

FR 502108

**UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

2001

N° attribué par la bibliothèque



THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Spécialité : Radiobiologie

présentée et soutenue publiquement

par

Lucie VINCENT-GENOD

le 17 octobre 2001

Titre :

Les dommages membranaires radio-induits comme bio-indicateurs de dose : Etudes des mécanismes et applications pratiques

Directeur de thèse : M. Philippe VOISIN

JURY

M. Jean-Marc COSSET	Professeur, Université de Paris-Sud	Président
Mme. Mireille DONNER	Directeur de Recherche INSERM	Rapporteur
M. Hubert THIERENS	Professeur, Université de Gent (Belgique)	Rapporteur
M. Bernard MIGNOTTE	Professeur, Université de Versailles	Examineur
M. Denis MATHE	Professeur, Université de Créteil	Examineur
M. Philippe VOISIN	Directeur de Recherche	Directeur de Thèse
M. Marc BENDERITTER	Chargé de Recherche	Responsable IPSN

**UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

2001

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Spécialité : Radiobiologie

présentée et soutenue publiquement

par

Lucie VINCENT-GENOD

le 17 octobre 2001

Titre :

Les dommages membranaires radio-induits comme bio-indicateurs de dose : Etudes des mécanismes et applications pratiques

Directeur de thèse : M. Philippe VOISIN

JURY

M. Jean-Marc COSSET	Professeur, Université de Paris-Sud	Président
Mme. Mireille DONNER	Directeur de Recherche INSERM	Rapporteur
M. Hubert THIERENS	Professeur, Université de Gent (Belgique)	Rapporteur
M. Bernard MIGNOTTE	Professeur, Université de Versailles	Examinateur
M. Denis MATHÉ	Professeur, Université de Créteil	Examinateur
M. Philippe VOISIN	Directeur de Recherche	Directeur de Thèse
M. Marc BENDERITTER	Chargé de Recherche	Responsable IPSN

Remerciements

Je tiens à exprimer mes très sincères remerciements à Philippe Voisin pour m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire de Dosimétrie Biologique Multiparamétrique, à l'Institut de Protection et de Sécurité Nucléaire, et d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je le remercie, tout particulièrement, de m'avoir donné la chance de découvrir la dosimétrie biologique.

Je souhaite exprimer mes plus vifs remerciements à Marc Benderitter pour m'avoir encadrée et encouragée tout au long de ce travail de recherche. Par sa compétence, son ouverture d'esprit et sa pédagogie, il m'a beaucoup appris.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire pour les diverses connaissances que chacun m'a apportées et pour leur soutien toujours constant.

J'adresse mes sincères remerciements à Jocelyne Aigueperse pour m'avoir accueillie au sein de la Section Autonome de Radiobiologie appliquée à la Médecine.

Je voudrais associer à ces remerciements le Professeur Jean-Marc Cosset qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse ainsi que Madame Mireille Donner et le Professeur Hubert Thierens qui ont accepté d'en être les rapporteurs.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mes proches à qui je dois tout et sur lesquels j'ai toujours pu compter.

Avant - propos



Liste des publications réalisées à la suite de cette étude :

Micro-organisation of the membrane after radiation-induced apoptosis: a flow cytometry study.

L. Vincent-Genod, M. Benderitter and P. Voisin.

Radiat. Environ. Biophys (2001) 40 : 213-219.

Membrane Fluidity as a potential biological dosimeter in case of accidental overexposures ?

L. Vincent-Genod, M. Benderitter, A. Berroud and P. Voisin

Diagnosis and treatment of Radiation Injury. EUR 18553. World Scientific 2001.

La fluidité membranaire, bio-indicateur d'effet cellulaire ?

L. Vincent-Genod, M. Benderitter and P. Voisin

EDF-Service de Radioprotection, Décembre 1999, n°. 15, 59-61.

Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure ?

M. Benderitter, **L. Vincent-Genod**, A. Berroud, S.Muller, M. Donner and P.Voisin

Int. J. Radiat. Biol 1999, vol. 75, N0 8, 1043-1053.

Simultaneous analysis of radio-induced membrane alteration and cell viability by flow cytometry.

M. Benderitter, **L. Vincent-Genod**, A. Berroud and P.Voisin

Cytometry 2000, vol 39, 151-157.

The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparametric investigation.

Benderitter M., **Vincent-Genod L.** and Voisin P

soumis pour publication dans Free Radical Biology and Medicine.

Sommaire

Remerciements	
Avant-propos	
Sommaire	
Liste des abréviations	1
Introduction générale	5
Chapitre 1 : Etude Bibliographique	11
I. Les rayonnements ionisants	11
I.1. Les différents types de rayonnements ionisant	11
I.1.1. Définition des rayonnements ionisants	11
I.1.2. Le transfert linéique d'énergie (TLE)	11
I.1.3. Les rayonnements « particulaires »	12
I.1.4. Les rayonnements électromagnétiques	13
I.2. Les grandeurs définies en radiobiologie	14
I.2.1. La dose absorbée (D) et le débit de dose absorbé	14
I.2.2. L'efficacité biologique relative (EBR)	14
I.2.3. La dose équivalente (HT)	15
I.2.4. La dose efficace (E)	16
I.3. Les sources d'exposition aux rayonnements ionisants	17
I.3.1. Les sources d'irradiation naturelles	17
I.3.2. Les sources d'irradiation médicales	18
I.3.3. Les sources d'irradiation industrielles	18
I.3.4. L'exposition d'origine professionnelle	19
II. L'accident radiologique	19
II.1. Le syndrome d'irradiation aiguë (SIA)	20
II.2. Les différents types de dosimétrie	21
II.2.1. La dosimétrie clinique	21
II.2.2. La dosimétrie physique	21
II.2.3. La dosimétrie biologique	22
III. Atteintes moléculaires des constituants membranaires lors d'une irradiation	23
III.1. Structure moléculaire de la membrane plasmique	23
III.1.1. Les protéines membranaires	24
III.1.2. Les lipides	25
III.1.3. Les sucres	28
III.2. Les mécanismes de lésions moléculaires radio-induites	28
III.2.1. Effet direct	29
III.2.2. Effet indirect	29
III.3. Effets des rayonnements ionisants au niveau des protéines	30
III.4. Effets des rayonnements ionisants au niveau des lipides	32
III.5. Effets des rayonnements ionisants au niveau des sucres	33
IV. Les mécanismes de défenses cellulaires	34
IV.1. Les systèmes de défenses anti-oxydants membranaires	35
IV.1.1. Les systèmes de défenses enzymatiques	35
IV.1.2. Les systèmes de défenses non enzymatiques	37
IV.1.3. Autres composés	40

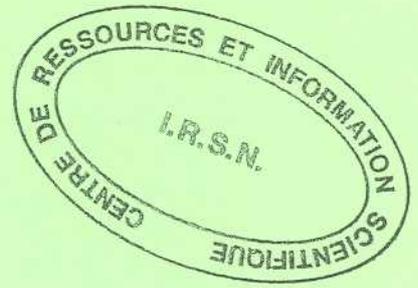
IV.2. Les systèmes de réparation membranaire.....	41
IV.2.1. Au niveau des protéines.....	41
IV.2.2. Au niveau des lipides.....	43
IV.3. Le système de balance anti-oxydante.....	45
V. Conséquences biologiques des rayonnements ionisants sur la membrane plasmique.....	46
V.1. Propriétés biophysiques de la membrane cellulaire.....	47
V.1.1. Dynamique moléculaire de la membrane plasmique.....	47
V.1.2. Techniques permettant la mesure de la fluidité membranaire.....	50
V.1.2.1. Principales techniques de fluorimétrie.....	50
V.1.2.2. Localisation dans la membrane cellulaire des marqueurs fluorescents.....	56
V.2. Altérations radio-induites des propriétés de la membrane cellulaire.....	57
V.2.1. Modifications radio-induites de la fluidité membranaire.....	58
V.2.2. Modifications radio-induites des fonctions et des propriétés membranaires.....	59
VI. Conséquences des rayonnements ionisants sur l'état cellulaire.....	61
VI.1. La mort cellulaire.....	62
VI.2. Apoptose et irradiation.....	66
VII. Conséquences des rayonnements ionisants au niveau tissulaire.....	67
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....	73
I. Etudes <i>in vitro</i>	73
I.1. Matériel biologique.....	73
I.1.1. Lignées cellulaires.....	73
I.1.2. Echantillons sanguins.....	74
I.2. Préparation des échantillons sanguins.....	74
I.2.1. Séparation des lymphocytes du sang total.....	74
I.2.2. Préparation des membranes totales de lymphocytes.....	75
I.2.3. Obtention d'hématies intactes.....	75
I.2.4. Préparation des membranes d'hématies.....	75
I.3. Caractéristiques des irradiations.....	76
I.4. Préparation des échantillons biologiques pour les mesures de fluidité membranaire.....	77
I.5. Mesures de la fluidité membranaire par spectrofluorimétrie.....	78
I.6. Mesure de la fluidité membranaire par cytométrie de flux.....	81
I.7. Mesure de la fluidité membranaire et détection simultanée de la viabilité cellulaire par cytométrie de flux.....	86
I.8. Dosage des lipides membranaires par Chromatographie Liquide Haute Performance.....	90
I.9. Analyse de la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....	94
II. Etudes <i>in vivo</i>	97
II.1. Matériel biologique.....	97
II.1.1. Modèle rat.....	97
II.1.2. Modèle singe.....	97
II.1.3. Etudes sur l'Homme.....	97
II.2. Préparation des échantillons sanguins.....	98
II.3. Caractéristique des irradiations.....	99
II.4. Préparation des échantillons biologiques pour la mesure de fluidité membranaire.....	100
II.5. Mesure de la fluidité membranaire par cytométrie de flux.....	100
II.6. Mesure de la fluidité membranaire et détection simultanée de la viabilité cellulaire par cytométrie de flux.....	100

II.7. Dosage de la vitamine E plasmatique par CLHP	100
II.8. Dosage des lipides membranaires par CLHP	105
II.9. Analyse de la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides par CPG.....	105
III. Méthodes statistiques	105
Chapitre 3 : Etudes <i>in vitro</i> des effets d'une irradiation sur la membrane cellulaire	109
I. Résultats	110
I.1. Mise au point de la technique de mesure de la fluidité membranaire	110
I.1.1. Conditions optimales d'utilisation des sondes fluorescentes	110
I.1.2. Comparaison de la mesure de fluidité membranaire par spectrofluorimétrie et cytométrie de flux	115
I.2. Influence d'une irradiation.....	117
I.2.1. Influence d'une irradiation sur la composition en phospholipides et en acides gras membranaires des érythrocytes et des lymphocytes	117
I.2.2. Influence d'une irradiation sur les mesures de fluidité membranaire dans les membranes des érythrocytes et des lymphocytes.....	130
I.2.3. Etude des liens éventuels entre fluidité membranaire et mort cellulaire radio-induite	133
II. Discussion	137
Chapitre 4 : Etudes <i>in vivo</i> des effets d'une irradiation sur la membrane cellulaire	155
I. Résultats	155
I.1. Protocole expérimental	155
I.2. Type de régimes.....	156
I.3. Effets des régimes sur les animaux en l'absence d'irradiation.....	158
I.3.1. Croissance et prise alimentaire.....	158
I.3.2. Dosage de la vitamine E plasmatique	159
I.3.3. Résultats obtenus sur les hématies	160
I.3.4. Résultats obtenus sur les lymphocytes	167
I.4. Effets de l'irradiation sur les animaux.....	170
I.4.1. Croissance et prise alimentaire.....	170
I.4.2. Dosage de la vitamine E plasmatique	172
I.4.3. Résultats obtenus sur les hématies	173
I.4.4. Résultats obtenus sur les lymphocytes	182
II. Discussion	189
Chapitre 5 : L'index de fluidité membranaire comme bio-indicateur d'une exposition à une irradiation	207
I. Résultats	208
I.1. Variations de l'index de fluidité membranaire en fonction du type cellulaire et du modèle considéré.....	208
I.2. Etudes <i>in vitro</i>	209
I.2.1. Les lymphoblastes.....	209
I.2.2. Les fibroblastes	210
I.2.3. Echantillons sanguins	215
I.3. Etudes <i>in vivo</i>	220
I.3.1. Le modèle rat.....	220

I.3.2. Le modèle singe	224
I.4. Etudes sur l'Homme.....	226
II. Discussion	230
Conclusion générale et perspectives	241
Références bibliographiques	247
Table des matières.....	279

Liste des abréviations

Acyl CoA	acyl coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANS	1-anilidonaphtalène-8-sulfonate
AO	Acridine Orange
3-AS	acide 3-(9-anthroyloxy) stéarique
6-AS	Acide 6-(9-anthroyloxy) stéarique
9-AS	Acide 9-(9-anthroyloxy) stéarique
12-AS	Acide 12-(9-anthroyloxy) stéarique
BE	Bromure d'éthidium
CIPR	Commission Internationale de Protection Radiologique
DHA	Acide docosahexaénoïque
DPH	1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
EBR	Efficacité Biologique Relative
EPA	Acide éicosapentaénoïque
MDA	Dialdéhyde malonique
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI	Phosphatidylinositol
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PS	Phosphatidylsérine
<r>	Anisotropie moyenne de fluorescence
Régime 1	Régime d'entretien
Régime 2	Régime enrichi en acides gras polyinsaturés à longues chaînes de type (n-3) et déplété en vitamine E
Régime 3	Régime enrichi en acides gras polyinsaturés à longues chaînes de type (n-3) et supplémenté en vitamine E
SAI	Syndrome d'irradiation aiguë
SEM	Erreur standard de la moyenne
SM	Sphingomyéline
SOD	Superoxyde dismutase
TLE	Transfert linéique d'énergie
TMA-DPH	1-(4-triméthylammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène
UNSCEAR	United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiations



Introduction générale

Lors d'une exposition accidentelle aux rayonnements ionisants, la reconstitution de la dose reçue aide les équipes hospitalières, en charge des patients irradiés, à adopter la meilleure stratégie thérapeutique. Trois types de dosimétrie sont réalisés à cet effet : la dosimétrie clinique, la dosimétrie physique et la dosimétrie biologique.

La dosimétrie clinique se base sur les symptômes précoces du syndrome des irradiés. La dosimétrie physique, grâce à la reconstitution de l'accident, permet d'évaluer la dose reçue et sa distribution dans tout l'organisme.

Par l'examen de certains paramètres biologiques, la dosimétrie biologique a pour objet, de quantifier les dommages radio-induits grâce à l'établissement d'une courbe de référence reliant l'intensité du paramètre à la dose d'exposition. Contrairement aux autres types de dosimétrie, elle permet d'estimer la dose reçue dans les cas où les symptômes cliniques sont inexistantes et le port du dosifilm non respecté. Actuellement, la seule technique qui présente une valeur médico-légale reconnue, se base sur les effets dommageables des radiations ionisantes sur la molécule d'ADN. Elle consiste à dénombrer, dans les lymphocytes circulants, la fréquence d'aberrations chromosomiques radio-induites de type instable (dicentriques et anneaux centriques) par la technique de cytogénétique conventionnelle. Grâce à des courbes dose-effet établies au laboratoire, en reportant la fréquence de dicentriques en fonction du nombre de métaphases observées, l'estimation de la dose reçue corps-entier est ainsi réalisée. Validée par trente années d'expérience, la cytogénétique conventionnelle est considérée comme l'indicateur biologique le plus spécifique de l'effet biologique des rayonnements ionisants, et donne l'estimation de dose la plus fiable en cas d'irradiation homogène et globale. Néanmoins la plupart des accidents d'irradiation sont hétérogènes et donc dans ce cas cette méthode présente certaines limites. C'est pourquoi, dans le but d'évaluer le plus précisément la dose, il est nécessaire de prendre en compte d'autres paramètres, cytogénétiques, biophysiques, et biochimiques, afin de rechercher de nouveaux bio-indicateurs de dose. La dosimétrie biologique se doit donc d'être multiparamétrique.

Bien que l'ADN, support de l'information génétique, soit considéré comme la cible principale des rayonnements ionisants par ses effets létaux et mutagènes, un ensemble de travaux scientifiques récents, y compris dans notre laboratoire, reconnaissent de plus en plus que la membrane plasmique est aussi le siège de dégradations qui pourraient intervenir dans les phénomènes de mort cellulaire radio-induites.

En effet, la membrane plasmique est une interface entre le milieu extra et intracellulaire, et donc son intégrité est indispensable à la survie de la cellule, mais aussi à l'intégrité fonctionnelle des tissus. Sous l'action d'une irradiation, de part sa constitution riche en acides gras polyinsaturés, elle est le lieu d'une peroxydation lipidique responsable d'importantes modifications structurales et fonctionnelles de ses propriétés biologiques. Les produits générés lors des réactions de

peroxydation, hautement réactifs, peuvent contribuer aux dommages radio-induits d'autres structures cellulaires. Ils sont susceptibles de diffuser dans la cellule jusqu'au noyau. Ces réactions peuvent jouer un rôle dans le développement des effets des radiations sur la cellule.

Ainsi, ces considérations ouvrent de nouvelles perspectives de développement de bio-indicateurs d'effets cellulaires.

Les membranes plasmiques ne sont pas des entités statiques, car ses constituants sont animés de divers mouvements au sein de la bicouche. On parle alors de fluidité membranaire : propriété de la membrane qui donne la possibilité à un constituant membranaire de se déplacer au sein de la matrice lipidique. Des méthodes biophysiques permettent d'estimer la cohésion membranaire. Les altérations de fluidité de l'environnement immédiat de sondes fluorescentes extrinsèques incorporées dans la membrane peuvent être mesurées grâce à la technique spectroscopique de polarisation de fluorescence.

Cette méthode a fait l'objet de récents travaux au sein de notre laboratoire afin d'étudier les altérations de fluidité membranaire radio-induites. Ces études ont montré que des modifications des propriétés biophysiques de la membrane plasmique après irradiation, étaient observables, *in vitro*, sur différents modèles cellulaires (lymphocytes et membranes d'érythrocytes) pour des doses comprises entre 0 et 8 Gy, doses compatibles avec nos préoccupations de dosimétrie biologique. De plus, ces effets persistaient dans le temps, jusqu'à 24 heures après irradiation. En parallèle, des expériences ont mis en évidence que les lymphocytes présentaient des variations de fluidité membranaire en fonction de leur état cellulaire (viable, apoptose ou nécrose). Ces résultats suggèrent la possibilité de pouvoir utiliser ces modifications de la fluidité membranaire comme bio-indicateurs d'effets cellulaires. Cependant, suite à ces précédents travaux, des questions soulevées dans ces études restent à résoudre :

- Quels sont les principaux mécanismes qui régissent les altérations radio-induites des propriétés biophysiques de la membrane ?
- Quelles sont les conséquences d'une irradiation sur les liens pouvant exister entre modifications membranaires et mort cellulaire ?
- Dans la perspective de valider l'index de fluidité membranaire comme indicateur biologique potentiel des effets des rayonnements ionisants, les observations réalisées jusqu'à présent *in vitro*, sont-elles vérifiables sur des modèles *in vivo* ?

Afin de fournir des réponses à ces questions, le sujet de recherche faisant l'objet de la présente thèse a été divisé en deux aspects principaux :

Le premier aspect consiste à approfondir l'étude des mécanismes conduisant aux modifications de la fluidité membranaire, et leurs conséquences, par des mesures biophysiques et biochimiques, afin de mieux maîtriser l'interprétation des phénomènes observés.

Le deuxième aspect a pour objectif d'évaluer l'index de fluidité membranaire comme indicateur biologique potentiel des effets des rayonnements ionisants en cas de suspicion d'irradiation.

Nous avons, tout d'abord, rappelé et rassemblé principalement les données essentielles (chapitre 1) sur les effets d'une irradiation sur les constituants membranaires et sur l'intégrité membranaire, sur les mécanismes de défenses anti-oxydantes et de réparation membranaire, et sur le rôle de la membrane dans la mort cellulaire radio-induite. Ces rappels mettent en évidence l'absence d'étude sur les liens susceptibles d'exister entre modifications radio-induites des propriétés biophysiques de la membrane, et d'une part la structure moléculaire des composés membranaires, et d'autre part la mort cellulaire. Puis, nous avons résumé l'ensemble des matériels et méthodes utilisés dans cette étude (chapitre 2).

La démarche de notre sujet de thèse a été la suivante.

Ce travail a consisté, tout d'abord, à comprendre, sur des modèles *in vitro*, les interconnexions entre altérations radio-induites de fluidité membranaire et composition en lipides membranaires (chapitre 3). Nous nous sommes également interrogés sur le rôle des modifications des propriétés biophysiques de la membrane, suite à une exposition aux rayonnements ionisants, dans les processus de mort cellulaire radio-induite. A cet effet nous avons utilisé une technique permettant de mesurer simultanément l'état de mort cellulaire, et l'évolution de la fluidité membranaire à l'aide de sondes fluorescentes permettant de cibler la mesure des perturbations de fluidité membranaire à différentes profondeurs de la membrane.

Puis, nous avons étudié les interconnexions entre altérations radio-induites de fluidité membranaire, composition en lipides des membranes et stress oxydatif, sur un modèle *in vivo* : le rat (chapitre 4). Nous avons alors sensibilisé les membranes plasmiques à la lipoperoxydation en diminuant artificiellement la capacité de défense anti-oxydante et en modifiant la composition en acides gras des lipides. Nous avons ainsi élaboré des régimes alimentaires permettant d'étudier ces différents paramètres.

Enfin, la dernière partie de ce travail a été consacrée à l'étude de la validation des dommages membranaires radio-induits comme bio-indicateurs potentiels des effets cellulaires de l'irradiation (chapitre 5). Précédemment, toutes ces observations avaient été réalisées sur des modèles *in vitro*. Notre objectif a donc été de poursuivre ces recherches sur des modèles *in vivo*, notamment sur deux modèles animaux (le rat et le singe), puis d'étendre ces travaux à l'Homme.

Chapitre 1 :
Etude bibliographique

I. Les rayonnements ionisants

Depuis la découverte de la radioactivité à la fin du 19^{ième} siècle, les propriétés des rayonnements ionisants sont utilisées dans de nombreux secteurs d'activité : l'industrie civile et militaire, la recherche et la médecine. Parallèlement à cet essor, une nouvelle discipline, la radiobiologie, s'est développée. Elle permet de comprendre quels sont les effets biologiques des interactions de la matière vivante avec les rayonnements ionisants.

I.1. Les différents types de rayonnements ionisants

I.1.1. Définition des rayonnements ionisants

Les rayonnements qui sont suffisamment énergétiques pour ioniser les atomes de la matière sont appelés rayonnements ionisants. Ils trouvent leur origine dans un phénomène physique appelé la radioactivité. Certains atomes comportent des noyaux instables (ou radionucléides) car leur nombre de nucléons ne vérifie plus les lois de la stabilité. Il se produit alors une désintégration spontanée, avec dégagement d'énergie qui aboutit à la formation de nouveaux nucléides. Ce retour à une configuration plus stable s'accompagne de l'émission d'un ou plusieurs types de rayonnements ionisants. Ce processus est alors appelé radioactivité. C'est un phénomène naturel. Les rayonnements ionisants se séparent en deux principales classes selon le type d'interaction avec la matière : les rayonnements électromagnétiques et les rayonnements « particuliers ».

I.1.2. Le transfert linéique d'énergie (TLE)

Les rayonnements ionisants cèdent toute ou une partie de leur énergie, au milieu qu'ils traversent, de manière discontinue et aléatoire le long de leur trajectoire. Afin de quantifier ces dépôts d'énergie réalisés à l'échelle microscopique, en un point de la trajectoire de la particule, il a été défini une grandeur appelée : le transfert linéique d'énergie ou TLE. C'est l'énergie d'une particule transférée au milieu par unité de longueur. Elle s'exprime en keV/ μm .

Les rayonnements qualifiés de TLE faible ont des trajectoires de particules à faible densité d'ionisations par opposition aux rayonnements de TLE fort dont la trace est constituée de particules à forte densité d'ionisations.

I.1.3. Les rayonnements « particuliers »

Les rayonnements particuliers sont composés de particules chargées positivement (les positons, les protons, les ions alpha ou les ions lourds), négativement (les électrons) ou non chargées (les neutrons). Ils constituent l'essentiel des rayonnements cosmiques. Ces rayonnements (exceptés les neutrons) interagissent avec la matière en induisant directement sur leur trajectoire l'ionisation (et l'excitation) des atomes du milieu qu'ils traversent.

I.1.3.1. Le rayonnement neutronique

Le neutron, particule non chargée, n'est arrêté que par collisions avec les noyaux des atomes du milieu qu'il traverse. La pénétration du rayonnement dépend de l'énergie des neutrons dont le TLE est élevé. Son parcours dans l'air peut aller jusqu'à 100 m et dans l'eau jusqu'à 1 m, pour des particules d'énergie comprise entre 0 et 10 MeV. Une forte épaisseur de béton, d'eau, ou de paraffine, les arrête. Ce sont les matériaux constitués d'éléments légers (par exemple l'hydrogène), dont la masse du noyau est proche de celles des neutrons, qui forment les écrans les plus efficaces.

I.1.3.2. Le rayonnement alpha

Il est constitué de noyaux d'hélium de masse « importante » par rapport à celle des électrons. C'est donc un rayonnement à fort TLE, dont la trajectoire dans la matière est quasi-rectiligne. Il est très peu pénétrant car il cède toute son énergie sur un faible parcours. Son parcours dans l'air est de 2 à 8 cm et dans l'eau de 20 à 100 μm , pour les particules d'énergie comprise entre 3 et 9 MeV. Dans le cas d'une exposition à des radionucléides qui sont émetteurs alpha (Pu^{238}), le risque biologique est donc principalement celui d'une exposition interne.

I.1.3.3. Le rayonnement bêta

Il se compose soit d'électrons, soit de positons. Ce sont des particules faiblement ionisantes. Elles parcourent une trajectoire d'autant plus sinueuse que leur énergie est faible. Son parcours dans l'air peut aller jusqu'à 12 cm et dans l'eau est de quelques mm, pour les particules d'énergie comprise entre 0 et 3 MeV. Elles sont arrêtées par quelques mètres d'air, une feuille d'aluminium ou sur quelques millimètres d'épaisseur dans les tissus biologiques.

I.1.4. Les rayonnements électromagnétiques

Les rayonnements électromagnétiques, peuvent être utilisés en médecine pour le diagnostic comme les rayons X, ou émis par des atomes radioactifs naturels ou artificiels tels que les rayonnements gamma. Ils ont la particularité d'interagir avec la matière en induisant indirectement sur leur trajectoire l'ionisation des atomes du milieu. Ces corpuscules non chargés produisent des ionisations (et des excitations) par l'intermédiaire de particules chargées (électrons) qu'ils mettent en mouvement au sein du milieu qu'ils traversent. Les neutrons, particules non chargées, interagissent de la même manière avec la matière en induisant la mise en mouvement de protons secondaires.

I.1.4.1. Le rayonnement gamma

De TLE faible, il est très pénétrant car constitué de photons. Il peut parcourir plusieurs centaines de mètres dans l'air. Pour l'arrêter, il est nécessaire d'utiliser d'épais écrans de plomb ou de bétons. Les photons de haute énergie (> 100 keV) ont un TLE plus faible que les photons de faibles énergie (< 100 keV).

I.1.4.2. Le cobalt-60 et le césium-137

Les principales sources de rayonnements utilisées dans les irradiateurs sont deux sources émettrices gamma : le cobalt-60 et le césium-137. Le cobalt-60, de période 5,271 ans, se désintègre en émettant successivement deux photons gamma d'énergie respective : 1,17 MeV et 1,33 MeV (figure 1). Le césium-137, de période 30 ans, retrouve son état fondamental en produisant un rayonnement gamma d'énergie égale à 0,662 KeV (figure 1).

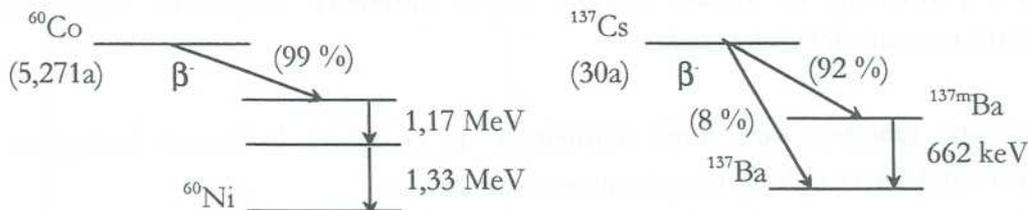


Figure 1 : Schémas de décroissance du cobalt-60 (^{60}Co) et du césium 137 (^{137}Cs).

1.2. Les grandeurs définies en radiobiologie

1.2.1. La dose absorbée (D) et le débit de dose absorbé

Elle est définie par la quantité d'énergie cédée au milieu, en un point, par unité de masse. L'énergie cédée est celle mise en jeu lors des ionisations, excitations et transferts thermiques produits dans le milieu concerné. En raison de la nature discontinue des événements qui aboutissent au dépôt d'énergie, la dose n'a une signification que si la masse considérée est suffisamment grande pour négliger les fluctuations statistiques appréciables sur le nombre de particules la traversant et sur l'énergie qu'elles y déposent. Elle représente la densité massique de l'énergie absorbée en un point du milieu. Son unité est le gray (Gy) qui correspond à une énergie déposée de un joule par kilogramme de matière ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$).

Le débit de dose correspond à la durée de l'exposition, c'est à dire à l'énergie déposée par unité de masse et de temps. Il est exprimé en gray par seconde (Gy/s).

1.2.2. L'efficacité biologique relative (EBR)

La dose absorbée permet de quantifier l'effet physique produit par une irradiation et donc d'estimer l'effet biologique généré. Plus la dose est élevée, plus cet effet est accru. Cependant, l'effet biologique est fonction de l'absorption d'énergie par des structures cellulaires de petites dimensions. C'est à dire qu'il dépend de la nature et de l'énergie des particules ionisantes. L'effet biologique dépend donc du TLE du rayonnement considéré. Ainsi les protons et les particules alpha sont, à dose absorbée égale, plus dangereuses que les rayons X ou les rayons gamma. C'est pourquoi, en radioprotection, aux valeurs de TLE sont associés des facteurs de pondération radiologique permettant de rendre compte de la différence d'efficacité biologique des rayonnements ionisants (cf ci-dessous).

L'EBR est une grandeur sans unité permettant de comparer l'efficacité biologique d'un rayonnement étudié avec celle d'un rayonnement de référence.

L'EBR_i d'un rayonnement i donné par rapport à un rayonnement j de référence est égal au rapport des doses absorbées du rayonnement de référence D_j et du rayonnement considéré D_i correspondantes à l'obtention d'un même effet biologique.

$$EBR_j = \frac{D_j}{D_i}$$

Le rayonnement de référence j est soit celui du cobalt-60, soit celui des rayons X de haute énergie (> 1 MeV).

1.2.3. La dose équivalente (H_T)

Contrairement à la dose absorbée, la dose équivalente (H_T) tient compte des différences d'effets observées selon le type et l'énergie des rayonnements ionisants. Pour cela des facteurs de pondération radiologique (W_r) ont été introduits. Ces facteurs ont été calculés à partir d'expériences radiologiques qui se basent sur l'EBR (tableau 1). Ils traduisent l'action moyenne des rayonnements ionisants sur un tissu ou organe.

Nature du rayonnement	Energie	W_r
Photons	Toutes les énergies	1
Electrons	Toutes les énergies	1
Neutrons	< 10keV	5
	10 keV à 100 keV	10
	100 keV à 2 MeV	20
	2 MeV à 20 MeV	5
	> 20 MeV	5
Protons	> 2 MeV	5
Particules alpha Fragments de fission Noyaux lourds		20

Tableau 1 : Facteurs de pondération pour les différents rayonnements d'après la CIPR 60.

La dose équivalente est calculée en sommant toutes les composantes du champ de rayonnements :

$$H_T = \sum_R W_R \cdot D_{T,R}$$

$D_{T,R}$ représente la dose de rayonnement R absorbée par l'organe T. La dose équivalente est exprimée en sievert (Sv).

La dose délivrée exprimée en sievert permet d'évaluer le risque pour la santé, quel que soit le type de rayonnement ionisant engagé.

I.2.4. La dose efficace (E)

La dose efficace permet d'estimer le risque total d'effets stochastiques résultant de l'exposition de plusieurs organes ou tissus de radiosensibilité différentes. Les effets aléatoires (ou effets stochastiques) sont les effets de l'irradiation dont la probabilité d'apparition, et non la gravité, dépend de la dose et pour lesquels il n'existe pas de dose seuil (induction des cancers et des effets héréditaires). La dose efficace est exprimée en sievert.

$$E = \sum_T W_T \cdot H_T$$

W_T est le facteur de pondération tissulaire. Il a été calculé en considérant le rapport de la probabilité d'induire des effets aléatoires suite à l'exposition d'un tissu, sur la probabilité totale d'induire des effets aléatoires résultant d'une irradiation totale (tableau 2) ; la somme des W_T étant égale à 1.

Le tissu ou organe intitulé « reste de l'organisme » est composé des capsules surrénales, du cerveau, de la partie supérieure du gros intestin, de l'intestin grêle, des reins, des muscles, du pancréas, de la rate, du thymus et de l'utérus.

Tissu ou organe	W_T
Thyroïde	0,05
Sein	0,05
Poumon	0,12
Œsophage	0,05
Estomac	0,12
Foie	0,05
Côlon	0,12
Vessie	0,05
Gonades	0,2
Peau	0,01
Moelle osseuse rouge	0,12
Surfaces osseuses	0,01
Reste de l'organisme	0,05

Tableau 2 : Facteurs de pondération pour les différents tissus d'après la CIPR 60.

Cette notion s'applique à l'irradiation interne et externe, et aux expositions globales et partielles.

I.3. Les sources d'exposition aux rayonnements ionisants

L'Homme est exposé à différentes sources de rayonnement qui sont classées en deux types principaux : l'exposition d'origine naturelle et l'exposition d'origine artificielle (principalement d'origine médicale et industrielle). La figure 2 résume la part de chaque exposition en se basant sur les doses efficaces annuelles moyennes délivrées aux individus du grand public recueillies par l'UNSCEAR 93 (UNSCEAR).

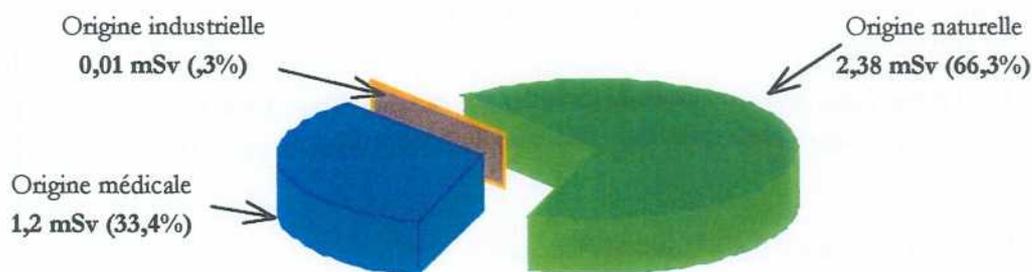


Figure 2 : Proportion des différentes sources d'exposition d'après l'UNSCEAR (1993). Les pourcentages sont calculés à partir de la dose efficace annuelle moyennée pour l'adulte.

I.3.1. Les sources d'irradiation naturelles

Depuis toujours l'Homme est exposé aux rayonnements ionisants émis par les sources d'irradiation naturelle. La part de l'exposition naturelle dans l'exposition globale de l'Homme est la plus importante (figure 3) parmi les autres sources d'irradiation. L'exposition externe a pour origine d'une part les rayonnements cosmiques provenant du soleil et des galaxies ; d'autre part les rayonnements telluriques générés par des radionucléides primordiaux constituant la croûte terrestre (potassium 40, thorium 232, uranium 238). Ce type d'exposition dépend de la situation géographique et principalement de la composition géologique des sols. Quant à l'exposition interne, elle provient de l'inhalation (radon 222) ou de l'ingestion (potassium 40) de radionucléides présents dans l'air ou dans l'alimentation, mais aussi des radionucléides naturels présents dans l'organisme humain. La part des différentes composantes de l'irradiation naturelle est résumée figure 3.

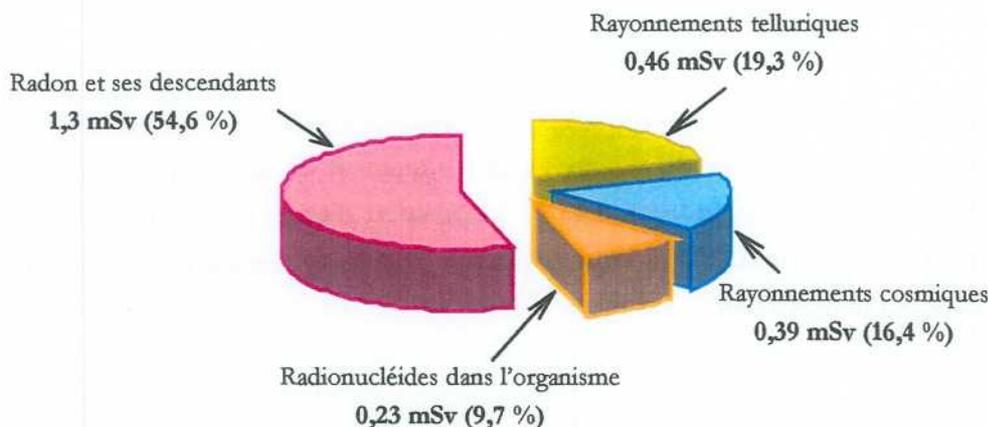


Figure 3 : Principales sources d'irradiation naturelles d'après l'UNSCEAR 1993. Les pourcentages sont calculés à partir de la dose efficace annuelle moyennée pour l'adulte.

I.3.2. Les sources d'irradiation médicales

L'exposition médicale résulte de l'ensemble des actes de radiodiagnostic, radiothérapie et médecine nucléaire pratiqués sur les individus d'une population. Elle représente 1,2 mSv/an, soit 50% de l'irradiation naturelle. Pour la population, la source d'exposition d'origine artificielle la plus importante est celle due à l'exposition médicale. Sa composante principale (1 mSv/an) résulte du radiodiagnostic (mammographie, radiographie dentaire etc.). La dose efficace moyenne annuelle due à la radiothérapie est extrêmement faible : 0,01 μ Sv/an. La contribution à l'exposition médicale de la médecine nucléaire est de 0,1 mSv/an. Quant à la curiethérapie, sa dose efficace moyenne annuelle est équivalente à celle due à la médecine nucléaire.

I.3.3. Les sources d'irradiation industrielles

Les rayonnements ionisants sont impliqués dans deux types d'activité industrielle : l'industrie électronucléaire et les industries non électronucléaires. Le risque d'exposition d'origine industrielle du grand public provient essentiellement des industries du cycle du combustible nucléaire. Pour les autres applications industrielles, le risque est essentiellement d'origine professionnelle.

I.3.3.1. L'industrie électronucléaire

Ce sont les rejets dans l'environnement d'effluents très faiblement radioactifs produits par les centrales nucléaires et les usines de retraitements des combustibles irradiés qui peuvent soumettre le grand public à une éventuelle exposition. Les limites de ces rejets sont fixées à des valeurs d'exposition ne présentant pas de risques pour la population. Ces limites sont évaluées à partir

des données concernant ces rejets et les chaînes alimentaires en utilisant des modèles de simulation de transfert. D'après l'UNSCEAR 93, la dose efficace moyenne annuelle en bordure d'installation représente 0,04 à 8,4 % de l'exposition naturelle.

I.3.3.2. L'industrie non électronucléaire

Les industries non électronucléaires emploient des sources de rayonnements scellées et non scellées pour la conduite de processus ou le contrôle de qualité.

Par exemple, en radiographie, des radionucléides (cobalt-60, iridium-192, générateurs de rayons X) permettent de détecter la présence éventuelle d'imperfections, de vides ou de corps étrangers dans un échantillon.

Les jauges industrielles qui servent à déterminer l'épaisseur, la densité ou la teneur en humidité des matériaux pendant la fabrication ou immédiatement après, mais aussi à surveiller le niveau de remplissage de cuves ou de réservoirs, utilisent des sources de rayonnements ionisants (strontium-90, americium-241, césium-137).

Des radionucléides de haute activité sont employés pour la stérilisation de fournitures médicales et la conservation d'aliments (cobalt-60, césium-137).

I.3.4. L'exposition d'origine professionnelle

C'est l'exposition des travailleurs à des rayonnements ionisants dans le cadre de leur activité professionnelle. Elle est principalement de type externe, l'exposition interne a pour origine essentiellement la présence de radon sur le lieu de travail.

Les professions présentant un risque d'exposition à une source artificielle de rayonnements ionisants sont : le radiodiagnostic (médical, dentaire et vétérinaire), la radiothérapie, l'utilisation de sources non scellées (médecine nucléaire, radioanalyse, recherche biomédicale), les applications industrielles et de recherche de radionucléides.

Les professions présentant un risque d'exposition à des sources naturelles de rayonnements ionisants sont : le personnel travaillant dans un lieu susceptible de présenter une concentration élevée de radon (mines, stationnements, tunnels etc.), le personnel naviguant sur des vols long courrier, et les spationautes.

II. L'accident radiologique

Des personnes peuvent être irradiées accidentellement dans différentes circonstances qui n'incluent pas toujours les installations nucléaires ou civiles. Les principales sources de

rayonnements mises en cause sont, soit des sources industrielles (gammagraphie, irradiateurs), soit des sources médicales (radiothérapie). Les catégories de personnels concernées sont celles des travailleurs et du public (sources égarées). Depuis la fin des années cinquante, environ trois cents accidents dus à des sources de rayonnement ont été répertoriés au niveau mondial. Plus de mille accidentés et une soixantaine de décès ont été recensés pour les accidents déclarés. Les causes principales de la survenue de ces accidents sont principalement le non respect ou la méconnaissance des règles de sécurité et l'erreur humaine.

II.1. Le syndrome d'irradiation aiguë (SIA)

Le syndrome d'irradiation aiguë est la combinaison de symptômes qui surviennent lors d'une irradiation globale (ou corps entier). Il se développe par étapes successives sur des périodes allant de quelques heures à plusieurs jours. Ses symptômes se composent de tous les signes cliniques et paracliniques apparentés aux lésions morphologiques ou à l'affaiblissement fonctionnel des différents organes exposés aux radiations ionisantes. La sévérité du syndrome dépend non seulement de la dose totale absorbée, de l'intensité et de la durée de l'irradiation, mais aussi de la distribution de l'irradiation sur tout le corps. En général, une dose délivrée sur une partie du corps est moins délétère que la même dose appliquée sur le corps entier. Egalement, une dose distribuée dans le temps est moins nocive que la même dose délivrée instantanément.

Lors d'une irradiation corps entier aiguë, les lésions organiques du SIA les plus significatives affectent principalement la moelle osseuse, le système gastro-intestinal, les gonades et la peau, le système pulmonaire, le système cardiovasculaire, le système nerveux central. Les symptômes et les signes paracliniques résultant du dysfonctionnement de ces organes constituent le SIA. Les nombreux tissus du corps présentent différents degrés de sensibilité à une exposition aux rayonnements ionisants. La moelle osseuse est le tissu le plus radiosensible, suivi du système gastro-intestinal. Le système nerveux central est caractérisé par sa radiorésistance au niveau organique et par sa grande radiosensibilité au niveau fonctionnel. Cette variabilité dans la sensibilité aux radiations explique que les signes et symptômes se déroulent en trois étapes successives : une phase initiale ou prodromique qui se développe dans les premières heures après une exposition, une phase de rémission relativement asymptomatique et une phase patente aux niveaux cliniques et paracliniques. La mort ou le rétablissement se produit dans les huit semaines après l'exposition, ils sont fonction de la dose délivrée et de la susceptibilité individuelle. Des séquelles peuvent se développer à moyen ou long terme.

II.2. Les différents types de dosimétrie

Le SAI peut selon la dose absorbée engager le pronostic vital. Il est donc essentiel que les facteurs de pronostics soient connus le plus précocement possible afin d'assurer la meilleure prise en charge possible des patients. C'est pourquoi trois types de dosimétrie ont été développés afin d'estimer la dose reçue et sa répartition. Ces évaluations de la dose absorbée et de la topographie de l'irradiation permettent de diagnostiquer l'ampleur du SAI et ainsi aident l'équipe soignante à établir la stratégie thérapeutique la mieux adaptée.

II.2.1. La dosimétrie clinique

Elle consiste à observer la cinétique d'apparition des symptômes cliniques caractéristiques du SAI. Les signes cliniques accompagnant la phase initiale (tableau 3) et leur délai de survenu sont des éléments essentiels qui permettent de déterminer un intervalle de dose, et donc de mettre en place les modalités de prise en charge de l'accidenté.

Délai d'apparition	Symptômes	Intervalle de dose (Gy)
Premières minutes	Etat de choc, signes neurologiques (désorientation, obnubilation, convulsions), signes cutanés	D > 15 Gy
Moins d'1 heure	Erythème, diarrhées	D > 4 Gy
Moins de 3 heures	Nausées, vomissements, asthénie intense	D > 1 Gy

Tableau 3 : Critères cliniques de tri.

II.2.2. La dosimétrie physique

Elle fournit une estimation de la dose reçue et de sa distribution dans l'organisme. Deux approches complémentaires peuvent être envisagées dans le cas d'une reconstitution dosimétrique. La première est une reconstitution par le calcul qui permet d'estimer les distributions de doses dans un modèle anthropomorphe numérique réaliste, positionné dans l'environnement de l'accident. La deuxième est une reconstitution expérimentale réalisée dans les circonstances aussi proches que possible de l'accident, à l'aide de mannequins en matériaux « équivalent tissu » et de dosimètres adaptés au type de rayonnement. La dosimétrie physique peut donc nous informer sur l'irradiation du compartiment médullaire qui est un paramètre essentiel dans la prise en charge médicale et le traitement du patient.

