 ;26 : 25-41.

62. Pershagen G, Akerblom G, Axelson O, Clavensjö B, Damber L, Desai G, Enflo A, Lagarde F, Mellander H, Svartengren et Swedjemark A.

Residential radon exposure and lung cancer in Sweden.
The New England J. of Medicine 1994 ; 330: 159-164.

63. Petersen G.R.

A case-cohort study of lung cancer, ionizing radiation, and tobacco smoking among males at the Hanford site.

Health Physics 1990 ; 58 : 3-11.

64 .Peto J.

Radon and the risks of cancer.

Nature 1990 ; 345 : 389-390.

65. Queval P., Beaumatin J., Morin M., Courtois D. et Lafuma J.

Inducibility of microsomal enzymes in normal and pre-cancerous lung tissue. Synergistic action of 5-6 benzo-flavon or methyl-cholanthrene in radiation induced carcinogenesis.

Biomedicine.1979 ; 31 : 182-186.

66. Queval P. et Beaumatin J.

Etude comparée de l'induction de la benzopyrène-hydroxylase au niveau du foie et dupoumon.

Rev. fr. Mal. Resp. 1978 ; 6 : 191-194.

67. Radford E.P et St. Clair Renard K.G.

Lung cancer in swedish iron miners exposed to low doses of radon daughters.

The New England J. of Medicine 1984 ; 310 : 1485-1494.

68. Reineking a, Becker K.H, Porstendörfer J.

Measurements of the activity size distributions of the short-lived radon daughters in the indoor and outdoor environment.

Radiat. Prot. Dosim. ,1988 ; 24 : 245-250.

69. Renoux A et Tymen G.

Le radon et ses descendants radioactifs à l'intérieur des habitations.

Pollution Atmosphérique 1988 ; : 181-189.

70. Renoux A et Tymen G.

Le radon : dose / effet.

Pollution Atmosphérique 1990 ; 45 : 167-177.

71. Rodenhuis S et Slebos RJ.

Significance of ras oncogene activation in human lung cancer.

Cancer Res 1992 ; 52 : 2665-2669

72. Roscoe R.J, Steeland K, Halperin W.E, Beaumont J.J et Waxweiler R.J.

Lung cancer mortality among nonsmoking uranium miners exposed to radon daughters.

JAMA 1989 ; 262 : 629-633.

73. Roscoe R.J, Deddens J.A, Salvan A et Schnorr T.M.

Mortality among Navajo uranium miners.

American Journal of Public Health 1995 ; 85 :535-540.

**74. Rutten A.A.J.J.L, Falke H.E, Catsburg J.F, Wortelboer H.M,
Blaauboer B.J, Doorn L, Van Leeuwen F.X.R, Theelen R et Rietjens
I.M.C.M.**

Interlaboratory comparison of microsomal pentoxyresorufin O-dealkylation determinations : standardization of assay conditions.

*Arch.Toxicol.*1992 ;66 : 237-244.

75. Samet J.M.

Diseases of uranium miners and other underground miners exposed to radon.

Occupational Medicine : State of the Art Reviews 1991 ; 6 :629-639.

76. Samet J.M, Pathak D.R, Morgan M.V, Key C.R, Valdivia A.A et Lubin J.H.

Lung cancer mortality and exposure to radon progeny in a cohort of New Mexico underground uranium miners.

Health Physics 1991 ; 61 : 745-752.

77. Samet J.M.

Radon and lung cancer.

J. Natl. Cancer Inst. ,1989 ; 81 : 745-757.

78. Samet J.M, Kutvirt D.M, Waxweiler R.J et Key C.R.

Uranium mining and lung cancer in Navajo men.

The New England Journal of Medicine 1984 ; 310 :1481-1484.

79. Schüttmann W.

Schneeberg lung disease and uranium mining in the Saxon Ore Mountains (Erzgebirge).

American Journal of Industrial Medicine 1993 ; 23 : 355-368.

80. Soucek P. et Gut I.

Cytochromes P-450 in rats : structures, functions, properties and relevant human forms.

Xenobiotica.1992 ; 22 : 83-103.

81. Steeland K.

Age specific interactions between smoking and radon among United States uranium miners.

Occupational and Environmental Medicine 1994 ; 51 : 192-194.

82. Strobel D.W et Dignam J.D.

Methods in enzymology.

Fleischer SE ed. Academic Press, New York 1980.

83. Taylor JA, Watson MA, Devereux TR, Michels RX, Saccomano G et Anderson M.

p53 mutation hotspot in radon-associated lung cancer.

The Lancet 1994 ; 343 : 86-87.

84. Thomas D, Pogoda J, Langholz B et Mack W.

Temporal modifiers of the radon-smoking interaction.

Health Physics 1994 ; 66 : 257-262.

85. Tirmarche M, Raphalen A et Chameaud J.

Epidemiological study of french uranium miners.