II.2.3. La dosimétrie biologique

La dosimétrie biologique a pour objet, par l'examen de certains paramètres biologiques, la quantification des dommages radio-induits et leur localisation dans l'organisme. A cet effet, il a donc été nécessaire de développer des bio-indicateurs de dose. Les caractéristiques principales d'un dosimètre biologique sont énumérées dans le tableau 4 :

- | | |
|---|---|
| ➤ | Relations dose-effet ; |
| ➤ | Facilité d'obtention et de dosage ; |
| ➤ | Spécificité de l'effet dû aux rayonnements ionisants ; |
| ➤ | Reproductibilité, sensibilité, et stabilité dans le temps ; |
| ➤ | Possibilité de traiter un nombre suffisant de cas ; |
| ➤ | Capacité de s'adapter aux différents types d'exposition ; |
| ➤ | Reconstitution <i>a posteriori</i> de l'exposition. |

Tableau 4 : Caractéristiques principales d'un dosimètre biologique.

Les analyses reposent actuellement sur la technique de cytogénétique conventionnelle qui est la seule technique aujourd'hui reconnue ayant une valeur médico-légale. Elle permet de visualiser et de dénombrer, dans les lymphocytes du sang périphérique, après une phase de culture de 48 heures, les aberrations chromosomiques de type instables (dicentriques, anneaux centriques, fragments) induites par les rayonnements ionisants. La fréquence des anomalies observées est rapportée à une dose équivalente pour le corps entier, par la lecture de courbes dose-effet établies pour différents types de rayonnements et différents débits de dose, à partir du comptage des anomalies dans des lymphocytes provenant d'échantillons sanguins irradiés *in vitro*. Mais, la technique de cytogénétique conventionnelle ne permet pas de répondre efficacement à toutes les circonstances accidentelles, notamment dans le cas des irradiations hétérogènes ou/et anciennes. C'est pourquoi de nouvelles techniques sont développées afin de rechercher de nouveaux bio-indicateurs qui sont basées sur les lésions radio-induites au niveau de la molécule d'ADN. Ces nouvelles méthodes sont :

Les micronoyaux qui sont la résultante d'anomalies chromosomiques (fragments ou chromosomes entiers) non incorporées dans les cellules filles lors de la division cellulaire. Cette technique, plus rapide que la technique de cytogénétique conventionnelle mais moins sensible, permettrait de répondre au problème du délai de réponse dans le cas d'un tri sur un grand nombre d'individus potentiellement irradiés.

Le FISH (Hybridation Fluorescente *in situ*) qui présente l'avantage de détecter les aberrations aussi bien stables (translocations et insertions) qu'instables. Cette technique permettrait donc d'envisager une dosimétrie biologique dans le cas des irradiations anciennes.

Les expertises réalisées sur les travailleurs de l'industrie mettent en évidence une des limitations de la cytogénétique conventionnelle qui concerne les irradiations localisées. Les suspicions d'exposition accidentelle concernent souvent les extrémités des membres. Dans ces cas, la cytogénétique conventionnelle sous estime la dose reçue. En effet, cette technique donne une estimation de dose intégrée sur le corps entier. Il est donc indispensable de développer de nouveaux bio-indicateurs qui s'appliqueraient à d'autres types cellulaires que le lymphocyte. D'autre part, le temps nécessaire à la réalisation d'une expertise est de 5 jours. Afin d'optimiser ce délai, il serait donc non négligeable d'avoir accès à un dosimètre dont la mise en œuvre est plus rapide pour aider l'équipe médicale à appliquer la stratégie thérapeutique la mieux adaptée. C'est pourquoi de nouvelles techniques basées sur les bio-marqueurs d'effets cellulaires sont recherchées.

III. Atteintes moléculaires des constituants membranaires lors d'une irradiation.

Lors d'une irradiation, les rayonnements ionisants déposent leur énergie dans tout le volume de la cellule. Bien que l'ADN, support de l'information génétique, soit considéré comme la cible principale des rayonnements ionisants par ses effets létaux et mutagènes, un ensemble de travaux scientifiques récents, y compris dans notre laboratoire, reconnaissent de plus en plus que la membrane plasmique est aussi le siège de dégradations qui pourraient intervenir dans les phénomènes de mort cellulaire radio-induites.

III.1. Structure moléculaire de la membrane plasmique

La membrane plasmique est une interface, de structure asymétrique, entre les milieux cellulaires et extracellulaires. Elle est constituée d'une double couche lipidique (7 à 9 nm d'épaisseur), des protéines membranaires et de la glycocalix (couche externe) de nature polysaccharidique (figure 4).

Le premier modèle dynamique de la membrane plasmique est le modèle de mosaïque fluide (Singer & Nicolson, 1972). Il définit la membrane comme une solution orientée, bidimensionnelle, de protéines « baignant » dans un solvant visqueux de lipides amphipatiques organisés en bicouche. Ce modèle macroscopique s'appuie sur les propriétés thermodynamiques des composants membranaires.

Des études récentes ont montré que les membranes plasmiques de la plupart des cellules eucaryotes sont constituées de micro-domaines lipidiques qui sont résistants à l'action des

détergents (Brown & London, 1997). Ces micro-domaines, appelés « rafts », sont enrichis en cholestérol et sphingolipides (Brown & London, 1997 ; Ikonen, 2001). Les cavéoles, considérées comme étant un type spécifique de « rafts » (Kurzchalia & Parton, 1999), sont de petites poches ou invaginations de la membrane plasmique, riches en cholestérol libre (Fielding, 2001). La cavéoline, protéine liée au cholestérol libre, est la principale protéine de structure des cavéoles (Fielding & Fielding, 2000). Les cavéoles comportent de nombreuses molécules impliquées dans les voies de signalisation cellulaire (Roch-Arveiller & Couderc, 2000). Elles ont de multiples fonctions, notamment contrôler le contenu surfacique en cholestérol libre, informer le noyau des changements membranaires par des signaux de transduction, et réguler les voies de signalisation en réponse à des stimuli extracellulaires. Les cavéoles agissent ainsi sur de nombreuses fonctions cellulaires telles que : la croissance et la division cellulaire, la locomotion (Fielding & Fielding, 2000).

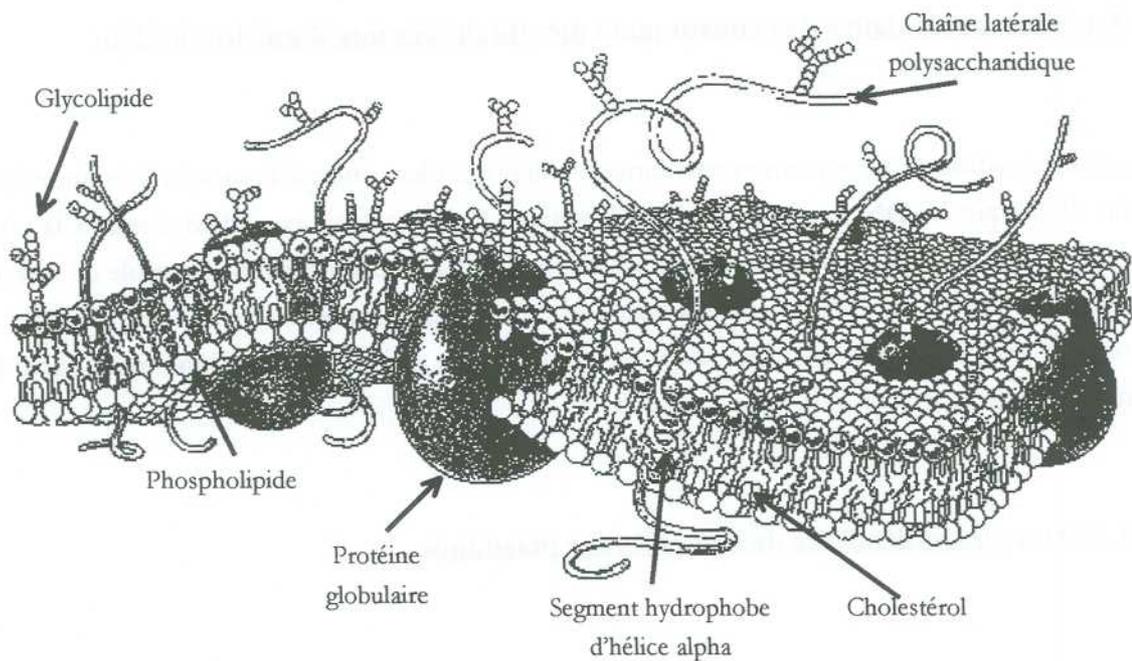


Figure 4 : Structure de la membrane cellulaire (Bretscher, 1985)

III.1.1. Les protéines membranaires

Les protéines représentent 50 % de la masse membranaire. Elles assurent toutes les fonctions spécifiques de la membrane : transport membranaire, réception d'information, activités enzymatiques, mécanismes de reconnaissance cellulaire et liaisons structurales.

Les protéines transmembranaires (ou intrinsèques) traversent une fois (protéines en hélices alpha) ou plusieurs fois (protéines globulaires) la partie intermembranaire hydrophobe. Les protéines en

hélices alpha agissent en général comme des récepteurs catalytiques. Les protéines globulaires assurent la fonction de protéine canal.

Les protéines périphériques (ou extrinsèques) sont ancrées grâce à des interactions de nature électrostatique à la périphérie de la membrane, celles situées à la face interne constituent essentiellement le cytosquelette membranaire. Elles contribuent à la rigidification de la structure cellulaire générale.

III.1.2. Les lipides

Les lipides sont les constituants majeurs des membranes. Il existe deux catégories de lipides qui participent à la structure des membranes : les phospholipides et les stérols.

III.1.2.1. Les phospholipides

Les phospholipides s'organisent en une double couche qui constitue la matrice de la membrane. Il existe deux types de phospholipides : les glycérolipides et les sphingolipides.

La structure des glycérophospholipides est indiquée sur la figure 5. Le squelette de ces molécules est le glycérol sur lequel sont fixés trois résidus. Deux de ses fonctions alcool sont estérifiées par des acides gras à longues chaînes. Ils peuvent être saturés ou comporter une ou plusieurs doubles liaisons (monoinsaturés ou polyinsaturés). C'est la partie hydrophobe de la molécule. Le troisième résidu constitue la partie polaire du lipide, généralement appelée la « tête polaire ». Il est composé d'un acide phosphorique fixé au glycérol sur sa dernière fonction alcool par une liaison ester. Cet acide phosphorique est lui-même estérifié par divers groupements : la choline, l'éthanolamine, la sérine ou le *myo*-inositol. Ces glycérolipides sont au nombre de quatre : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI).

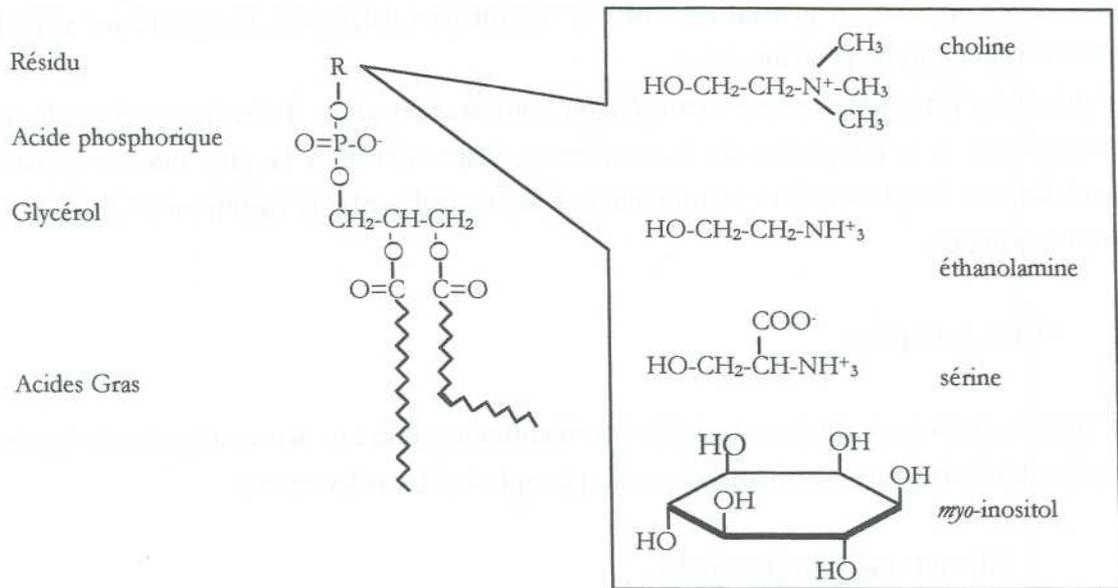


Figure 5 : Structures moléculaires des glycérophospholipides

Les sphingolipides sont composés d'un amino-alcool comportant une longue chaîne latérale, la sphingosine, qui joue le rôle du glycérol. Sur la fonction amine est greffé un résidu acyl et la fonction alcool porte le groupement polaire : le plus fréquemment c'est la phosphorylcholine. Les lipides correspondants sont alors appelés les sphingomyélines (SM) (figure 6).

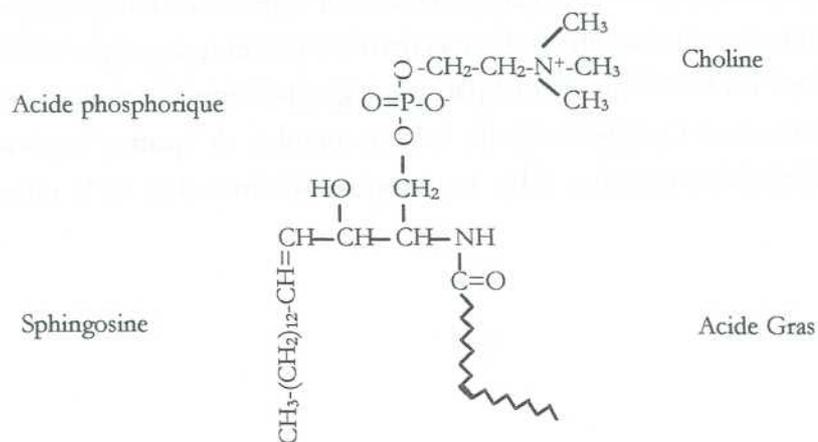


Figure 6 : La structure moléculaire de la sphingomyéline.

La proportion des différentes classes de phospholipides qui constituent la membrane plasmique est caractéristique du type cellulaire considéré. Par exemple, le pourcentage des principales classes de phospholipides dans les membranes d'érythrocytes humains est présenté dans le tableau 5.

Phospholipides	% des phospholipides totaux
<i>SM</i>	24
<i>PC</i>	29
<i>PE</i>	26
<i>PS</i>	13

Tableau 5 : Proportion des principales classes de phospholipides dans les membranes d'érythrocytes humains (Roelofsen et coll., 1996).

La répartition des différentes classes de phospholipides dans les membranes cellulaires est asymétrique. Les lipides neutres (phosphatidylcholine et sphingomyéline) se situent principalement dans le feuillet extracellulaire tandis que les lipides chargés anioniques (phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine) se regroupent dans le feuillet cytoplasmique (figure 7).

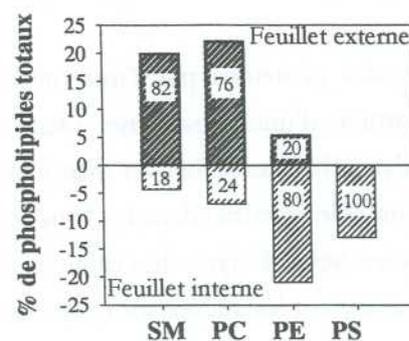


Figure 7 : Distribution asymétrique des principaux phospholipides dans les membranes d'érythrocytes humains (Roelofsen et coll., 1996). Les chiffres sur les histogrammes indiquent le pourcentage de chaque classe de phospholipides (SM : sphingomyéline ; PC : phosphatidylcholine; PE : phosphatidyléthanolamine; PS : phosphatidylsérine) présent soit dans le feuillet externe, soit dans le feuillet interne de la membrane d'érythrocyte.

Le cytosquelette joue un rôle important dans la conservation de l'asymétrie des glycérophospholipides, et en particulier dans le maintien de la PS au niveau du feuillet cytoplasmique. La modification de cet équilibre peut provenir de l'action concertée de deux facteurs : un dysfonctionnement (ou inhibition) de la flippase d'aminophospholipide et une perturbation (destruction ou enlèvement) du squelette de la membrane des globules rouges (Roelofsen et coll., 1996). Dans les membranes d'hématies humaines, de nombreuses pathologies peuvent induire la perte de cette asymétrie. Elles ont pour conséquences l'externalisation de la PE et du PS qui est compensée par l'internalisation de la PC. L'asymétrie de SM est maintenue.

III.1.2.2. Les stérols

Leur structure est très différente de celle des lipides présentés précédemment. Ils sont constitués d'un noyau stéroïde composé de quatre cycles saturés. L'extrémité du noyau stéroïde comporte une chaîne latérale ramifiée possédant une ou plusieurs doubles liaisons. Le plus important des stérols participant à la structure des membranes plasmiques des cellules eucaryotes est le cholestérol. Il s'intercale entre les chaînes carbonées des phospholipides sous forme libre (non estérifié) et diminue la souplesse et la perméabilité de la double couche (Bretscher, 1985). Dans les cellules eucaryotes, il existe une quantité comparable de cholestérol et de phospholipides.

III.1.3. Les sucres

Les protéines extra-cellulaires et certaines molécules lipidiques sont liées, au niveau de la couche externe de la membrane cellulaire, à des chaînes composées de sucres complexes ou polysaccharides. Ce sont donc des glycoprotéines et des glycolipides. Elles forment « un manteau cellulaire » appelé glycocalix.

Les polysaccharides sont associés aux protéines par l'intermédiaire du groupement hydroxyl d'une sérine ou du groupement amide d'une asparagine. Dans ce dernier cas, il existe deux groupes de polysaccharides : les polysaccharides riches en mannose et ceux dits complexes.

Ces sucres de la membrane jouent un rôle essentiel dans les fonctions d'interface des membranes. Le profil glucidique du glycocalix varie selon le type de cellule et son état de différenciation. Les fonctions biologiques auxquelles participent les sucres sont séparées en deux classes (Muramatsu, 1989) :

- Les fonctions directes qui s'intéressent aux processus de reconnaissance entre les surfaces cellulaires. La reconnaissance entre le sucre et le ligand va modifier la structure soit de la molécule qui reconnaît le sucre, soit de la molécule qui le porte. Ce signal de reconnaissance est alors transmis à la cellule.
- Les fonctions indirectes qui consistent à la modulation des fonctions et des propriétés des protéines transmembranaires par les sucres.

III.2. Les mécanismes de lésions moléculaires radio-induites

Les effets des rayonnements ionisants sur la molécule cible peuvent être induits par transfert direct de l'énergie radiative à la molécule, c'est l'effet direct. Le deuxième mode d'interaction est l'effet indirect qui agit sur la molécule cible par des réactions physico-chimiques ayant lieu dans son environnement proche.

III.2.1. Effet direct

L'irradiation induit l'ionisation et l'excitation des molécules cibles provoquant des lésions au niveau même de ces molécules.

III.2.2. Effet indirect

L'eau constitue environ 80 % de la masse des organismes vivants. La cellule peut donc être assimilée à une solution aqueuse. Lors d'une exposition à une irradiation, les molécules d'eau ionisées et excitées génèrent des ions et des espèces radicalaires très réactives (HO^\bullet , H^\bullet , et e_{aq}^-). C'est la radiolyse de l'eau (tableau 6). Ces radicaux ont une distribution très hétérogène autour de la trajectoire de la particule ionisante. A partir du lieu de leur formation, les espèces radicalaires diffusent dans le milieu et peuvent se recombiner entre elles. Ces deux phénomènes entrent en compétition et sont fonction du TLE du rayonnement. La probabilité de recombinaison est d'autant plus grande que les grappes d'ionisation sont proches et donc que la densité d'ionisation est importante (particules à TLE élevé). A l'issue de cette étape diffusionnelle, les produits de la radiolyse de l'eau sont : HO^\bullet (radical hydroxyl), H^\bullet , e_{aq}^- , H^+ , H_2O_2 (le peroxyde d'hydrogène est un précurseur de radicaux) et H_2 . Les radicaux non recombinés vont interagir avec les molécules biologiques, entraînant leur modification chimique. La présence d'oxygène dans le milieu, notamment dans les tissus biologiques, augmente l'effet de l'irradiation, c'est un radiosensibilisateur. Lors de l'étape diffusionnelle, il s'oppose aux réactions de recombinaison en favorisant la formation de nouvelles espèces radicalaires plus stables et donc pouvant diffuser plus loin dans le milieu. Ce sont l'anion superoxyde O_2^\bullet et le radical hydroperoxyle HO_2^\bullet .

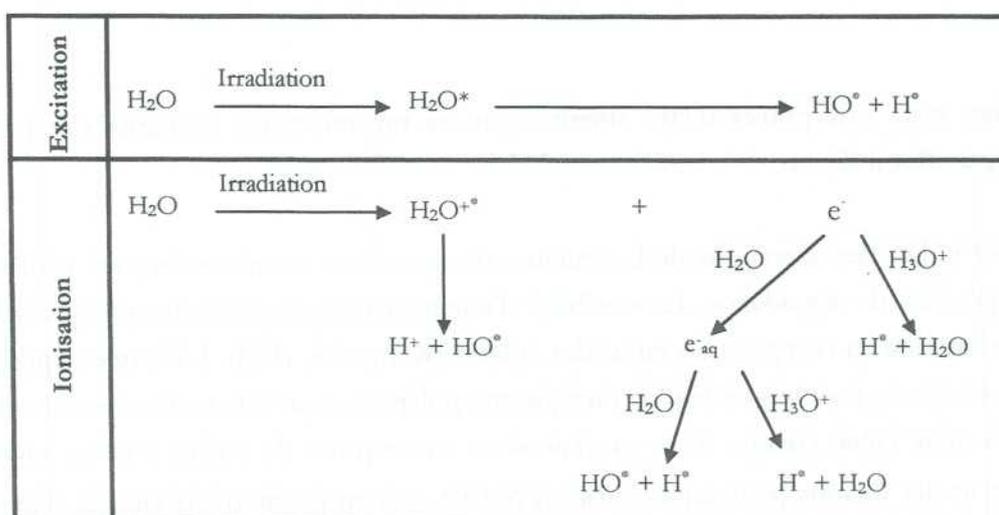


Tableau 6 : La radiolyse de l'eau.

En réalité, les espèces radicalaires peuvent migrer jusqu'à une distance de 25 nm pendant leur courte durée de vie (tableau 7). L'importance relative de l'effet indirect sur une molécule biologique dépend de la quantité d'eau présente à son voisinage immédiat (Dutreix et coll., 1993) et du TLE du rayonnement mis en jeu. Il est intéressant de noter que dans le cas du rayonnement gamma, qui est constitué de photons de TLE faible, c'est l'interaction de type effet indirect qui est prédominante. D'autre part, l'épaisseur de la membrane cytoplasmique (7 à 9 nm) est faible par rapport à celle des phases aqueuses qui l'entourent. Par conséquent, les produits de la radiolyse de l'eau ont un accès illimité pour attaquer et modifier chimiquement les constituants membranaires (Stark, 1991). C'est donc l'effet indirect des rayonnements ionisants qui est prépondérant, au niveau de la membrane plasmique, en comparaison de l'effet direct.

Temps (secondes)	Evènement
10^{-18}	Une particule ionisante traverse une molécule
10^{-15}	Intervalle de temps entre ionisations successives
10^{-14}	Dissociation d'espèces excitées électroniquement Début des réactions ions-molécules
10^{-12}	Les radicaux diffusent
10^{-10}	Les réactions dépendant des diffusions les plus rapides sont terminées
10^{-5}	Capture des radicaux par des capteurs réactifs

Tableau 7 : Echelle des temps en radiochimie.

III.3. Effets des rayonnements ionisants au niveau des protéines

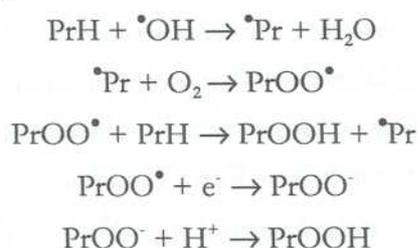
Les protéines sont susceptibles d'être atteintes par les rayonnements ionisants soit par effet direct, soit par effet indirect.

L'effet direct induit des altérations de la structure des protéines membranaires qui génèrent de nombreux produits de dégradation. La sensibilité d'une protéine aux effets directs de l'irradiation est indépendante de sa composition en acides aminés (Kempner, 1993). L'énergie déposée à la surface des protéines peut migrer le long du squelette polypeptidique à la recherche d'une liaison covalente de plus faible énergie. Il se produit alors une rupture de chaîne soit au niveau de l'enchaînement des liaisons peptidiques (Liaison N-C α), soit en position C α latérale (Kempner, 1993). La localisation de cette rupture peut être modifiée en fonction de la nature de l'acide aminé se trouvant en position C α latérale. Si ce substitut est de nature aromatique, il protégera la

protéine d'une cassure au niveau de la liaison peptidique adjacente. La nature hydrophobe ou hydrophile de l'environnement pourrait jouer aussi un rôle déterminant dans les mécanismes régissant la localisation de cette rupture, en opposant une barrière au passage de l'électron.

La radiolyse de l'eau produit des espèces radicalaires très réactives qui vont attaquer les liaisons peptidiques ainsi que les acides aminés qui constituent les protéines.

Ces radicaux peuvent réagir au niveau d'une liaison peptidique en provoquant sa rupture et former ainsi des fonctions carbonyles (groupements aldéhydes ou cétones). Parallèlement à la production de fonctions carbonyles, l'oxydation des protéines, suite à l'effet indirect des rayonnements ionisants, peut générer des hydroperoxydes (PrOOH) selon la réaction chimique suivante (Simpson et coll., 1992) :



Ce processus comporte des similitudes avec les réactions de lipoperoxydation. Ces formes peroxydées sont susceptibles de propager les dommages oxydatifs grâce à des réactions en chaîne (Dean et coll., 1993).

L'attaque radicalaire de certaines chaînes latérales de polypeptides peut être aussi à l'origine de la formation de groupements carbonyles (Davies et coll., 1991). Par exemple, l'attaque radicalaire des résidus arginine, lysine et proline aboutit à la formation d'acide glutamique (Rice-Evans, 1994).

Les acides aminés, de part leur structure chimique, possèdent des susceptibilités différentes vis à vis des radicaux. Les plus réactifs sont les résidus aromatiques du type histidine, tryptophane, et tyrosine, la cystéine, la proline, et dans une moindre mesure la méthionine, l'arginine et la lysine (Davies et coll., 1991 ; Stadtmann & Oliver, 1991).

Les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) possèdent un groupement thiol (SH) qui s'oxyde facilement pour générer des radicaux thiyls (RS[•]), espèces très réactives qui vont former des ponts disulfures inter ou intramoléculaires.

Les résidus aromatiques (tryptophane, phénylalanine, tyrosine et histidine) réagissent de manière prépondérante avec les radicaux hydroxyls et créent des pontages (ponts bityrosine).

La présence de métaux de transition complexés dans la structure de la protéine peut faciliter l'initiation de réactions radicalaires. Ce processus est décrit par (Stadtmann & Oliver, 1991) comme étant la MCO (oxydation catalysée par les ions métalliques). La réaction de Fenton (Fe²⁺

+ $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$) permet de générer des radicaux hydroxyls qui réagissent avec les acides aminés voisins du site actif. Quand les radicaux sont formés au niveau d'un site spécifique d'acide aminé, ils peuvent être rapidement transférés sur d'autres sites à l'intérieur de l'infrastructure de la protéine.

III.4. Effets des rayonnements ionisants au niveau des lipides

L'effet indirect est majoritaire au niveau de la membrane plasmique. Les espèces radicalaires produites lors de la radiolyse de l'eau vont attaquer les doubles liaisons C=C des chaînes d'acides gras polyinsaturées, qui sont séparées par un groupement méthylène (Edwards et coll., 1984 ; Bonnefont-Rousselot, 1994). C'est la réaction de peroxydation lipidique (figure 8). Elle est initiée par la capture d'un atome d'hydrogène en position bis-allylique d'un acide gras (LH). Le radical lipidique ($\text{L}\cdot$) ainsi produit va se stabiliser sous forme de diène conjugué. Il réagit ensuite avec une molécule d'oxygène pour former le radical peroxy ($\text{LOO}\cdot$). Une phase de propagation débute et aboutit à la production d'hydroperoxydes lipidiques (LOOH). Ce processus de propagation entre en compétition avec les réactions de terminaison et s'amplifiera jusqu'à ce que les quantités d'oxygène et d'acides gras non oxydés soient épuisées. D'autre part, la présence d'ion Fe^{2+} peut promouvoir la lipoperoxydation en réagissant avec les hydroperoxydes lipidiques pour synthétiser les radicaux alkoxy ($\text{LO}\cdot$) qui relancent ainsi la chaîne des peroxydations (Stark, 1991).

Les hydroperoxydes peuvent être dégradés et aboutir à la formation de produits cytotoxiques. Les principaux produits de dégradation de la lipoperoxydation sont le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE). Ces espèces sont très réactives et donc toxiques. En particulier, le 4-HNE inhibe l'agrégation des plaquettes et bloque l'action des macrophages (Rice-Evans, 1994).

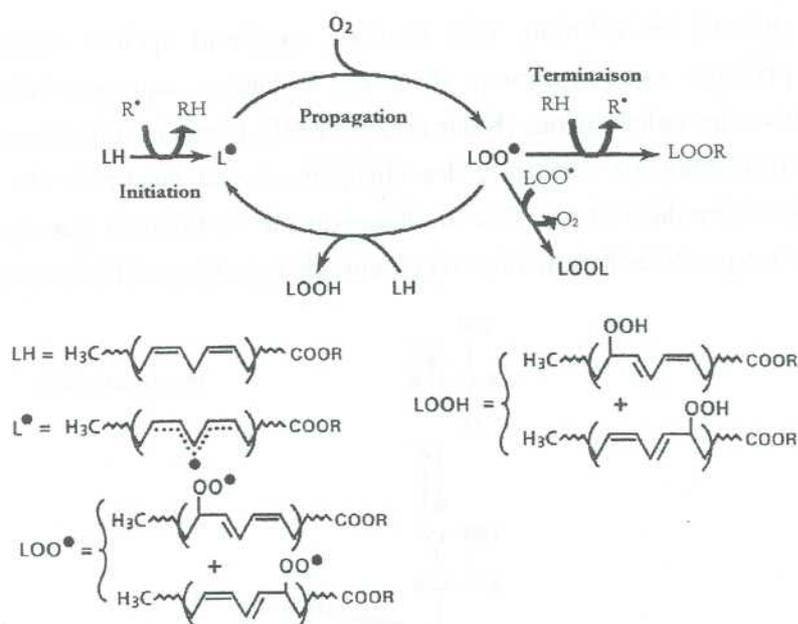


Figure 8 : Le mécanisme d'oxydation des acides gras polyinsaturés initié par les radicaux libres.

Un autre mécanisme important induit par les radiations et qui accompagne la peroxydation lipidique, est la fragmentation des phospholipides due à une attaque radicalaire de leur partie hydrophile (Edimecheva et coll., 1997). Certains lipides, qui possèdent un groupement hydroxyle en position β de leur liaison amide ou ester, sont susceptibles de subir une fragmentation lors d'une exposition aux rayonnements ionisants.

D'autres modifications de la structure des lipides accompagnent la peroxydation des chaînes d'acides gras insaturées : hydrolyse des têtes des phospholipides, des pontages lipide-lipide et protéine-lipide (Leyko & Bartosz, 1986).

III.5. Effets des rayonnements ionisants au niveau des sucres

Les monosaccharides peuvent être oxydés par des radicaux libres si la réaction est catalysée par des métaux de transition (figure 9), générant des radicaux libres, du peroxyde d'hydrogène et des espèces carbonyles réactives. L'oxydation du glucose induit des dommages au niveau des protéines résultant de l'action des espèces radicalaires produites, et des liaisons covalentes établies entre les groupements carbonyles (générés par le processus d'oxydation) et les composants des protéines (Rice-Evans, 1994). Kaler et coll., (1993) ont montré que l'irradiation gamma de carbohydrates dans des solutions aqueuses provoquait l'altération de flux ioniques au niveau des membranes cellulaires de cellules synaptiques. De plus, ces effets sont d'autant plus marqués que

l'ion Fe^{2+} est présent en solution. Ces résultats suggèrent qu'une irradiation gamma de carbohydrates présents non seulement dans des solutions aqueuses mais aussi dans les membranes, génère des radio-toxines (Kaler et coll., 1993). Certains auteurs ont relevé, après une exposition aux rayonnements ionisants, des changements du glycocalix de cellules sanguines provenant de souris irradiées *in vivo*. Ces modifications se traduisaient par des altérations dose-dépendantes de la capacité de liaison à des récepteurs de type lectine (Kubasova et coll., 1981).

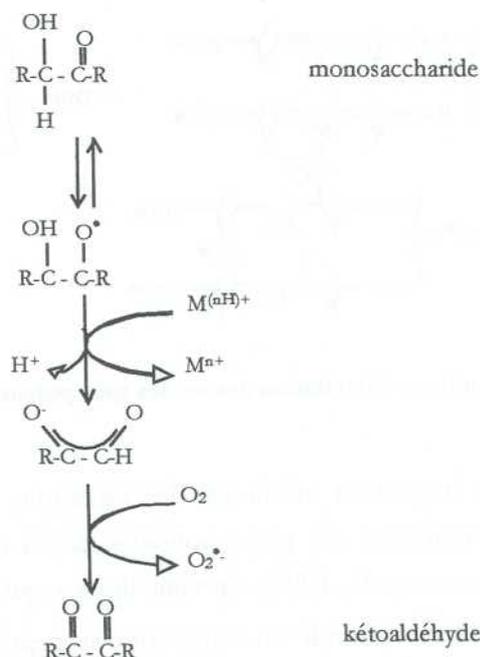


Figure 9 : Oxydation du glucose par les radicaux libres (Rice-Evans, 1994).

IV. Les mécanismes de défenses cellulaires

Un anti-oxydant est défini comme une substance capable de retarder ou de prévenir l'oxydation d'un substrat. Il est présent en faible quantité par rapport à celle du substrat. Halliwell (1995) considère que les anti-oxydants agissent à différents niveaux dans les réactions d'oxydation, et qu'ils ont cinq mécanismes d'action :

- (i) Diminuer les concentrations en oxygène sur le site de la réaction d'oxydation ;
- (ii) Prévenir l'initiation des réactions en chaîne en piégeant les radicaux initiateurs ;
- (iii) Se lier à des catalyseurs tels que les métaux de transition afin de prévenir la synthèse de chaînes de radicaux initiateurs et de limiter les réactions de lipoperoxydation et d'oxydation des protéines ;

-
- (iv) Décomposer les peroxydes pour qu'ils ne soient pas reconvertis en radicaux initiateurs ;
 - (v) Casser les chaînes de réactions afin de prévenir la capture d'un atome d'hydrogène par les espèces radicalaires actives.

Dans toute cellule il existe un équilibre entre la présence d'un stress oxydatif basal, notamment au niveau de la mitochondrie, et le niveau des systèmes de défenses anti-oxydantes. Dans la situation d'une attaque oxydative, ces mêmes systèmes sont activés dans l'organisme afin de lutter contre les espèces oxydantes indésirables et d'éviter leur apparition (Deby, 1991). Cette intervention anti-oxydante, en inhibant ou réduisant la toxicité des radicaux libres, peut offrir une protection contre les rayonnements ionisants (Greenstock, 1993).

IV.1. Les systèmes de défenses anti-oxydants membranaires

Les systèmes de défenses anti-oxydantes agissent sur trois niveaux de protection (Diplock, 1994). Le premier niveau de défense est principalement de type enzymatique. Il fait intervenir des enzymes dont l'activité dépend de la présence de minéraux (Mn, Cu, Zn et Se). Il consiste à contrôler la formation et la propagation d'espèces radicalaires primaires générées à partir de la molécule d'oxygène.

Le second niveau implique l'action des vitamines C et E, des carotènes et du glutathion. Leur rôle est de prévenir la propagation d'espèces radicalaires secondaires dans les chaînes de réaction telles que la lipoperoxydation, initiées et conduites par les radicaux primaires.

Le troisième niveau a pour but de palier, de manière enzymatique, à la formation d'espèces radicalaires secondaires qui peuvent aggraver les dommages oxydatifs à partir de réactions catalysées par les métaux présents dans leur environnement.

IV.1.1. Les systèmes de défenses enzymatiques

Certaines enzymes jouent un rôle primordial dans ces mécanismes de protection radicalaire. Selon certains auteurs (Edwards et coll., 1984 ; Bonnefont-Rousselot, 1994) ces systèmes de défense biologique seraient susceptibles de prévenir la peroxydation lipidique induite par les radiations ionisantes dans les membranes cellulaires *in vivo*.

Les premières espèces réduites synthétisées à partir de la molécule d'oxygène sont l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Le contrôle de ce processus initial est donc le premier niveau de défense érigé contre les dommages radicalaires.

IV.1.1.1. La Superoxyde Dismutase (SOD)

Chez les mammifères, il existe deux formes de superoxyde dismutase. Les Cu/Zn-SOD qui se situent au niveau du cytoplasme et du glycocalix, et les Mn-SOD qui sont localisées dans la mitochondrie. Toutes catalysent la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée selon la réaction chimique suivante (Deby, 1991) :



Les SOD ont un rôle fonctionnel important dans le contrôle des radicaux formés à partir de l'oxygène. Elles pourraient contribuer au maintien de l'intégrité des structures de la membrane (Köteles, 1982).

IV.1.1.2. La glutathion peroxydase et la catalase

Le compartiment cytosolique est protégé des dommages oxydatifs dus au peroxyde d'hydrogène par la catalase et la glutathion peroxydase liée au selenium (GSHPx). GSHPx est aussi présente dans les mitochondries.

IV.1.1.3. La glutathion peroxydase (GSHPx)

La glutathion peroxidase est un seleno-enzyme dont la fonction catalytique dépend de la teneur en minéral de l'enzyme. La GSHPx catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes lipidiques (figure 10) :

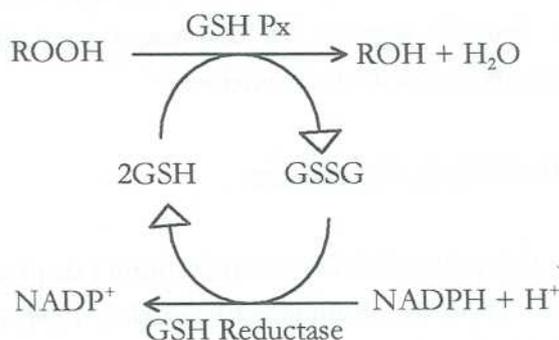


Figure 10 : Action de la GSHPx.

En présence de NADPH, elle régénère le glutathion (GSH).

IV.1.1.4. La catalase

La catalase est localisée dans la membrane des peroxysomes. La réaction générale catalysée par cet enzyme est la suivante :



Lorsque la concentration en peroxyde d'hydrogène est élevée, la glutathion peroxydase est dépassée. Dans ces circonstances, bien que la catalase soit peroxysomale, son rôle est alors important car le peroxyde d'hydrogène en excès peut traverser les membranes et ainsi être dégradé au niveau des peroxysomes.

IV.1.2. Les systèmes de défenses non enzymatiques

Des substances capables de neutraliser un radical libre par molécule, appelées piègeurs stoechiométriques, constituent un autre mécanisme de défense.

Une des premières cibles des espèces radicalaires produites à partir de l'oxygène sont les chaînes d'acides gras polyinsaturées présentes au niveau des phospholipides membranaires. Le principal anti-oxydant membranaire est la vitamine E (ou α -Tocopherol). Il existe une relation synergétique par laquelle la vitamine C et probablement certains caroténoïdes augmentent l'efficacité de la vitamine E en la régénérant.

IV.1.2.1. La vitamine E (α -Tocophérol)

La vitamine E (α -TOH) est liposoluble. α -TOH est oxydé lorsqu'il piège un radical peroxyde lipidique dans la membrane cellulaire (figure 11). Son premier produit de dégradation est le radical α -tocopheroxyle (α -TO $^{\bullet}$) qui peut accepter un hydrogène et ainsi se régénérer en vitamine E. Cette réaction est donc réversible. Si l' α -tocopheroxyle est à son tour oxydé, le produit généré est l' α -tocopheryl quinone (α -TQ) dont l'anneau chromanol est ouvert. La formation de α -TQ est irréversible. *In vivo*, il existe un mécanisme qui régénère efficacement α -TOH à partir de son radical. C'est pourquoi, seule une faible quantité de α -TQ est synthétisée et détectée dans les tissus.

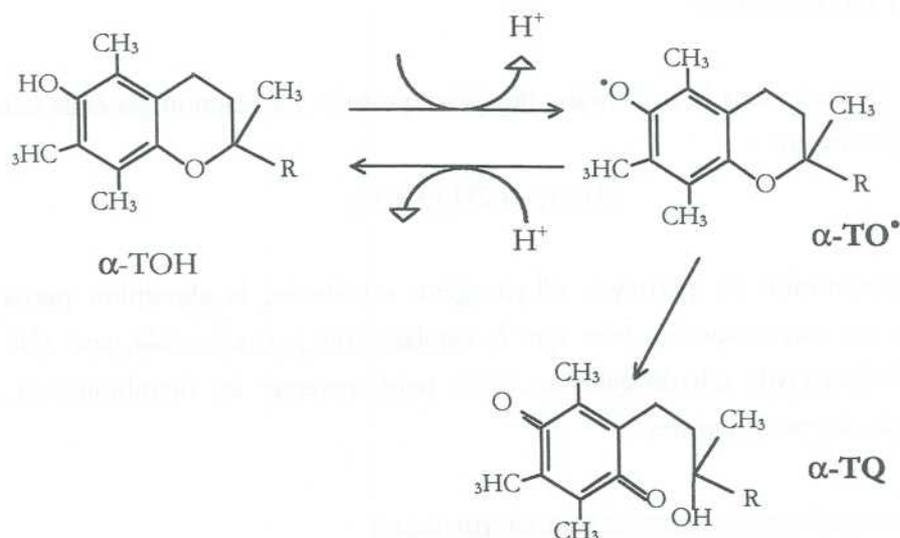


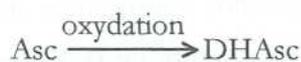
Figure 11 : Schéma d'oxydation de la vitamine E

Il semble que des réarrangements structuraux des phospholipides membranaires permettraient une plus grande efficacité de la vitamine E vis à vis du piégeage des radicaux peroxydes (RO₂•) générés par la peroxydation lipidique (Bonfont-Rousselot, 1994).

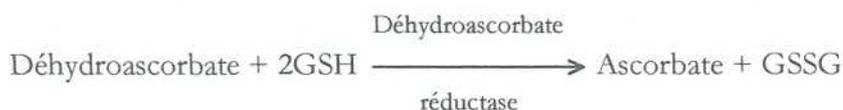
IV.1.2.2. La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C est hydrosoluble. Les gènes codant pour une des enzymes requis pour la synthèse d'ascorbate étant absents chez l'Homme et chez le primate, ces espèces n'ont pas la capacité de produire de la vitamine C à partir du glucose. Elles sont donc dépendantes d'une source externe de vitamine fournie par leur régime alimentaire.

La vitamine C (ou ascorbate) piège les espèces radicalaires oxygénées (O₂•, HO₂• et HO•) selon la réaction suivante :



Lorsque la vitamine C (Asc) est oxydée, son produit de dégradation est le déhydroascorbate (DHAsc). La réaction enzymatique qui permettra au déhydroascorbate de se reconvertir en acide ascorbique est la suivante :



L'ascorbate a une deuxième fonction importante *in vivo* qui est de régénérer α -TOH à partir de son radical. Ce mécanisme est décrit figure 12. L'acide ascorbique sert de donneur d'hydrogène afin de prévenir la formation irréversible de α -TQ.

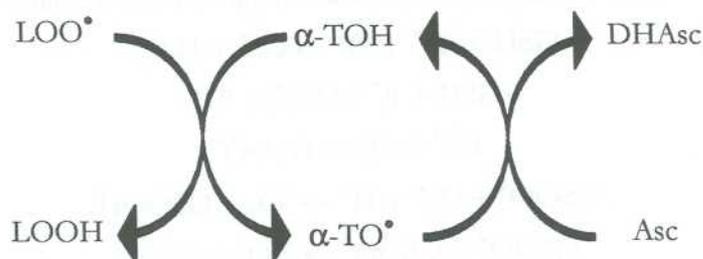


Figure 12 : Régénération de la vitamine E par la vitamine C.

La figure 12 peut être complétée par la réaction enzymatique de régénération de la vitamine C (figure 13) :

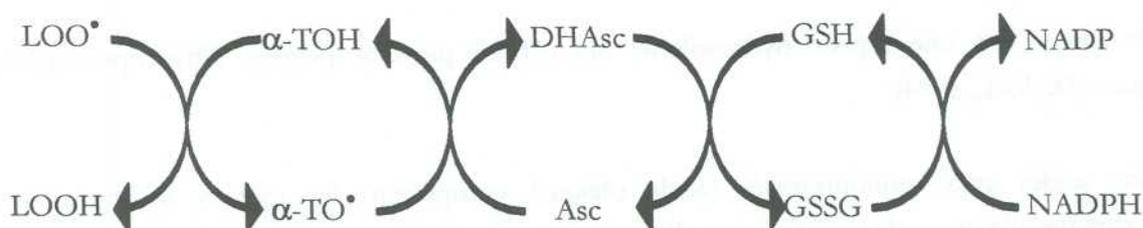


Figure 13 : Régénération de la vitamine E par la vitamine C et de la vitamine C par le glutathion.

La vitamine C joue donc un rôle d'anti-oxydant direct en piégeant les espèces radicalaires oxygénées, et indirect en réagissant avec le radical tocophéroxy pour régénérer la vitamine E.

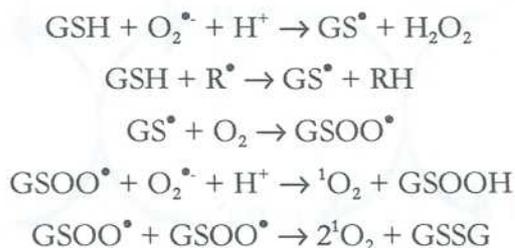
IV.1.2.3. Les caroténoïdes

Ils sont aussi appelés provitamines A. Un des précurseurs de la vitamine A est le β -carotène. Cet anti-oxydant a aussi un double rôle : direct et indirect. Il agit de manière synergique avec la vitamine E afin de piéger les radicaux libres présents au niveau de la membrane. Il serait aussi capable de régénérer l' α -TOH à partir de son radical α -tocophéroxy dans les systèmes biologiques *in vivo*.

IV.1.2.4. Le glutathion (GSH)

Le glutathion permet de générer des espèces réduites pour les anti-oxydants de type enzymatique. Le GSH joue un rôle de protection primordial contre les dommages induits par les radicaux

libres. C'est un piègeur des radicaux hydroxyl et de l'oxygène singulet. Mais suite à la réaction avec $\cdot\text{OH}$ des radicaux thiyls sont produits. Ces radicaux sont toutefois moins réactifs que les radicaux hydroxyls. Bien que le GSH joue un rôle de protection dans les cellules vivantes, il est possible qu'il soit à l'origine de réactions secondaires néfastes pour la cellule (Diplock, 1994) :



IV.1.3. Autres composés

L'ubiquinone, ou coenzyme Q, agirait en tant qu'anti-oxydant dans les membranes cellulaires (Diplock, 1994).

L'acide urique est une espèce hydrosoluble qui est un puissant piègeur d'hydroperoxydes lipidiques (Diplock, 1994).

Certains acides gras monoinsaturés (acide oléique) complexent les métaux de transition catalyseurs des réactions de peroxydation. Ils sont donc des inhibiteurs de la lipoperoxydation en arrêtant l'activité pro-oxydante des ions métalliques (Balasubramanian et coll., 1988). Ce sont des agents anti-catalytiques.

Voici un schéma récapitulatif (figure 14) des systèmes de protection anti-oxydants de la cellule :

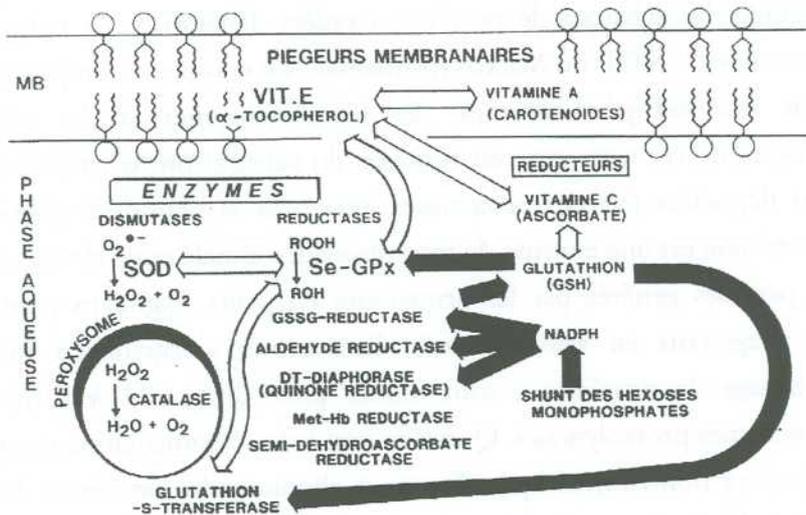


Figure 14 : Systèmes de protection cellulaires (Chaudière, 1988). Les flèches vides matérialisent les effets de synergie et de protections mutuelles. Les flèches pleines symbolisent les contraintes métaboliques ou de compartimentation.

IV.2. Les systèmes de réparation membranaire

Les systèmes de défenses anti-oxydantes de la cellule préviennent l'initiation et la propagation des dommages dus à une attaque radicalaire. Mais la cellule possède aussi des systèmes enzymatiques qui dégradent et/ou réparent les dégradations résultant des atteintes oxydatives. Ils sont nommés systèmes de réparation. Il est important de noter que la dégradation ou l'élimination des molécules oxydées précèdent les processus de réparation (Davies et coll., 1990).

IV.2.1. Au niveau des protéines

Suite à une attaque radicalaire, les protéines sont oxydées, et dégradées rapidement et complètement en acides aminés libres. La protéolyse constitue la première étape du processus de réparation. La dégradation des protéines oxydées et des fragments de protéines a pour but d'éliminer de telles espèces, et de prévenir leur participation dans les réactions d'agrégaions et de liaisons croisées ou dans d'autres activités délétères.

La dénaturation et/ou l'augmentation de l'hydrophobicité des protéines oxydées est le mécanisme de reconnaissance par lequel les modifications oxydatives transforment les protéines en substrat

protéolytique (Davies et coll., 1990). Dans les érythrocytes, 80 à 90 % de l'activité protéolytique sur les protéines oxydées est réalisée par un complexe de protéinases, protéases, et peptidases qui coopèrent pour dégrader les substrats de protéines oxydées dénaturées. Ce complexe de haut poids moléculaire est appelé : MOP ou Macroxyprotéinase. Ce complexe comporte de multiples sites actifs tels que des sulfhydryl-enzymes, des métallo-enzymes et des sérine-enzymes. L'importance de chacun de ces sites varie en fonction du substrat protéolytique. Les protéines cytoplasmiques sont dégradées par des protéinases, protéases et peptidases présentes dans le cytoplasme. Une protéinase est une enzyme de reconnaissance initiale et de clivage. Une protéase dégrade les grands peptides générés par les protéinases en petits fragments peptidiques. Une peptidase clive ces fragments en acides aminés. Les termes « dégradation de protéines », « protéolyse » et « clivage de protéines », sont utilisés pour désigner l'hydrolyse de liaisons peptidiques par des enzymes protéolytiques. Quant au terme de « fragmentation des protéines », il fait référence à la cassure non-enzymatique, directe et chimique des protéines. Le mécanisme d'action de MOP est décrit figure 15. Dans les autres types cellulaires de mammifères, les complexes de protéinase de haut poids moléculaire (600000 à 700000 dalton) représentent des formes différentes de MOP (Davies et coll., 1990).

Les acides aminés libérés suite à la dégradation des protéines oxydées dénaturées peuvent être réutilisés pour la synthèse des protéines qui constitue la deuxième étape du processus de réparation. En effet, uniquement quelques acides aminés dans chaque protéine auraient été oxydés à la suite d'un stress (Davies et coll., 1990).

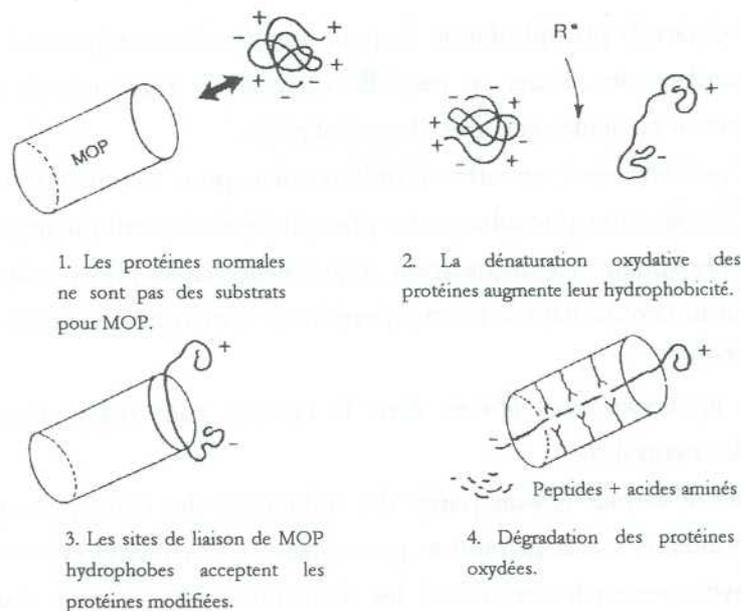


Figure 15 : Dégradation sélective des protéines oxydées par MOP (Pacifi & Davies, 1991). (1) Les protéines naturelles possèdent des structures secondaires et tertiaires qui piègent les résidus hydrophobes. (2) Les dommages radicalaires induits sur les protéines provoquent leur dénaturation et l'exposition des résidus hydrophobes. (3) Cette nouvelle conformation permet à MOP de reconnaître les protéines aberrantes en tant que substrat. (4) Les protéines oxydées dénaturées sont enfilées dans le cœur du cylindre de MOP où de multiples sites actifs dégradent les protéines en petits peptides et acides aminés.

IV.2.2. Au niveau des lipides

Plusieurs mécanismes de réparation sont développés par la cellule afin de minimiser l'énergie nécessaire à l'élimination des lipides qui sont endommagés, fonctionnellement inactifs ou délétères.

L'hydrolyse sélective des acides gras oxydés constitue la première étape des processus de réparation des lipides membranaires (Davies et coll., 1990). Elle consiste à éliminer des espèces souvent réactives et polaires produites lors des réactions de lipoperoxydation : hydroperoxydes, aldéhydes, époxydes et cétones.

La phospholipase A_2 interagit avec une grande spécificité sur les zones de modifications structurales de la matrice hydrophobe de la membrane. Elle joue un rôle crucial dans le métabolisme et le « turn-over » des phospholipides membranaires. Elle agit en clivant les acides gras des phospholipides en position sn-2. Son activité est nécessaire pour les réactions de réacylation et de déacylation qui sont impliquées dans la synthèse de phospholipides spécifiques. Sevanian & Kim (1985) ont montré que la spécificité de cette enzyme pour les phospholipides oxydés est extrêmement grande et peut être reliée à son affinité pour l'hydrolyse des acides gras

polyinsaturés. D'autre part, la phospholipase A_2 peut être activée en réponse à des perturbations de l'organisation membranaire. Dans ce cas, elle catalyse les réactions de transacylation qui façonnent la composition en acides gras des phospholipides.

La phospholipase C possède aussi une affinité préférentielle pour les substrats oxydés (Gamache et coll., 1988). Elle clive les têtes phosphates des phospholipides membranaires en hydrolysant la liaison ester glycéro-phosphate. La dégradation séquentielle par la phospholipase C et la lipase diacylglycérol pourrait intervenir dans la restructuration de la membrane suite à un stress oxydatif (Gamache et coll., 1988).

Les hydroperoxydes lipidiques ainsi libérés dans le cytosol vont réagir avec les peroxydases cytosoliques afin de les neutraliser.

L'enzyme responsable de la plus grande partie des réductions des hydroperoxydes lipidiques en leurs alcools correspondants est la glutathion peroxydase. Cet enzyme cytosolique a une faible activité contre les hydroperoxydes acylés ou les hydroperoxydes intégrés dans la membrane. Ainsi, la capacité de cette enzyme à arrêter les réactions en chaîne radicalaires est limitée si les peroxydes restent associés avec la membrane (van Kujik et coll., 1987). La phospholipase A_2 facilite l'action de la GSH-Px en relarguant les hydroperoxydes d'acides gras des phospholipides membranaires, permettant ainsi la réduction de ces espèces par les peroxydases cytosoliques et la détoxification des hydroperoxydes d'acides gras (van Kujik et coll., 1987).

L'action conjointe de la phospholipase A_2 et du glutathion peroxydase initie un processus de réparation membranaire important.

Le processus d'élimination des acides gras altérés et de la neutralisation des espèces lipidiques réactives est complété par la réacylation des lysophospholipides, générés par l'action d'hydrolyse de la phospholipase A_2 en position sn-2 des phospholipides (van Kujik et coll., 1987). C'est la deuxième étape du processus de réparation des lipides membranaires oxydés. La phase de réacylation dépend de l'énergie disponible pour la synthèse de l'acyl gras coenzyme A (FA-CoA). Le processus complet de réparation membranaire impliquant la phospholipase A_2 , la GSH-Px et la réacylation est décrit figure 16. Plusieurs mécanismes pourraient stimuler la réacylation : les modifications de la structure des membranes suite à une oxydation, l'augmentation des concentrations en lysophospholipides, l'élévation du taux d'acides gras libres, et l'accumulation d'espèces lipidiques oxydées (Davies et coll., 1990). Zaleska & Wilson (1989) ont montré que certaines conditions de peroxydations (et dans certaines situations) pouvaient inhiber, plutôt que stimuler, l'acylation des phospholipides. Pendant les stades précoces de la peroxydation lipidique des membranes, il y aurait stimulation de l'acylation, précédant l'accumulation d'espèces lipidiques oxydées. Lorsque le stress oxydatif augmente, il existe une inhibition apparente de la réacylation (Dise et coll., 1987), mais le mécanisme de cette inhibition reste encore inconnu.

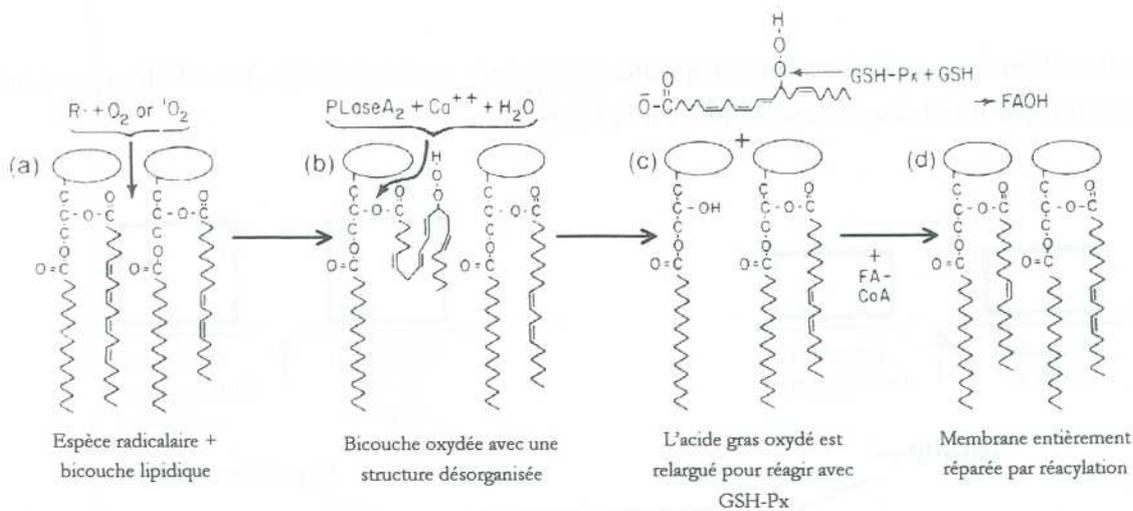


Figure 16 : Modèle de réparation des phospholipides insaturés altérés dans les bicouches membranaires, suite à une oxydation (van Kujik et coll., 1987). Différentes espèces radicalaires et oxydantes peuvent attaquer la membrane (a) et produire des peroxydes lipidiques. La structure en bicouche est désorganisée par les peroxydes polaires (b). La phospholipase A2 élimine sélectivement les acides gras oxydés (c), la désorganisation membranaire diminue, et le GSH-Px présent dans la phase aqueuse peut alors réduire les hydroperoxydes relargués. La réparation est complète après réacylation par l'acide gras coenzyme A à longue chaîne (d).

IV.3. Le système de balance anti-oxydante

La production intracellulaire de molécules réactives dérivées de l'oxygène ou « stress oxydant » peut perturber l'homéostasie redox (Morel & Barouki, 1998). Le « potentiel redox intracellulaire » est la résultante de l'état redox des couples oxydo-réducteurs présents dans la cellule. Il va déterminer les proportions relatives des espèces (oxydées ou réduites) de chaque couple redox. Un stress oxydant est caractérisé par une surproduction des espèces réactives dérivées de l'oxygène. Les systèmes de défenses anti-oxydants de la cellule vont être activés afin de limiter la formation et l'accumulation de ces espèces délétères. Les conséquences d'un tel stress dépendent de la capacité de défense de la cellule vis à vis d'une telle attaque radicalaire. Si elle n'est pas létale, une vague oxydante est détoxiquée en quelques heures. Néanmoins, la perturbation des systèmes anti-oxydants, principalement celui de (ré)génération du glutathion, peut produire aussi un déséquilibre pro-oxydant dont l'effet, bien que moins intense est plus durable (Morel & Barouki, 1998). La capacité de réparer les membranes altérées suite à un stress oxydant peut être influencée par le degré de lipoperoxydation (Davies et coll., 1990). En effet, tant que la peroxydation ne dépasse pas la capacité de la cellule à réduire et à éliminer les hydroperoxydes d'acides gras, elle pourra faire face à une telle attaque. Il existe donc un équilibre entre la

production d'espèces radicalaires et la capacité de défenses anti-oxydantes des cellules que nous schématisons par une balance représentée sur la figure 17.

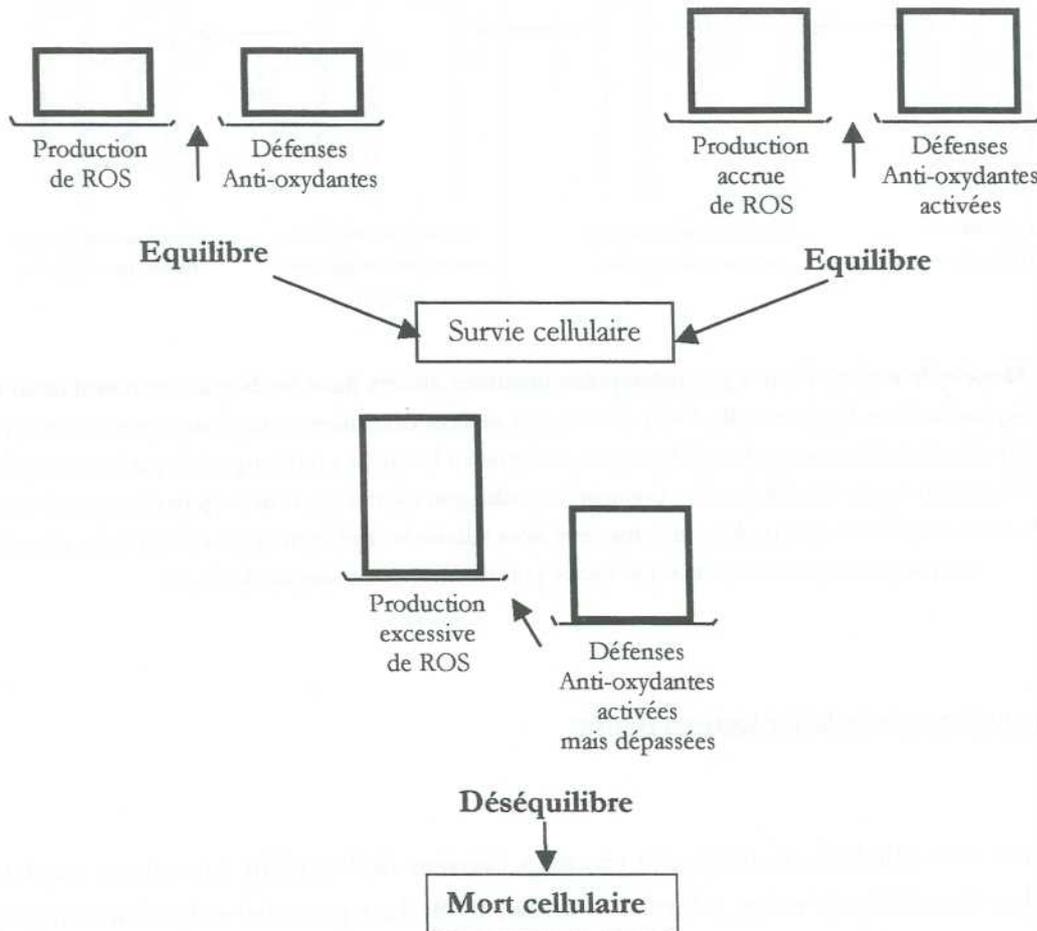


Figure 17 : Le système de balance anti-oxydante (ROS : espèces radicalaires dérivées de l'oxygène)

V. Conséquences biologiques des rayonnements ionisants sur la membrane plasmique

Les mécanismes de lésions moléculaires, consécutifs à une irradiation, perturbent l'intégrité de la membrane et participent au développement d'altérations fonctionnelles induites par les radiations, notamment aux modifications des propriétés biophysiques de la membrane.

V.1. Propriétés biophysiques de la membrane cellulaire

V.1.1. Dynamique moléculaire de la membrane plasmique

Les membranes ne sont pas des entités statiques, car les protéines et les lipides sont animés de divers mouvements au sein de la bicouche. On parle alors de fluidité membranaire : propriété de la membrane qui donne la possibilité à un constituant membranaire (protéine ou lipide) de se déplacer au sein de la matrice lipidique. Les énergies mises en jeu sont d'origine thermique (agitation brownienne). Un mécanisme actif d'entraînement par des protéines contractiles peut être aussi à l'origine du mouvement d'un constituant (Wolf, 1988). Mais quel que soit le mécanisme de mise en mouvement d'un constituant, l'énergie mise en jeu est très faible et la résistance de la matrice lipidique au mouvement (viscosité) est très limitante.

La compréhension des mouvements des lipides et des protéines au sein de la membrane a permis de définir un modèle microscopique de la dynamique des membranes biologiques (Smith & Oldfield, 1984) qui complète le modèle macroscopique de mosaïque fluide de Singer et Nicholson.

V.1.1.1. Mouvement des protéines

La diffusion latérale des protéines dépend essentiellement de la fluidité de la matrice lipidique, de la taille de la protéine, des interactions entre composants membranaires et des différentes fonctions associées aux protéines membranaires.

Des mouvements de migration des protéines vers des pôles cellulaires lors d'interactions avec des molécules extracellulaires sont à l'origine des phénomènes de «patching» (ou regroupement) et de «capping» (ou redistribution polaire).

La diffusion de rotation des protéines s'organise selon deux axes : autour d'un axe normal au plan de la membrane comme c'est le cas dans les fonctions de transport, ou autour d'une parallèle à la membrane (Andre & Donner, 1983(b)).

V.1.1.2. Mouvement des lipides

Il existe deux types de mouvements des lipides (figure 18) : des mouvements locaux et des déplacements moléculaires.

Les mouvements locaux concernent la flexibilité des chaînes hydrocarbonées, c'est à dire les rotations locales des différents atomes de carbone autour de l'axe des chaînes d'acides gras qui sont négligeables par rapport aux mouvements d'oscillation (ou de rotation d'ensemble) de ces mêmes chaînes.

Les déplacements moléculaires comprennent deux mouvements :

- Le mouvement de diffusion transverse (ou flip flop) permet le passage d'un constituant d'un feuillet à l'autre. Dans les membranes biologiques, la durée du phénomène de flip flop diffère selon le système étudié de 20 min à 2 heures. Ce mouvement jouerait un rôle dans le maintien de l'asymétrie de la composition en phospholipides.
- Le mouvement de diffusion latérale est le déplacement des phospholipides, au niveau du même feuillet, dans le plan de la membrane (Leterrier & Viret, 1986).

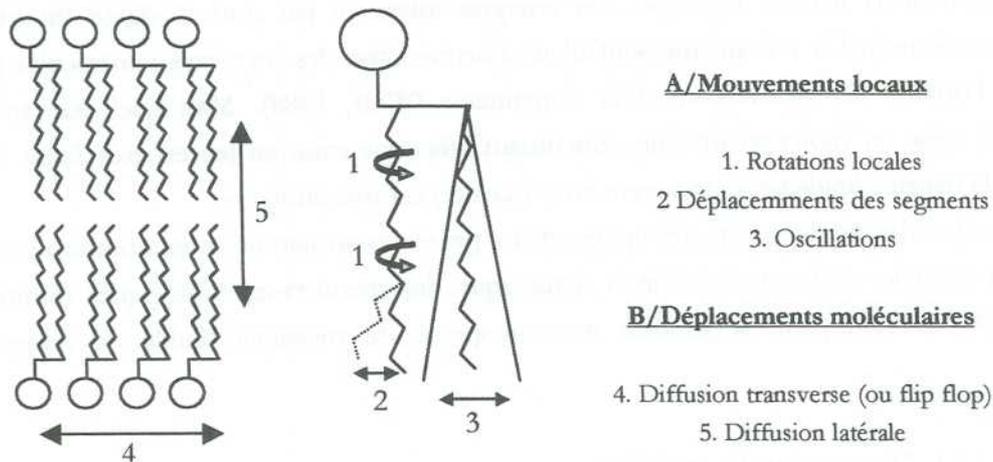


Figure 18 : Principaux mouvements des phospholipides (Leterrier & Viret, 1986).

La dynamique moléculaire est décrite par des temps caractéristiques (ou temps de corrélation) qui sont liés aux phénomènes de diffusion. Ces paramètres sont en relation directe avec la fluidité des microsystèmes biologiques. Le choix de la sonde et de la méthode spectroscopique adaptées à l'étude d'un de ces mouvements dépend de l'ordre de grandeur du temps caractéristique de ce mouvement (tableau 8).

Mouvements des lipides	Temps caractéristiques (s)
Rotations locales	10^{-10} à 10^{-11}
Rotations d'ensemble	10^{-8} à 10^{-9}
Diffusion transverse (flip flop)	Dizaines de minutes à plusieurs heures
Diffusion latérale	10^{-6} à 10^{-8}

Tableau 8 : Ordre de grandeur des temps caractéristiques des mouvements des lipides dans les membranes.

V.1.1.3. Les modulateurs intrinsèques de la fluidité membranaire

Ce sont des composants membranaires qui agissent soit dans le sens d'une augmentation de la fluidité, soit au contraire dans le sens d'une diminution.

Modulateurs agissant dans le sens d'une rigidification

Le rapport molaire cholestérol/phospholipides est un paramètre quantitatif inversement corrélé à la fluidité membranaire. En effet, le cholestérol augmente le degré d'ordre et la rigidité de la couche lipidique (Shinitzky & Barenholz, 1978). Il assure la stabilité mécanique en immobilisant les chaînes hydrocarbonées des phospholipides.

Le rapport molaire sphingomyéline/phosphatidylcholine serait aussi un paramètre quantitatif inversement corrélé à la fluidité membranaire (Shinitzky & Barenholz, 1978). En effet, la sphingomyéline, en raison de son faible degré d'insaturation, rigidifierait le feuillet externe de la membrane tandis que la phosphatidylcholine le fluidifierait.

La présence de complexes multiprotéiques de taille très importante constituant des domaines fixes dans la bicouche lipidique, comme les jonctions (serrées ou à trou), limite la diffusion moléculaire. De plus, le cytosquelette, qui confère à la cellule ses caractéristiques de flexibilité, de stabilité et de forme, en interagissant avec les protéines extrinsèques de la couche interne, constituerait un autre obstacle à la diffusion des lipides et des protéines dans la matrice lipidique. En effet, l'hétérogénéité de la distribution de la spectrine (constituant majeur du cytosquelette membranaire), chez les lymphocytes-T, est corrélée à des différences dans l'organisation lipidique de la membrane plasmique, en particulier dans la mobilité des lipides (Langner et coll., 1992).

La présence des protéines dans les membranes biologiques provoque des modifications de la cohésion membranaire. Elles seraient responsables d'un effet rigidifiant qui agirait préférentiellement dans leur environnement immédiat. Ainsi dans les membranes de microsomes, il existerait un gradient croissant de fluidité du voisinage des protéines à l'ensemble de la matrice lipidique (Engelke et coll., 1994). Cependant l'influence des protéines sur la bicouche lipidique ne peut pas être réduite à un seul mécanisme. Dans des liposomes où sont incorporés des polypeptides, les petites protéines agiraient en tant qu'obstacles mécaniques à la diffusion latérale des lipides, tandis que les protéines de plus grande taille seraient entourées d'une couche de lipides de plus faible fluidité que l'ensemble de la matrice lipidique (Engelke et coll., 1996).

Modulateurs agissant dans le sens d'une fluidification

Le degré d'insaturation des chaînes d'acide gras influence la fluidité de la bicouche. La présence de doubles liaisons dans les chaînes aliphatiques diminue le degré d'ordre des membranes et donc augmente sa fluidité. Cependant, l'effet le plus important sur la fluidité est obtenu lorsque la première insaturation est introduite dans la chaîne d'acide gras. Par contre, l'introduction ultérieure de doubles liaisons (passage à la polyinsaturation) a moins d'influence sur la fluidité (Wolf, 1988). Inversement, la diminution du nombre d'insaturations est corrélée à une augmentation de la viscosité.

V.1.2. Techniques permettant la mesure de la fluidité membranaire

Les méthodes spectroscopiques utilisées pour estimer la fluidité membranaire sont des techniques de fluorimétrie qui sont basées sur l'incorporation de sondes fluorescentes extrinsèques dans les membranes biologiques. L'intérêt de ces techniques provient de la spécificité des changements des caractéristiques de fluorescence des sondes en fonction de leur microenvironnement, et de la capacité de ces sondes à fournir des informations sur la rapidité des phénomènes et/ou sur les paramètres structuraux du système étudié. La viscosité est un paramètre macroscopique qui perd de sa signification physique à l'échelle moléculaire. Le terme de fluidité est alors utilisé pour caractériser d'une manière générale la viscosité et la cohésion du microenvironnement de la sonde.

V.1.2.1. Principales techniques de fluorimétrie

Les techniques de fluorimétrie permettant d'estimer le mouvement des phospholipides dans les membranes cellulaires sont : la polarisation de fluorescence, la méthode de formation d'excimères intermoléculaire, la mesure de la durée de vie de la fluorescence et la résonance paramagnétique électronique. Parmi toutes ces méthodes physiques, nous avons choisi de présenter la polarisation de fluorescence et la formation d'excimères intermoléculaires qui sont les techniques utilisées dans notre travail expérimental.

V.1.2.1.1. Polarisation de fluorescence

La technique de polarisation de fluorescence permet d'estimer la fluidité membranaire en analysant la capacité de rotation de sondes fluorescentes incorporées dans la structure membranaire. Cette capacité est fonction de l'état de fluidité membranaire du microenvironnement de la sonde. Plus le milieu qui environne la sonde est fluide, plus ses

mouvements seront facilités. Inversement, plus ce milieu est rigide, plus ses mouvements seront limités.

L'excitation des sondes fluorescentes par une lumière polarisée verticalement (\vec{E}) génère une population de molécules excitées dont les moments de transition (\vec{M}_0) sont orientés préférentiellement dans la direction du vecteur électrique d'excitation. Si les sondes ont des mouvements de rotation qui sont lents ou rapides par rapport à la durée de vie de leur état excité, aucune information ne peut être recueillie sur la cohésion du milieu. Il est indispensable que la sonde ait un état d'excitation dont la durée de vie est comparable au temps caractéristique du mouvement de rotation étudié. Ainsi, la dépolarisation de la fluorescence émise nous donne une information sur la fluidité de son microenvironnement. L'état de polarisation de la fluorescence émise est caractérisé par l'émission d'anisotropie de fluorescence $\langle r \rangle$:

$$\langle r \rangle = \frac{(I_{//} - I_{\perp})}{(I_{//} + 2I_{\perp})}$$

Ce paramètre est obtenu en projetant les composantes du vecteur électrique de l'émission de fluorescence sur le plan de polarisation de la lumière d'excitation. $I_{//}$ et I_{\perp} sont les composantes de l'intensité de fluorescence émise polarisée respectivement parallèlement et perpendiculairement par rapport au plan de polarisation incident.

$(I_{//} + 2I_{\perp})$ est proportionnel à l'intensité totale de fluorescence.

L'équation de Perrin permet alors de calculer la viscosité η du milieu à partir de $\langle r \rangle$ définie précédemment :

$$\frac{r_0}{\langle r \rangle} = 1 + \frac{kR\tau}{V\eta}$$

avec r_0 : anisotropie de fluorescence en l'absence de tout mouvement

τ : durée de vie réelle de la sonde fluorescence

T : température absolue

R : constante des gaz parfaits

V : volume molaire

Cependant l'application de cette loi est limitée dans le cadre des études de membranes biologiques et ceci pour les raisons suivantes (Stoltz & Donner, 1985) :

- Les sondes fluorescentes ne sont pas sphériques. Elles présentent souvent la forme d'un bâtonnet.
- Les systèmes membranaires constituent un milieu anisotrope où les sondes ne peuvent se relaxer dans toutes les directions de l'espace.
- Les sondes fluorescentes se répartissent de la même façon dans les régions fluides et rigides de la membrane.

C'est pourquoi, la microviscosité η (viscosité dans les membranes) ne peut être considérée que comme un paramètre qualitatif, semi-empirique pour comparer les fluidités des systèmes membranaires. Par conséquent, il est préférable d'exprimer les résultats en termes d'anisotropie de fluorescence $\langle r \rangle$.

La règle principale qui permet d'interpréter les résultats obtenus grâce à la technique de polarisation de fluorescence est la suivante : lorsque la mobilité augmente, la dépolarisation de l'émission de fluorescence augmente. C'est à dire en d'autres termes : la polarisation décroît ou l'anisotropie de fluorescence diminue. Donc la fluidité membranaire est reliée de manière inverse aux valeurs d'anisotropie de fluorescence (figure 19).

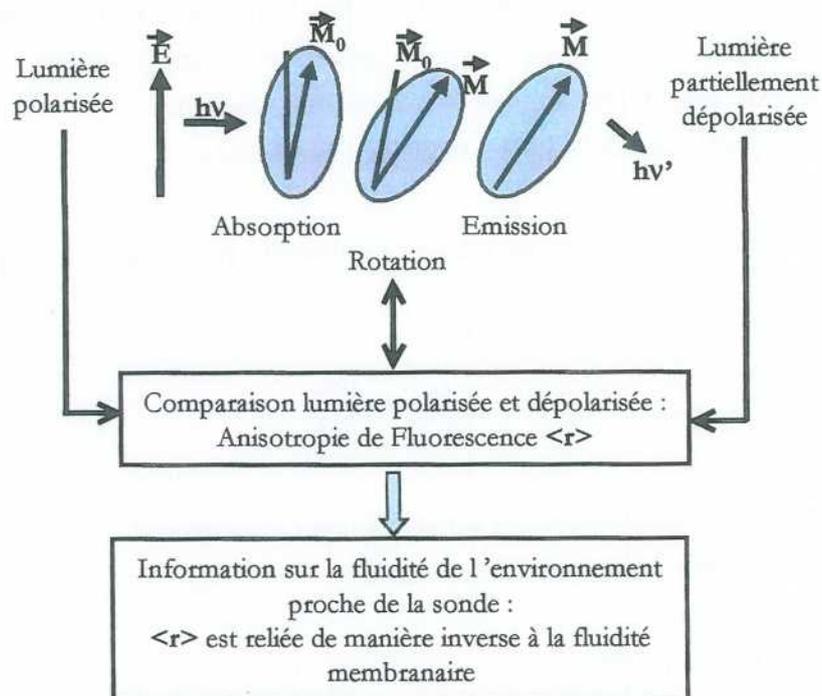


Figure 19 : Principes de la technique de polarisation de fluorescence permettant la mesure des mouvements de rotations des sondes incorporées dans la membrane (Valeur, 1993).

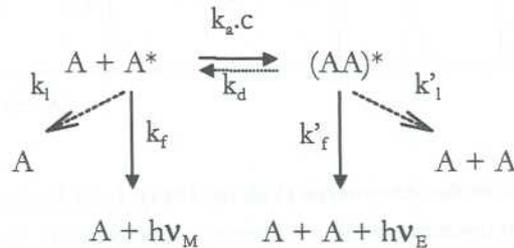
V.1.2.1.2. La formation d'excimères intermoléculaires

La méthode spectroscopique de formation d'excimères intermoléculaires permet d'estimer la cohésion lipidique membranaire et en particulier l'aptitude des lipides à se mouvoir dans le plan de la membrane.

Un monomère est une molécule fluorescente seule dans son état stable : A.

Un excimère est un dimère excité. Il est formé lors de la collision d'un fluorophore dans son état excité avec le même fluorophore mais dans son état stable : (AA)*. L'ensemble est un complexe moléculaire qui existe uniquement dans un état excité.

Le mécanisme de réaction est le suivant (Galla & Sackmann, 1974) :



k_a est la constante de vitesse du second ordre qui caractérise le processus bimoléculaire de formation des excimères.

k_d est la constante de vitesse caractérisant la dissociation du complexe excité (ou excimère) en A^* et A.

k_f et k'_f sont les constantes de vitesse (probabilités de transition par unité de temps, en s^{-1}) pour l'émission de fluorescence des monomères excités et des excimères, respectivement.

k_i et k'_i sont les constantes de vitesse caractérisant le retour à l'état stable par un processus non radiatif.

c est la concentration de la sonde fluorescente.

La formation d'excimères est révélée par l'observation d'une raie d'émission supplémentaire, à une énergie plus basse que la raie d'émission des monomères (figure 20).

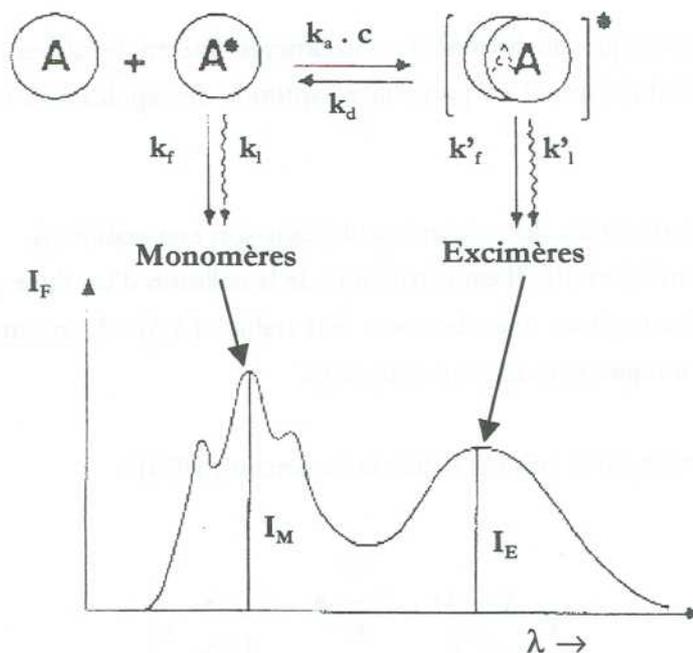


Figure 20 : Schéma de formation des excimères (Valeur, 1993). I_M et I_E sont les intensités maximales du spectre d'émission de fluorescence des monomères et des excimères, respectivement. k_a est la constante de vitesse du second ordre qui caractérise le processus bimoléculaire de formation des excimères. k_d est la constante de vitesse caractérisant la dissociation du complexe excité (ou excimère) en A^* et A . k_f et k'_f sont les constantes de vitesse (probabilités de transition par unité de temps, en s^{-1}) pour l'émission de fluorescence des monomères excités et des excimères, respectivement. k_i et k'_i sont les constantes de vitesse caractérisant le retour à l'état stable par un processus non radiatif. c est la concentration de la sonde fluorescente

Le rapport des rendements quantiques de fluorescence des excimères (ϕ_E) et des monomères (ϕ_M) est directement relié à la constante de vitesse du second ordre k_a (caractéristique du processus bimoléculaire de formation des excimères) selon la relation suivante :

$$\frac{\phi_E}{\phi_M} = \frac{k'_f \tau'_0 c}{k_f (1 + k_d \tau'_0)} k_a \quad (1)$$

τ'_0 est la durée de vie de l'état excité des excimères

Pour des températures inférieures à 60 °C, la dissociation des excimères est négligeable devant la désexcitation des complexes excités en deux monomères ($k_d \tau'_0 \ll 1$). L'équation (1) s'écrit donc :

$$\frac{\phi_E}{\phi_M} = \frac{k'_f}{k_f} \tau'_0 c k_a \quad (2)$$

En raison du recouvrement des spectres d'émission des monomères et des excimères, il est impossible de déterminer l'aire de chaque spectre et donc de calculer les rendements quantiques de fluorescence. Cependant, le rapport I_E/I_M des intensités maximales de fluorescence mesurées sur le spectre des excimères et des monomères, est directement proportionnel au rapport des rendements quantiques de fluorescence ϕ_E/ϕ_M , d'où la relation suivante :

$$\frac{\phi_E}{\phi_M} = \frac{1}{\kappa} \frac{I_E}{I_M} = \frac{k_f'}{k_f} \tau_0' c k_a \quad (3)$$

κ est un coefficient de proportionnalité qui dépend uniquement de la distribution spectrale de l'émission des monomères et des excimères.

La formation d'excimères est un processus limité par la diffusion dans les membranes fluides (à l'état cristal-liquide). Elle implique une collision entre les molécules A et A*. En reliant la fréquence de saut diffusionnelle au coefficient de diffusion latérale (D_{diff}), Galla & Sackmann, (1974) ont obtenu une équation décrivant la relation existant entre le coefficient de diffusion et l'efficacité de formation des excimères :

$$D_{diff} = \frac{\lambda k_a}{4d_c} = \frac{I_E}{\kappa I_M} \frac{k_f'}{k_f} \frac{\lambda}{4d_c} \frac{1}{\tau_0' c} \quad (4)$$

Avec λ : longueur d'un saut diffusionnel

d_c : distance critique pour la formation d'excimères

La réaction de A avec A* dépend de la fluidité de l'environnement. Plus le milieu est fluide, plus la vitesse de transport relatif de A vers A* est élevée et plus la désactivation de A par A* est importante (Andre et coll., 1983(a)). Le rapport I_E/I_M caractérise l'efficacité de la synthèse de ces complexes excités, et donc est une mesure du mouvement latéral à l'intérieur des membranes (Galla & Luisetti, 1980). Il peut être assimilé à un index de diffusion latérale dans la structure membranaire.

Les principaux paramètres influençant le nombre d'excimères formés sont:

- la concentration de la sonde fluorescente incorporée dans les membranes
- la durée de vie de l'état excité des monomères
- la fluidité de la membrane cellulaire : plus le milieu est fluide, plus le taux de formation d'excimères sera important, et donc l'index de diffusion latérale augmentera.

V.1.2.2. Localisation dans la membrane cellulaire des marqueurs fluorescents

Les sondes utilisées dans le cadre des études de la cohésion de la matrice lipidique par la technique de polarisation de fluorescence sont : le 1-(4-triméthylammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH), le 1-anilino-naphtalène-8-sulfonate (ANS), et les acides *n*-(9-anthroyloxy) stéariques (*n*-AS ; *n*=3, 6, 9 ou 12) . L'étude de la diffusion latérale des phospholipides peut être réalisée grâce à l'acide 1-pyrènedécanoïque (APD).

Ce sont des sondes fluorescentes qui se positionnent à des profondeurs différentes de la matrice lipidique et permettent donc de pouvoir estimer la fluidité membranaire à divers niveaux de la membrane cellulaire. La figure 21 représente leurs structures moléculaires ainsi que leur localisation membranaire.

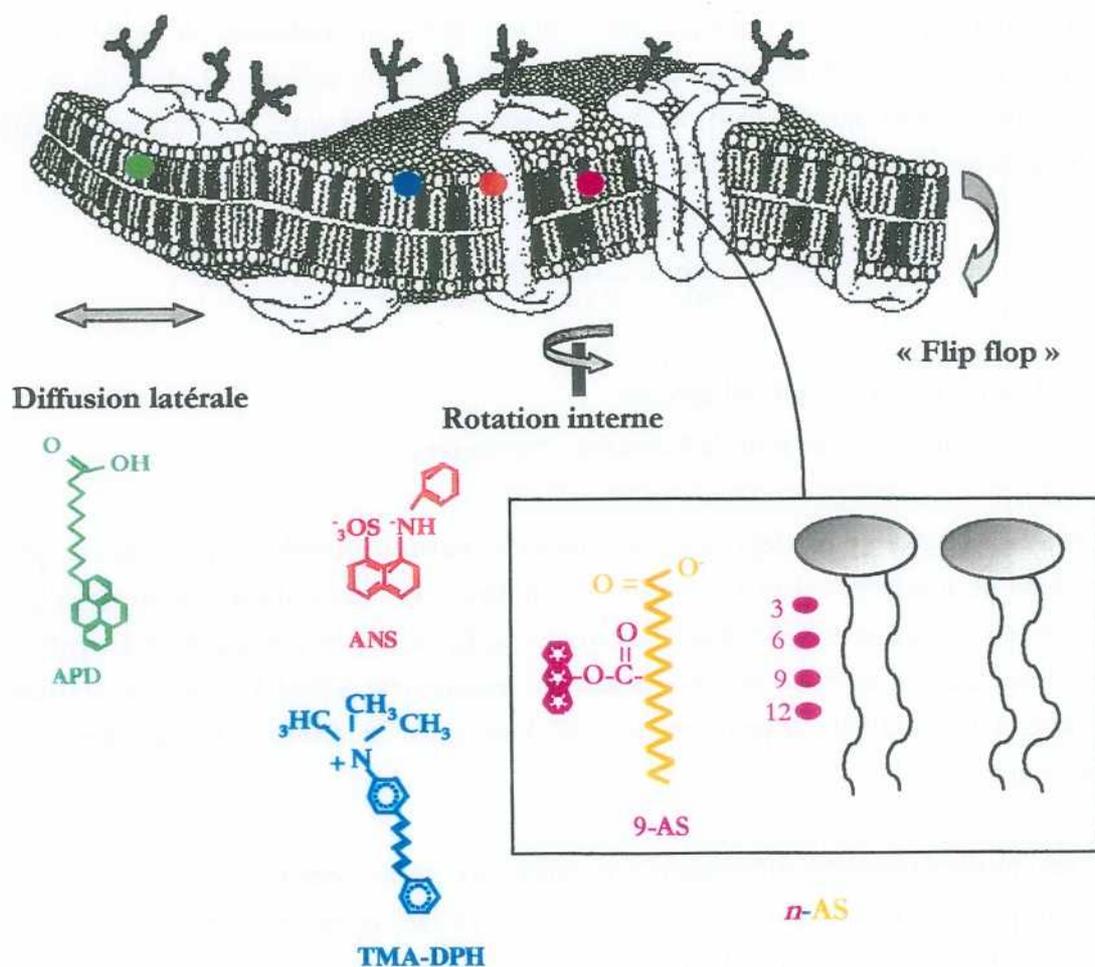


Figure 21 : Représentation des structures moléculaires des sondes fluorescentes et de leur localisation dans la membrane plasmique.