Cancer Detection and Prevention 1992 ; 16 : 169-172.

86. Tirmarche M, Raphalen A , Allin F, Chameaud J et Bredon P.

Mortality of a cohort of French uranium miners exposed to relatively low radon concentrations.

Br. J. Cancer 1993 ; 67 : 1090-1097.

87. Tomasek L, Darby S.C, Swerdlow A.J, Placek V et Kunz E.

Radon exposure and cancers other than lung among uranium miners in West Bohemia.

The Lancet 1993 ; 341 : 919-923.

88. Tomasek L, Swerdlow A.J, Darby S.C, Placek V et Kunz E.

Mortality in uranium miners in West Bohemia : a long term cohort study.

Occupational and Environmental Medicine 1994 ; 51 : 308-315.

89. Tomasek L et Darby S.C.

Recent results from the study of West Bohemian uranium miners exposed to radon and its progeny.

Environmental Health Perspectives 1995 ; 103 :55-57.

90. Tymen G.

Caractérisation des descendants du radon.

Pollution Atmosphérique 1992 ; :36-47.

91. Vähäkangas K.H, Samet J.M, Metcalf R.A, Welsh J.A, Bennett W.P, Lane D.P et Harris.C.C.

Mutations of p53 and *ras* genes in radon-associated lung cancer from uranium miners.

The Lancet 1992 ; 339 :576-580.

92. Van der Hoeven T.A. et Coon M.J.

Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes .

The Journal of Biological Chemistry.1974 ; 249 : 6302-6310.

93 .Villard P.H, Seree E, Lacarelle B, Therene-Fenoglio M.C, Barra Y, Anttolini L, Bruguerole B, Durand A et Catalin J.

Effect of cigarette smoke on hepatic and pulmonary cytochromes P-450 in mouse : evidence for CYP 2E1 induction in lung.

Biochemical and biophysical research communications.1994 ; 202 : 1731-1737.

94. Wattenberg L.W, Page M.A et Leong J.L.

Induction of increased benzpyrene hydrolase activity by flavones and related compounds.

Cancer Res. 1968 ; 28 : 934-937.

95. Weibert E.R.

Morphometry of the human lung.

Berlin, Springer Verlag Editions, 1983.

96. Wilkinson G.S, Tietjen G.L, Wiggs L.D, Galke W.A, Acquavella J.F, Reyes Voelz G.L et Waxweiler R.J.

Mortality among plutonium and other radiation workers at a plutonium weapons facility.

American Journal of Epidemiology 1987 ; 125 :231-250.

97. Woodward A, Rodger D, McMickael A.J, Crouch P et Mylvaganam A.

Radon daughter exposures at the Radium Hill uranium mine and lung cancer rates among former workers, 1952-87.

Cancer Causes and Control 1991 ; 2 :213-220.

98. Xiang-Zhen X, Lubin J.H, Jun-Yao L, Li-Fen Y, Sheng L.Q, Lan Y, Jian-Zhang W et Blot W.J.

A cohort study in Southern China of tin miners exposed to radon and radon decay products.

Health Physics 1993 ; 64 :120-131.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	18
 Chapitre I	
RAPPELS DE PHYSIQUE ATOMIQUE ET NUCLEAIRE.....	22
 <u>1. STRUCTURE DE L'ATOME ET DU NOYAU</u>	
	23
 <u>2. STABILITE NUCLEAIRE</u>	
	24
 <u>3. LES TRANSFORMATIONS RADIOACTIVES</u>	
	25
3.1. Les transformations isobariques.....	25
3.1.1. <i>L'émission β^-</i>	27
3.1.2. <i>L'émission β^+ et la capture électronique</i>	27
3.2. Les transformations par partition.....	28
3.2.1. <i>L'émission α</i>	28
3.2.2. <i>La fission spontanée</i>	28
3.3. Les transformations isomériques.....	29
3.3.1. <i>L'émission γ</i>	29
3.3.2. <i>La conversion interne</i>	29

<u>4. RADIOACTIVITES NATURELLE ET ARTIFICIELLE</u>	29
4.1. La radioactivité naturelle.....	29
4.2. La radioactivité artificielle.....	30
<u>5. UNITES DE MESURE ET D'EXPOSITION</u>	30
5.1. Unités d'activité.....	30
5.2. Unités d'exposition.....	31
<u>6. EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS</u>	32
6.1. Les phénomènes moléculaires.....	32
6.1.1. <i>Les mécanismes d'altération de type direct</i>	32
6.1.2. <i>Les mécanismes d'altération de type indirect</i>	33
6.1.3. <i>L'effet oxygène</i>	35
6.1.4. <i>Action des radiations ionisantes sur les acides nucléiques</i>	35
6.1.5. <i>Mécanismes de réparation des acides nucléiques</i>	36
6.2. Les phénomènes cellulaires.....	37
6.2.1. <i>Effets des radiations ionisantes sur les cellules qui se divisent</i>	37
6.2.2. <i>Effets des radiations ionisantes sur les cellules différenciées</i>	39
6.3. Influence de la nature du rayonnement.....	40
6.4. Effets tissulaires.....	41