Le TMA-DPH est une molécule amphipatique qui s'ancre grâce à son groupement chargé (le triméthylammonium) au niveau des têtes polaires des phospholipides. Son groupement hydrophobe (le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) s'intercale entre les plus hautes portions des chaînes d'acides gras. Il se localise à l'interface eau-lipide de la membrane (Kuhry et coll., 1983).

L'ANS est une molécule amphiphile qui se positionne à l'interface eau-lipide de la membrane, au voisinage des protéines membranaires (Yonei & Kato, 1978).

Les acides stéariques sont constitués d'une chaîne d'acide gras sur laquelle est positionné soit en position C3, C6, C9 ou C12 un noyau anthracène qui est le groupement chromophore de la molécule. Ils s'orientent dans la phase lipidique parallèlement aux chaînes acyles des phospholipides. Ces sondes permettent d'estimer la fluidité membranaire à des profondeurs croissantes de la bicouche de la membrane (Thulborn & Sawyer, 1978).

L'acide 1-pyrènedécanoïque est une molécule amphiphile dont l'extrémité hydrophobe est constituée d'une molécule aromatique qui est le pyrène (groupement émissif ou chromophore), reliée par une chaîne carbonée à un groupement carboxyle. Elle s'incorpore très facilement dans les membranes lipidiques (Galla & Hartmann, 1980). L'extrémité hydrophile est ancrée à l'interface eau-lipide de la membrane, tandis que le pyrène étant attaché au dixième carbone de la chaîne carbonée, est logé profondément dans la région hydrophobe de la membrane. D'après les dimensions de Van-der-Waals d'une molécule de pyrène ($10 \text{ \AA} \times 7 \text{ \AA} \times 4 \text{ \AA}$), on peut supposer que l'acide 1-pyrènedécanoïque occuperait la même surface dans la matrice lipidique qu'une molécule de lipide (Sackmann, 1976). Il possède donc des ressemblances avec les phospholipides membranaires.

V.2. Altérations radio-induites des propriétés de la membrane cellulaire

Les modifications membranaires radio-induites consécutives à une altération structurale de ses principaux constituants, sont souvent provisoires, et concernent principalement les charges surfaciques, les activités des enzymes liées à la membrane cellulaire et les fonctions de nombreux récepteurs membranaires (Köteles, 1979). Des changements de fluidité membranaire, de la perméabilité aux ions et des perturbations dans les interactions avec les récepteurs membranaires ont aussi été rapportés par plusieurs auteurs (Edwards et coll., 1984 ; Bonnefont-Rousselot, 1994). Ces modifications mêmes temporaires de la structure de la membrane peuvent conduire à des erreurs dans la reconnaissance de molécules ou de cellules étrangères, dans les processus de

transfert d'informations, de régulation, d'endocytose, et d'infection par des parasites, des virus et des bactéries (Köteles, 1982).

V.2.1. Modifications radio-induites de la fluidité membranaire

De nombreuses études ont montré que la peroxydation lipidique est à l'origine d'une diminution de la fluidité membranaire lorsqu'elle est mesurée sur des liposomes préparés à partir de phospholipides insaturés (Dobretsov et coll., 1977 ; Rice-Evans & Hochstein, 1981 ; Eichenberger et coll., 1982). Les effets sont identiques quand ce sont les rayonnements ionisants qui initient la peroxydation lipidique sur des vésicules de phospholipides. Barber & Thomas (1978) ont irradié des bicouches de lécithines à une dose unique de 35 Gy. Ces auteurs ont observé une fluidification de la région des têtes polaires des phospholipides qui conduit à une augmentation de la polarité des régions hydrophobes qui se rigidifient. Des résultats similaires ont été observés par Parasassi et coll. (1992) pour des doses comprises entre 22 et 110 Gy, sur des vésicules lipidiques. Ces deux équipes expliqueraient l'augmentation de la polarité des régions hydrophobes par la pénétration de molécules d'eau dans la bicouche. L'ensemble des études sur l'irradiation de liposomes décrites dans la littérature sont cohérentes.

Cependant, les résultats observés après irradiation de membranes naturelles sont contradictoires et varient selon les études réalisées. Ils décrivent soit une augmentation (Yonei & Kato, 1978 ; Grzelinska et coll., 1979 ; Yonei et coll., 1979 ; Purohit et coll., 1980 ; Gwozdziński, 1991(a) ; Gwozdziński, 1991(b) ; Kölling et coll., 1994 ; Berroud et coll., 1996 ; Giusti et coll., 1998 ; Benderitter et coll., 1999), soit une diminution (Purohit et coll., 1980 ; Joshi et coll., 1982 ; Parasassi et coll., 1991 ; Giusti et coll., 1998) de la fluidité membranaire. Cette non-uniformité des résultats pourrait s'expliquer en considérant les compositions membranaires qui varient d'un type cellulaire à un autre, le large spectre des doses d'irradiation appliquées (0,5 Gy à 40 kGy), la localisation des sondes fluorescentes et les techniques de détection utilisées.

La méthode de polarisation de fluorescence a permis de mettre en évidence, après irradiation des membranes d'érythrocytes, pour des doses de l'ordre de 200 à 1000 Gy, une augmentation de la fluidité des têtes polaires des phospholipides mesurée avec l'ANS (Purohit et coll., 1980) et une rigidification de la région hydrophobe des membranes détectées avec le DPH (Purohit et coll., 1980 ; Joshi et coll., 1982 ; Parasassi et coll., 1991). Lorsque l'exposition aux rayonnements ionisants est plus faible, c'est à dire ne dépasse pas 40 Gy, Yonei & Kato (1978) ont observé une fluidification de la membrane d'érythrocyte à la fois au niveau des têtes polaires et au niveau des régions hydrophobes. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus pour des doses inférieures à 40 Gy (Yonei et coll., 1979) sur les membranes d'érythrocytes, et pour des doses ne dépassant pas 9 Gy (Kölling et coll., 1994) sur les membranes de thymocytes. Ils ont été obtenus grâce à la méthode de formation d'excimères intermoléculaires qui a permis de mettre en

évidence une augmentation des mouvements de diffusion latérale du pyrène traduisant la fluidification des régions hydrophobes de la membrane.

D'autres techniques permettent aussi d'évaluer les modifications radio-induites de fluidité membranaire telles que la résonance paramagnétique électronique (Grzelinska et coll., 1979 ; Guille et coll., 1987 ; Gwozdziński, 1991(a) ; Gwozdziński, 1991(b)) et la fluorimétrie de phase différentielle (Joshi et coll., 1982 ; Parasassi et coll., 1991 ; Giusti et coll., 1998). Guille et coll. (1987) n'ont pas détecté de peroxydation lipidique radio-induite dans les membranes d'érythrocytes, pour des doses comprises entre 0,5 kGy et 2,5 kGy. Cependant, des changements dans le mouvement de marqueurs de spin ont été détectés, qui seraient attribués aux atteintes des protéines par les rayonnements ionisants. Ces résultats suggèrent que la technique de résonance paramagnétique électronique permette d'observer les modifications radio-induites de fluidité membranaire dues principalement aux altérations dans la structure des protéines.

La plupart de ces études ont été réalisées pour des doses de l'ordre du kGy, doses non compatibles avec les perspectives de dosimétrie biologique. D'autre part, les modifications de fluidité membranaire radio-induites ont été observées soit sur des liposomes, soit sur des membranes cellulaires, mais très rarement sur des cellules entières, excepté dans notre laboratoire (Berroud et coll., 1996 ; Benderitter et coll., 1999). Toutefois, aucune mesure n'a été effectuée sur des érythrocytes « entiers ». Enfin, toutes ces expériences de mesure de fluidité membranaire, suite à une exposition aux rayonnements ionisants, ont été réalisées sur des modèles *in vitro*, mais jamais sur des modèles *in vivo*.

V.2.2. Modifications radio-induites des fonctions et des propriétés membranaires

Les diverses fonctions et propriétés membranaires sont reliées à l'état physiologique de la membrane et de ses constituants :

La perméabilité membranaire

La perméabilité membranaire aux ions semble être accrue consécutivement à la perte des groupements sulfhydryles. Le passage d'acides aminés à travers la membrane cellulaire grâce à des protéases peut être aussi augmenté suite à une irradiation (Bonfont-Rousselot, 1994), ainsi que la perméabilité aux acides gras, aux protéines étrangères et aux toxines (Köteles, 1982). Kuo et coll. (1993) ont observé une activation des canaux de potassium 5 minutes après une irradiation gamma lorsque des cellules sont exposées à une dose de 1,5 Gy. Ces auteurs suggèrent qu'une des réponses précoces de la cellule à un stress oxydant soit la perméabilité accrue aux ions potassium. L'exposition aux rayonnements ionisants induit une rapide augmentation du calcium

intracellulaire à partir de 1 Gy (Todd & Mikkelsen, 1994). Ces modifications radio-induites de la perméabilité membranaire aux ions K^+ et Ca^{2+} sont transitoires. D'autre part, Zeidler et coll. (1995) ont observé l'effet des rayonnements ionisants sur des canaux ioniques reconstitués artificiellement par des molécules d'antibiotique de polyène imbriqués dans les membranes. Ils ont constaté l'inactivation de ces canaux ioniques qui résulterait, selon ces auteurs, de l'attaque des radicaux libres induits par la peroxydation des polyènes. Cette attaque provoquerait la déstabilisation de la structure cylindrique de ces canaux ioniques et donc leur fermeture.

Les activités enzymatiques membranaires

Les activités enzymatiques sont fonction de l'état des molécules constituant la protéine enzymatique et de leur proche environnement lipidique (Köteles, 1979). Elles sont liées à la présence de groupements thiols dans la protéine. Une atteinte de l'intégrité de ces groupements a pour conséquence une perte de cette activité (Bonfont-Rousselot, 1994).

La mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique des cellules est due à la présence de groupements chargés négativement (principalement des complexes protéines-carbohydates) à la surface des membranes plasmiques. C'est une propriété complexe qui dépend de l'état métabolique de la cellule, des forces ioniques et du pH du milieu. Des altérations des propriétés électrophorétiques de la cellule peuvent refléter des modifications dans le nombre de groupements ioniques sur la membrane, dans les constantes de dissociation des groupements ioniques ou dans leur disposition topographique à la surface de la membrane. Ces changements de la charge surfacique membranaire peuvent conduire à altérer les interactions cellule-cellule, calcium-membrane, et la perméabilité aux ions (Edwards et coll., 1984). La mobilité électrophorétique des cellules de mammifères en culture est déterminée par la présence d'acides de carbohydates : acide sialique, sulfate de chondroïtine, et acide hyaluronique (Sato et coll., 1977). Les érythrocytes et les ghosts d'érythrocytes irradiés aux doses de 1/ 2,5/ 5/ ou 30 Gy présentent une réduction de la mobilité électrophorétique 4 heures après irradiation (Sato et coll., 1977). Dans les hématies, l'acide sialique reste le principal constituant chargé négativement. Cependant, la quantité d'acide sialique est constante après une exposition aux rayonnements ionisants. D'autre part, la diminution radio-induite de la mobilité électrophorétique est fonction de la température. Donc, l'irradiation provoque des modifications de la mobilité électrophorétique qui n'ont pas pour origine la perte de groupements chargés négativement à la surface membranaire, mais qui résulteraient d'un réarrangement topographique de ces groupes.

Les communications intercellulaires (récepteur-ligand)

Les récepteurs membranaires dépendent pour assurer leurs fonctions, des mouvements des complexes protéiques et de la mobilité des lipides dans un large domaine autour des protéines (Köteles, 1979). Cependant il existe un délai entre l'irradiation et l'atteinte des récepteurs qui laisseraient supposer que l'inactivation des récepteurs serait plutôt due à une perturbation des mécanismes de synthèse de ces récepteurs, et non directement reliée à l'attaque membranaire (Edwards et coll., 1984 ; Bonnefont-Rousselot, 1994). Toutefois les radiations ionisantes modifient la topographie des récepteurs membranaires, et jouent un rôle non négligeable dans la réponse immunitaire (Bonnefont-Rousselot, 1994). En effet, les résultats présentés par Albanese & Dainiak (2000) indiquent que les radiations ionisantes modulent l'expression d'un facteur de croissance (TNFSF6) sur la surface cellulaire, mais aussi la quantité de ce ligand relarguée sur des vésicules extracellulaires. Ils ont observé que les radiations ionisantes diminuent les taux de TNFSF6 biologiquement actifs présents sur les vésicules exfoliées. Selon ces auteurs, cet effet aurait pour origine les dommages au niveau des protéines, les changements dans la configuration des protéines ou les modifications des interactions lipide-protéine.

La membrane joue un rôle actif d'interface entre le milieu extra et intracellulaire. Toute perturbation de l'environnement des cellules aura des répercussions sur les fonctions membranaires mais aussi sur la survie de la cellule. Or, après une exposition aux rayonnements ionisants, des modifications des fonctions et des propriétés membranaires peuvent être détectées ainsi que des perturbations de la survie cellulaire. Le principal problème est donc d'essayer de comprendre le rôle de la membrane dans les processus conduisant à la mort cellulaire radio-induite.

VI. Conséquences des rayonnements ionisants sur l'état cellulaire

Les radiations ionisantes provoquent des cassures simples et doubles brins de la molécule d'ADN qui sont suffisantes pour conduire la cellule vers sa mort cellulaire. Néanmoins, bien que l'ADN soit considéré comme la cible principale des rayonnements ionisants, lors d'une irradiation, l'énergie est déposée dans tout le volume de la cellule. Il est donc possible d'envisager l'existence d'autres mécanismes intervenant dans les processus provoquant la mort cellulaire radio-induite. Ainsi, les rayonnements ionisants peuvent avoir pour cible la membrane plasmique et/ou le cytoplasme pour initier une séquence d'évènements biochimiques qui aboutissent à l'apoptose ou

mort cellulaire programmée (Ramakrishnan et coll., 1993 ; Haimovitz-Friedman et coll., 1994 ; Ojeda et coll., 1994 ; McClain et coll., 1995).

VI.1. **La mort cellulaire**

La mort cellulaire est un processus qui aboutit à la cessation de l'activité biologique. Les modifications qui l'accompagnent sont irréversibles. Il est généralement admis qu'il existe deux modes alternatifs de mort cellulaire : la mort cellulaire programmée ou apoptose, et la mort cellulaire accidentelle ou nécrose.

Caractéristiques et différences morphologiques de la mort par apoptose et nécrose

La mort cellulaire par apoptose (ou mort cellulaire par suicide) est caractérisée par des critères morphologiques (Majno & Joris, 1995 ; Darzynkiewicz et coll., 1997) qui la distinguent de la nécrose. La cellule en apoptose se détache des cellules voisines puis se déshydrate. La perte d'eau intracellulaire induit une diminution de son volume cellulaire (rétrécissement et déformation de sa forme originelle ronde) et une augmentation de sa densité. La chromatine devient pycnotique (condensation de la chromatine) et forme de petites masses égales le long de la membrane nucléaire (margination de la chromatine). Elle prend ainsi une forme concave ressemblant à un croissant de lune, un fer à cheval ou une faucille. L'enveloppe nucléaire se désintègre et le noyau se fragmente (caryoexie). Plusieurs fragments nucléaires pycnotiques diffusent dans le cytoplasme. Ces fragments, avec des constituants du cytoplasme (incluant des organelles intactes), sont ensuite enveloppés par des fragments de la membrane plasmique : on dit que la cellule bourgeonne. Ces structures se séparent de la cellule et forment des vésicules qui sont appelées : corps apoptotiques. Cependant, la cellule peut aussi rétrécir en une masse dense et ronde, tel un unique corps apoptotique. *In vivo*, les corps apoptotiques sont reconnus et phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines (cellules épithéliales ou fibroblastes), sans enclencher une réaction inflammatoire dans le tissu. Les éléments intracellulaires tels que les mitochondries ne gonflent pas ou peu durant la mort par apoptose. Une des caractéristiques importantes du processus apoptotique est la préservation, durant les phases initiales, de l'intégrité structurelle et de la plupart des fonctions membranaires. Durant les derniers stades du processus apoptotique, les corps apoptotiques présentent une perte de l'intégrité membranaire avant d'être absorbés par les macrophages. *In vitro*, les corps apoptotiques dégénèrent progressivement, car ils ne sont pas phagocytés, ils gonflent et finalement sont lysés. Leur contenu se déverse dans le milieu extracellulaire et cette phase est appelée nécrose secondaire.

La nécrose, ou mort cellulaire accidentelle, est un mécanisme passif, catabolique et dégénératif (Darzynkiewicz et coll., 1997). Elle caractérise la réponse à une blessure massive qui peut être induite par une overdose d'agents cytotoxiques. Le premier événement de la nécrose est le gonflement des mitochondries et de la cellule tout entière. La chromatine nucléaire se condense de manière inégale, et le noyau se dissout faiblement (caryolyse). La rupture de la membrane plasmique et le relargage des constituants cytoplasmiques dans le milieu extracellulaire surviennent dans les dernières phases du processus nécrotique. La mort par nécrose induit une réaction inflammatoire du tissu et une cicatrice étendue.

Les séquences morphologiques de ces deux types de mort cellulaire sont résumées sur la figure 22.

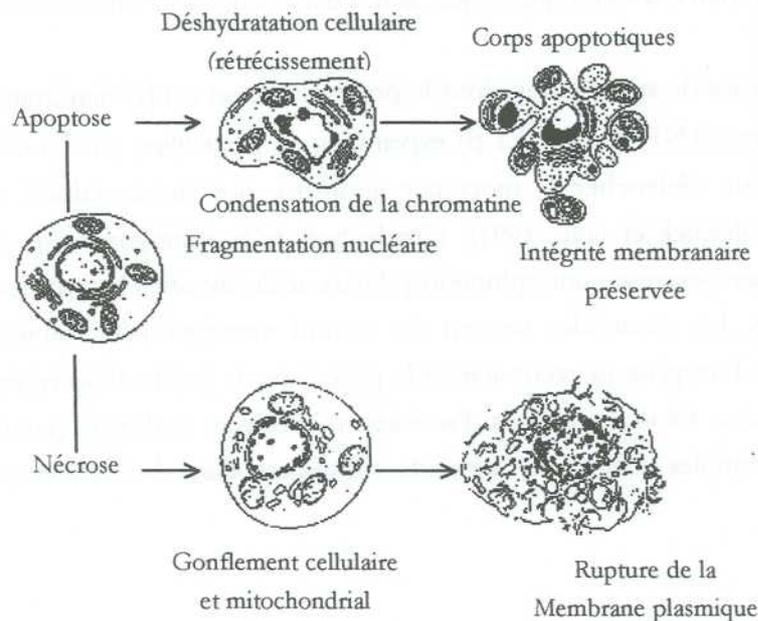


Figure 22 : Schéma illustrant les changements morphologiques survenant durant les processus de mort cellulaire par apoptose et nécrose (Darzynkiewicz et coll., 1997).Caractéristiques biochimiques du processus apoptotique

L'apoptose est schématiquement divisée en trois phases : induction, exécution et dégradation (Mignotte et coll., 1998).

Phase d'induction

La phase d'induction comporte de multiples voies de signalisation qui dépendent du type cellulaire et de la nature du signal inducteur : carence en signaux de survie, signaux de mort, infection virale, dommages au niveau de l'ADN, exposition aux rayonnements ionisants, augmentation du calcium intracellulaire etc.

Chaque stimulus apoptogène active spécifiquement une (ou des) voie(s) de signalisation qui converge(nt) vers le stade d'engagement apoptotique. Il existe principalement deux types de voies : les voies de signalisation à point de départ nucléaire et celles à point de départ membranaire.

Le gène suppresseur de tumeur p53 joue un rôle primordial dans les voies de signalisation nucléaire. Lorsqu'une altération génétique survient, p53 oblige la cellule soit à interrompre sa multiplication et à réparer la lésion génétique, soit à déclencher son suicide. C'est le « gardien du génome ».

Il existe plusieurs voies de signalisation dont le point de départ est la membrane plasmique. Des molécules de surfaces (TNF, Fas-L, IL1- β) exprimées, en particulier, par les cellules du système immunitaire peuvent déclencher la mort par apoptose par l'intermédiaire de la voie de la sphingomyéline (Kolesnick et coll., 1994). L'hydrolyse de la sphingomyéline membranaire par une sphingomyélinase neutre ou une sphingomyélinase acide aboutit à la synthèse de céramides et de phosphocholine. Les céramides servent de second messager pour initier l'apoptose. Les espèces réactives de l'oxygène peuvent activer le processus de mort cellulaire programmée, dans certaines circonstances, selon deux voies d'activation : indirecte et directe (Jacobson, 1996). Ces espèces sont susceptibles d'être des seconds messagers dans la transduction des signaux apoptotiques.

Phase d'exécution

Au terme de la phase d'induction, les cellules subissent une série de modifications physiologiques qui va les engager irréversiblement dans la mort cellulaire. Malgré la diversité des signaux d'induction, les cellules engagées dans le processus apoptotique ont des caractéristiques biochimiques et morphologiques identiques. Ces résultats suggèrent que la phase d'exécution soit indépendante de l'inducteur et du type cellulaire. L'hypothèse a été émise que tous ces signaux convergent vers une série d'étapes communes dont le principal chef d'orchestre est la mitochondrie (Green & Reed, 1998 ; Mignotte et coll., 1998 ; Susin et coll., 1999).

Les mitochondries des cellules normales comportent des protéines de survie cellulaire appelées protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Elles sont localisées dans la membrane mitochondriale externe et assurent deux fonctions primordiales pour la survie cellulaire : (1) le confinement dans l'espace inter-membranaire mitochondrial de facteurs mitochondriaux

apoptogènes : le cytochrome c et l'AIF (facteur inducteur d'apoptose), (2) le maintien de la synthèse d'ATP dans la matrice mitochondriale. Ces fonctions sont assurées grâce au maintien à l'état fermé du pore de transition de perméabilité (PTP) de la membrane mitochondriale interne. Les voies de signalisation activatrices de l'engagement apoptotique et inhibitrices de la survie cellulaire sont capables : (1) d'inactiver la protéine de survie Bcl-2, (2) d'activer les protéines pro-apoptotiques de type Bax. Bax est localisée dans la membrane mitochondriale externe et assure l'ouverture permanente et irréversible du PTP de la membrane mitochondriale interne, et sa communication avec le cytosol grâce à un pore de la membrane mitochondriale externe. Il y a alors : (1) libération du cytochrome c et de l'AIF dans le cytoplasme, (2) annulation du gradient électrochimique $\Delta\psi_m$ de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale provoqué par la suppression de l'activité de synthèse d'ATP. Le cytochrome c, ainsi libéré de l'espace inter-membranaire mitochondrial, se lie avec la protéine Apaf-1 pour s'associer avec la pro-caspase 9 pour former un complexe moléculaire nommé apoptosome et ainsi enclencher l'activation de la caspase-9. Une cascade protéolytique va être initiée qui aboutit à l'exécution biochimique et morphologique du processus apoptotique (Green & Reed, 1998). Donc, les mitochondries remplissent un double rôle dans la mort cellulaire par apoptose. Elles intègrent différents signaux d'initiation pro-apoptotique et coordonnent la réponse de mort (Susin et coll., 1999).

Phase de dégradation

Lorsque les cellules sont dans la phase de dégradation, elles présentent l'ensemble des caractéristiques moléculaires et morphologiques de l'apoptose.

Lors des premiers stades de cette phase de dégradation, les phospholipides de la membrane plasmique perdent leur asymétrie. Schlegel et coll. (1993) ont montré que cette perte d'asymétrie est liée à une diminution du compactage des lipides du feuillet externe de la membrane. Ces modifications sont détectées avant la fragmentation de l'ADN (Mower et coll., 1994 ; Martin et coll., 1995). Ce réarrangement lipidique est provoqué par le flip-flop de la phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe de la membrane. Cette exposition de la PS précède la perte d'intégrité de la membrane. C'est aussi un signal de reconnaissance pour que ces cellules deviennent la cible des cellules phagocytaires (Martin et coll., 1995 ; Darzynkiewicz et coll., 1997 ; Pradhan et coll., 1997) et soient rapidement éliminées. Bien qu'il existe d'autres modifications membranaires qui permettent la reconnaissance des cellules apoptotiques, c'est l'externalisation de la PS qui est la plus répandue (Martin et coll., 1995). Ces modifications de l'asymétrie membranaire des cellules en apoptose semblent indépendantes, dans une certaine mesure, de l'activité nucléaire (Reno et coll., 1998). Ces altérations membranaires sont détectées grâce à des marqueurs fluorescents tels que l'annexine V (externalisation de la PS) et la merocyanine 540 (décompactage des lipides). Ils permettent de différencier les cellules qui sont en début

d'apoptose de celles en fin d'apoptose qui sont perméables aux monoazides d'éthidium car elles ont perdu leur intégrité membranaire (Darzynkiewicz et coll., 1997).

D'autre part, van Engeland et coll., 1997. ont montré que plusieurs composants du cytosquelette étaient dégradés durant le processus apoptotique. Le bourgeonnement de la membrane pourrait être la conséquence du clivage de la fodrine (Martin et coll., 1996), une protéine multifonctionnelle dont les propriétés sont proches de celles de la spectrine. Ce clivage pourrait favoriser le mouvement d'externalisation de la PS. La condensation de la chromatine serait associée à une dégradation irréversible des lamines.

La phase de dégradation des cellules en apoptose est caractérisée par le clivage, par des endonucléases, de la molécule d'ADN en fragments inter-nucléosomiques. Ce processus biochimique est le plus utilisé pour la détection des cellules en apoptose. Les produits de dégradation de l'ADN sont des sections oligonucléosomiques ou nucléosomiques qui génèrent un profil caractéristique en échelle lorsqu'ils sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Ces fragments sont des multiples de 185 paires de base (Majno & Joris, 1995) qui correspondent à la taille approximative d'un nucléosome.

En résumé, la phase d'initiation du processus apoptotique est principalement pré-mitochondriale, la phase effectrice (ou d'exécution) est essentiellement mitochondriale, et la phase de dégradation est post-mitochondriale (Susin et coll., 1999).

VI.2. Apoptose et irradiation

Plusieurs voies de signalisation conduisant vers la mort par apoptose peuvent être activées lors d'une exposition aux rayonnements ionisants. Leur point de départ, génomique ou membranaire, est controversé selon les auteurs considérés. Néanmoins l'étude comparative de ces deux voies révèle des caractéristiques communes quant à la phase effectrice et à la phase de dégradation.

Les radiations ionisantes induisent différents types de lésions au niveau de la molécule d'ADN : des cassures doubles et simples brins, et des liaisons inter-brins. Les lésions radio-induites incorrectement réparées (ou irréparables) enverraient un signal persistant qui enclencherait le processus apoptotique à travers une voie d'induction lente qui nécessite la synthèse de protéines actives (Cregan et coll., 1999). Radford (1999) privilégie le rôle joué par les dommages au niveau de l'ADN dans l'initiation de l'apoptose radio-induite. Selon cet auteur, plusieurs arguments confortent cette assertion : les rayonnements ionisants ont pour cible principale la molécule d'ADN, l'existence de relations étroites entre p53 et la réponse aux radiations ionisantes, et l'influence de la capacité des systèmes de réparation enzymatique de l'ADN sur la sensibilité à

l'apoptose. Cependant, certains auteurs suggèrent que les dommages membranaires radio-induits génèrent des seconds messagers qui sont les premiers initiateurs de l'apoptose radio-induite. Haimovitz-Friedman et coll. (1994) ont montré que l'irradiation induit l'hydrolyse des sphingomyélines membranaires en céramides qui déclenchent le processus apoptotique. L'importance des dommages membranaires radio-induits dans la mort cellulaire par apoptose a été évaluée en utilisant un piègeur d'espèces actives de l'oxygène : le trolox (analogue de la vitamine E). Ce composé pénètre dans les membranes cellulaires et protège les cellules des dommages oxydatifs. Lorsqu'il est ajouté après irradiation, il inhibe la fragmentation de l'ADN en bloquant l'augmentation du taux de calcium intracellulaire (Ramakrishnan et coll., 1993 ; McClain et coll., 1995). Ces résultats suggèrent, d'après leurs auteurs, que l'oxydation des membranes, suite à une exposition aux rayonnements ionisants, est responsable de la mort par apoptose. Ojeda et coll. (1994) ont montré que la protéine kinase C (PKC), associée à la membrane, joue un rôle important dans les processus apoptotiques radio-induits. En effet, elle est impliquée dans la transduction du signal de la membrane vers le noyau où, elle induit la fragmentation de l'ADN (Ojeda et coll., 1992). Ce mécanisme serait la conséquence de la lipoperoxydation radio-induite au niveau membranaire. Ces dommages membranaires provoqueraient l'hydrolyse du phosphatidylinositolbiphosphate en inositoltriphosphate et diacylglycérol, qui sont responsables de la mobilisation du calcium et de l'activation des PKC. Ainsi, ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse d'une participation active de la membrane dans l'initiation des réactions en chaîne conduisant vers l'apoptose radio-induite.

Au niveau de la phase effectrice, Chen et coll. (2000) ont montré que le relargage du cytochrome c des mitochondries s'effectuait en deux étapes lors du processus apoptotique radio-induit. Deux à huit heures après irradiation, le cytochrome c est libéré dans le cytosol en faibles quantités. Ce relargage permet l'activation des caspases mais n'a aucun effet sur la production d'ATP et sur le potentiel membranaire mitochondrial. La totale déplétion du cytochrome c mitochondrial est réalisée 16 heures après une exposition aux rayonnements ionisants. Ce relargage massif induit une diminution des taux d'ATP, une augmentation des espèces réactives de l'oxygène et une diminution du potentiel membranaire mitochondrial. Cette dernière étape précède la fragmentation nucléaire.

VII. Conséquences des rayonnements ionisants au niveau tissulaire

Un tissu est constitué d'un ensemble de cellules qui ne sont pas indépendantes les unes des autres. C'est une structure complexe où il existe un équilibre entre naissance et mort cellulaire : homéostasie cellulaire. Les cellules communiquant entre elles, il existe une coopération cellulaire au sein d'un tissu. Lors d'une irradiation, des facteurs sont relargués dans le milieu extracellulaire

par les cellules atteintes et peuvent induire la mort de cellules non irradiées. C'est le « bystander effect ». La notion de contact direct de cellule à cellule n'est ni nécessaire, ni suffisante pour la transmission de signaux intercellulaires par des facteurs (de croissance ou de mort) liés à la membrane cellulaire. Albanese & Dainiak (2000) ont montré que l'exfoliation de certains facteurs radio-induits serait un mécanisme qui permettrait d'expliquer ce « bystander effect ». Ce mécanisme d'exfoliation radio-induit serait aussi à l'origine des « effets abscopaux ». Les vésicules exfoliées à partir de la membrane des cellules localisées à l'intérieur du champ d'irradiation, pourraient migrer dans le corps au niveau de sites éloignés de la partie irradiée pour y provoquer des dommages (Albanese & Dainiak, 2000). Ces résultats sont nécessaires à la compréhension de l'expression des lésions tissulaires radio-induites. L'apparition d'une lésion macroscopique est conditionnée par la mort d'une proportion suffisante de cellules : la dose seuil correspond au taux de dépeuplement à partir duquel un effet est décelable. La radiosensibilité d'un tissu dépend de l'état de différenciation des cellules qui le constituent et des mécanismes d'homéostasie cellulaire. La dose seuil et le délai d'apparition des lésions varient d'un tissu à l'autre.

Les tissus sont classés en deux catégories : les tissus compartimentaux et les tissus non compartimentaux.

Les tissus compartimentaux sont constitués d'un compartiment de cellules souches où la division cellulaire est très active, d'un compartiment de cellules en voie de maturation où les cellules se multiplient en achevant leur différenciation, et d'un compartiment composé de cellules différenciées (ou fonctionnelles) qui ne se divisent plus et meurent par sénescence. Ce sont des tissus à renouvellement rapide : la moelle osseuse, les tissus embryonnaires, l'épithélium cutané etc.

Les tissus non compartimentaux sont de deux types. Les tissus à renouvellement conditionnel (foie, endothélium vasculaire) sont composés de cellules différenciées dont la prolifération cellulaire est stimulée lors d'une lésion importante. Le seul tissu statique chez l'Homme est le système nerveux central où les cellules neuronales ne se divisent jamais et ne sont jamais renouvelées.

Lors d'une exposition aux rayonnements ionisants, les tissus sont d'autant plus radiosensibles que les cellules qui le composent sont moins différenciées, ont un potentiel de prolifération plus grand et se divisent plus vite. Donc, pour les tissus compartimentaux, l'atteinte des cellules souches (les plus radiosensibles) provoque un délai dans l'apparition des lésions proportionnel à la durée de vie des cellules matures. Les tissus à renouvellement conditionnel expriment les dommages plus tardivement. Quand le nombre de cellules baisse considérablement, un seuil critique est atteint, il induit alors un processus de prolifération compensatoire. Dans le cas des tissus statiques, l'expression clinique des lésions est très tardive. Elle est liée à l'atteinte des cellules environnantes telles que les cellules endothéliales.

Au-delà d'une certaine dose, la perte cellulaire au niveau de certains tissus devient suffisamment importante pour que ceux-ci ne soient plus entièrement aptes à remplir leurs fonctions. Des signes pathologiques apparaissent et traduisent cet effondrement fonctionnel. Chez l'Homme, quatre grands types de tissus se distinguent pour leur sensibilité à l'irradiation :

- le tissu hématopoïétique pour des doses de 1 à 8 Gy.
- le tissu intestinal pour des doses de 6 à 12 Gy,
- le tissu pulmonaire pour des doses au-delà de 15 Gy,
- le tissu nerveux pour des doses supérieures à 20 Gy.

Chapitre 2 :
Matériels et Méthodes

I. Etudes *in vitro*

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Lignées cellulaires

I.1.1.1. Lymphoblastes

La lignée de cellules lymphoblastiques (RPMI 1788), utilisée dans cette étude, provenait de la collection de l'American Type Culture Collection, USA. (ATCC) (RPMI 1788).

Leur culture a été effectuée en milieu RPMI 1640 contenant déjà du glutaMAX-I (Life Technologies, France). A ce milieu ont été additionnés :

- 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Life Technologies, France) décomplémenté à 56 °C, sous agitation pendant 30 minutes.
- 1 % d'une solution stock à 100 mM de Pyruvate de sodium (Life Technologies, France).
- 1 % d'une solution stock à 10 000 UI/ml de Pénicilline et Streptomycine (Life Technologies, France).

Le SVF apporte aux cellules différents facteurs mitogènes nécessaires à leur croissance. La pénicilline et la streptomycine sont des antibiotiques inhibant le développement de micro-organismes nuisibles au développement cellulaire.

L'entretien de la lignée cellulaire a été effectué par repiquage tous les deux jours dans des flasques de 75 cm² par simple dilution au 1/3. Les boîtes de culture ont été placées dans une étuve régulée à 37 °C, en atmosphère humide et avec un apport de 5 % de CO₂.

I.1.1.2. Fibroblastes

Les lignées cellulaires de fibroblastes provenaient également de la collection de l'ATCC (CCD-27Sk). C'étaient des cellules de peau humaines isolées à partir de biopsies cutanées localisées au niveau de la poitrine. Ces lignées étaient non immortalisées.

Leur culture a été effectuée en milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) sans pyruvate de sodium, sans pyruvinate, avec 4500 mg/ml de glucose (Life Technologies, France). A ce milieu ont été additionnés :

- 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Life Technologies, France).
- 1 % d'une solution stock à 10 000 UI/ml de Pénicilline et Streptomycine (Life Technologies, France).

L'entretien de la lignée cellulaire a été effectué par repiquage tous les trois jours dans des flasques de 75 cm² à bouchon ventilé, par simple dilution au 1/3. Cette étape nécessitait l'emploi de 0,25 % de trypsine-EDTA (1:1 ; V:V) (Life Technologies, France) qui permettait le détachement des cellules adhérentes à la paroi du flasque. Les boîtes de culture ont été placées dans une étuve régulée à 37°C, en atmosphère humide et avec un apport de 5 % de CO₂.

I.1.2. Echantillons sanguins

Pour les mesures biophysiques et biochimiques, des prélèvements sanguins ont été obtenus après accord consenti de donneurs sains :

- Soit sur des tubes héparinés de 7 ml provenant du Service Médical du Travail (CEA de Fontenay-aux-Roses, Paris) pour les expériences réalisées sur les hématies.
- Soit sur des poches de 450 ml de sang total prélevées sur Citrate Phosphate Dextrose (CPD) provenant de l'Etablissement Français du Sang d'Ile de France (Rungis, France) pour les études sur les lymphocytes.
- Soit sur des poches de buffy coat de 50 ml provenant de l'Etablissement Français du Sang d'Ile de France (Rungis, France) pour les études sur les lymphocytes.

I.2. Préparation des échantillons sanguins

I.2.1. Séparation des lymphocytes du sang total

Un volume de sang total, dilué au 1/2 dans du milieu RPMI 1640 sans glutaMAX-I (Life Technologies, France), était déposé soigneusement sur 2 volumes de ficoll-isopaque (Lymphoprep™, pharmacia, France). Une centrifugation à 770 g pendant 20 minutes, à température ambiante, permettait de séparer les différentes fractions cellulaires. L'anneau de

cellules mononucléées a été prélevé doucement à l'interface, puis lavé deux fois dans du milieu RPMI 1640 sans glutaMAX-I (Life Technologies, France) à 400 g pendant 10 minutes.

I.2.2. Préparation des membranes totales de lymphocytes

Les membranes totales de lymphocytes ont été obtenues à partir de la méthode décrite par (Adams et coll., 1985).

Toutes les opérations ont été réalisées à 4°C.

Les lymphocytes provenant de sang humain ont été séparés du sang total selon le protocole décrit au paragraphe I.2.I. La suspension cellulaire a été centrifugée à 400 g pendant 4 minutes. Le culot a été resuspendu dans 10 volumes de tampon Tris à 40mM, pH=7,4. Les cellules ont été incubées dans la glace pendant 10 minutes pour permettre leur gonflement. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée à 3015 g pendant 10 minutes. Le culot ainsi obtenu a été resuspendu dans 5 volumes de MgCl₂ à 2 mM dans 40 mM de tampon Tris, pH=7,4. Dix minutes après incubation, les cellules ont été lysées à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce (espace interpiston/cylindre « large » 25 µm-76 µm, Polylabo, France) en effectuant 25 aller-retours avec le piston, soient 50 cassures. La suspension obtenue a été resuspendue dans le même volume de tampon Tris à 40mM, pH=7,4, et centrifugée à 100 g pendant 5 minutes afin d'éliminer les noyaux intacts et les cellules non lysées. Le surnageant a été prélevé puis ultracentrifugé à 12060 g pendant 10 minutes (ultracentrifugeuse Centrikon T-1190, Rotor TFT80.13, Kontron, France). Le culot a alors été resuspendu dans 4 ml de tampon Tris à 40mM, pH=7,4.

I.2.3. Obtention d'hématies intactes

500 µl de sang total ont été lavés une fois durant 15 minutes, à 220 g dans 6 ml de tampon phosphate PBS (Dubelcco sans calcium, sans magnésium et sans bicarbonate de sodium-Life Technologies, France). Le surnageant a été éliminé et 7 µl du culot d'hématies ont été resuspendus dans 2 ml de PBS. La concentration a été alors ajustée à 4.10⁶ hématies/ml.

I.2.4. Préparation des membranes d'hématies

Les membranes d'hématies ont été obtenues à partir de la méthode décrite par Dodge et coll. (1963).

Toutes les opérations ont été réalisées à 4 °C.

Les hématies ont été lavées trois fois dans 30 ml de tampon de lavage (solution de NaCl à 0,9 %) à 220 g, pendant 10 min. L'hémolyse a été réalisée par addition de 30 ml de tampon hémolyse (solution de tampon barbital à 30 mOsm, pH = 7,4), sous agitation elliptique, durant 30 min. Les

membranes ont été ensuite lavées dans ce tampon 20 min à 16000 g (Centrikon T-124, Kontron, France). Le surnageant a été éliminé et les lavages ont été poursuivis jusqu'à obtention d'un culot parfaitement blanc (ne contenant plus d'hémoglobine) resuspendu ensuite dans 4 ml de tampon hémolyse.

I.3. Caractéristiques des irradiations

I.3.1. Cultures cellulaires

Les cellules ont été exposées aux rayonnements gamma d'énergie 1,17 MeV et 1,33 MeV provenant d'une source de Cobalt-60 (irradiateur ICO 4000, IPSN).

Les lymphoblastes ont été irradiés dans leur milieu de culture, dans un bain thermostaté à 37 °C, pour des doses de 2 à 8 Gy, aux débits de 1 et 0,1 Gy/min.

L'irradiation des fibroblastes a été réalisée dans les flasques de culture, à température ambiante, l'irradiateur étant en position verticale, pour une dose de 8 Gy, au débit de 1 Gy/min.

Pour chaque échantillon irradié, un témoin a été traité dans les mêmes conditions expérimentales sans exposition aux rayonnements ionisants. Après irradiation, les suspensions cellulaires ont été, soit analysées immédiatement, soit incubées dans une étuve à 37 °C pour simuler les conditions biologiques de la réparation.

I.3.2. Sang Total

Les échantillons sanguins qui constituaient le matériel biologique pour les expérimentations de dosage des lipides membranaires ont été exposés aux rayonnements gamma d'énergie 0,662 KeV provenant d'une source de Césium-137 (irradiateur IBL 637, IPSN). Ils ont été irradiés à température ambiante, pour une dose de 8 Gy, au débit de 0,5 Gy/min.

Les autres échantillons sanguins ont été irradiés à l'aide d'une source de Cobalt-60 (irradiateur ICO 4000, IPSN), dans un bain thermostaté à 37 °C, pour des doses de 4 et 8 Gy, aux débits de 1 et 0,5 Gy/min.

Pour chaque échantillon irradié, un témoin a été traité dans les mêmes conditions expérimentales sans irradiation. Après irradiation, les échantillons sanguins, comme précédemment, ont été, soit analysés immédiatement, soit incubés dans une étuve à 37 °C pour simuler les conditions biologiques de la réparation.

I.4. Préparation des échantillons biologiques pour les mesures de fluidité membranaire

I.4.1. Sondes fluorescentes

Les solutions stocks des sondes fluorescentes utilisées dans cette étude ont été préparées comme suit :

Le 1-(4-triméthylammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH, Molecular Probes, USA) a été dissous dans du N, N-diméthyl formamide (DMF, Sigma, France) à la concentration de 2 mM. L'acide 1-pyrènedécanoïque (APD, Sigma, France) a été préparé en dissolvant ce produit dans une solution de DMF à la concentration de 1mM. Les acides stéariques (Molecular Probes, USA) avec $n = 3, 6, 9,$ et 12 ont été dissous dans une solution d'éthanol (Rectapur, Prolabo, France) à la concentration de 2 mM. Ces solutions ont été aliquotées et conservées à l'obscurité, à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le 1-anilinonaphtalène-8-sulfonate (ANS, Sigma, France) a été dissout dans du PBS (Dubelcco, France) à la concentration de 10 mM. Cette solution mère a été aliquotée et stockée à l'obscurité, à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ces solutions ont été renouvelées tous les 15 jours.

I.4.2. Marquage des suspensions cellulaires

Optimisation de la technique

Des études préalables d'optimisation de la technique ont permis de déterminer les concentrations de sondes et de cellules optimales, le temps nécessaire à l'incorporation de la sonde dans les membranes et le nombre de lavages nécessaires afin d'éliminer les molécules de marqueurs libres. Voici un tableau récapitulatif (tableau 9) des principaux paramètres qui conditionnent l'utilisation de ces sondes fluorescentes :

Sondes	Type cellulaire	Concentration cellulaire	Concentration finale de la sonde	Temps d'incubation	Nombre de lavages
TMA-DPH	Fibroblaste	1.10 ⁶ cell/ml	2 μM	10 min	1
	Lymphocyte	2.10 ⁶ cell/ml			
APD	Lymphoblaste	1.10 ⁶ cell/ml	10 μM	15 min	2
ANS	Fibroblaste	1.10 ⁶ cell/ml	10 μM	10 min	aucun
3, 6, 9, et 12-AS	Fibroblaste	1.10 ⁶ cell/ml	2 μM	20 min	1
	Lymphocyte	2.10 ⁶ cell/ml			
	Hématie	4.10 ⁶ cell/ml			

Tableau 9 : Paramètres conditionnant le marquage des suspensions cellulaires en fonction du marqueur fluorescent et du type cellulaire.

Protocole

Les culots cellulaires ont été resuspendus dans une solution saline équilibrée de PBS dont le volume a été ajusté afin d'obtenir la concentration cellulaire finale définie dans le tableau 9. Un volume adéquat de solution stock de chaque sonde a été ajouté pour obtenir la concentration finale définie dans le tableau 9. Les échantillons marqués ont été placés à l'obscurité dans un bain-marie à 37 °C pendant le temps d'incubation nécessaire à l'incorporation de la sonde. Les suspensions cellulaires ont été ensuite lavées, uniquement lorsque la mesure a été réalisée au spectrofluorimètre, par centrifugation à 100 g pendant 10 minutes (ou 200 g pour les hématies), afin d'éliminer les molécules de marqueurs non incorporées dans les membranes. Les mesures de fluidité membranaire ont été ensuite réalisées par spectrofluorimétrie ou cytométrie de flux.

I.5. Mesures de la fluidité membranaire par spectrofluorimétrie

I.5.1. Appareil de mesure

Les mesures des intensités de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre en excitation continue, (SFM 25, Bioteck, France). La source lumineuse était une lampe xénon à haute pression qui fournissait un spectre de lumière polychromatique. Les fluctuations de la source ont été compensées par un faisceau de référence. Deux monochromateurs motorisés permettaient une sélection continue des longueurs d'onde. L'un était destiné pour le faisceau d'excitation et l'autre pour le faisceau d'émission de fluorescence. Afin d'éviter des perturbations

de la mesure de la fluorescence par la lumière transmise, on recueillait le faisceau d'émission selon un axe faisant un angle de 90 ° avec la lumière excitatrice. L'intensité de fluorescence émise a été détectée et amplifiée par un photomultiplicateur. Une imprimante permettait d'enregistrer les données obtenues. Les suspensions cellulaires ont été introduites dans des cuves à quartz de 1 ml. Les mesures ont été réalisées à 37 °C, sous une légère agitation. Les dimensions de ces cuves étaient calculées de manière à ce que leur densité optique soit inférieure à 0,1 afin d'éviter les phénomènes de diffusion (Engelke et coll., 1996).

I.5.2. Etablissement des conditions spectrales de mesure

L'établissement systématique des spectres d'absorption et d'émission des sondes en présence des suspensions cellulaires a permis de déterminer leurs longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de fluorescence maximales dans nos conditions expérimentales (tableau 10) :

Sondes	Type cellulaire	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
TMA-DPH	Lymphocyte	350	425
	Fibroblaste		
APD	Lymphoblaste	344	Monomères : 396 Excimères : 470
ANS	Fibroblaste	390	467
3-AS	Lymphocyte	366	440
	Hématie	367	446
	Fibroblaste	366	443
6-AS	Lymphocyte	366	436
	Hématie	367	446
	Fibroblaste	366	433
9-AS	Lymphocyte	366	436
	Hématie	367	442
	Fibroblaste	366	430
12-AS	Lymphocyte	366	436
	Hématie	367	442
	Fibroblaste	366	437

Tableau 10 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission maximales d'utilisation des sondes fluorescentes (TMA-DPH, APD, ANS, 3, 6, 9 et 12-AS) dans nos conditions expérimentales.

I.5.3. Principe de la mesure par la méthode de formation des excimères intermoléculaires

Les échantillons ont été excités à 344 nm. Les émissions de fluorescence ont été recueillies à 396 nm pour les monomères et à 470 nm pour les excimères (largeur de fente 5 nm). Ces valeurs ont

été corrigées en soustrayant l'intensité de fluorescence obtenue pour une suspension cellulaire non marquée.

I.5.4. Principe de la mesure par la méthode de polarisation de fluorescence

Les mesures d'anisotropie de fluorescence ont été réalisées en utilisant un accessoire de polarisation de fluorescence qui comportait deux filtres de polarisation. Le polariseur était placé dans le faisceau d'excitation, juste avant la cuve de l'échantillon. L'analyseur était situé au niveau du faisceau d'émission, juste après l'échantillon. Le montage est décrit figure 23. Un système électromécanique permettait d'orienter ces deux filtres afin de polariser la lumière soit verticalement, soit horizontalement.

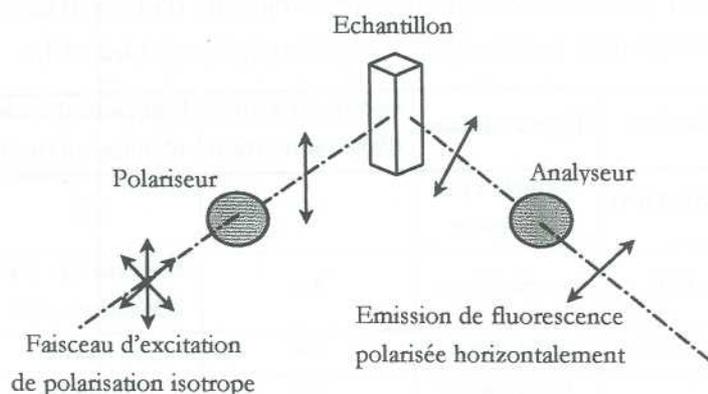


Figure 23 : Principe de la mesure de la polarisation de fluorescence par un spectrofluorimètre équipé d'un accessoire de polarisation. Le faisceau d'excitation constitué d'une lumière isotrope est polarisé verticalement par le polariseur. L'analyseur placé après l'échantillon permet d'analyser la composante horizontale de l'émission de fluorescence.

La mesure de l'anisotropie de fluorescence a été effectuée en trois étapes :

Mesure du blanc

Des mesures des intensités de fluorescences obtenues pour une suspension cellulaire non marquée ont été réalisées afin de s'affranchir du bruit de fond.

Détermination des facteurs de correction G

Lorsqu'un échantillon est éclairé par une lumière polarisée horizontalement (I_H), les composantes d'émission parallèle ($I_{//}$)_H et perpendiculaire (I_{\perp})_H au faisceau d'excitation sont égales. Cependant, les composants optiques du spectrofluorimètre ont des propriétés polarisantes qui peuvent

provoquer des interférences sur la mesure des valeurs d'anisotropie. Il est donc nécessaire d'introduire un facteur de correction G spécifique de chaque longueur d'onde. A cet effet, l'échantillon est éclairé par une lumière d'excitation polarisée horizontalement (polariseur horizontal). L'analyseur est orienté verticalement et horizontalement afin de recueillir les valeurs des composantes parallèle et perpendiculaire de l'intensité de fluorescence émise : $(I_{//})_H$ et $(I_{\perp})_H$. Le facteur de correction est défini par la formule suivante :

$$G = \frac{(I_{//} - I_{B//})_H}{(I_{\perp} - I_{B\perp})_H}$$

Avec I_B correspondant aux intensités de fluorescence en l'absence de marqueur.

Détermination des intensités d'émission polarisée

L'échantillon a été excité par une lumière polarisée verticalement. L'amplitude du signal d'émission a été déterminée pour les composantes parallèle et perpendiculaire au faisceau incident en réglant l'analyseur parallèlement et perpendiculairement à la direction du polariseur. L'anisotropie de fluorescence $\langle r \rangle$ est définie par :

$$\langle r \rangle = \frac{[(I_{//} - I_{B//})_V - G * (I_{\perp} - I_{B\perp})_V]}{[(I_{//} - I_{B//})_V + 2G * (I_{\perp} - I_{B\perp})_V]}$$

L'intensité totale de fluorescence est décrite par la relation suivante :

$$I_f = [(I_{//} - I_{B//})_V + 2G * (I_{\perp} - I_{B\perp})_V]$$

1.6. Mesure de la fluidité membranaire par cytométrie de flux

Des mesures de la polarisation de fluorescence sont possibles en cytométrie en flux, en adaptant un module de polarisation. Cette méthode présente de nombreux avantages par rapport aux techniques utilisant un spectrofluorimètre. Elle permet, notamment, de réaliser l'analyse au niveau d'une cellule isolée et donc de s'affranchir des perturbations de la mesure dues à la présence de marqueurs libres dans la suspension cellulaire (Fox & Delohery, 1987 ; Böck et coll., 1989). D'autre part, il est possible d'effectuer la mesure sur des populations cellulaires sélectionnées selon leur taille et leur granulosité.

I.6.1. Appareil de mesure

Les mesures de la polarisation ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre en flux : FACS Vantage SE (Becton Dickinson, France). Le principe optique de la détermination de la polarisation de fluorescence en cytométrie de flux est décrit figure 24. Un laser à argon innova 305 (Cohérent, France) dont la longueur d'onde était fixée à 488 nm a été réglé à la puissance de 200 mW. L'utilisation de deux filtres passe-bande centrés sur cette même longueur d'onde (488 ± 5 nm), placés devant FSC (photomultiplicateur) et SSC (photomultiplicateur), permettait de détecter la diffusion de la lumière mesurée respectivement dans l'axe du rayon incident sous un petit angle ($< 12^\circ$) et sous un angle droit. Ces deux paramètres FSC et SSC sont respectivement corrélés à la taille des événements analysés et à la réfringence du cytoplasme. Le laser UV à krypton innova 302 (350,7 nm, 200 mW) (Cohérent, France) constituait la source de lumière, déjà polarisée verticalement, qui excitait les molécules fluorescentes pour les mesures de polarisation de fluorescence. Une lame demi-onde positionnée devant le laser à krypton innova 302 orientait la polarisation du faisceau laser du plan vertical au plan horizontal. Un filtre passe-haut (LPF420) était placé sur le trajet optique de la fluorescence émise afin de ne transmettre que les longueurs d'ondes supérieures à 420 nm. Ce filtre arrêtait la lumière diffusée provenant du faisceau excitateur (350,7 nm). Une lame séparatrice (50/50) divisait à parts égales l'émission de fluorescence entre les deux photomultiplicateurs (PMT) : FL3-2 et FL4. Des filtres polarisés étaient posés devant chaque PMT de façon à transmettre uniquement la composante verticale (FL3-2) ou horizontale (FL4) de la polarisation obtenue.

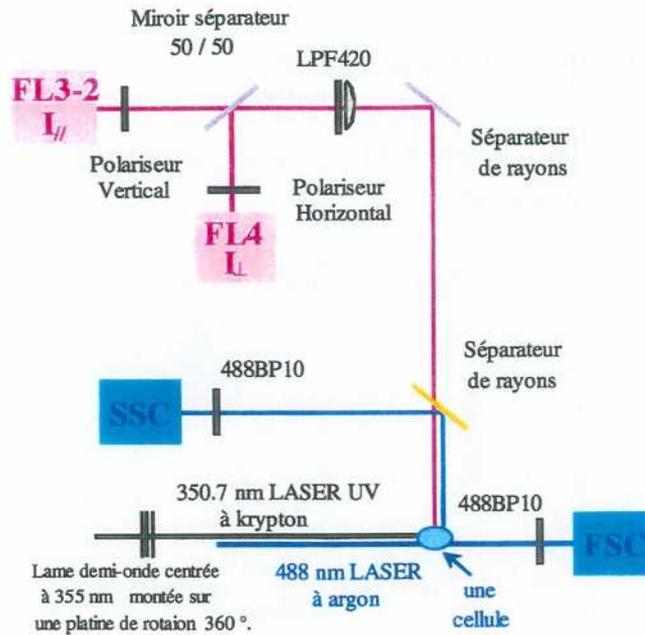


Figure 24 : Schéma optique du principe de la détermination de la polarisation de fluorescence par cytométrie de flux. Les lasers sont réglés à la puissance de 200 mW. Les rectangles représentent les photomultiplicateurs : FSC et SSC détectent et amplifient un signal corrélé respectivement à la taille et à la granulosité des cellules ; FL3-2 et FL4 détectent et amplifient les composantes de l'émission de fluorescence respectivement parallèle et perpendiculaire au faisceau d'excitation. Les filtres interférentiels permettent de sélectionner les longueurs d'ondes : 488BP10 est un filtre passe-bande centré sur 488 ± 5 nm et LPF420 est un filtre passe-haut qui transmet les longueurs d'ondes supérieures à 420 nm.

Le logiciel CELLQuest (Becton Dickinson, France) permet l'acquisition et l'analyse des données. En pratique, deux cytogrammes (FSC/SSC et FL3-2/FL4 ou $I_{//}/I_{\perp}$) et trois histogrammes ($I_{//}$, I_{\perp} , et le rapport $I_{//}/I_{\perp}$) sont nécessaires pour réaliser les mesures de polarisation de fluorescence et calculer les valeurs d'anisotropie de fluorescence selon la formule :

$$\text{Soit } R = \frac{I_{//}}{I_{\perp}}, \langle r \rangle = \frac{R-1}{R+2}.$$

I.6.2. Principe de la mesure

Préparation des échantillons biologiques pour la mesure

Les suspensions cellulaires ont été préparées de manière identique à celles destinées à la mesure de la fluidité membranaire par spectrofluorimétrie, excepté l'étape de lavage qui n'était pas nécessaire.

Détermination de la population cellulaire d'intérêt

Sur le cytogramme FSC/SSC, la région R1 permettait de cibler la population cellulaire d'intérêt : lymphocytes ou hématies (figure 25).

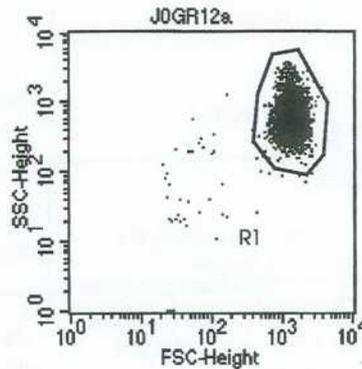


Figure 25 : Cytogramme FSC/SSC permettant de sélectionner la population d'hématies au niveau de la région R1.

Etape d'équilibrage

La lame demi-onde placée au niveau du faisceau d'excitation (figure 26) était positionnée à 45 ° afin d'orienter la polarisation de la lumière excitatrice horizontalement : $I_{//} = I_{\perp}$ ($\langle r \rangle = 0$ et $R = 1$). Les amplifications des deux PMT (FL3-2 et FL4) étaient alors réglées afin que les histogrammes de distribution de $I_{//}$ (I_{para}) et I_{\perp} (I_{perp}) se superposent (figure 26).

Cette étape a été réalisée pour chaque échantillon et précédait toujours l'étape de mesure.

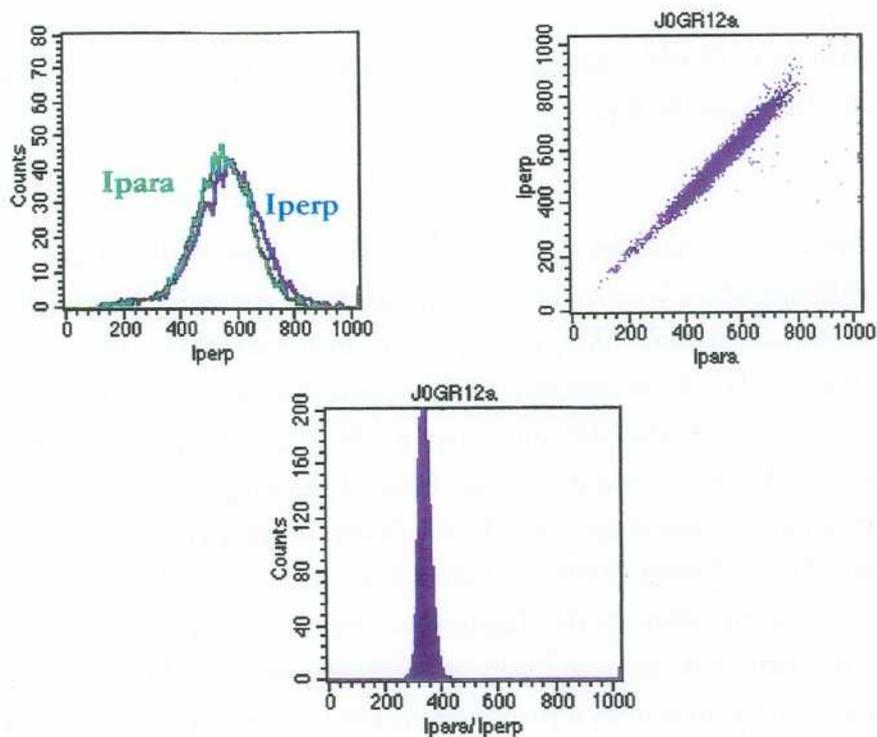


Figure 26 : Etape d'équilibrage : $I_{//} = I_{\perp}$ ou $I_{para} = I_{perp}$ ou $R=1$.

Etape de mesure

Une fois l'équilibrage réalisé, les amplifications des PMT n'étaient plus modifiées. La lame demi-onde a été alors positionnée à 0° afin de laisser passer la lumière excitatrice polarisée verticalement. Les mesures de $I_{//}$ et I_{\perp} ont alors été effectuées (figure 27).

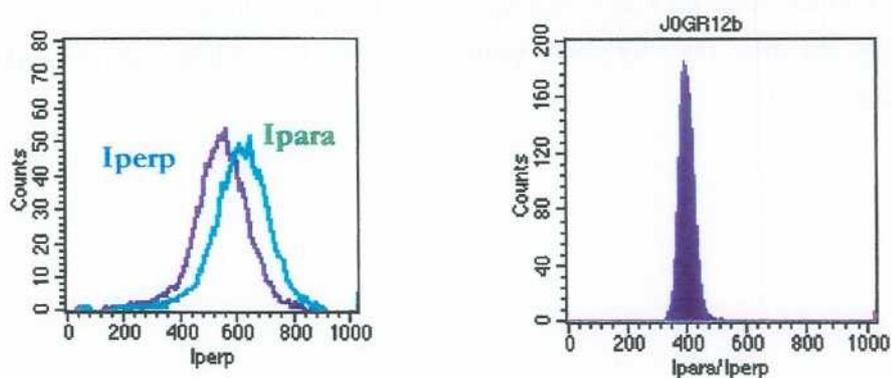


Figure 27 : Etape de mesure

Pour chaque échantillon, 10000 évènements étaient enregistrés, la vitesse d'analyse étant réglée à 200 évènements par seconde.

I.7. Mesure de la fluidité membranaire et détection simultanée de la viabilité cellulaire par cytométrie de flux

Grâce à l'utilisation de multiples longueurs d'ondes monochromatiques délivrées simultanément par un ou plusieurs lasers, la cytométrie de flux permet de multiplier le nombre de fluorochromes aux caractéristiques spectrales différentes pouvant être fixés sur la cellule. Les voies de mesure sont alors réglées afin de ne recevoir l'information que de l'un ou de l'autre des marqueurs fluorescents. Nous avons ainsi développé une méthode permettant de mesurer l'état de fluidité membranaire des différents états de viabilité cellulaire des lymphocytes.

La technique du double marquage des cellules à l'acridine orange (AO) et au bromure d'éthidium (BE) permet, d'après Olivier (1995) et Lecoœur & Gougeon (1996) de discriminer les cellules viables des cellules en début et fin d'apoptose. Ainsi, cette méthode a été appliquée afin de discriminer les différents états de viabilité cellulaire des lymphocytes, et la technique de polarisation de fluorescence nous a permis de mesurer la fluidité membranaire sur chacun de ces états.

I.7.1. Appareil de mesure

Le schéma optique du montage de cytométrie de flux permettant la mesure simultanée de l'état de viabilité et de la fluidité membranaire de chaque cellule prise isolément est décrit figure 28. Par rapport au schéma de la figure 24, deux PMT (FL1 et FL2) ont été ajoutés afin de détecter les émissions de fluorescence de l'acridine orange (AO) et du bromure d'éthidium (BE), fluorochromes excités par le laser à argon à 488 nm. FL1 et FL2 recueillaient respectivement la fluorescence jaune-verte de l'AO intercalée dans la double hélice de l'ADN et la fluorescence rouge-orange du BE, fluorochrome pénétrant dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire.

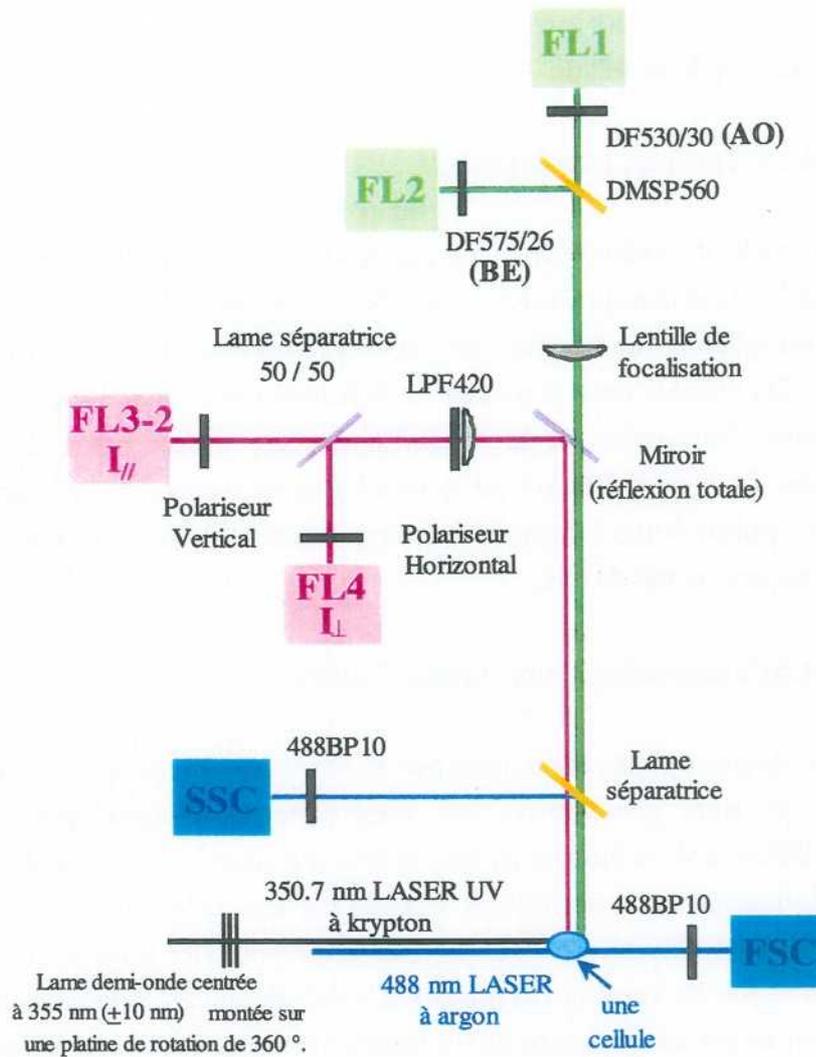


Figure 28 : Schéma optique du principe de la détection simultanée de l'état de viabilité cellulaire et de la fluidité membranaire par cytométrie de flux. Les lasers sont réglés à la puissance de 200 mW. Les rectangles représentent les photomultiplicateurs : FSC et SSC détectent et amplifient un signal corrélé respectivement à la taille et à la granulosité des cellules ; FL3-2 et FL4 détectent et amplifient les composantes de l'émission de fluorescence respectivement parallèle et perpendiculaire au faisceau d'excitation ; FL1 et FL2 détectent et amplifient l'émission de fluorescence respectivement de l'AO et du BE. Les filtres interférentiels permettent de sélectionner les longueurs d'ondes : 488BP10 est un filtre passe-bande centré sur 488 ± 5 nm ; LPF420 est un filtre passe-haut qui transmet les longueurs d'ondes supérieures à 420 nm ; DF575/26 est un filtre dichroïque centré sur 575 ± 13 nm ; DF530/30 est un filtre dichroïque centré sur 530 ± 15 nm ; DMSP560 est un miroir dichroïque passe-bas qui transmet les longueurs d'ondes inférieures à 560 nm et qui réfléchit à angle droit celles supérieures à 560 nm.

I.7.2. Principe de la mesure

Préparation des échantillons pour la mesure

Des solutions stocks d'acridine orange à 3 µg/ml et de bromure d'éthidium à 10 µg/ml ont été préparées tous les mois dans une solution de PBS et conservées à 4 °C, à l'abri de la lumière.

Les suspensions cellulaires de lymphocytes ont été préparées selon des procédures expérimentales identiques à celles utilisées pour la mesure de la fluidité membranaire par cytométrie de flux. A l'issue du temps d'incubation de la sonde fluorescente membranaire, 5 µl de chacune des solutions stocks d'AO et de BE ont été ajoutés à 1 ml de suspension cellulaire. Les échantillons ont été placés pendant 5 min à l'obscurité, à température ambiante. Les suspensions ont ensuite été analysées par cytométrie de flux.

Détermination de la population lymphocytaire d'intérêt

Les cellules en apoptose sont caractérisées par un rétrécissement de leur volume cellulaire et une augmentation de leurs granulosités. Ces caractéristiques morphologiques modifient leurs propriétés de diffusion de la lumière en SSC et FSC (Lecoeur & Gougeon, 1996). Les cellules en apoptose se distinguent donc des cellules vivantes par une diminution et une augmentation du signal respectivement détecté par FSC et SSC. C'est pourquoi nous avons ainsi délimité les frontières de la région R1 sur le cytogramme FSC/SSC (figure 29). Afin de vérifier que les limites de R1 englobent toutes les sous-populations lymphocytaires, nous avons marqué les suspensions cellulaires avec 3 anti-corps monoclonaux de surface (anti-CD2, anti-CD3 et anti-CD11b) et la 7-aminoactinomycine D (7-AAD). Le marquage des cellules avec ces 3 anti-corps permettait de discriminer les différentes sous-populations lymphocytaires : lymphocytes B, T et NK. La 7-AAD est un fluorochrome qui pénètre uniquement dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, c'est-à-dire les cellules mortes. Les résultats de ces marquages (résultats non présentés) ont montré que la région R1 englobait toutes les sous-populations lymphocytaires, et que les lymphocytes morts étaient caractérisés par une diminution de leur taille et une augmentation de la réfringence de leur cytoplasme. Les limites de la région R1 ainsi définie dans nos expériences étaient similaires à celles obtenues par Hertveldt et coll. (1997).

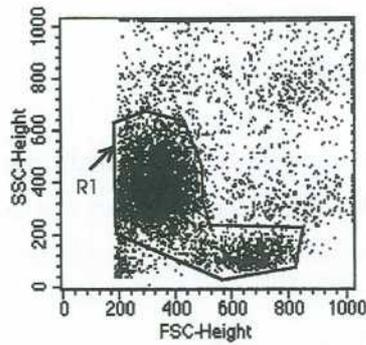


Figure 29 : Cytogramme FSC/SSC permettant de repérer la population de lymphocytes au niveau de la région R1.

Détection des différents états de viabilité des lymphocytes

Le cytogramme FL1/FL2 permettait de différencier les états de viabilité cellulaire de la population lymphocytaire (figure 30). Trois régions (R2, R3 et R4) étaient délimitées et représentaient les populations des lymphocytes vivants (R2), des lymphocytes en début d'apoptose (R3) et en fin d'apoptose (R4) (Lecoeur & Gougeon, 1996). Les cellules en début d'apoptose étaient caractérisées par une diminution de la fluorescence de l'AO mais restaient imperméables au BE, et les cellules en fin d'apoptose devenaient perméables au BE (Lecoeur & Gougeon, 1996).

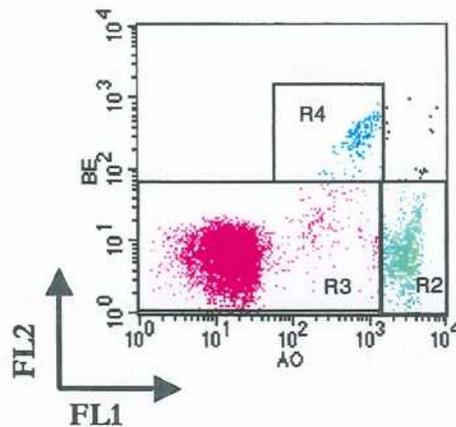


Figure 30 : Cytogramme FL1/FL2 permettant de discriminer les lymphocytes vivants (R2), des cellules en début d'apoptose (R3) et en fin d'apoptose (R4) (Lecoeur & Gougeon, 1996).

Mesure de la polarisation de fluorescence

L'étude de la fluidité membranaire a été réalisée sur chaque sous-population définissant ces trois états de viabilité lymphocytaire : R2, R3 et R4. Les étapes d'équilibrage et de mesure, décrites dans le paragraphe I.6.2, ont été ainsi appliquées sur chacune de ces populations.

Pour chaque échantillon, 10000 évènements ont été enregistrés, la vitesse d'analyse étant réglée à 200 évènements par seconde.

I.8. Dosage des lipides membranaires par Chromatographie Liquide Haute Performance

I.8.1. Matériel biologique

Les extractions des lipides membranaires ont été réalisées à partir d'échantillons de membranes d'hématies et de membranes totales de lymphocytes provenant de sang humain.

I.8.2. Extraction des lipides totaux

Les échantillons biologiques étant assimilés à du sérum, la méthode appliquée était celle de Bligh & Dyer (1959).

Réactifs :

- Chloroforme (RP Rectapur, Prolabo) distillé, à 0,02 % de BHT (butylhydroxytoluène)
- Méthanol (Chromanorm, Prolabo)
- Eau bi-distillée
- Réactif de Folch : chloroforme/méthanol (2 : 1), à 0,01 % de BHT

Protocole :

Le chloroforme et le méthanol ont été additionnés à 2 ml de suspension dans les proportions suivantes : chloroforme/méthanol/eau (1 : 2 : 0,8). Ce mélange a été agité énergiquement puis le volume a été complété afin d'obtenir les proportions suivantes : chloroforme/ méthanol/ eau (2 : 2 : 1,8). Ce mélange final a été centrifugé à 1733 g pendant 10 minutes. Une solution biphasique a été alors obtenue. La phase supérieure, constituée de méthanol et d'eau, a été éliminée tandis que

la phase inférieure, contenant les lipides, a été filtrée sur un filtre plissé comportant 1 à 2 g de sulfate de sodium d'anhydre. Les extraits ont ensuite été évaporés grâce à un évaporateur rotatif, puis l'évaporation a été terminée sous un flux d'azote. Les résidus secs ont ensuite été resuspendus dans 2 ml de chloroforme et congelés à -80°C jusqu'à l'analyse.

I.8.3. Extractions des lipides polaires

La séparation des lipides neutres (cholestérol) des lipides polaires (phospholipides), a été réalisée sur des colonnes de Silice (Supelclean LC-SI, Sigma, France). L'élution des lipides neutres a été obtenue avec du chloroforme. L'extraction des phospholipides a ensuite été effectuée avec le méthanol. Après évaporation, les résidus secs de lipides polaires ont été pesés puis resuspendus dans du chloroforme et stockés à -20°C en attendant d'être analysés en chromatographie liquide haute performance.

I.8.4. Séparation des différentes classes de phospholipides par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

La chaîne de mesure se composait d' :

- un injecteur manuel : vanne d'injection Rheodyne munie d'une boucle de 200 μl
- un module de pompes : P 200 (Thermo Separation Products)
- un détecteur : DDL 31 (Eurosep, France)
- un intégrateur : Shimadzu CR 5A

Le système d'analyse se composait d'une colonne (Kromasil, 5 μm , 7,8 mm * 250 mm, AIT, France) constituée d'une phase stationnaire de Silice greffée, apolaire. La détection des différentes classes de phospholipides a été réalisée par chromatographie de partage, sous gradients d'élution en phase normale. La phase mobile était constituée de 2 mélanges éluants qui étaient eux-mêmes composés de trois solvants (de qualité pour CLHP, Merck, France) :

- Solvant A : hexane
- Solvant B : isopropanol-chloroforme (4 : 1)
- Solvant C : isopropanol-eau (1 : 1)
- Mélange éluant D : A-B-C (42 : 52 : 6, v/v/v)
- Mélange éluant E : A-B-C (32 : 52 : 16, v/v/v)

L'élution des différentes classes de phospholipides a été réalisée à température ambiante, à un débit constant de 2,5 ml/min, grâce à un gradient d'élution (Christie, 1985) dont le profil est

présenté figure 31. A l'issue de la séparation ($t = 45$ min), une phase de stabilisation ($t = 15$ min) de la colonne, avec le mélange éluant initial D, précédait une nouvelle injection.

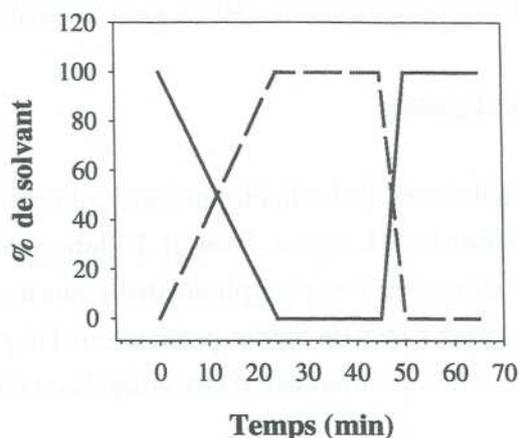


Figure 31 : Profil du gradient d'éluant pour l'analyse des différentes classes de phospholipides. Les courbes en trait plein et en pointillé représentent respectivement le mélange éluant D et E.

En sortie de la colonne, 10 % de l'effluent ont été dérivés vers le détecteur et les 90 % restants ont été collectés afin de déterminer la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides.

La quantification et la séparation des classes de phospholipides ont été réalisées grâce à un détecteur à diffusion de lumière (DDL 31, Eurosep, France). Son principe de fonctionnement reposait sur la nébulisation de l'effluent chromatographique par un courant de gaz inerte, suivie d'une évaporation de l'éluant et d'un entraînement des solutés sous forme de micro-particules dans une chambre de détection. La quantité de lumière diffusée par ces fines particules traversant le rayonnement lumineux était proportionnelle à la masse de soluté injectée. Les éluants étant évaporés, seule une phase vapeur traversait le faisceau optique sans donner de signal de diffusion, et donc il n'y avait pas de dérive de la ligne de base due à l'utilisation de gradients d'éluant. La température de nébulisation a été fixée à 40 °C, et la pression d'azote à 1 bar.

Comme la réponse de ce détecteur était non linéaire, des courbes de calibration logarithmiques ont été réalisées pour chaque classe de phospholipides.

Les phospholipides ont été séparés selon leur degré de polarité. D'après le chromatogramme de la figure 32, leur ordre d'éluant était le suivant : PE, PI, PS, PC, et SM.

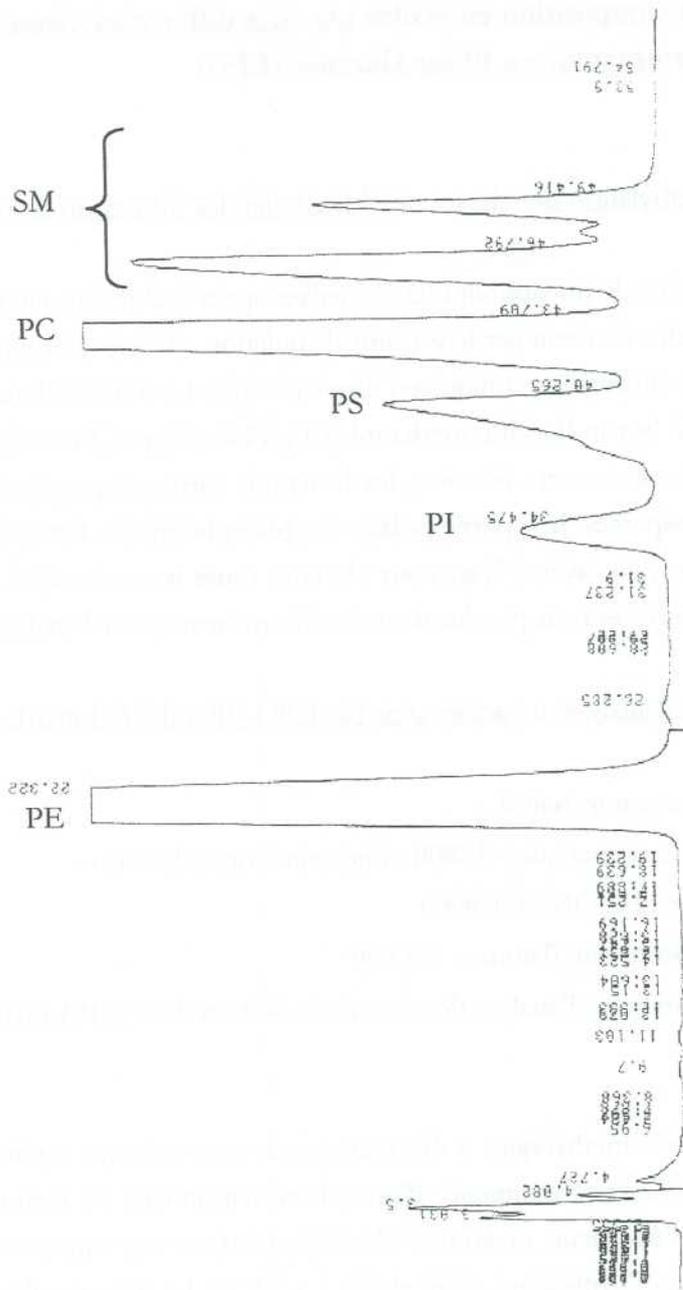


Figure 32 : Chromatogramme représentant la séparation des différentes classes de phospholipides de membranes d'hématies.

I.9. Analyse de la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

I.9.1. Transméthylation des classes de phospholipides (Morrison & Smith, 1964)

Les différentes fractions de phospholipides recueillies après CLHP ont été évaporées sous azote, puis transméthylées afin de diminuer leur point d'ébullition, et ainsi d'obtenir des composés plus volatils pour l'analyse chromatographique en phase gazeuse. La transméthylation a été réalisée par réaction avec 10 % de boron fluorure-méthanol (BF_3 , Fluka, Sigma, France) / méthanol, pendant 5 min, à 80 °C. A l'issue de cette réaction, les fonctions carboxyliques des chaînes d'acides gras ont été méthylées et séparées de la partie polaire des phospholipides. Les acides gras méthylés ont été extraits à l'hexane, puis lavés à l'eau pour éliminer toute trace d'acidité. Les échantillons ont ensuite été évaporés à sec et resuspendus dans du chloroforme pour l'analyse en CPG.

I.9.2. Méthode d'analyse des acides gras par CPG (Blondel & Linard, 1996)

La chaîne de mesure se composait d' :

- un échantillonneur automatique : AS800 : injecteur « on-columns »
- un chromatographe : FISIONS GC8000
- un détecteur à ionisation de flamme : FID 80
- un logiciel d'acquisition et d'analyse des données : Nelson 2600 (SRA instruments)

La séparation des esters méthyliques a été réalisée sur une colonne capillaire (CPWax 52 CB, Chrompack, 50 m * 0.32 mm) composée d'une phase stationnaire de formule $[\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}]$, de 0,25 μm d'épaisseur, et greffée chimiquement sur un support de Silice fondue. La pression du gaz vecteur, l'hydrogène, a été réglée à 1,2 bars. La mise en place d'une pré-colonne de Silice fondue (2 m * 0,32 mm) permettait le dépôt des contaminants peu volatils.

L'élution des esters méthyliques a été réalisée grâce à un gradient de température du four du chromatographe. Après injection, la température a été maintenue à 54 °C pendant 4 min puis élevée à 194 °C (à raison de 3 °C par minute). La durée de la séparation variait de 96 à 140 minutes, en fonction du nombre de carbones des esters méthyliques analysés.

La détection des esters d'acides gras méthylés a été réalisée avec un détecteur à ionisation de flamme, chauffé à 250 °C. Les temps de rétention variaient en fonction de la longueur des chaînes, de leur degré d'insaturation et de la position de leur(s) double(s) liaison(s). Il existe une relation linéaire entre les logarithmes décimaux des temps de rétention des esters méthyliques et leur nombre de carbone. Donc, chaque acide gras a été identifié par le calcul de sa Longueur

Equivalente de Chaîne (LEC) selon la formule de Kovats (figure 33), et comparée à un tableau de LEC de références établi dans les mêmes conditions à partir de la chromatographie d'esters méthyliques connus.

$$\text{LEC} : 2^* \frac{|\log(T_x - T_s) - \log(T_n - T_s)|}{|\log(T_{n+2} - T_s) - \log(T_n - T_s)|} + n$$

Avec T_n : temps de rétention de l'acide gras saturé de référence à n atomes de carbone

T_{n+2} : temps de rétention de l'acide gras saturé de référence à n+2 atomes de carbone.

T_x : temps de rétention de l'acide gras inconnu X qui élu entre les temps T_n et T_{n+2}

T_s : temps du solvant

n : nombre de carbone du premier acide gras de référence

Figure 33 : Formule de Kovats. Calculs de la LEC des esters méthyliques d'acides gras.

Voici le type de chromatogramme qui a été obtenu à partir de l'analyse en CPG des différents esters méthylés d'acide gras du PE membranaire d'hématies (figure 34) :

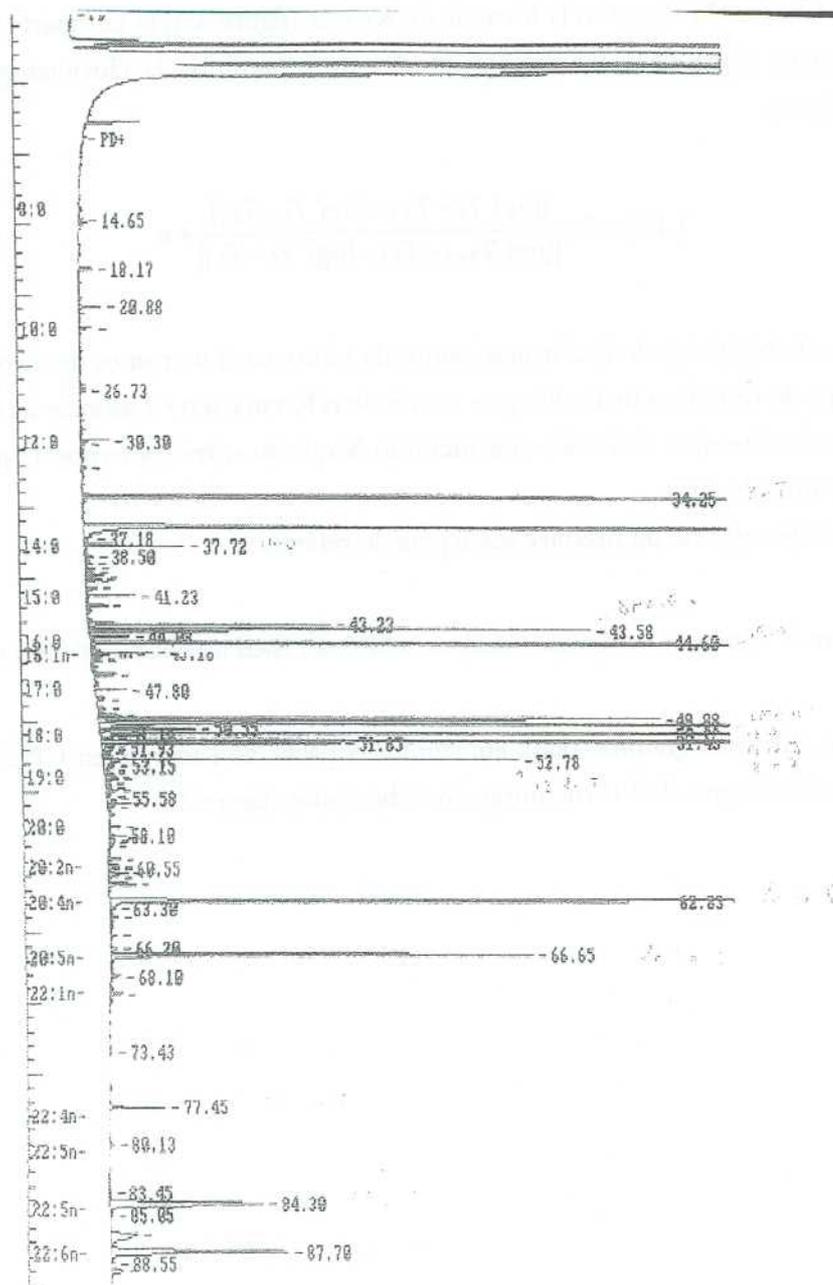


Figure 34 : Chromatogramme de séparation en CPG des différents acides gras composants la PE des membranes d'hématies.

II. Etudes in vivo

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Modèle rat

Des rats mâles de souche Wistar (élevage Janvier, Le Genest St Isle, France), âgés de 3 à 4 semaines, pesant environ 80 g, ont été nourris *ad libitum* pendant 5 semaines, avant irradiation, avec trois régimes alimentaires différents dont les compositions seront décrites dans le chapitre 4. Leur prise alimentaire et leur croissance ont été contrôlées avant et après irradiation. La boisson était également distribuée *ad libitum*. Les animaux ont été répartis par trois dans des cages de polycarbonate, dans une salle dont la température était régulée à 22 °C, avec un cycle lumineux de 12 heures.

Les échantillons sanguins obtenus à partir du modèle rat ont été prélevés au niveau de l'aorte abdominale sur des animaux anesthésiés avec du penthobarbital sodique (60 mg/kg) par voie intra-péritonéale. Le sang total a été recueilli dans deux tubes héparinés de 7 ml et placé à 4 °C. Les animaux ont ensuite été sacrifiés par surdosage d'anesthésique et rupture du diaphragme.