Chapitre II

LE RADON	42
<u>1. DONNEES PHYSIQUE</u>	43
1.1. Origine physique du radon.....	43
1.2. Devenir du radon inhalé.....	43
<u>2. GEOLOGIE DU RADON</u>	48
<u>3. RADON ET RADIOACTIVITE NATURELLE</u>	49
<u>4. RADON ET CANCER</u>	50
4.1. Etudes épidémiologiques sur les populations de mineurs.....	51
4.2. Anatomie pathologique.....	53
4.3. Biologie moléculaire.....	53
4.4. Modèles expérimentaux.....	56
<u>5. RADON ET EXPOSITION DOMESTIQUE</u>	58

Chapitre III**LES CYTOCHROMES P450.....60****1. CARACTERISTIQUES DES CYTOCHROMES P450.....63****2. INDUCTION DU CYTOCHROME P450 1A1.....67****Chapitre IV****ETUDE EXPERIMENTALE.....71****1. MATERIEL ET METHODES.....72**

1.1. Les animaux.....72

1.2. Préparation des microsomes pulmonaires.....73

1.2.1. Principe.....73

1.2.2. Méthode.....73

1.3. Dosage des protéines.....77

1.3.1. La méthode de Bradford.....78

1.3.2. La méthode de Lowry.....80

1.4. Vérification de la contamination croisée.....82

1.4.1. Mesure de l'activité NADPH cytochrome P450 réductase...82

1.4.2. <i>Mesure de l'activité NADH oxydase</i>	84
1.5. Mesure des activités éthoxyrésorufine- <i>O</i> -déalkylase dépendantes de la sous famille 1A1 du cytochrome P450.....	85
1.5.1. <i>Principe</i>	85
1.5.2. <i>Matériel</i>	85
1.5.3. <i>Méthode</i>	87
1.6. Analyse statistique.....	88
<u>2. RESULTATS</u>	89
2.1. Préparation des microsomes.....	89
2.2. Dosage des protéines.....	90
2.2.1. <i>Concentrations en protéines des microsomes et des fractions intermédiaires</i>	90
2.2.2. <i>Analyse statistique</i>	91
2.2.3. <i>Concentrations en protéines dans les microsomes de foie et de poumon</i>	94
2.3. Vérification de la contamination croisée.....	94
2.3.1. <i>Activité NADPH cytochrome P450 réductase</i>	95
2.3.2. <i>Activité NAD oxydase</i>	97
2.3.3. <i>Comparaison des activités réductase et oxydase</i>	97

2.4 . Activité éthoxyrésorufine- <i>O</i> -déalkylase dépendante de la sous famille 1A1 du cytochrome P450.....	101
2.4.1. Réalisation de la courbe d'étalonnage.....	101
2.4.2. Mesure des activités éthoxyrésorufine- <i>O</i> -déalkylase dans les <i>différents groupes</i>	103
<u>3. DISCUSSION</u>	105
3.1. Dosage des protéines.....	105
3.2. Contamination des microsomes.....	105
3.3. Les activités éthoxyrésorufine- <i>O</i> -déalkylase.....	106
<u>4. CONCLUSIONS-PERSPECTIVES DE L'ETUDE</u>	108
CONCLUSION	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	111

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 dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

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.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 54

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Résumé :

De nombreux travaux montrent un rôle carcinogène du tabac, des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des rayonnements ionisants dans la survenue de cancers broncho-pulmonaires. Parmi les rayonnements ionisants, l'effet du radon et de ses produits de filiation (polonium, plomb, bismuth) a été largement étudié. L'intérêt porté au radon s'explique par l'existence d'une exposition naturelle ou domestique, et par la survenue de nombreux cancers broncho-pulmonaires chez les mineurs d'uranium suivis étroitement au plan épidémiologique depuis cinquante ans.

Associée à cet effet carcinogène, une augmentation des activités enzymatiques chargées de la détoxification a été mise en évidence, en particulier pour les activités dépendantes du cytochrome P450.

Notre étude consiste en la mesure de l'activité éthoxyrésorufine-O-déalkylase dépendante de la sous famille 1A1 du cytochrome P450, dans la fraction microsomale des poumons de rats.

Les activités EROD sont mesurées dans des groupes de rats témoins, de rats ayant inhalé du radon (dose totale :1000 WLM), et de rats soumis à des injections répétées de benzo naphthoflavone (inducteur du cytochrome P450 1A1).

Mots clefs :

- Cancers broncho-pulmonaires
- Rayonnements ionisants
- Radon
- Cytochrome P450 1A1
- Carcinogenèse bronchique