II.1.2. Modèle singe

Des singes mâles de type *macaca fascicularis* pesant 6 à 7 kg ont été nourris à raison d'une ration de croquettes par jour supplémentée par un apport de fruits (carottes, pommes, bananes, ou oranges). Ils ont été placés dans des cages individuelles dans une salle dont la température est de 22 °C, avec un cycle lumineux de 12 heures.

Les échantillons sanguins de singes ont été collectés par prélèvement sous intraveineuse de 3 ml de sang total et recueillis sur héparine.

Toutes les expériences réalisées sur ces modèles animaux ont été contrôlées et approuvées par le comité d'éthique de l'IPSN.

II.1.3. Etudes sur l'Homme

Les patients traités au service de radiothérapie de l'Institut Gustave Roussy (IGR, Villejuif, France), dont le consentement a été recueilli préalablement par leur radiothérapeute, ont été

prélevés avant et après la première fraction de dose à raison de 3 ml de sang total sur héparine de lithium. Ces expériences ont été approuvées par le comité d'éthique de l'IGR.

II.2. Préparation des échantillons sanguins

II.2.1. Séparation du plasma

Le plasma a été obtenu à partir des échantillons sanguins prélevés sur le modèle rat par centrifugation à 2200 g, à 4 °C, pendant 15 minutes. Pour les études de dosage de la vitamine E, le plasma a été aliquoté et conservé à -20 °C jusqu'aux analyses. Le culot cellulaire a été resuspendu avec le même volume de milieu RPMI 1640 sans glutaMAX-I (Life Technologies, France) que de plasma prélevé. Ces cellules ont été utilisées pour les mesures biophysiques et les dosages biochimiques.

II.2.2. Séparation des lymphocytes du sang total

Le protocole réalisé est le même que celui mis en œuvre pour les expériences *in vitro* (cf. paragraphe I.2.1).

II.2.3. Obtention d'hématies intactes

Le protocole réalisé est le même que celui mis en œuvre pour les expériences *in vitro* (cf. paragraphe I.2.3).

II.2.4. Préparation des membranes d'hématies

Le protocole réalisé est le même que celui mis en œuvre pour les expériences *in vitro* (cf. paragraphe I.2.4).

II.3. Caractéristique des irradiations

II.3.1. Modèle rat

Les animaux ont été irradiés avec une source gamma de Cobalt-60 (irradiateur ICO 4000, IPSN). Les rats ont été placés individuellement dans des tubes cylindriques aérés en plastique, animés d'un mouvement de rotation permettant une irradiation homogène de l'animal. Les doses totales reçues par chaque animal étaient de 1,5 et 8 Gy, pour un débit de dose de 0,5 Gy/min. Des groupes d'animaux témoins ont été traités de manière similaire, mais n'ont pas été exposés aux rayonnements ionisants. Des prélèvements sanguins suivis du sacrifice des animaux ont été réalisés à différents temps après irradiation.

II.3.2. Modèle singe

Les singes ont été exposés à une irradiation gamma (irradiateur ICO 4000, IPSN) en champ large. L'animal a été anesthésié avant irradiation puis placé sur un siège de contention. Les singes ont tout d'abord été exposés en position dorsale à une dose de 4 Gy, puis ils ont été retournés en position ventrale pour une dose de 4 Gy. Les animaux recevaient donc une dose totale de 8 Gy, au débit de 0,1 Gy/min. Des prélèvements sanguins ont ensuite été réalisés à différents temps après irradiation.

II.3.3. Etudes sur l'Homme

Cette étude a été réalisée grâce à l'obtention d'échantillons de sang de patients présentant différentes pathologies de type leucémique qui nécessitaient une greffe de moelle osseuse (collaboration avec le service de radiothérapie de l'Institut Gustave Roussy). Les patients subissaient une mise en aplasie par un traitement combiné de chimiothérapie et de radiothérapie. Les irradiations corps entier ont été réalisées avec un accélérateur linéaire délivrant un rayonnement X de 15,82 MeV à raison de fractions de 1,8 Gy toutes les 12 à 18 heures pendant 5 à 8 jours, suivies d'une chimiothérapie de 3 jours. Des prélèvements sanguins ont été obtenus avant la première et la deuxième fraction de dose.

II.4. Préparation des échantillons biologiques pour la mesure de fluidité membranaire

Le protocole réalisé est le même que celui mis en œuvre pour les expériences *in vitro* (cf. paragraphe I.4).

II.5. Mesure de la fluidité membranaire par cytométrie de flux

Le protocole réalisé est le même que celui mis en œuvre pour les expériences *in vitro* (cf. paragraphe I.6).

II.6. Mesure de la fluidité membranaire et détection simultanée de la viabilité cellulaire par cytométrie de flux

Le protocole réalisé est le même que celui mis en œuvre pour les expériences *in vitro* (cf. paragraphe I.7).

II.7. Dosage de la vitamine E plasmatique par CLHP

II.7.1. Matériel biologique

Les échantillons de plasma ont été obtenus à partir de la méthode décrite précédemment, au paragraphe II.2.1. Le plasma a ensuite été prélevé, puis aliquoté et congelé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, à l'obscurité, afin d'éviter la photo-dégradation et l'oxydation de la vitamine E.

II.7.2. Principe de la méthode

Après déprotéinisation et en présence d'un standard interne, les isomères de la vitamine E (figure 35) ont été détectés et dosés par chromatographie liquide haute performance selon la méthode de Lehmann & Martin (1982).

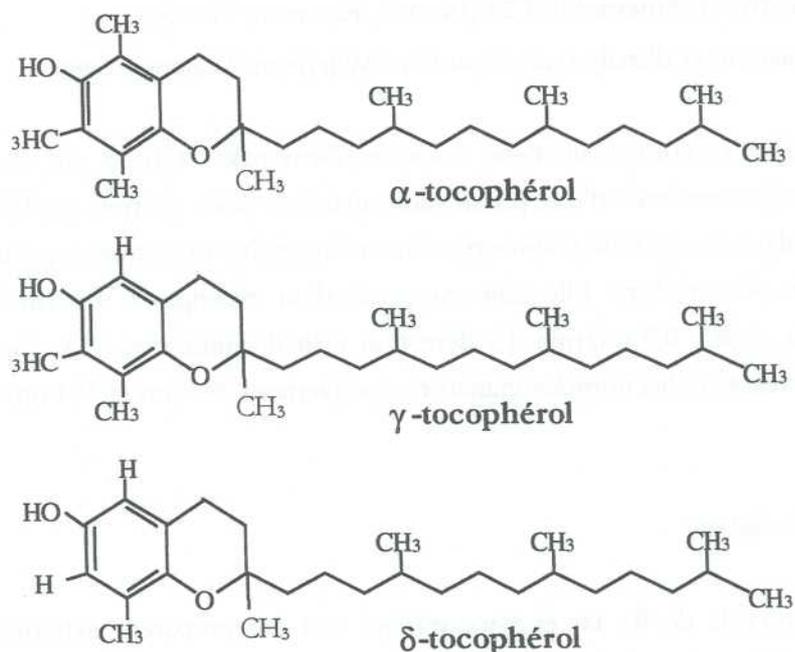


Figure 35 : principaux isomères de la vitamine E.

II.7.3. Solutions standards

Des solutions mères de δ -, α - et γ -tocophérol ont été préparées à la concentration de 1, 50 et 1 mg/ml respectivement. Ces solutions ont été aliquotées et conservées à -80°C , à l'obscurité.

II.7.4. Extraction de la vitamine E

A $50\ \mu\text{l}$ de plasma, on ajoutait $100\ \mu\text{l}$ du standard interne (δ -tocophérol $5\ \mu\text{g/ml}$) et $400\ \mu\text{l}$ de méthanol. Les échantillons ont ensuite été agités pendant une minute avant d'être centrifugés à $1000\ g$, pendant 10 minutes, à 4°C . Le surnageant a été prélevé et injecté dans le système de chromatographie. Toutes ces opérations ont été réalisées à 4°C et à l'obscurité afin d'éviter la photo dégradation et l'oxydation de la vitamine E.

II.7.5. Quantification de la vitamine E

La chaîne de mesure se composait d'un :

- Injecteur automatique : WatersTM 717 plus Autosampler
- Module de contrôle des pompes : Waters 625 LC system
- Module de dégazage des solvants sous helium

- Détecteur : spectrofluorimètre SFM 25 (Bio-tek, Kontron, France)
- Logiciel d'acquisition et d'analyse des données : Millennium (Waters, France)

Le système d'analyse se composait d'une colonne (Delta-pak™ C18, 5 µm, 2 mm * 150 mm (WATERS, France)) constituée d'une phase stationnaire de silice greffée, apolaire. La détection de la vitamine E plasmatique a été réalisée par chromatographie de partage à polarité inversée. La phase mobile était donc polaire. Elle était composée d'un mélange de méthanol et d'eau (94:6, v:v). Le débit était réglé à 0,7 ml/min. La détection était fluorimétrique. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sélectionnées étaient respectivement 293 nm et 324 nm.

Courbes étalons de dosage

Des solutions standards de δ -, α - et γ -tocophérol ont été préparées extemporanément à la concentration de 0,5 et 5 µg/ml. Des gammes étalons (figure 36) ont été réalisées à chaque dosage en ajoutant à 50 µl d'eau, 100 µl de chaque isomère de la vitamine E et 200 µl de méthanol. Les échantillons ont ensuite été agités pendant une minute avant d'être centrifugés à 3000 g, pendant 10 minutes, à 4 °C. Les courbes étalons ont ensuite été réalisées en faisant varier le volume d'injection. La quantité la plus faible des isomères de la vitamine E pouvant être détectée par cette méthode était de 0,91 ng dans 20 µl d'échantillon injecté.

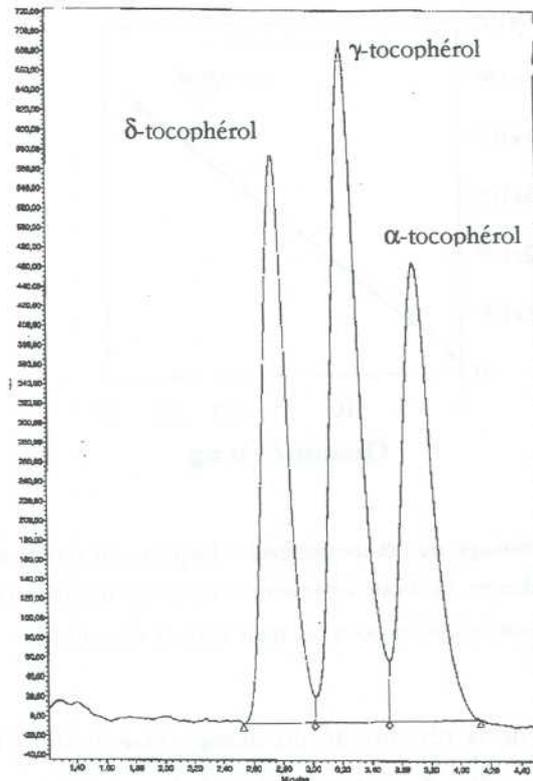


Figure 36 : Chromatogramme d'une solution contenant 27,27 ng de δ -, α - et γ -tocophérol.

Une bonne reproductibilité et répétitivité du dosage ont été établies. Les coefficients de variation de la reproductibilité du dosage étaient de 4,34 %, 2,15 % et 2,56 % respectivement pour α - (figure 37), δ - et γ -tocophérol. Les coefficients de corrélation linéaire étaient toujours supérieurs à 0,9988.

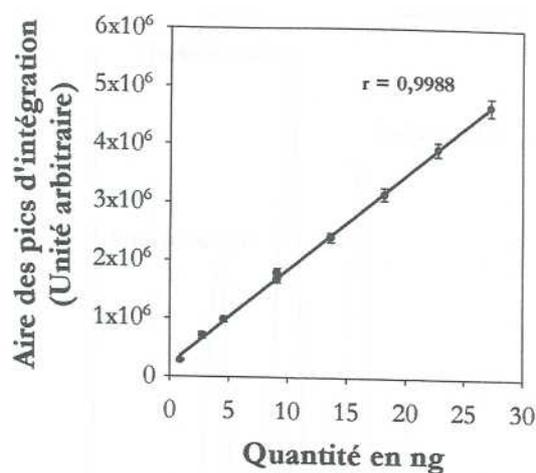


Figure 37 : Reproductibilité du dosage de l' α -tocophérol. Chaque point résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins six mesures indépendantes. La droite représente la droite de régression linéaire correspondant aux mesures réalisées pour l'isomère α de la vitamine E.

Les coefficients de variation de la répétitivité du dosage étaient de 7,19 %, 2,33 % et 3,91 % respectivement pour α - (figure 38), δ - et γ -tocophérol. Les coefficients de corrélation linéaire étaient toujours supérieurs à 0,9995.

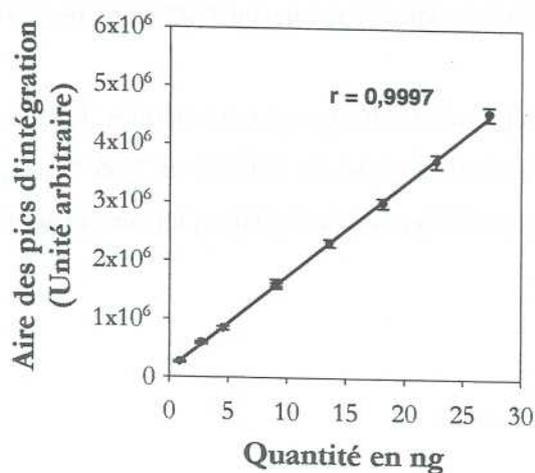


Figure 38 : Répétitivité du dosage de l' α -tocophérol. Chaque point résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins six mesures indépendantes. La droite représente la droite de régression linéaire correspondant aux mesures réalisées pour l'isomère α de la vitamine E.

II.8. Dosage des lipides membranaires par CLHP

Les extractions ont été réalisées sur des échantillons de membranes d'hématies provenant de sang de rat.

Le protocole réalisé est le même que celui mis en œuvre pour les expériences *in vitro* (cf. paragraphe I.8).

II.9. Analyse de la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides par CPG

Le protocole réalisé est le même que celui mis en œuvre pour les expériences *in vitro* (cf. paragraphe I.9).

III. Méthodes statistiques

Chaque mesure représente la valeur moyenne de plusieurs expériences dont le nombre est mentionné dans les légendes. La précision de chaque valeur moyenne est déterminée en calculant l'erreur standard de la moyenne (SEM).

Afin de déterminer si les différences observées sont significativement différentes, nous avons comparé les valeurs moyennes correspondant à deux échantillons en utilisant soit le test non paramétrique de Mann et Whitney (SigmaStat version 2.03, Jandel Corporation) ; soit le test paramétrique *t*-test de Student (SigmaStat version 2.03, Jandel Corporation) si le nombre d'expériences est supérieur à 5, si la distribution des échantillons est normale et si les variances sont égales. La valeur de *p* calculée par ces tests représente la probabilité pour que les valeurs moyennes comparées soient équivalentes.

Un test de régression linéaire a aussi été utilisé dans lequel « *r* » est le coefficient de corrélation linéaire.

Chapitre 3 :
Etudes *in vitro* des effets d'une irradiation
sur la membrane cellulaire

Sous l'action de leurs effets indirects, les rayonnements ionisants induisent la production d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène qui sont principalement à l'origine des réactions de lipoperoxydation des chaînes d'acides gras insaturées des phospholipides de la membrane plasmique. Ces modifications biochimiques des constituants de la membrane peuvent induire des altérations de ses propriétés biophysiques (Berroud et coll., 1996 ; Benderitter et coll., 1999) qui elles-mêmes pourraient jouer un rôle dans les processus de mort cellulaire radio-induites (Benderitter et coll., 2000). Dans ce premier chapitre, nous nous proposons donc d'approfondir l'étude des mécanismes conduisant aux modifications de la fluidité membranaire, et leurs conséquences, afin de démontrer que la membrane est une cible sensible des rayonnements ionisants.

Dans un premier temps, nous allons étudier l'évolution du profil des principaux acides gras des phospholipides de la membrane d'érythrocytes et de lymphocytes après irradiation, dans le but de comprendre les mécanismes régissant les modifications de fluidité membranaire observables après une exposition aux rayonnements ionisants.

Dans un deuxième temps, afin de démontrer que la membrane est une cible sensible des rayonnements ionisants, nous nous sommes intéressés aux rôles des altérations radio-induites de ces propriétés biophysiques sur certaines propriétés cellulaires. Des études antérieures réalisées dans notre laboratoire ont mis en évidence que les lymphocytes présentaient des variations de fluidité membranaire en fonction de leur état cellulaire (viable, apoptose ou nécrose) (Benderitter et coll., 2000). Nous nous proposons donc d'étudier le rôle des modifications des propriétés biophysiques de la membrane dans les processus de mort cellulaire radio-induite. A cet effet nous avons développé une technique permettant de mesurer simultanément l'état de mort cellulaire, et l'évolution de la fluidité membranaire à différentes profondeurs de la membrane.

I. Résultats

I.1. Mise au point de la technique de mesure de la fluidité membranaire

I.1.1. Conditions optimales d'utilisation des sondes fluorescentes

Des études préliminaires ont été réalisées afin de déterminer les conditions optimales expérimentales d'utilisation des sondes fluorescentes incorporées dans les membranes des différents types cellulaires considérés.

Nous donnons ici pour exemple, l'optimisation des paramètres nécessaires à la mesure de la fluidité membranaire des hématies par le 9-AS. La démarche présentée ci-après est identique pour chaque sonde considérée quel que soit le modèle cellulaire étudié.

I.1.1.1. Détermination des caractéristiques spectroscopiques du 9-AS pour des hématies irradiées et non irradiées

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence du 9-AS incorporé dans les membranes d'hématies intactes ont été enregistrés avant et après une exposition au rayonnement gamma à une dose de 8 Gy et pour un débit de dose de 0,1 Gy/min (figure 39).

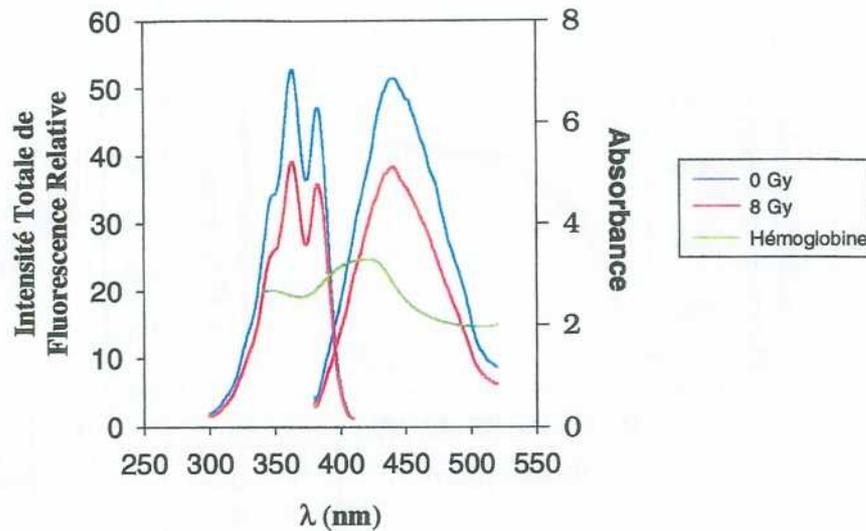


Figure 39 : Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence du 9-AS incorporé dans une suspension d'hématies. L'incubation du 9-AS dans la suspension cellulaire a été réalisée à 37 °C. En bleu sont représentés les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence du 9-AS incorporé dans une suspension d'hématies non irradiées. En rouge sont représentés les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence du 9-AS incorporé dans une suspension d'hématies irradiées à une dose de 8 Gy et un débit de dose de 0,1 Gy/min. En vert est représenté le spectre d'absorption de l'hémoglobine. Chaque spectre résulte de la valeur moyenne de 3 observations.

Les résultats montrent qu'il existe deux pics d'excitation de fluorescence (367 nm et 383 nm) avec une intensité maximale à 367 nm. Le spectre d'émission de fluorescence du 9-AS présente un maximum à 442 nm. Suite à une exposition aux rayonnements ionisants, aucun déplacement des maxima d'excitation et d'émission de fluorescence n'a été observé. Le spectre d'absorbance d'une suspension d'hématies intactes correspond à celui de l'hémoglobine. Il est également représenté figure 39. Son maximum d'absorption se situe à 420 nm et donc n'interfère pas avec l'émission de fluorescence du 9-AS à 442 nm.

I.1.1.2. Cinétique d'incorporation du 9-AS dans une suspension cellulaire d'hématies irradiées et non irradiées

Les cinétiques d'incorporation du 9-AS dans les membranes d'hématies intactes ont été mesurées avant et après une exposition au rayonnement gamma à une dose de 8 Gy et à un débit de dose de 0,1 Gy/min (figure 40).

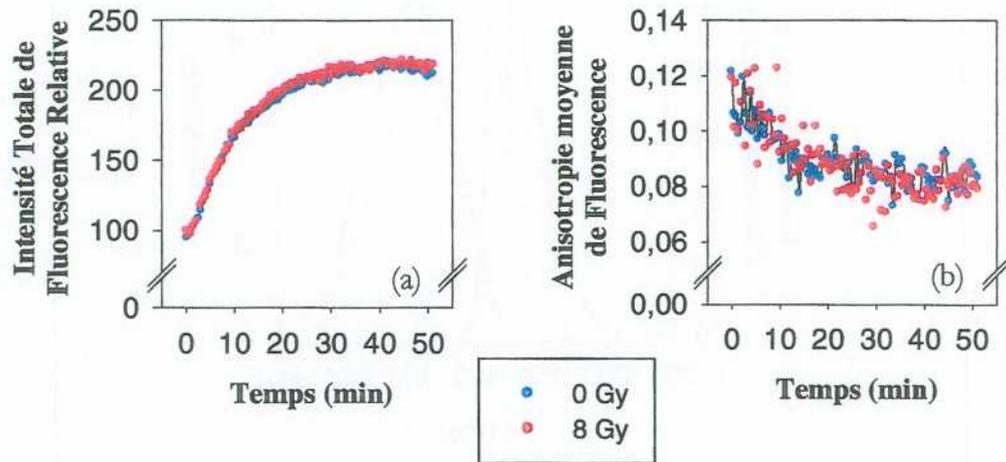


Figure 40 : Cinétique d'incorporation du 9-AS dans une suspension d'hématies. Les cinétiques d'incorporation du 9-AS ont été réalisées à 37 °C. Les points bleus représentent les valeurs d'intensité de fluorescence (a) et d'anisotropie de fluorescence (b) du 9-AS incorporé dans une suspension d'hématies non irradiées. Les points rouges représentent les valeurs d'intensité de fluorescence (a) et d'anisotropie de fluorescence (b) du 9-AS incorporé dans une suspension d'hématies irradiées à une dose de 8 Gy et un débit de dose de 0,1 Gy/min. Chaque point résulte de la valeur moyenne de 3 observations.

L'incorporation du 9-AS dans les membranes d'hématies s'effectue progressivement au cours du temps (figure 40a). Le palier de saturation de l'évolution de l'intensité de fluorescence est atteint après 20 minutes d'incubation à 37 °C. Les valeurs d'anisotropie de fluorescence se stabilisent plus tôt à partir de 15 minutes (figure 40b). Suite à une exposition aux rayonnements ionisants, la cinétique de pénétration de la sonde fluorescente est semblable à celle obtenue pour les témoins (figure 40a et 40b). Ces résultats nous ont conduit à définir un temps optimum de 20 minutes pour l'incorporation du 9-AS dans les membranes d'hématies intactes.

I.1.1.3. Influence de la concentration du 9-AS sur les valeurs d'intensité de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence dans les suspensions d'hématies.

L'influence de la concentration finale du marqueur fluorescent sur les valeurs d'intensité de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence a été testée pour plusieurs concentrations d'hématies. Les résultats obtenus sont rassemblés figure 41.

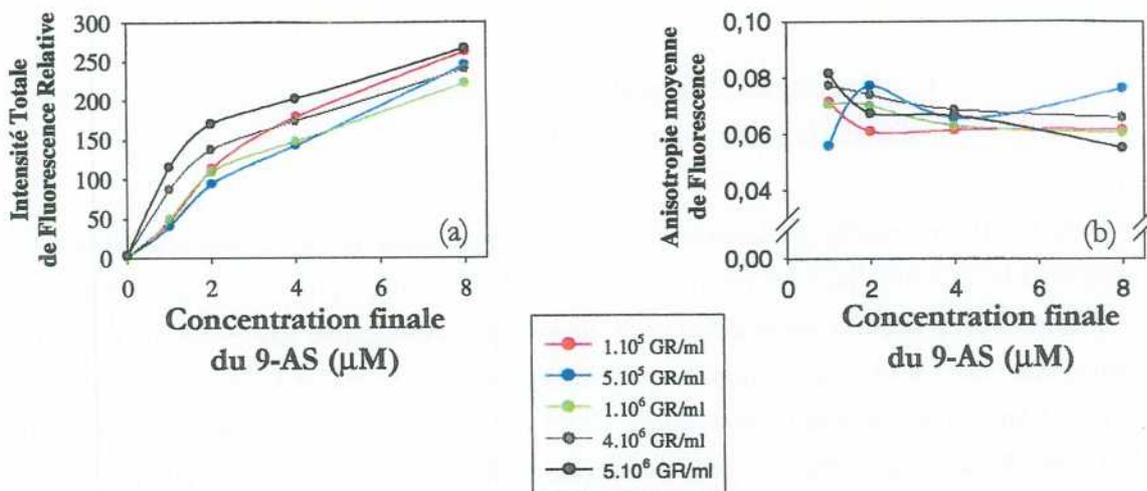


Figure 41 : Variation de l'intensité totale de fluorescence du 9-AS incorporé dans les suspensions d'hématies en fonction de la concentration finale de la sonde fluorescente. Les mesures d'intensité de fluorescence (a) et d'anisotropie de fluorescence (b) ont été réalisées à 37 °C après une incubation de 20 minutes de la sonde fluorescente. Les courbes de couleur différente représentent les variations obtenues pour plusieurs concentrations de globules rouges. Chaque point résulte de la valeur moyenne de 3 observations.

Quelle que soit la concentration cellulaire testée, les variations de l'intensité de fluorescence (figure 41a) et des valeurs d'anisotropie de fluorescence (figure 41b) en fonction de la concentration finale du 9-AS sont similaires. Leur évolution se décompose en deux phases. De 0 à 2 μM, l'augmentation de l'intensité de fluorescence est associée à une diminution des valeurs d'anisotropie de fluorescence. Pour des concentrations supérieures à 2 μM, l'intensité de fluorescence croît linéairement alors que les valeurs d'anisotropie restent stables. Cette augmentation linéaire de la fluorescence est sans doute liée à une concentration de marqueurs trop élevée dans les membranes qui serait dominée par la formation de grappes (ou d'agrégats) des sondes fluorescentes. De plus, il est possible que des marqueurs en excès dans le surnageant puissent entraîner des résultats erronés. C'est pourquoi nous avons choisi d'incorporer le 9-AS à la concentration finale de 2 μM.

Par ailleurs, à 2 μM, les valeurs d'anisotropie de fluorescence augmentent pour des concentrations cellulaires comprises entre 1.10⁶ GR/ml et 4.10⁶ GR/ml (figure 41b). Mais lorsque les concentrations cellulaires sont supérieures à 4.10⁶ GR/ml ces valeurs diminuent. Ces résultats peuvent s'expliquer par une augmentation de la concentration en hémoglobine qui fausse la mesure des valeurs d'anisotropie.

Afin de nous affranchir de ces artéfacts, nous avons donc décidé d'incorporer le 9-AS dans une suspension d'hématies ajustée à 4.10⁶ GR/ml à la concentration finale de 2 μM.

I.1.1.4. Influence de l'élimination des molécules de 9-AS libres sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence

Les mesures des intensités de fluorescence par spectrofluorimétrie sont liées à la fluorescence des marqueurs incorporés dans les membranes des cellules et aux signaux de fluorescence émis par les sondes libres dans la suspension. Les propriétés amphiphiles du 9-AS lui permettent de former des micelles en milieu aqueux qui génèrent une fluorescence parasite non caractéristique de la cohésion membranaire des cellules. Cette perturbation de la mesure peut être évitée en effectuant des lavages préalables qui éliminent les molécules de marqueurs libres.

Nous avons donc mesuré l'intensité de fluorescence du 9-AS dans les suspensions d'hématies avant et après un et deux lavages (tableau 11).

	Intensité totale de fluorescence relative	Variations en %
Aucun lavage	164,41 ± 4,64	
Un lavage	88,35 ± 8,02 ***	- 46,3 %
Deux lavages	98,70 ± 10,99 ***	- 40 %

Tableau 11 : Intensité totale de fluorescence du 9-AS dans les suspensions d'hématies avant et après lavages. Les mesures ont été réalisées à 37 °C après une incubation de 20 minutes de la sonde fluorescente. Les variations ont été déterminées par rapport aux échantillons non lavés. Les valeurs mesurées ont été obtenues à partir de 5 observations indépendantes. Différences significatives par rapport aux échantillons non lavés, *** p < 0,001.

Après élimination du surnageant par une simple centrifugation et resuspension dans un milieu sans marqueur (un seul lavage), nous observons une diminution significative (p < 0,001) de l'intensité de fluorescence de 46,3 % par rapport à celle observée initialement (tableau 11). Si nous effectuons un second lavage, les variations de l'intensité de fluorescence sont du même ordre que celles observées après un seul lavage. Quant aux valeurs d'anisotropie, elles diminuent dans la suspension cellulaire après un et deux lavages, mais ces variations ne sont pas significatives (tableau 12).

	Anisotropie moyenne De fluorescence	Variations en %
Aucun lavage	0,066 ± 0,004	
Un lavage	0,062 ± 0,005	- 6,7 %
Deux lavages	0,057 ± 0,007	- 13,2 %

Tableau 12 : Anisotropie de fluorescence du 9-AS dans les suspensions d'hématies avant et après lavages. Les mesures ont été réalisées à 37 °C après une incubation de 20 minutes de la sonde fluorescente. Les variations ont été déterminées par rapport aux échantillons non lavés. Les valeurs mesurées ont été obtenues à partir de 5 observations indépendantes.

Les résultats obtenus mettent en évidence la nécessité d'éliminer par centrifugation les molécules de marqueurs libres non incorporés dans les membranes d'hématies afin de mesurer uniquement la composante de l'anisotropie de fluorescence liée aux cellules intactes. C'est pourquoi, lorsque les mesures de fluidité membranaire sont réalisées en spectrofluorimétrie, il est indispensable d'effectuer un lavage.

I.1.2. Comparaison de la mesure de fluidité membranaire par spectrofluorimétrie et cytométrie de flux

I.1.2.1. Hématies

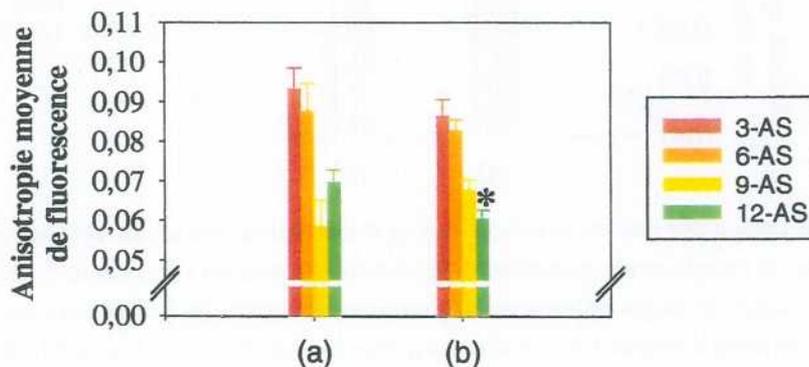


Figure 42 : Comparaison des valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes d'hématies mesurées au spectrofluorimètre (a) et en cytométrie de flux (b). Les suspensions cellulaires n'ont pas été exposées aux rayonnements ionisants. Chaque histogramme représente la valeur moyenne ± SEM de 12 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs obtenues en spectrofluorimétrie, * $p < 0,05$.

Les résultats présentés figure 42 indiquent qu'il existe un gradient de fluidité membranaire dans les membranes d'hématies quelle que soit la technique utilisée.

En effet, en spectrofluorimétrie, les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 9-AS et du 12-AS sont inférieures respectivement de 37,2 % ($p = 0,001$) et de 25,3 % ($p = 0,002$) par rapport à celles obtenues avec le 3-AS. Nous observons également une diminution de 33,3 % ($p = 0,011$) et de 20,7 % ($p = 0,03$) des valeurs respectives du 9-AS et du 12-AS par rapport à celles mesurés avec le 6-AS (figure 42a).

En cytofluorimétrie, nous constatons une diminution de 21,4 % ($p = 0,001$) et de 30,1 % ($p < 0,001$) des valeurs d'anisotropie mesurées d'une part avec le 9-AS et d'autre part avec le 12-AS en comparaison de celles obtenues avec le 3-AS. Par ailleurs, les valeurs du 9-AS et du 12-AS sont également inférieures ($p < 0,001$) respectivement de 18 % et de 27,1 % à celles mesurées avec le 6-AS. De plus, uniquement lorsque les mesures sont réalisées en cytométrie de flux, les valeurs d'anisotropie du 12-AS sont inférieures de 11,1 % ($p = 0,042$) à celles mesurées avec le 9-AS (figure 42b).

Seule une diminution de 13,24 % ($p = 0,025$) des valeurs d'anisotropie du 12-AS mesurées en cytométrie de flux par rapport à celles obtenues en spectrofluorimétrie a été observée (figure 42).

I.1.2.2. Lymphocytes

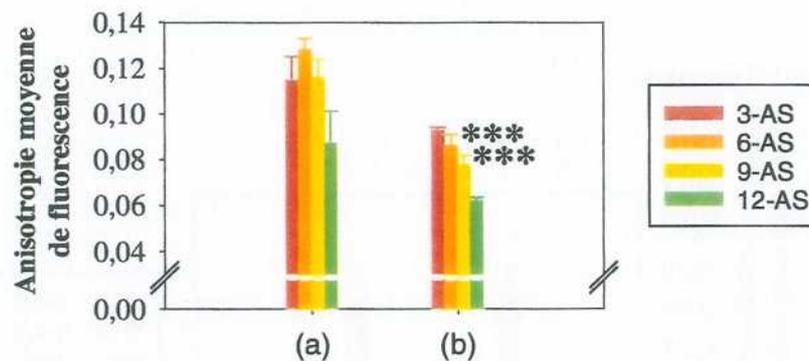


Figure 43 : Comparaison des valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes de lymphocytes mesurées au spectrofluorimètre (a) et en cytométrie de flux (b). Les suspensions cellulaires n'ont pas été exposées aux rayonnements ionisants. Les mesures ont été réalisées au spectrfluorimètre sur toute la suspension cellulaire et en cytométrie de flux sur la région R1. Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM d'au moins six expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs obtenues en spectrofluorimétrie, *** $p < 0,001$.

Les résultats présentés figure 43 indiquent qu'il existe un gradient de fluidité dans les membranes de lymphocytes quelle que soit la technique utilisée.

En spectrofluorimétrie, les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 12-AS sont inférieures de 35,7 % ($p < 0,001$) et de 28,6 % ($p = 0,003$) par rapport à celles mesurées respectivement pour le 6-AS et le 9-AS (figure 43a). En cytométrie de flux, cette diminution est de 26,7 % ($p < 0,001$) et de 18,3 % ($p < 0,001$) quand nous comparons les valeurs d'anisotropie du 12-AS par rapport à celles obtenues d'une part pour le 6-AS et d'autre part pour le 9-AS. Cependant, uniquement lorsque les mesures sont réalisées en cytofluorimétrie, les valeurs d'anisotropie du 6-AS, du 9-AS et du 12-AS sont inférieures respectivement de 10,8 % ($p = 0,007$), de 19,9 % ($p < 0,001$) et de 34,6 % ($p < 0,001$) par rapport à celles mesurées avec le 3-AS. De plus, les valeurs d'anisotropie du 9-AS sont inférieures ($p = 0,023$) de 10,2 % à celles obtenues avec le 6-AS lorsque nous utilisons la technique de cytométrie de flux (figure 43b).

La comparaison entre les deux techniques de mesure montre que les valeurs obtenues en cytométrie de flux sont inférieures à celles mesurées en spectrofluorimétrie. En effet, nous constatons une diminution de 30,2 % ($p < 0,001$) et de 30,4 % ($p < 0,001$) des valeurs d'anisotropie respectives du 6-AS et du 9-AS mesurées en cytométrie de flux par rapport à celles obtenues en spectrofluorimétrie. D'autre part, nous remarquons également que les valeurs du 3-AS et du 12-AS sont plus faibles lorsque les mesures sont réalisées en cytométrie de flux.

I.2. Influence d'une irradiation

I.2.1. Influence d'une irradiation sur la composition en phospholipides et en acides gras membranaires des érythrocytes et des lymphocytes

I.2.1.1. Protocole expérimental

Les échantillons sanguins ont été irradiés à température ambiante, au débit de dose de 0,5 Gy/min, et à une dose de 8 Gy, par une source gamma de ^{137}Cs . Ils ont été maintenus à 37 °C jusqu'à 1 heure, 14 heures et 72 heures après irradiation. Les membranes d'érythrocytes ont été isolées 1 heure et 72 heures après irradiation. Les lymphocytes ont été séparés du sang total puis lysés 14 heures après irradiation. Les phospholipides membranaires ont été dosés et séparés par Chromatographie Liquide Haute Performance. Les analyses de la composition en acides gras ont ensuite été réalisées par Chromatographie sous Phase Gazeuse sur chaque classe de phospholipides membranaires (cf. Matériels et Méthodes).

I.2.1.2. Résultats obtenus sur les érythrocytes

I.2.1.2.1. Evolution après irradiation de la composition en phospholipides membranaires

Composition basale

Classes de phospholipides	%
PE	25,9 ± 0,5
PI	2,3 ± 0,5
PS	12,0 ± 1,4
PC	37,7 ± 1,7
SM	24,3 ± 1,3

Tableau 13 : Composition en phospholipides des membranes d'érythrocytes. (PE : phosphatidyléthanolamine ; PI : phosphatidylinositol ; PS : phosphatidylsérine ; PC : phosphatidylcholine ; SM : sphingomyéline) Chaque pourcentage résulte de la valeur moyenne ± SEM de six observations indépendantes.

Les membranes d'hématies sont constituées majoritairement de PC. Les proportions de PE et de SM sont similaires. Par ailleurs, la classe de phospholipides la moins représentée est celle des PI (tableau 13).

Effet de l'irradiation

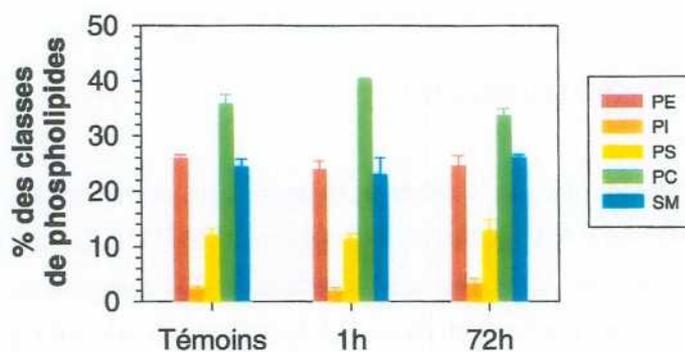


Figure 44: Effet d'une irradiation gamma sur la composition en phospholipides membranaires des érythrocytes. Les échantillons sanguins ont été irradiés à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubés 1 et 72 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Chaque histogramme représente la valeur moyenne ± SEM de 4 à 6 expériences indépendantes.

Dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative des pourcentages des différentes classes de phospholipides n'a été observée après irradiation (figure 44), que ce soit une heure ou 3 jours après une exposition à 8 Gy.

I.2.1.2.2. Composition en acides gras totaux des membranes d'érythrocytes avant et après irradiation

Composition basale

Classes d'acides gras	%
Saturés	48,85 ± 2,83
Monoinsaturés	19,52 ± 1,11
n-6	20,42 ± 1,91
n-3	5,63 ± 0,28
(n-6) + (n-3)	26,05 ± 1,92
[(n-6) + (n-3)]/ Saturés	0,55 ± 0,06

Principaux acides gras	%
16:0	27,97 ± 2,42
18:0	13,88 ± 1,08
18:1n-9	12,11 ± 0,88
18:2n-6	7,39 ± 1,19
20:4n-6	9,66 ± 0,90
18:3n-3	0,30 ± 0,03
20:5n-3	0,60 ± 0,08
22:6n-3	3,08 ± 0,22

Tableau 14 : Composition en acides gras totaux des phospholipides qui constituent les membranes des érythrocytes. (16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Chaque pourcentage résulte de la valeur moyenne \pm SEM de six observations indépendantes.

Les valeurs du rapport [(n-6) + (n-3)]/Saturés étant inférieures à 1, les phospholipides des membranes d'hématies sont donc constitués majoritairement d'acides gras saturés. Plus précisément, c'est l'acide palmitique qui est le plus représenté. De plus, la proportion d'acides gras polyinsaturés en (n-6) est 3,6 fois supérieure à celle en (n-3). Plus spécifiquement, cela se traduit par un pourcentage d'acide arachidonique 16,1 et 3,1 fois supérieur à celui mesuré respectivement pour l'EPA (acide éicosapentaénoïque) et le DHA (acide docosahexaénoïque) (tableau 14).

Effet de l'irradiation

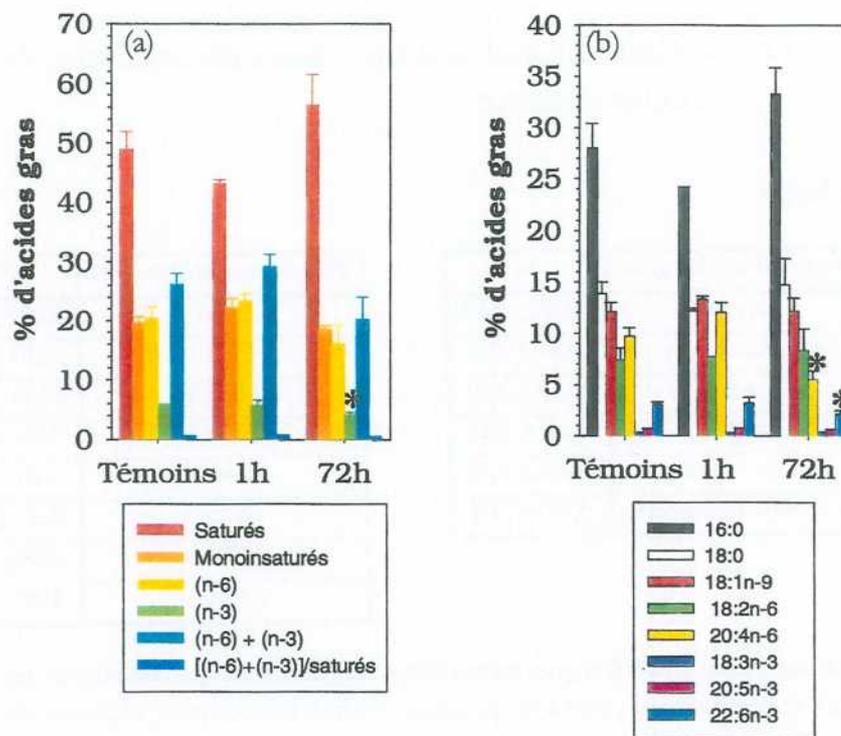


Figure 45 : Effet d'une irradiation gamma sur la composition en acides gras totaux des phospholipides de la membrane d'érythrocyte. Les échantillons sanguins ont été irradiés à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubés 1 et 72 heures à 37 °C. La figure (a) représente la proportion des principales classes d'acides gras qui constituent les phospholipides des membranes d'hématies. La figure (b) représente la proportion des principaux acides gras qui constituent les phospholipides des membranes d'hématies (16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 4 à 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

Dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative de la composition en acides gras des phospholipides n'a été observée 1 heure après irradiation (figure 45).

Par contre, soixante douze heures après une exposition aux rayonnements ionisants, le pourcentage d'acides gras polyinsaturés en (n-3) diminue significativement de 27 % par rapport aux résultats obtenus à 0 Gy ($p = 0,038$) (figure 45a). Ces résultats s'expliquent par une dégradation accrue de DHA de 31,2 % ($p = 0,038$) (figure 45b). D'autre part, bien que nous n'ayons constaté aucune variation du pourcentage d'acides gras polyinsaturés en (n-6), le pourcentage d'acide arachidonique diminue aussi de 43,3 % ($p = 0,019$) après irradiation.

I.2.1.2.3. Effet de l'irradiation sur la composition en acides gras de chaque classe de phospholipides dans les membranes d'érythrocytes

Composition basale

Classes d'acides gras	PE (%)	PC (%)	PS (%)	SM (%)
Saturés	24,49 ± 1,31	55,48 ± 4,51	49,93 ± 2,99	68,93 ± 4,15
Monoinsaturés	18,12 ± 0,61	20,45 ± 1,45	13,50 ± 2,77	24,62 ± 3,30
n-6	32,26 ± 1,17	21,59 ± 4,06	26,55 ± 2,08	4,82 ± 0,91
n-3	12,09 ± 1,10	2,47 ± 0,65	9,79 ± 0,43	1,57 ± 0,18
(n-6) + (n-3)	44,35 ± 1,40	24,06 ± 4,43	36,34 ± 2,39	6,39 ± 1,07
[(n-6) + (n-3)]/ Saturés	1,84 ± 0,14	0,47 ± 0,10	0,75 ± 0,07	0,10 ± 0,02

Principaux acides gras	PE (%)	PC (%)	PS (%)	SM (%)
16:0	14,94 ± 1,19	39,93 ± 4,25	12,01 ± 2,18	34,87 ± 3,67
18:0	7,48 ± 0,60	10,87 ± 2,28	34,46 ± 2,50	15,92 ± 1,63
18:1n-9	14,28 ± 0,72	14,62 ± 1,31	10,22 ± 2,60	7,68 ± 1,29
18:2n-6	4,98 ± 0,23	14,52 ± 3,38	5,17 ± 1,43	1,68 ± 0,33
20:4n-6	21,08 ± 1,19	4,83 ± 1,92	16,10 ± 1,19	1,75 ± 0,56
18:3n-3	0,48 ± 0,10	0,26 ± 0,04	0,30 ± 0,15	0,23 ± 0,07
20:5n-3	1,11 ± 0,23	0,41 ± 0,10	0,55 ± 0,12	0,39 ± 0,12
22:6n-3	6,50 ± 0,66	1,34 ± 0,44	6,53 ± 0,44	0,38 ± 0,16
DMA	12,87 ± 1,87			

Tableau 15 : Composition en acides gras des différentes classes de phospholipides qui constituent les membranes des érythrocytes. (DMA diméthyl acétal ; 16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Chaque pourcentage résulte de la valeur moyenne \pm SEM de six observations indépendantes.

Les classes des SM, PC et PS sont constituées majoritairement d'acides gras saturés car les valeurs du rapport [(n-6) + (n-3)]/ Saturés dans ces classes sont inférieures à 1. Plus précisément, l'acide palmitique est l'acide gras le plus représenté dans la classe des PC et SM, tandis que pour la classe des PS c'est l'acide stéarique. Par contre, la classe des PE est composée principalement d'acides gras polyinsaturés car le rapport [(n-6) + (n-3)]/ Saturés est supérieur à 1. Elle comporte principalement des acides gras polyinsaturés en (n-6) avec une proportion 2,6 fois supérieure à celle des (n-3). L'acide gras polyinsaturé majoritaire dans la classe des PE est l'acide arachidonique. En effet, son pourcentage est 19 et 3,2 fois supérieur à celui obtenu

respectivement pour l'EPA et le DHA. Par ailleurs, les plasmalogènes (DMA) sont caractéristiques des PE membranaires des érythrocytes humains (tableau 15).

Effet de l'irradiation

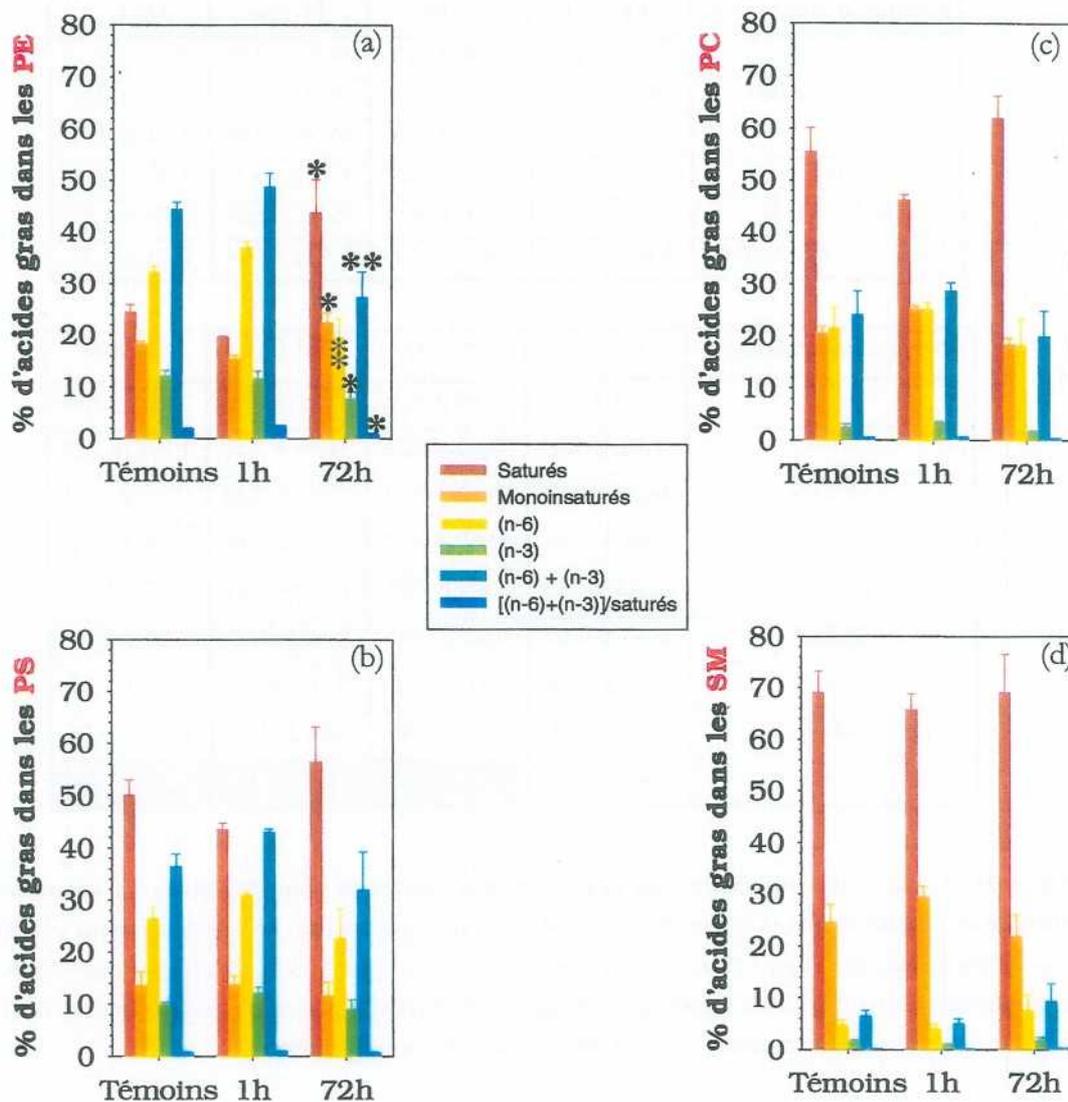


Figure 46 : Effet d'une irradiation gamma sur la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides de membranes d'érythrocyte. Les échantillons sanguins ont été irradiés à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubés 1 et 72 heures à 37 °C. Les 4 figures (a), (b), (c) et (d) représentent la proportion des principales classes d'acides gras mesurés respectivement dans la classe des PE, PS, PC et SM. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 4 à 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux témoins (0 Gy), * p < 0,05, ** p < 0,01.

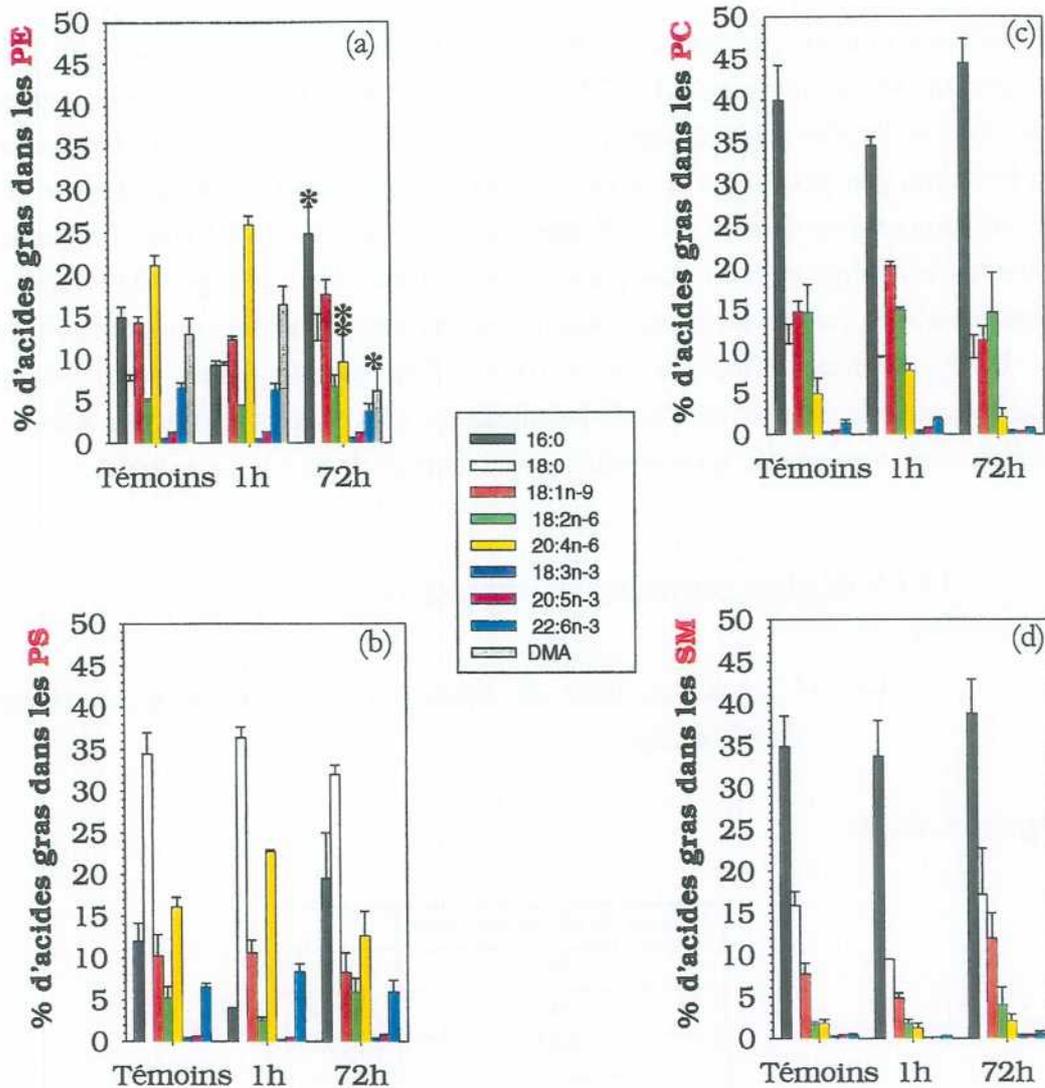


Figure 47 : Effet d'une irradiation gamma sur la composition des principaux acides gras des différentes classes de phospholipides de membranes d'érythrocytes. Les échantillons sanguins ont été irradiés à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubés 1 et 72 heures à 37 °C. Les 4 figures (a), (b), (c) et (d) représentent la proportion des principaux acides gras mesurés respectivement dans la classe des PE, PS, PC et SM (DMA diméthyl acétal ; 16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 4 à 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux témoins (0 Gy), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative du pourcentage des acides gras n'a été observée une heure après irradiation pour toutes les classes de phospholipides. D'autre part, nous constatons des variations de la composition en acides gras après irradiation uniquement pour la classe des PE (figure 46 et 47). En effet, 72 heures après une exposition aux

rayonnements ionisants, le rapport [(n-6) + (n-3)]/ Saturés diminue de 60,3 % ($p = 0,019$) pour atteindre une valeur inférieure à 1 ($0,73 \pm 0,26$) (figure 46a). Ces résultats sont confirmés par la baisse du taux d'acides gras polyinsaturés (n-6) + (n-3) de 38,6 % ($p = 0,01$). Plus précisément, ce sont les acides gras polyinsaturés en (n-6) qui sont les plus atteints (diminution de 39,3 % ; $p = 0,01$) en comparaison de ceux en (n-3) (diminution de 36,7 % ; $p = 0,038$). En particulier, nous constatons une diminution du taux d'acide arachidonique de 54,6 % ($p = 0,01$) (figure 47a). Ces déséquilibres sont compensés par une augmentation du taux d'acides gras moninsaturés (23,9 % ; $p = 0,038$) et saturés (78,8 % ; $p = 0,019$). Plus spécifiquement, nous constatons une augmentation de la proportion d'acide palmitique de 65,6 % ($p = 0,019$). Par ailleurs, les DMA sont également consommés après irradiation (diminution de 52,1 % ; $p = 0,038$).

I.2.1.3. Résultats obtenus sur les lymphocytes

I.2.1.3.1. Evolution après irradiation de la composition en phospholipides membranaires

Composition basale

Classes de phospholipides	%
PE	$29,7 \pm 1,0$
PI	$3,5 \pm 0,5$
PS	$12,5 \pm 2,5$
PC	$41,6 \pm 4,1$
SM	$12,9 \pm 1,9$

Tableau 16 : Composition en phospholipides membranaires des lymphocytes.

(PE : phosphatidyléthanolamine ; PI : phosphatidylinositol ; PS : phosphatidylsérine ; PC : phosphatidylcholine ; SM : sphingomyéline) Chaque pourcentage résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 4 observations indépendantes.

Les membranes de lymphocytes sont constituées majoritairement de PC. Les proportions de PS et de SM sont similaires. Par ailleurs, la classe de phospholipides la moins représentée est celle des PI (tableau 16). Nous pouvons également remarquer que la proportion de SM des membranes d'érythrocytes (cf. I.2.1.2.1) est 2 fois supérieure à celle mesurée pour les membranes de lymphocytes.

Effet de l'irradiation

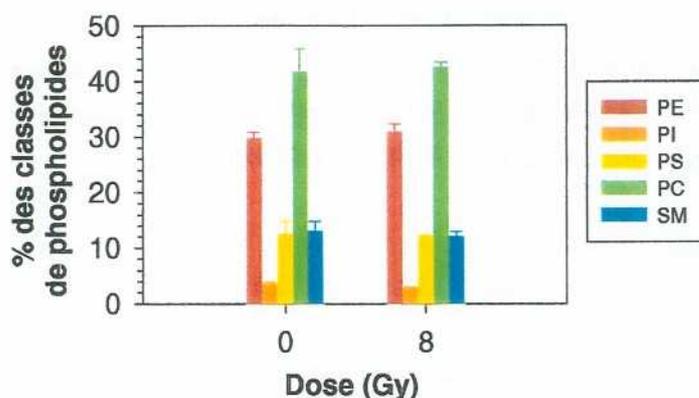


Figure 48 : Effet d'une irradiation gamma sur la composition en phospholipides membranaires des lymphocytes. Les échantillons sanguins ont été irradiés à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubés 14 heures à 37 °C. Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes.

Dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative des pourcentages des différentes classes de phospholipides n'a été observée après irradiation (figure 48).

I.2.1.3.2. Composition en acides gras totaux des membranes de lymphocytes avant et après irradiation

Composition basale

Classes d'acides gras	%
Saturés	39,41 \pm 1,28
Monoinsaturés	24,19 \pm 1,59
n-6	23,91 \pm 2,04
n-3	3,95 \pm 0,46
(n-6) + (n-3)	27,85 \pm 2,17
[(n-6) + (n-3)]/ Saturés	0,71 \pm 0,08

Principaux acides gras	%
16:0	19,56 \pm 3,35
18:0	15,41 \pm 2,36
18:1n-9	18,81 \pm 1,11
18:2n-6	7,27 \pm 0,52
20:4n-6	12,65 \pm 1,80
18:3n-3	0,63 \pm 0,22
20:5n-3	0,48 \pm 0,08
22:6n-3	1,52 \pm 0,37

Tableau 17 : Composition en acides gras totaux des phospholipides qui constituent les membranes de lymphocytes. (16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Chaque pourcentage résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 4 observations indépendantes.

Les valeurs du rapport $[(n-6) + (n-3)]/\text{Saturés}$ étant inférieures à 1, les phospholipides de membranes de lymphocytes sont donc constitués majoritairement d'acides gras saturés. La proportion d'acides gras polyinsaturés en (n-6) est 6,1 fois supérieure à celle en (n-3). Plus spécifiquement, cela se traduit par un pourcentage d'acide arachidonique 26,4 et 8,3 fois supérieur à celui mesuré respectivement pour l'EPA et le DHA (tableau 17).

Effet de l'irradiation

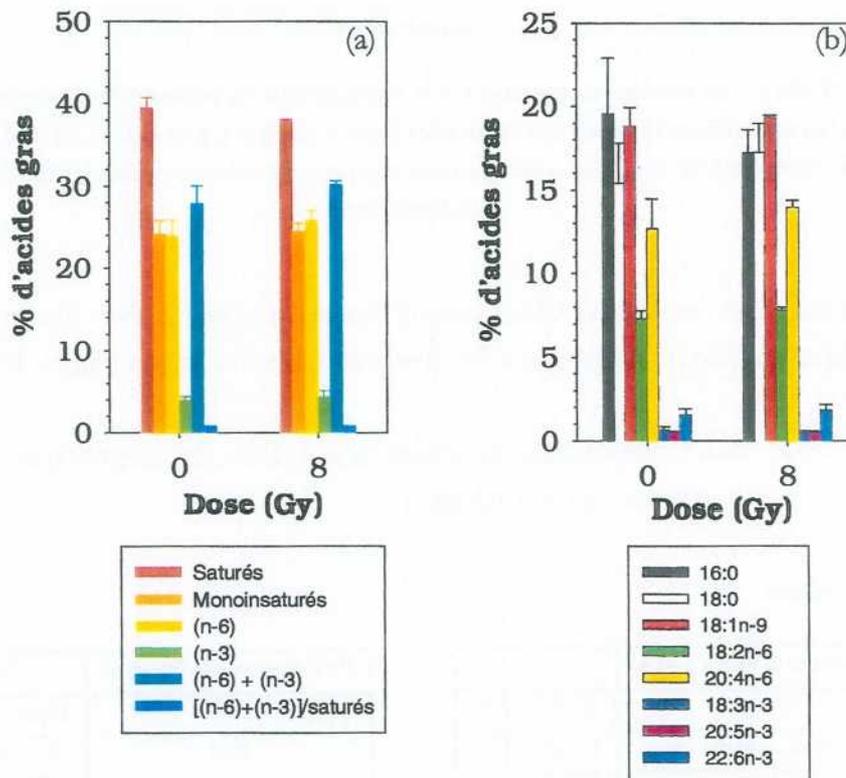


Figure 49 : Effet d'une irradiation gamma sur la composition en acides gras totaux des phospholipides des membranes de lymphocytes. Les échantillons sanguins ont été irradiés à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubés 14 heures à 37 °C. La figure (a) représente la proportion des principales classes d'acides gras qui constituent les phospholipides des membranes de lymphocytes. La figure (b) représente la proportion des principaux acides gras qui constituent les phospholipides des membranes de lymphocytes (16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes.

Comme pour les érythrocytes, aucune variation significative de la composition en acides gras des phospholipides n'a été observée après irradiation (figure 49).

I.2.1.3.3. Effet de l'irradiation sur la composition en acides gras de chaque classe de phospholipides dans les membranes de lymphocytes

Composition basale

Classes d'acides gras	PE (%)	PC (%)	PS (%)	SM (%)
Saturés	18,34 ± 0,54	49,84 ± 3,08	41,30 ± 2,82	59,68 ± 3,52
Monoinsaturés	20,79 ± 1,95	27,35 ± 0,77	30,84 ± 1,69	23,69 ± 5,63
n-6	36,14 ± 1,70	20,33 ± 2,23	23,28 ± 1,83	14,63 ± 7,69
n-3	7,29 ± 0,82	2,43 ± 0,55	4,46 ± 0,26	1,91 ± 0,27
(n-6) + (n-3)	43,43 ± 1,72	22,76 ± 2,78	27,74 ± 1,57	16,55 ± 7,55
[(n-6) + (n-3)]/ Saturés	2,38 ± 0,15	0,47 ± 0,08	0,68 ± 0,09	0,29 ± 0,15

Principaux acides gras	PE (%)	PC (%)	PS (%)	SM (%)
16:0	4,75 ± 0,35	33,47 ± 4,60	4,32 ± 0,36	26,77 ± 5,62
18:0	11,72 ± 1,04	12,16 ± 2,04	33,61 ± 2,43	19,68 ± 6,04
18:1n-9	17,61 ± 2,00	21,59 ± 0,63	27,46 ± 1,46	10,47 ± 2,92
18:2n-6	6,89 ± 0,40	9,97 ± 0,32	5,20 ± 0,64	3,59 ± 0,98
20:4n-6	23,53 ± 1,27	7,12 ± 1,57	12,85 ± 1,17	8,42 ± 6,83
18:3n-3	0,92 ± 0,15	0,72 ± 0,52	0,16 ± 0,09	0,50 ± 0,14
20:5n-3	0,85 ± 0,18	0,35 ± 0,07	0,36 ± 0,03	0,32 ± 0,04
22:6n-3	2,97 ± 0,64	0,74 ± 0,32	2,24 ± 0,34	0,38 ± 0,01
DMA	17,21 ± 1,91			

Tableau 18 : Composition en acides gras des différentes classes de phospholipides qui constituent les membranes de lymphocytes. (DMA diméthyl acétal ; 16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Chaque pourcentage résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 4 observations indépendantes.

Les classes des SM, PC et PS sont constituées majoritairement d'acides gras saturés car les valeurs du rapport [(n-6) + (n-3)]/ Saturés dans ces classes sont inférieures à 1. Plus précisément, l'acide palmitique est l'acide gras le plus représenté dans la classe des PC et SM, tandis que pour la classe des PS c'est l'acide stéarique. Par contre, la classe des PE est composée principalement d'acides gras polyinsaturés car le rapport [(n-6) + (n-3)]/ Saturés est supérieur à 1. Elle comporte principalement des acides gras polyinsaturés en (n-6) car leur proportion est 5 fois supérieure à celle des (n-3). Plus spécifiquement, l'acide gras polyinsaturé majoritaire dans la classe des PE est l'acide arachidonique. En effet, son pourcentage est 27,7 et 7,9 fois supérieur à celui obtenu

respectivement pour l'EPA et le DHA. Par ailleurs, les plasmalogènes (DMA) sont caractéristiques des PE membranaires des lymphocytes humains (tableau 18).

Effet d'une irradiation

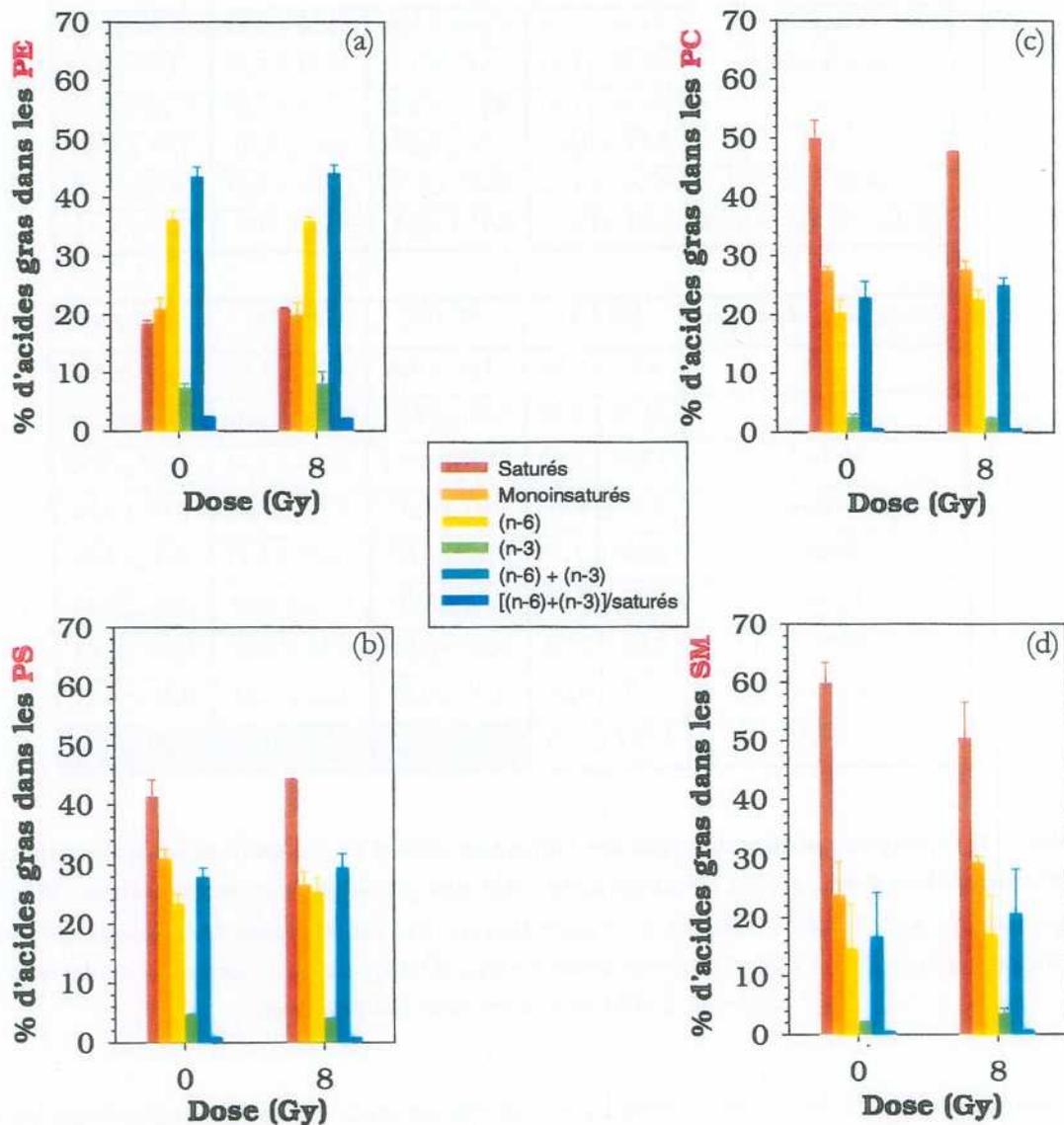


Figure 50 : Effet d'une irradiation gamma sur la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides des membranes de lymphocytes. Les échantillons sanguins ont été irradiés à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubés 14 heures à 37 °C. Les 4 figures (a), (b), (c) et (d) représentent la proportion des principales classes d'acides gras mesurés respectivement dans la classe des PE, PS, PC et SM. Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes.

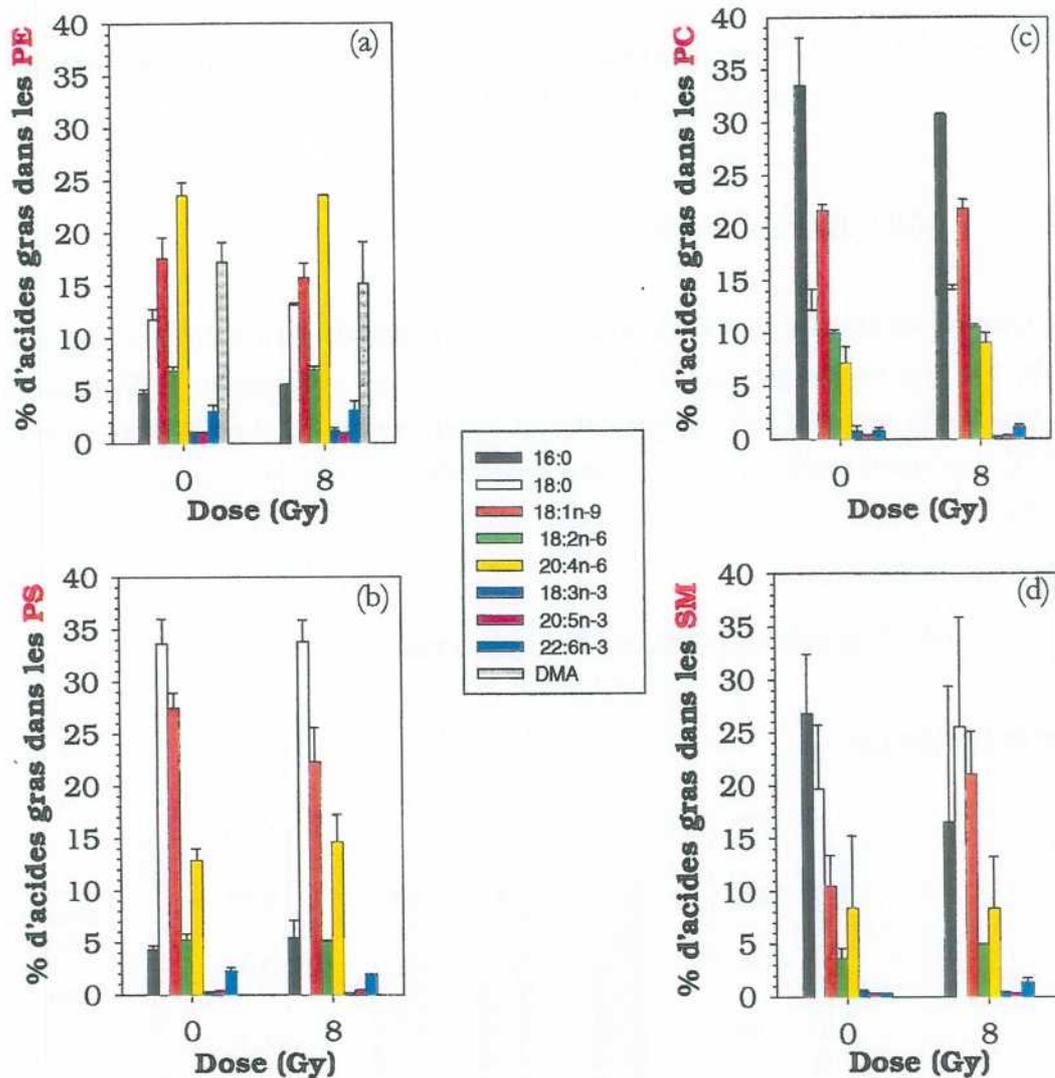


Figure 51 : Effet d'une irradiation gamma sur la composition des principaux acides gras des différentes classes de phospholipides des membranes de lymphocytes. Les échantillons sanguins ont été irradiés à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubés 14 heures à 37 °C. Les 4 figures (a), (b), (c) et (d) représentent la proportion des principaux acides gras mesurés respectivement dans la classe des PE, PS, PC et SM (DMA diméthyl acétal ; 16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes.

Contrairement à ce que nous avons observé pour les membranes d'érythrocytes, 72 heures après irradiation, dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative de la composition en acides gras des principales classes de phospholipides n'a été constatée après irradiation dans les membranes de lymphocytes (figure 50 et 51).

I.2.2. Influence d'une irradiation sur les mesures de fluidité membranaire dans les membranes des érythrocytes et des lymphocytes

I.2.2.1. Protocole expérimental

Les échantillons sanguins ont été irradiés à 37 °C, au débit de dose de 0,5 Gy/min, à une dose de 8 Gy, par une source gamma de ^{60}Co . Les mesures de polarisation de fluorescence ont été réalisées sur les hématies et les lymphocytes en cytométrie de flux, 1 et 24 heures après incubation à 37 °C. Les sondes utilisées pour ces deux types cellulaires étaient les acides stéariques (3, 6, 9 et 12-AS).

I.2.2.2. Résultats obtenus sur les érythrocytes

Effet de l'irradiation

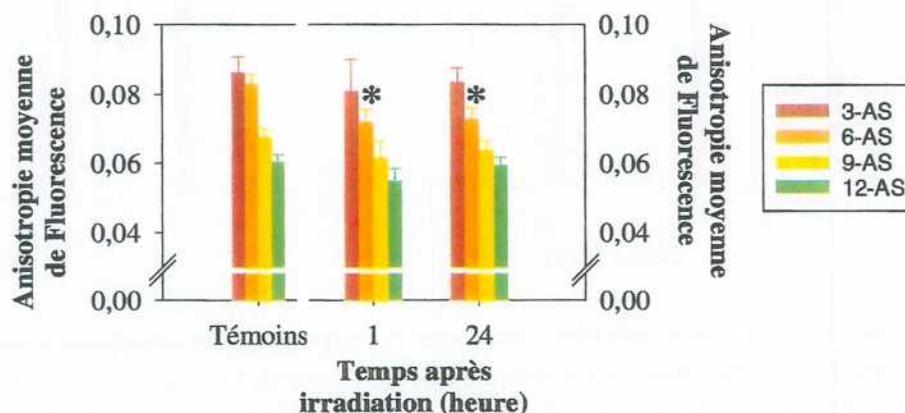


Figure 52 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes d'hématies. Les mesures ont été réalisées en cytométrie de flux. Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubées 1 et 24 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Pour les témoins, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 12 expériences indépendantes. 1h et 24h après irradiation, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

Les résultats obtenus figure 52 mettent en évidence une diminution des valeurs du 6-AS de 12,9 % ($p = 0,042$) et de 12,1 % ($p = 0,048$), par rapport aux valeurs témoins, respectivement 1 heure et 24 heures après une exposition gamma à une dose de 8 Gy.

Le gradient de fluidité membranaire existant dans les membranes d'hématies peut être exprimé sous forme de rapports d'anisotropie de fluorescence.

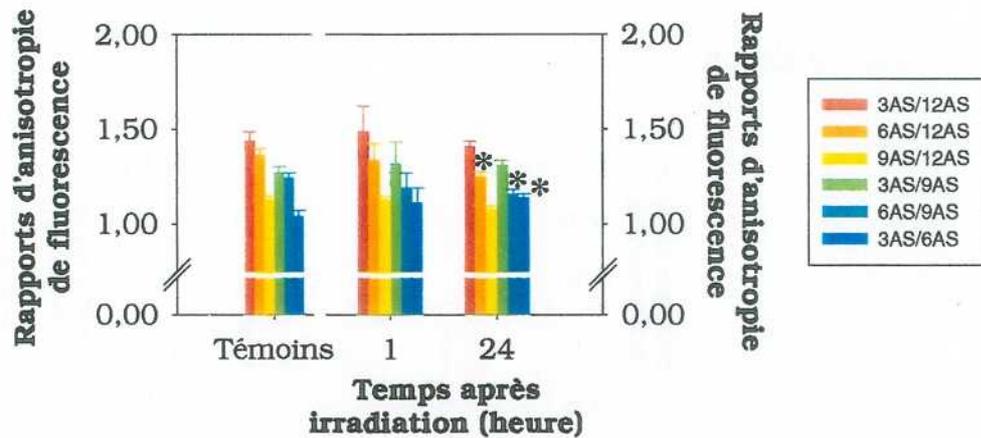


Figure 53 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs des rapports d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes d'hématies. Les mesures ont été réalisées en cytométrie de flux. Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubées 1 et 24 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Pour les témoins, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 12 expériences indépendantes. 1h et 24h après irradiation, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

Les résultats de la figure 53 indiquent que des variations significatives du gradient de fluidité membranaire ne sont observables que 24 heures après irradiation. En effet, en comparaison des valeurs obtenues à 0 Gy, nous constatons une diminution des valeurs des rapports 6-AS/12-AS (de 8,1 %, $p = 0,033$) et 6-AS/9-AS (de 7,4 %, $p = 0,037$) parallèlement à une augmentation des valeurs du rapport 3-AS/6-AS (de 9,4 %, $p = 0,042$).

I.2.2.3. Résultats obtenus sur les lymphocytes

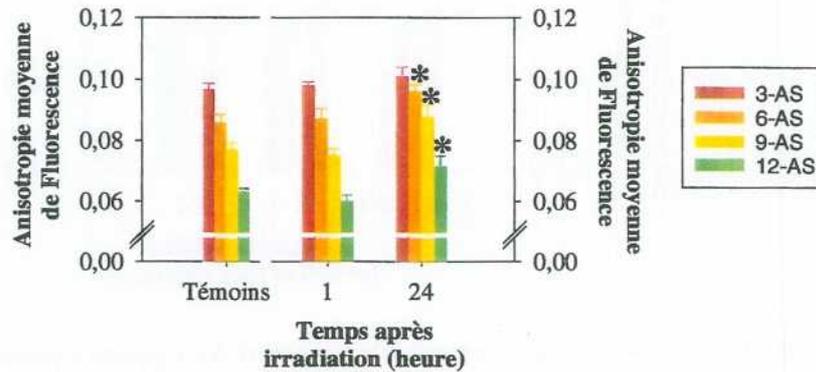
Effet de l'irradiation

Figure 54 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes de lymphocytes. Les mesures ont été réalisées en cytométrie de flux. Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubées 1 et 24 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Pour les témoins, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 12 expériences indépendantes. 1h et 24h après irradiation, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

Nous observons des variations significatives des valeurs d'anisotropie des acides stéariques uniquement 24 heures après une exposition aux rayonnements ionisants (figure 54). Ces résultats mettent en évidence une augmentation des valeurs du 6, 9 et 12-AS respectivement de 11,6 % ($p = 0,015$), de 13,8 % ($p = 0,026$) et de 13,2 % ($p = 0,028$) en comparaison des valeurs témoins.

Comme pour les érythrocytes, le gradient de fluidité membranaire existant dans les membranes de lymphocytes peut s'exprimer sous forme de rapports d'anisotropie de fluorescence.

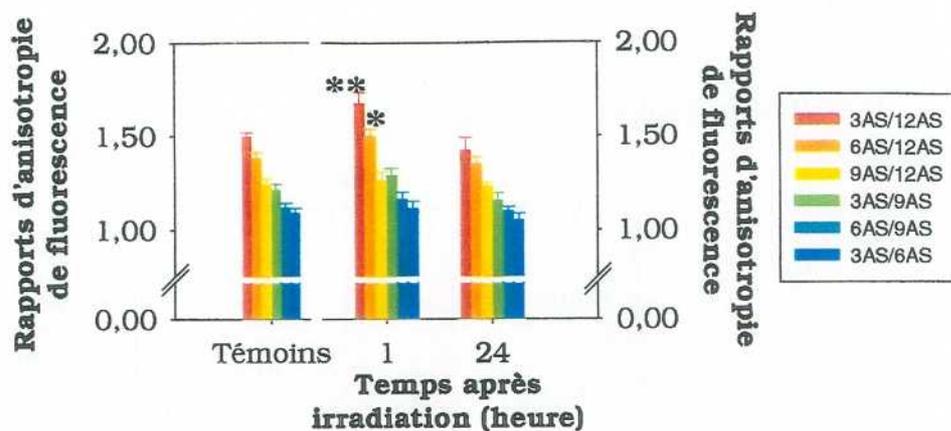


Figure 55 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs des rapports d'anisotropie de fluorescence des acides steariques incorporés dans les membranes de lymphocytes Les mesures ont été réalisées en cytométrie de flux. Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubées 1 et 24 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Pour les témoins, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 12 expériences indépendantes. 1h et 24h après irradiation, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes.

Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

Les résultats présentés figure 55 indiquent que des variations du gradient de fluidité membranaire ne sont observables qu'une heure après irradiation. En effet, les valeurs des rapports 3-AS/12-AS et 6-AS/12-AS augmentent respectivement de 12,1 % ($p = 0,004$) et de 8,8 % ($p = 0,044$) par rapport aux valeurs mesurées à 0 Gy.

I.2.3. Etude des liens éventuels entre fluidité membranaire et mort cellulaire radio-induite

I.2.3.1. Protocole expérimental

Les échantillons sanguins ont été irradiés à 37 °C, au débit de dose de 0,5 Gy/min, et à une dose de 8 Gy, par une source gamma de ^{60}Co . Les mesures simultanées de viabilité cellulaire et de fluidité membranaire ont été réalisées sur les lymphocytes, en cytométrie de flux, 1 et 24 heures après incubation à 37°C. Le double marquage des cellules à l'acridine orange et au bromure d'éthidium a permis de discriminer les cellules viables des cellules en début et fin d'apoptose. Sur chaque état cellulaire ainsi défini, la fluidité membranaire a été déterminée grâce à la technique de polarisation de fluorescence. Les sondes utilisées étaient les acides steariques (3, 6, 9 et 12-AS).

I.2.3.2. Résultats

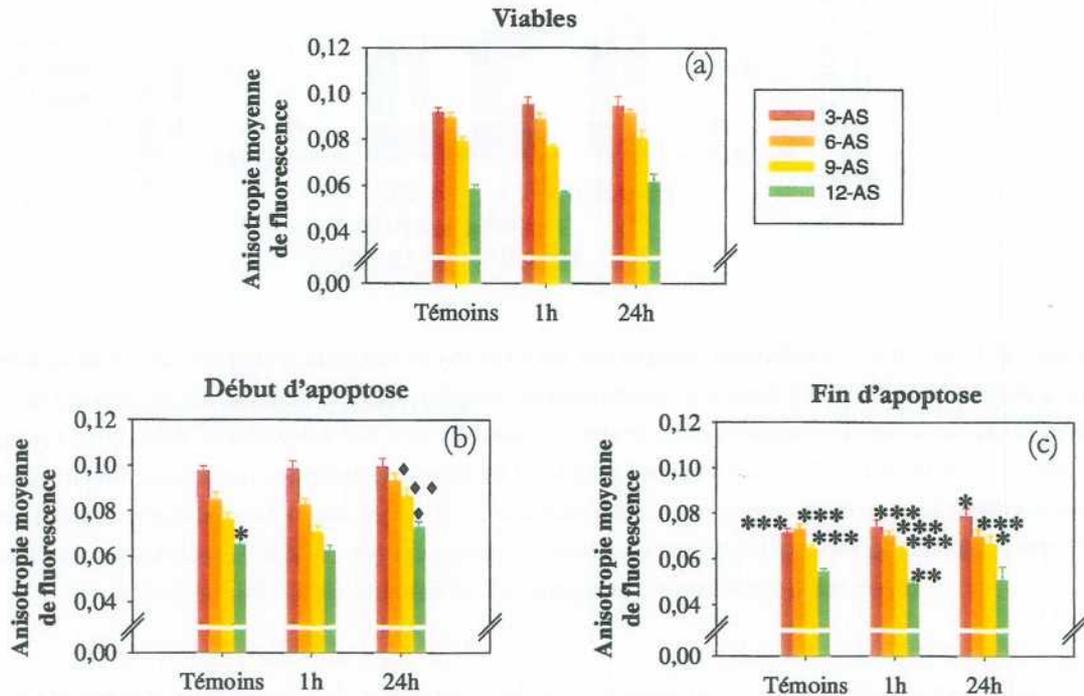


Figure 56 : Effet d'une irradiation gamma sur la fluidité membranaire des lymphocytes en fonction de leurs différents états de viabilité cellulaire. Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubées 1 et 24 heures à 37°C. Après l'incorporation des acides stéariques dans les membranes de lymphocytes, les mesures des valeurs d'anisotropie de fluorescence ont été effectuées en cytométrie de flux. Les 3 figures représentent l'évolution des valeurs d'anisotropie de fluorescence en fonction des différents états de viabilité des lymphocytes : viables (a), début d'apoptose (b) et fin d'apoptose (c). Les valeurs témoins regroupent les valeurs obtenues sur les lymphocytes non irradiés aux différents temps après irradiation. Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 à 12 expériences indépendantes respectivement pour les témoins et les irradiés. Différences significatives des lymphocytes en début et fin d'apoptose par rapport aux lymphocytes viables, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Différences significatives par rapport aux valeurs obtenues 1h après irradiation, $\blacklozenge p < 0,05$, $\blacklozenge\blacklozenge p < 0,01$.

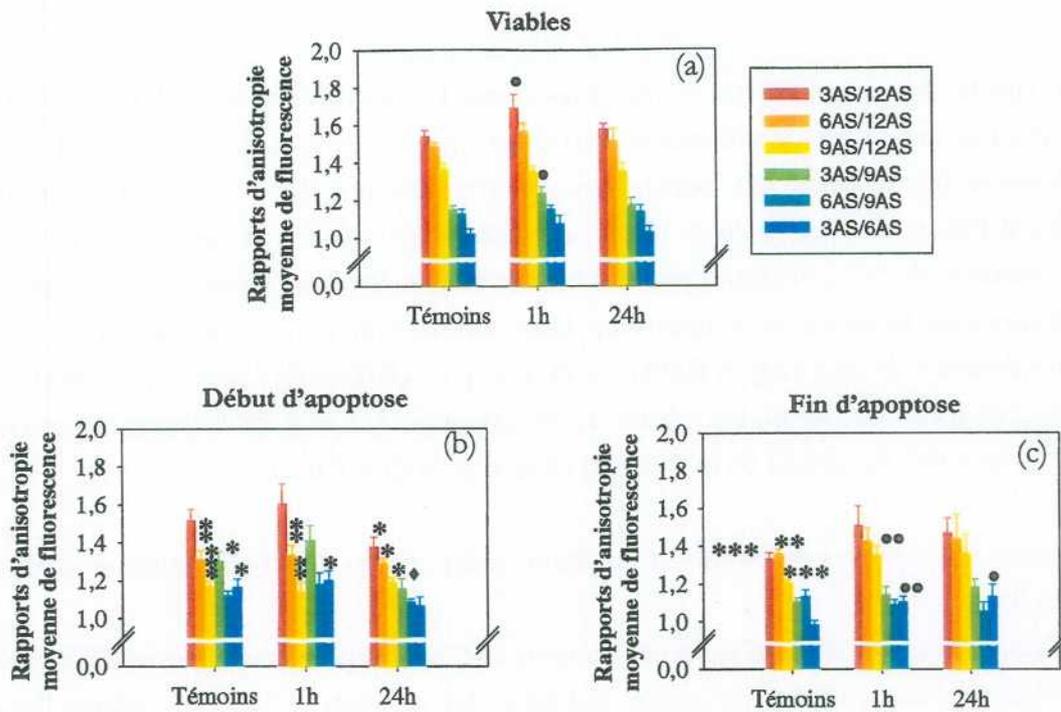


Figure 57 : Effet d'une irradiation gamma sur le gradient de fluidité membranaire existant dans les membranes de lymphocytes en fonction de leurs différents états de viabilité cellulaire. Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubées 1 et 24 heures à 37°C. Les calculs des rapports d'anisotropie de fluorescence ont été obtenus à partir des mesures des valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques réalisées en cytométrie de flux. Les 3 figures représentent l'évolution des valeurs des rapports d'anisotropie de fluorescence en fonction des différents états de viabilité des lymphocytes : viables (a), début d'apoptose (b) et fin d'apoptose (c). Les valeurs témoins regroupent les valeurs obtenues sur les lymphocytes non irradiés aux différents temps après irradiation. Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 à 12 expériences indépendantes respectivement pour les témoins et les irradiés. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy) • $p < 0,05$ et •• $p < 0,01$. Différences significatives des lymphocytes en début et fin d'apoptose par rapport aux lymphocytes viables, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Différences significatives par rapport aux valeurs obtenues 1h après irradiation, ♦ $p < 0,05$.

Evolution de la fluidité membranaire en fonction des différents états de viabilité des lymphocytes

Les résultats observés figure 56 indiquent que la fluidité membranaire varie en fonction des différents états de viabilité des lymphocytes.

Dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative des valeurs d'anisotropie mesurées dans les cellules en début d'apoptose en comparaison de celles obtenues pour les cellules viables n'a été observée après irradiation (figure 56b). Seuls les lymphocytes témoins en début d'apoptose se différencient de la population viable par une augmentation de 11,7 % ($p = 0,036$) des valeurs d'anisotropie du 12-AS.

Par contre, les lymphocytes en fin d'apoptose se distinguent des cellules viables par une diminution des valeurs d'anisotropie de fluorescence du 3, 6 et 9-AS jusqu'à 24 heures après irradiation (figure 56c). Les valeurs témoins d'anisotropie du 3, 6 et 9-AS sont inférieures respectivement de 22,2 % ($p < 0,001$), de 18,8 % ($p < 0,001$) et de 18,8 % ($p < 0,001$) en comparaison de celles obtenues pour les cellules viables. Dès une heure après une exposition aux rayonnements ionisants, nous observons également une diminution des valeurs du 3, 6, et 9-AS respectivement de 22,1 % ($p < 0,001$), de 21,3 % ($p < 0,001$) et de 15,6 % ($p < 0,001$). De même, 24 heures après irradiation, les valeurs d'anisotropie du 3, 6 et 9-AS baissent respectivement de 17,9 % ($p = 0,019$), de 23,1 % ($p < 0,001$) et de 17,3 % ($p = 0,032$).

Le calcul des rapports d'anisotropie de fluorescence (figure 57) confirme les résultats observés figure 56.

Les lymphocytes en début d'apoptose témoins et 1 heure après irradiation se différencient de la population viable par des variations opposées des rapports 3-AS/6-AS (région haute de la bicouche lipidique), 6-AS/12-AS et 9-AS/12-AS (centre de la bicouche lipidique) (figure 57b). En effet, nous constatons une diminution des rapports d'anisotropie du 6-AS/12-AS et du 9-AS/12-AS, mesurés dans les lymphocytes témoins, respectivement de 11,9 % ($p = 0,006$) et de 14,5 % ($p < 0,001$). Par contre, les valeurs du rapport 3-AS/6-AS augmentent de 13,8 % ($p = 0,015$). Des résultats similaires sont constatés 1 heure après irradiation : diminution des rapports d'anisotropie du 6-AS/12-AS et du 9-AS/12-AS respectivement de 14,6 % ($p = 0,006$) et de 16,2 % ($p = 0,004$), et augmentation des valeurs du rapport 3-AS/6-AS de 11,1 % ($p = 0,041$). Mais le gradient de fluidité membranaire de la surface au centre de la bicouche (3-AS/12-AS) reste inchangé.

Au contraire, les membranes des lymphocytes en fin d'apoptose semblent beaucoup plus désorganisées. En effet, les lymphocytes témoins présentent des valeurs des rapports du 3-AS/12-AS, 6-AS/12-AS et 9-AS/12-AS significativement inférieures respectivement de 13,5 % ($p < 0,001$), de 8,8 % ($p = 0,002$) et de 12 % ($p = 0,001$) par rapport à celles obtenues pour les lymphocytes viables (figure 57c).

Evolution après irradiation de la fluidité membranaire des lymphocytes

Dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative des valeurs d'anisotropie des acides stéariques n'a été observée après une exposition aux rayonnements ionisants quels que soient l'état de viabilité cellulaire considéré, et le délai écoulé après irradiation (1 et 24 heures) (figure 56).

Cependant, nous constatons que le gradient de fluidité membranaire est modifié après irradiation uniquement pour les lymphocytes viables et en fin d'apoptose (figure 57).

Pour les cellules viables, les rayonnements ionisants induisent des perturbations de la totalité du gradient : de la surface au centre de la bicouche. En effet, les valeurs des rapports 3-AS/12-AS et 3-AS/9-AS, mesurées dans les cellules viables, augmentent 1 heure après irradiation respectivement de 9,5 % ($p = 0,05$) et de 7,4 % ($p = 0,042$) (figure 57a).

Quant aux lymphocytes en fin d'apoptose, leur gradient de fluidité membranaire est altéré principalement au niveau de la partie haute de la bicouche lipidique. 1 heure et 24 heures après irradiation, les valeurs du rapport 3-AS/6-AS augmentent respectivement de 12,4 % ($p = 0,008$) et de 15,5 % ($p = 0,015$) (figure 57c).

Evolution de la fluidité membranaire en fonction du type d'inducteur d'apoptose : apoptose spontanée et apoptose radio-induite

Un taux basal d'apoptose spontanée d'environ 5 à 10 % a été mesuré pour les lymphocytes témoins. Ce taux restait constant 1 heure après l'exposition aux rayonnements ionisants. Cependant, 24 heures après irradiation, le nombre de cellules en apoptose augmentait pour atteindre des valeurs de 30 à 40 % (résultats non présentés).

Les propriétés biophysiques de la membrane des lymphocytes en début d'apoptose, mesurées 1 heure après irradiation, ne sont pas différentes de celles des lymphocytes témoins (figure 56b et 57b). Mais les valeurs d'anisotropie du 6, 9 et 12-AS mesurées 24 heures après irradiation augmentent respectivement de 13,5 % ($p = 0,037$), de 22,3 % ($p = 0,009$) et de 16,8 % ($p = 0,023$) en comparaison de celles obtenues 1 heure après une exposition aux rayonnements ionisants (figure 56b). Ces résultats sont en accord avec les données obtenues figure 57b. En effet, d'une part, les valeurs du rapport 3-AS/9-AS mesurées 24 heures après irradiation sont inférieures de 17,9 % ($p = 0,037$) à celles obtenues 1 heure après une exposition aux rayonnements ionisants (figure 57b). D'autre part, contrairement aux résultats observés 1 heure après irradiation, les valeurs du rapport 3-AS/12-AS, mesurées 24 heures après irradiation, dans les lymphocytes en début d'apoptose, diminuent de 13,3 % ($p = 0,032$) en comparaison de celles obtenues pour la population viable (figure 57b).

II. Discussion

Dans ce chapitre, notre objectif consiste à montrer que la membrane cellulaire peut être une cible sensible des rayonnements ionisants. Notre démarche s'articule autour de trois questions principales :

- Quel est l'effet d'une irradiation sur la composition en phospholipides et en acides gras de la membrane ?
- Si une irradiation induit des modifications biochimiques des constituants membranaires, quelles sont leurs conséquences sur les propriétés biophysiques de la membrane ?
- Si un effet membranaire radio-induit existe (modifications biochimiques et /ou biophysiques), a-t-il des répercussions sur certaines propriétés cellulaires, en particulier sur la mort cellulaire ?

Afin de mettre en évidence une spécificité de la membrane dans la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants, nous avons sélectionné deux modèles cellulaires différents de par l'existence ou non d'une régulation génique : le lymphocyte et l'érythrocyte.

Modifications de la composition en acides gras membranaires après irradiation : rôle du stress oxydant radio-induit

La proportion des différentes classes de phospholipides membranaires (PE:PI:PS:PC:SM ; 26:2:12:38:24) que nous avons observée dans les érythrocytes humains est conforme à celle mentionnée dans la littérature (Leterrier & Gary-Bobo, 1989). Le profil des différentes classes de phospholipides obtenu pour les membranes de lymphocytes humains est (PE:PI:PS:PC:SM ; 30:4:13:42:13). Comme pour les érythrocytes, les classes majoritaires de phospholipides des lymphocytes sont PE et PC. Cependant, la composition en SM est deux fois plus faible pour les membranes de lymphocytes. Ces résultats indiquent que la proportion des différents types de phospholipides varie d'un type cellulaire à un autre (Leterrier & Viret, 1986). Pour les érythrocytes, les membranes sur lesquelles a été dosée la composition en phospholipides correspondent uniquement aux membranes plasmiques. Pour les lymphocytes, les dosages ont été réalisés sur une suspension membranaire fortement enrichie en membranes plasmiques. En effet, Koizumi et coll. (1981) ont extrait les phospholipides de membranes plasmiques de lymphocytes isolés de ganglions lymphatiques de souris. Ils ont montré que, comparées aux cellules entières, les membranes plasmiques comportent une proportion plus importante de PS et SM, et un plus faible taux de PI. Or, Marinetti & Cattieu (1982) ont déterminé le profil en phospholipides de cellules entières de lymphocytes humains qui est (PE:PI:PS:PC:SM ; 29:7:5:46:9). En comparaison de ces résultats, nous obtenons également des taux plus élevés de PS et SM, et des proportions de PI plus faibles. Ainsi, nous pouvons supposer que les membranes de lymphocytes obtenues dans nos conditions expérimentales sont composées majoritairement de membranes plasmiques.

Nous avons observé que le profil des différentes classes de phospholipides est inchangé après irradiation, pour les deux types cellulaires testés, érythrocyte et lymphocyte. Berkovic et coll. (1997) ont constaté des résultats similaires 24 et 48 heures après une exposition gamma de lignées cellulaires cancéreuses, à une dose de 2 Gy. Deux hypothèses peuvent alors être émises. La

première consiste à expliquer cette absence de variation par l'existence d'un système de régulation passive de la composition en phospholipides, externe à la cellule, par les lipoprotéines plasmiques. Cependant, comme les lipoprotéines transportent principalement des lécithines (PC), nous aurions dû observer une augmentation de la proportion des PC après irradiation. En outre, ces études étant réalisées *in vitro*, les lipoprotéines plasmiques ne sont pas renouvelées et les échanges avec les cellules sont donc limités. La deuxième hypothèse la plus probable est que la principale cible des espèces radicalaires générées par l'irradiation dans nos conditions expérimentales, c'est à dire à des doses relativement faibles, ne serait pas la partie hydrophile des phospholipides mais plutôt leur partie hydrophobe : les chaînes d'acides gras.

Nous avons donc analysé la composition en acides gras totaux. Elle présente un taux élevé d'acide palmitique, stéarique, oléique et arachidonique dans les deux types cellulaires. Des résultats similaires ont été observés par Blomstrand (1966) sur des lymphocytes humains. De plus, les membranes de lymphocytes et d'érythrocytes sont caractérisées par un pourcentage d'acides gras en (n-6) plus élevé que celui en (n-3).

Les résultats obtenus 72 heures après irradiation indiquent, pour l'érythrocyte, que les quantités de DHA et d'acide arachidonique diminuent et sont responsables de la baisse du taux d'acides gras polyinsaturés en (n-6) + (n-3). En effet, Konings (1987) a montré que les acides gras polyinsaturés les plus radiosensibles sont le DHA et l'acide arachidonique et qu'ils sont les cibles privilégiées de réactions de peroxydation. Plus le degré d'insaturation des chaînes d'acides gras est élevé, plus importante est leur dégradation par les rayonnements ionisants Samuni & Barenholz (1997). Nos résultats confirment également ceux de Hallahan et coll. (1994) qui ont observé le relargage d'acide arachidonique dans le milieu de culture suite à une irradiation X de lignées cellulaires à une dose de 10 Gy. Ces observations ne sont pas spécifiques d'un stress oxydant radio-induit, car des résultats semblables ont été obtenus sur des membranes intestinales à la suite d'un stress oxydant de type Fe^{2+} /ascorbate (Dudeja & Brasitus, 1993). Dans nos conditions expérimentales, contrairement aux érythrocytes, aucune variation de la composition en acides gras totaux des membranes de lymphocytes n'a été observée après irradiation. Afin d'expliquer ces résultats différents, nous allons nous appuyer sur des expériences menées dans notre laboratoire de mesures du niveau de défenses anti-oxydantes de ces deux types cellulaires vis à vis d'un stress oxydant radio-induit (Benderitter et coll., 2001). La mesure de la capacité anti-oxydante totale des cellules a été réalisée grâce au test à la phycoérythrine développé par Cao & Prior (1998). Ce test est une méthode fiable et sensible pour quantifier la capacité des anti-oxydants à absorber les radicaux peroxy. Les résultats obtenus ont montré que le niveau basal des défenses anti-oxydantes est plus élevé chez l'érythrocyte que chez le lymphocyte. Parce qu'ils sont des transporteurs de l'oxygène, les globules rouges sont soumis à un stress oxydant continu et par conséquent ils doivent posséder un système de défense efficace contre les espèces réactives de l'oxygène susceptibles d'être générées intrinsèquement. En effet, les érythrocytes se protègent

des produits d'oxydation de l'hémoglobine essentiellement par l'action de la SOD qui est un agent de destruction rapide de l'anion superoxyde, et de la glutathion peroxydase qui est un enzyme de détoxification des peroxydes (Boivin, 1984). Après une irradiation de 2 à 8 Gy, cette étude menée au laboratoire a montré que le niveau basal de défenses anti-oxydantes des érythrocytes ne varie pas (Benderitter et coll., 2001). Cependant, chez le lymphocyte, les résultats observés indiquent une activation dose-dépendante des défenses anti-oxydantes après une exposition aux rayonnements ionisants aux mêmes doses. Lors d'une irradiation, les systèmes de lutte contre l'oxydation n'étant pas inductibles (absence de noyau) chez l'érythrocyte contrairement aux lymphocytes, ils sont rapidement dépassés. Des lésions moléculaires des composants membranaires apparaîtraient alors, comme celles consécutives à la peroxydation des lipides.

Pour préciser notre analyse, nous avons étudié l'évolution du profil en acides gras de chaque classe de phospholipides après irradiation. Les résultats obtenus chez l'érythrocyte, indiquent que seule la classe des PE est modifiée par les rayonnements ionisants, 72 heures après une exposition aux rayonnements gamma. Ces résultats sont similaires à ceux observés par Cantafora et coll. (1987) après une irradiation gamma de membranes d'érythrocytes à des doses très fortes (de 500 Gy à 4600 Gy). Ces observations peuvent s'expliquer par la richesse de cette classe de phospholipides en acides gras polyinsaturés en (n-3) + (n-6) qui augmente notablement la sensibilité des PE aux effets d'une irradiation. En effet, la cascade radio-induite des réactions radicalaires (Swartz & Swartz, 1983) initie des réactions de lipoperoxydation au niveau des chaînes d'acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires (Bonnefont-Rousselot, 1994). En outre, l'augmentation de la susceptibilité des phospholipides aux réactions de peroxydation est corrélée à une augmentation de la proportion d'acides gras polyinsaturés (Vossen et coll., 1995). C'est pourquoi nous observons, après irradiation, dans la classe des PE, une diminution de la proportion d'acides gras polyinsaturés au profit des acides gras monoinsaturés et saturés. En particulier, nous constatons une baisse du taux d'acide arachidonique qui est compensée par une augmentation du pourcentage d'acide palmitique. Nos résultats confirment ceux de Cantafora et coll. (1987) qui ont également constaté une diminution de la proportion d'acides gras polyinsaturés dans la classe des PE après irradiation et en particulier une chute du pourcentage d'acide arachidonique. Cependant, bien que le DHA soit considéré comme une cible des réactions de peroxydation, aucune diminution de sa proportion dans la classe des PE n'a été observée dans nos conditions expérimentales. Dans nos membranes d'érythrocytes, le taux d'acide arachidonique étant 19 fois supérieur à celui obtenu pour le DHA, l'acide arachidonique est donc préférentiellement la cible des réactions de lipoperoxydation. L'acide arachidonique aurait donc un rôle protecteur vis à vis du DHA. Deux hypothèses permettraient d'expliquer la diminution radio-induite du taux d'acides gras polyinsaturés dans la classe des PE des érythrocytes. La première serait la formation de liaisons covalentes entre les

radicaux des chaînes d'acides gras voisines durant le processus de lipoperoxydation (Eichenberger et coll., 1982). La deuxième hypothèse, la plus probable, serait l'existence d'un système de réparation membranaire qui, hydrolyserait les acides gras peroxydés de la membrane (Cantafora et coll., 1987), grâce à l'action de la phospholipase A2 (PLA2). Les substrats préférentiels de la PLA2 sont les acides gras se trouvant en position *sn*-2 du glycérol des PE (Okazaki et coll., 1978). Or, les chaînes grasses insaturées (oléique, linoléique, arachidonique, EPA et DHA) se situent principalement en position *sn*-2 et les chaînes grasses saturées (palmitique, stéarique) se localisent en position *sn*-1 (Béréziat et coll., 1988). Sevanian & Kim (1985) ont montré que l'activité de la PLA2 est augmentée dans les liposomes soumis à un stress oxydant de type Fe²⁺/ascorbate, et que cette augmentation est corrélée au degré de lipoperoxydation. D'autre part, l'activité d'hydrolyse de la PLA2 est plus importante pour les acides gras oxydés que pour les acides gras non oxydés (Sevanian & Kim, 1985). Donc la PLA2 a une fonction essentielle qui est la détoxification des peroxydes des phospholipides membranaires (van Kujik et coll., 1987). Son action permet à la glutathion peroxydase de réduire les peroxydes d'acides gras ainsi relargués dans la phase aqueuse (van Kujik et coll., 1987). Les lysophospholipides présents dans les membranes sont alors réparés par un mécanisme de réacylation (van Kujik et coll., 1987). Les érythrocytes n'ont pas la capacité de synthétiser de nouveaux acides gras mais possèdent les mécanismes enzymatiques permettant la réacylation *in situ* (Dise et coll., 1980). La réacylation des lysophospholipides s'effectuerait donc par le captage d'un acide gras exogène par les acyl CoA synthétases. Ils seraient ensuite transférés sur les lysophospholipides présents dans les membranes par l'acyl CoA acyltransférase (Béréziat et coll., 1988). Les sources de l'apport exogène sont les fractions des acides gras du plasma transportées par l'albumine et les lipoprotéines de faible densité (LDL) (Spector, 1992). La fraction des acides gras non estérifiés (libres) complexés avec l'albumine est surtout formée des acides palmitique, stéarique et oléique. *In vitro*, en l'absence d'une régulation physiologique, seuls ces acides gras seraient disponibles pour les systèmes de réacylation. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'augmentation du taux d'acide palmitique dans la classe des PE membranaires des érythrocytes après irradiation. Contrairement aux érythrocytes, nous n'avons observé aucune modification du profil en acides gras des différentes classes de phospholipides des membranes de lymphocytes après irradiation. La différence constatée entre ces deux modèles pourrait s'expliquer au niveau de la réacylation des lysophospholipides. En effet, pour le lymphocyte, les sources d'acides gras sont exogène et/ou endogène car il est pourvu d'une régulation génique. Il existerait des mécanismes enzymatiques de désaturases et d'élongases au niveau du reticulum endoplasmique qui permettraient de modifier les acides gras provenant des sources exogènes afin de réacyler les lysophospholipides de la membrane avec des acides gras polyinsaturés. Bien que ces mécanismes soient principalement décrits pour les cellules hépatiques (Galli et coll., 1992), certains auteurs ont montré que de tels processus étaient également activés au niveau du reticulum endoplasmique des lymphocytes. Anel et coll. (1990) ont observé durant le processus de transformation blastique

des lymphocytes-T que les élongases et les désaturases étaient activées 72 heures après une stimulation avec la phytohémataglutinine. Cependant les cellules ne peuvent synthétiser d'acide arachidonique sans l'apport exogène d'acide linoléique ou gamma-linolénique qui sont des acides gras essentiels (Koolman & Röhm, 1994). Donc l'absence de modification de la composition en acides gras après irradiation observée chez le lymphocyte s'expliquerait soit par une limitation des dommages infligés aux lipides par les rayonnements ionisants (activation des défenses antioxydantes), soit par une réparation efficace et rapide de ces dommages (activation de mécanismes enzymatiques). Il serait donc intéressant d'utiliser des inhibiteurs de la PLA2 (mepacrine et bromphenylbromide) et de doser la composition en acides gras du plasma afin d'éclaircir leur rôle sur le profil en acides gras membranaires après irradiation.

Notre étude a mis en évidence que les plasmalogènes sont caractéristiques des PE membranaires des érythrocytes et des lymphocytes humains. De plus, 72 heures après irradiation, ils sont consommés dans les membranes d'érythrocytes. Les plasmalogènes présentent une liaison éther-vinyle en position *sn*-1 (Ingrand et coll., 2000). A cause de la réactivité de cette fonction enoléther, ils sont plus sensibles aux réactions d'oxydation que leurs analogues : les esters d'acides gras (Brosche & Platt, 1998). Ils sont donc considérés comme des antioxydants endogènes (Brosche & Platt, 1998). Sindelar et coll. (1999) ont démontré que, à la suite d'un stress oxydatif, ils protègent les acides gras polyinsaturés des dommages oxydatifs, et que leur fonction éther-vinyle est consommée simultanément. Selon ces auteurs, les plasmalogènes interféreraient avec les réactions de propagation de la lipoperoxydation plutôt qu'avec l'initiation de la lipoperoxydation.

Nos résultats indiquent donc qu'une exposition des érythrocytes aux radiations ionisantes, à des doses relativement faibles, induit des dommages membranaires au niveau de la composition en acides gras des phospholipides. Ces altérations seraient liées au remplacement des acides gras polyinsaturés peroxydés par de nouveaux acides gras saturés durant le processus de réparation membranaire. Les lymphocytes, qui possèdent une régulation génique, ne présentent pas de modifications structurelles des constituants lipidiques des membranes après irradiation. Cette absence de variation semblerait provenir de l'existence d'un système de réparation membranaire fidèle. Cependant des variations des propriétés biophysiques de la membrane des érythrocytes et des lymphocytes ont été observées suite à une exposition aux rayonnements ionisants (Benderitter et coll., 1999). Les mesures de polarisation de fluorescence avaient été effectuées en incorporant trois sondes fluorescentes dans la bicouche : le TMA-DPH qui se localise à l'interface eau-lipide, le DPH qui se situe dans les régions hydrophobes et l'ANS qui s'incorpore à l'interface lipide-protéine de la membrane. Donc, afin de mieux comprendre les liens susceptibles d'exister entre fluidité membranaire et composition en lipides de la membrane, nous avons étudié l'évolution de la fluidité membranaire, après irradiation, à l'aide de sondes fluorescentes

permettant de cibler la mesure des perturbations de fluidité membranaire à différentes profondeurs de la bicouche lipidique.

Modifications des propriétés biophysiques de la membrane après irradiation

Les conditions optimales d'utilisation des acides stéariques définies dans nos études préliminaires sont conformes à celles obtenues par Muller (1988). Elles sont valables quelle que soit la technique de mesure utilisée (spectrofluorimétrie et cytométrie de flux). Comme les suspensions cellulaires de globules rouges sont extrêmement turbides, il est nécessaire de travailler avec des concentrations cellulaires suffisamment diluées (inférieures ou égales à 4.10^6 GR/ml) afin de minimiser les problèmes de diffusion de lumière qui perturbent les mesures de polarisation de fluorescence (Dickens et coll., 1988).

L'utilisation des acides stéariques (acides gras n-(9-anthroyloxy), n = 3, 6, 9 et 12) nous a permis d'obtenir des informations sur leur micro-environnement, à des profondeurs croissantes de la bicouche lipidique (de la surface au centre de la membrane plasmique) (Thulborn et coll., 1979). Nos résultats montrent qu'il existe un gradient de fluidité dans les membranes d'érythrocytes ($\langle r \rangle_{3-AS} > \langle r \rangle_{9-AS} > \langle r \rangle_{12-AS}$ et $\langle r \rangle_{6-AS} > \langle r \rangle_{9-AS} > \langle r \rangle_{12-AS}$) et de lymphocytes ($\langle r \rangle_{3-AS} > \langle r \rangle_{6-AS} > \langle r \rangle_{9-AS} > \langle r \rangle_{12-AS}$). Ces observations indiquent que plus l'on pénètre dans la bicouche lipidique plus le milieu est fluide car la position des doubles liaisons des acides gras polyinsaturés se localise dans les régions profondes de la membrane. En effet, les acides stéariques sont constituées d'un noyau anthracène (groupement chromophore) qui est attaché par une liaison ester à des positions croissantes sur la chaîne carbonée de l'acide gras (Thulborn & Sawyer, 1978). Le noyau anthracène est immergé dans la région hydrocarbonée de la membrane et donc bien protégé de la phase aqueuse (Chalpin & Kleinfeld, 1983). Les sondes sont présentes dans la bicouche à des niveaux correspondant à la position du groupement chromophore sur l'acide gras et permettent ainsi d'estimer le gradient de fluidité membranaire (Chalpin & Kleinfeld, 1983).

Cependant, la comparaison des deux techniques utilisées montre que les mesures en cytométrie de flux potentialisent l'existence de ce gradient et donc reflètent mieux la localisation des sondes dans la membrane. En effet, les mesures obtenues par spectrofluorimétrie donnent une valeur intégrée de l'anisotropie de fluorescence sur la totalité de la suspension cellulaire et peuvent être perturbées par la présence de sondes libres, non incorporées dans les membranes, qui ont des durées de vie rotationnelle différentes (Fox & Delohery, 1987). Le cytomètre de flux mesure les émissions de fluorescence des sondes incorporées dans une cellule unique, entraînée par un fluide, interceptant le faisceau des rayons lasers. Cette mesure est ainsi insensible à la fluorescence émise par les marqueurs libres présents dans le milieu suspendant (Collins et coll., 1990). Les valeurs d'anisotropie obtenues par cytométrie de flux sur une suspension de lymphocytes sont inférieures à celles mesurées par spectrofluorimétrie. En effet, les mesures effectuées par

spectrofluorimétrie intègrent la totalité des cellules présentes dans la suspension : lymphocytes principalement mais aussi monocytes, et plaquettes. Au contraire, la cytométrie de flux permet de discriminer les différentes populations cellulaires et donc de réaliser les analyses sur un type cellulaire précis. Ces mesures comparatives mettent en évidence que la cytométrie de flux est une méthode plus sensible et plus précise que la spectrofluorimétrie pour les mesures de fluidité membranaire. Des résultats similaires ont été observés par Fox & Delohery (1987) et Collins et coll. (1990).

A notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude est réalisée sur la mesure de la fluidité membranaire après irradiation sur des globules rouges intacts. Nos résultats ont mis en évidence des modifications de la fluidité membranaire dès 1 heure après une exposition aux rayonnements ionisants alors que la composition en lipides de la membrane n'est pas encore altérée. Ces variations se traduisent par une diminution des valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6-AS. Ces résultats suggèrent une augmentation de la fluidité membranaire du compartiment hydrophobe de la bicouche lipidique après une exposition aux rayonnements ionisants. D'autre part, nos résultats indiquent que les dommages membranaires radio-induits s'organisent en micro-domaines. Ces observations confirment les résultats observés par Benderitter et coll. (1999) sur des préparations membranaires d'érythrocytes. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette fluidification des régions hydrocarbonées profondes que nous avons constatée à des temps précoces après irradiation. Dans un premier temps, les modifications observées peuvent s'expliquer par les effets d'une exposition aux rayonnements ionisants sur les lipides membranaires. Grzelinska et coll. (1979) ont également constaté une augmentation de la fluidité de la région hydrophobe de la bicouche lipidique après une irradiation des membranes d'érythrocytes à des doses très importantes (1 kGy à 40 kGy). Ils attribuent ces modifications au processus de lipoperoxydation qui créeraient des cavités là où se situent les acides gras polyinsaturés et ainsi augmenteraient le désordre de la membrane. Kergonou et coll. (1981) ont observé l'augmentation du taux de dialdéhyde malonique (MDA), un endoperoxyde cyclique, dans les érythrocytes, suite à l'irradiation totale de rats à une dose de 8 Gy. De plus, des expériences réalisées au laboratoire ont montré qu'une exposition aux rayonnements ionisants d'échantillons sanguins à 2 et 4 Gy induit simultanément, dans les membranes de globules rouges, un processus de lipoperoxydation et la synthèse de MDA, 1 heure après irradiation (Benderitter et coll., 2001). Jain et coll. (1993) suggèrent que le processus de lipoperoxydation génèrent des endoperoxydes cycliques qui s'accumuleraient dans la membrane et augmenteraient la distance intermoléculaire entre les lipides adjacents. Ce mécanisme contribuerait ainsi à augmenter la mobilité moléculaire. Dans un deuxième temps, les résultats que nous avons obtenus peuvent aussi s'expliquer par les effets des rayonnements ionisants sur les protéines membranaires. Benderitter et coll. (1999) ont montré que les processus de lipoperoxydation ne sont pas les seules sources des altérations membranaires radio-induites. Benderitter et coll. (1999) ont observé

des modifications des interactions lipide-protéine dans les membranes de globules rouges, mesurées avec l'ANS, après une irradiation à une dose de 8 Gy. Nos résultats confirment ceux de Gwozdziński (1991a) qui a irradié des membranes d'érythrocytes à des doses de 200 à 500 Gy. En effet, cet auteur a constaté une augmentation de la fluidité de la région hydrophobe de la membrane parallèlement à des changements de la conformation des protéines. Il a réalisé une autre étude (Gwozdziński, 1991b) en irradiant des membranes d'érythrocytes de poisson très riches en acides gras polyinsaturés et ont observé les mêmes résultats que précédemment. Ils en ont conclu que l'augmentation de la fluidité membranaire après irradiation aurait pour origine des modifications des interactions lipide-protéine, plutôt que la lipoperoxydation. Des résultats similaires ont été obtenus par Yonei & Kato (1978) et Kölling et coll. (1994) après irradiation de membranes respectivement de globules rouges et de thymocytes, à des doses semblables à notre étude (1 Gy et 0,5 Gy à 6 Gy). Ils ont également attribué cette augmentation de la fluidité membranaire à des altérations des interactions lipide-protéine induites par des modifications de la conformation des protéines. Cantafora et coll. (1987) ont montré que l'irradiation-gamma de membranes de globules rouges diminuait la proportion d'acides gras polyinsaturés dans la classe des PE, et altérait les groupements thiols (SH) des protéines membranaires et les protéines du cytosquelette. Ces observations ont été réalisées pour des doses très importantes : de 500 Gy à 4600 Gy. Pour des doses beaucoup plus faibles, de 5 à 20 Gy, Verma et coll. (1991) ont noté des modifications des structures secondaires et tertiaires des protéines membranaires. Des expériences réalisées dans notre laboratoire indiquent que les principales protéines du cytosquelette (spectrine et actine) sont oxydées après une exposition gamma à des doses comprises entre 0 et 10 Gy (Benderitter et coll., 2001). Ces atteintes se traduisent par une augmentation de la proportion de groupements carbonyles. Or, la flexibilité de la membrane du globule rouge est largement dépendante du squelette membranaire dont la spectrine et l'actine sont les principaux composants (Boivin, 1984). Les segments hydrophobes de la spectrine interagissent avec les lipides de la membrane (Boivin, 1984). Le cytosquelette est accroché aux protéines transmembranaires. Donc, l'augmentation de la fluidité membranaire à des temps précoces après irradiation de globules rouges aurait pour origine des modifications des protéines du cytosquelette qui altèreraient les interactions entre lipides et protéines.

En outre, les résultats obtenus sur le gradient de fluidité membranaire indiquent que des perturbations de ce gradient apparaissent à partir de 24 heures après une exposition aux rayonnements ionisants. Ces modifications se localisent tout le long des chaînes hydrocarbonées mais sont maximales au niveau de la position du 6-AS. De plus, nous observons une fluidification du micro-environnement du 6-AS. Sakanashi et coll. (1986) et Rego & Oliveira (1995) ont également observé une augmentation de la fluidité membranaire de cellules de la rétine et de mélanome à la suite d'un stress oxydant de type respectivement Fe^{2+} /ascorbate et irradiation UltraViolet. Sakanashi et coll. (1986) expliquent ces variations par l'existence d'un mécanisme de réparation. Ces auteurs confirment donc notre hypothèse de l'existence d'un processus de

détoxication des membranes par la PLA2. Nous avons vu précédemment que l'irradiation modifiait la composition en lipides de la membrane des érythrocytes 72 heures après irradiation. Nous supposons qu'à partir de 24 heures, la composition en lipides membranaires commencerait à être altérée en raison de l'activation du processus de réparation membranaire. Ainsi, l'hydrolyse des acides gras oxydés par la PLA2 génèrerait des lysophospholipides qui désorganiseraient la structure de la membrane en induisant une augmentation de la fluidité membranaire.

L'irradiation induirait donc, à des temps précoces, un processus de lipoperoxydation qui serait responsable de l'augmentation de la fluidité membranaire des érythrocytes. Cette fluidification aurait pour origine d'une part la formation d'endoperoxydes cycliques qui augmentent le désordre moléculaire, et d'autre part les atteintes au niveau des protéines du cytosquelette qui altèreraient les interactions lipides-protéines. Les dommages membranaires seraient ensuite réparés en éliminant les acides gras oxydés. Cette réparation se traduirait alors par une fluidification de la bicouche lipidique des érythrocytes.

L'exposition au rayonnement gamma induit également des altérations des propriétés biophysiques de la membrane des lymphocytes. En effet, les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6, 9 et 12-AS augmentent après irradiation. Contrairement aux résultats obtenus pour les érythrocytes, nous observons une rigidification des régions profondes de la partie hydrophobe de la membrane. Benderitter et coll. (1999) ont observé, en utilisant le TMA-DPH, une augmentation de la fluidité de l'interface eau-lipide de la membrane. Ces études confirment les résultats obtenus par Giusti et coll. (1998), (Parasassi et coll. (1991) et Parasassi et coll. (1992). Selon ces auteurs, l'accumulation d'hydroperoxydes dans les régions profondes de la membrane et les liaisons croisées entre lipides adjacents désorganisent les régions hautes de la bicouche lipidique. Cette déstructuration de la membrane favorise la pénétration des molécules d'eau de la phase aqueuse jusqu'à la position des hydroperoxydes lipidiques. Le gradient de polarité de la membrane est alors altéré. Le TMA-DPH étant fluorescent en milieu aqueux, son pouvoir de rotation est alors amplifié, tandis que l'accumulation d'hydroperoxydes de lipides dans les régions profondes de la membrane induit une diminution de la fluidité membranaire du 6, 9 et 12-AS. Purohit et coll. (1980) et Joshi et coll. (1982) ont également observé une rigidification des régions hydrophobes après irradiation de membranes naturelles. Joshi et coll. (1982) attribuent ces variations à la peroxydation lipidique. Chen & Yu (1994) suggèrent que la lipoperoxydation génèrent des espèces réactives (4-hydroxynonanal et dialdéhyde malonique) qui interagissent avec les constituants de la membrane en provoquant des restrictions de la mobilité de la bicouche. Eichenberger et coll. (1982) ont constaté, à la suite d'un stress oxydant non radio-induit, une diminution de la fluidité membranaire des régions hydrocarbonées de la bicouche parallèlement à une diminution du taux d'acides gras polyinsaturés. Or, dans nos conditions expérimentales, aucune modification de la composition en acides gras des membranes de lymphocytes n'a été observée après une exposition aux rayonnements ionisants. Les membranes plasmiques des

lymphocytes ont un rapport molaire cholestérol/phospholipides égal à environ 0,58 (Koizumi et coll., 1981). Nous suggérons donc que le cholestérol puisse être une cible des rayonnements ionisants aussi importante que les autres constituants membranaires (lipides et protéines). Le cholestérol exerce un effet rigidifiant dans les membranes cellulaires. En effet, une augmentation du rapport molaire cholestérol/phospholipides induit une diminution de la fluidité membranaire (Cooper, 1978). Or, Sevanian & McLeod (1987) et Maerker & Jones (1991) ont montré qu'une irradiation gamma de liposomes induisait la formation de produits d'oxydation du cholestérol appelés oxystérols du type 7-kétocholestérol (7-kéto), 7-hydroperoxyde (7-OOH) et cholestérol-5 β ,6 β -époxyde (β -CE). Le mécanisme d'attaque de la molécule du cholestérol par les rayonnements ionisants a pour origine : l'oxydation du cholestérol et des acides gras polyinsaturés par les espèces radicalaires très réactives générées par l'irradiation, et par les radicaux alkoxylys et peroxylys formés lors des réactions de lipoperoxydation (Sevanian & McLeod, 1987). La production de ces espèces est considérée comme un index de la lipoperoxydation (Sevanian & McLeod, 1987) et un indicateur d'une irradiation passée (Maerker & Jones, 1991). Les réactions de propagation de la peroxydation lipidique sont principalement responsables de la synthèse des oxystérols (Sevanian & McLeod, 1987). L'oxydation du cholestérol augmente avec la durée de l'irradiation et le nombre d'insaturations des acides gras (Sevanian & McLeod, 1987). Lelong et coll. (1988) ont montré que les oxystérols se localisent dans les membranes cellulaires. Les hydroxycholestérols diminuent la fluidité des membranes cellulaires (Richert et coll., 1984 ; Rooney et coll., 1985 ; Szostek et coll., 1991). Il serait donc intéressant de doser les oxystérols après irradiation dans nos conditions expérimentales et de vérifier leur influence sur les propriétés biophysiques de la membrane.

Nous avons montré qu'une exposition aux rayonnements ionisants induit, dans un premier temps, des modifications précoces des propriétés biophysiques des membranes d'érythrocytes générées par le processus de lipoperoxydation ; et dans un deuxième temps des altérations tardives de la composition en lipides, traduisant la réparation de la bicouche lipidique, qui joueraient un rôle dans les atteintes radio-induites de la fluidité membranaire. Chez le lymphocyte, bien qu'aucune modification de la composition en acides gras de la membrane n'ait été mise en évidence, nous avons constaté que l'irradiation modifie sa fluidité. Ces modifications pourraient être attribuées à l'oxydation de composants membranaires autres que les lipides et les protéines tels que le cholestérol. Pour montrer l'importance de ces atteintes membranaires après irradiation, il est nécessaire d'étudier leur impact sur une fonction cellulaire. Nous nous sommes donc interrogés sur l'importance des altérations des propriétés biophysiques de la membrane sur la mort cellulaire radio-induite. En effet, Benderitter et coll. (2000) ont observé, après irradiation de lymphocytes, des variations de leur fluidité membranaire en fonction de l'état de viabilité cellulaire. Des mesures de polarisation avaient été réalisées en incorporant le TMA-DPH et le DPH dans les membranes. Nous avons donc étudié l'évolution de la fluidité membranaire au

cours du processus apoptotique à l'aide des acides stéariques qui permettent de cibler la mesure des perturbations à différentes profondeurs de la membrane.

Etude des liens éventuels entre la fluidité membranaire et la mort cellulaire radio-induite

Nous avons mis au point une technique de cytométrie de flux permettant de mesurer simultanément l'état de mort cellulaire et l'évolution de la fluidité membranaire après irradiation. La viabilité cellulaire a été mesurée en marquant les lymphocytes avec l'acridine orange (AO) et le bromure d'éthidium (BE). Ce double marquage a permis de différencier les cellules viables, des cellules en début d'apoptose et en fin d'apoptose. Les résultats obtenus confirment ceux observés par Lecoœur & Gougeon (1996). L'AO est incorporée dans toutes les cellules. Aux faibles concentrations d'AO utilisées, nous ne détectons que l'émission des monomères d'AO intercalés dans la double hélice de la molécule ADN (Olivier, 1995). Le BE ne pénètre dans les cellules que si leur intégrité membranaire n'est pas maintenue. Lorsque les cellules sont en début d'apoptose, la chromatine se condense mais l'intégrité membranaire est préservée. Ces modifications nucléaires induisent une réduction de l'accessibilité à la molécule d'ADN pour l'AO provoquant ainsi une diminution de la fluorescence émise par l'AO (Telford et coll., 1992). Lorsque les cellules sont en fin d'apoptose, l'intégrité membranaire est rompue et le BE pénètre dans les cellules pour se lier à la molécule d'ADN. Ainsi, sur chaque état de viabilité cellulaire les mesures de fluidité membranaire ont été réalisées en incorporant les acides stéariques dans les membranes de lymphocytes.

L'étude de l'évolution de la fluidité membranaire des lymphocytes, durant le processus d'apoptose non radio-induit, indique que les cellules en début d'apoptose se distinguent des cellules viables principalement par une rigidification des zones profondes de la bicouche lipidique. Benderitter et coll. (2000) ont observé que ces variations étaient compensées par une fluidification de la surface de la membrane. Ces résultats suggèrent donc que les cellules en début d'apoptose tendent à maintenir leur intégrité membranaire jusqu'aux stades avancés de la mort cellulaire. Ces modifications peuvent être reliées aux différentes perturbations membranaires, décrites dans la littérature, caractéristiques du processus apoptotique. Avant les étapes de fragmentation de l'ADN et de perte de l'intégrité membranaire, c'est à dire en début d'apoptose, la compaction des lipides de la membrane plasmique est diminuée (Schlegel et coll., 1993 ; Mower et coll., 1994). D'autre part, les PS sont externalisées afin de permettre la reconnaissance des cellules en apoptose par les cellules phagocytaires (Pradhan et coll., 1997). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'externalisation de la PS. Selon Martin et coll. (1995), Diaz & Schroit (1996) et Bratton et coll. (1997), le flip-flop de la PS serait lié à une perte de l'asymétrie membranaire provoquée par l'activation d'une translocase non spécifique, calcium dépendante.

Tyurina et coll. (2000) suggèrent que le cytochrome c, libéré de la mitochondrie par un stress oxydant, se lie aux PS du feuillet membranaire cytoplasmique et induit l'oxydation des PS. Les PS ainsi peroxydés inhibent l'activité de l'aminophospholipide translocase provoquant l'externalisation des PS. En outre, le clivage de certaines protéines du cytosquelette (cytokératine et vimentine) a été détecté dans les stades précoces de l'apoptose, simultanément à l'externalisation des PS (van Engeland et coll., 1997). Cependant, ces deux processus sont indépendants l'un de l'autre (van Engeland et coll., 1997). Par ailleurs, notre étude montre que la désorganisation de la membrane plasmique augmente avec l'engagement des cellules dans le processus apoptotique. En effet, les cellules en fin d'apoptose se caractérisent par un gradient de fluidité membranaire totalement altéré et une fluidification de toutes les régions hydrocarbonées de la membrane. Ces résultats semblent être reliés à la perte de l'intégrité membranaire qui survient dans le dernier stade du processus apoptotique.

Donc nous avons montré que les cellules en début et fin d'apoptose se distinguent des cellules viables par des perturbations spécifiques de leur état de fluidité membranaire qui s'organisent en micro-domaines. Quel effet l'irradiation introduit-elle maintenant sur les propriétés biophysiques de la membrane de chaque état de viabilité cellulaire ?.

L'évolution après irradiation de la fluidité membranaire des lymphocytes indique que le gradient de fluidité mesuré dans les cellules viables est totalement perturbé. Plus précisément, ce serait dans les régions hautes de la bicouche que se localiseraient ces dommages. Ces résultats sont concordants avec nos études précédentes (Benderitter et coll., 2000). En effet, nous avons observé une fluidification de la région hydrocarbonée et de l'interface eau-lipide de la membrane des cellules viables. D'autre part, la fluidité membranaire des cellules en début d'apoptose n'est pas altérée suite à une exposition aux rayonnements ionisants. Ces résultats suggèrent l'absence de réactivité de l'état de fluidité membranaire des cellules en début d'apoptose. En effet, les membranes des cellules en apoptose sont souvent considérées comme étant des structures non-réactives et non-réceptives (Mower et coll., 1994). Par ailleurs, les cellules en fin d'apoptose présentent des modifications radio-induites du gradient de fluidité au niveau de la partie haute de la bicouche. Leur intégrité membranaire étant déjà perturbée par le processus apoptotique, l'irradiation semble amplifier ce phénomène.

Donc l'irradiation altère les propriétés biophysiques des cellules viables et en fin d'apoptose. Finalement, quel est donc le rôle de ces altérations dans le processus de mort cellulaire radio-induite ?.

Les modifications des propriétés biophysiques de la membrane sont spécifiques du type d'inducteur d'apoptose : apoptose spontanée et apoptose radio-induite. Ce processus apoptotique radio-induit nécessitait plusieurs heures pour s'établir. En effet, nous avons mesuré un taux basal d'apoptose très faible, qui restait stable une heure après le début de l'expérience, mais augmentait

significativement 24 heures après irradiation. L'apoptose détectée 1 heure après le début de l'expérience est attribuée à l'apoptose spontanée (Philippé et coll., 1997), tandis que l'apoptose détectée 24 heures après irradiation des lymphocytes est attribuée à l'apoptose radio-induite (Philippé et coll., 1997). Les propriétés biophysiques de la membrane des cellules en début d'apoptose ne sont pas modifiées une heure après irradiation. Cependant, 24 heures après irradiation, nous observons une rigidification des régions profondes de la bicouche en comparaison des résultats obtenus 1 heure après irradiation. Nos travaux ont donc mis en évidence une spécificité de la réponse de la membrane durant le processus d'apoptose radio-induite. Deux hypothèses peuvent alors être formulées.

La première est qu'il existerait des modifications radio-induites de la distribution cellulaire des différentes sous-population lymphocytaires au cours de nos expériences. Dans des conditions expérimentales semblables, Philippé et coll. (1997) ont montré que le pourcentage des sous-populations lymphocytaires (lymphocytes T et B) sensibles à l'apoptose décroît rapidement et complètement après une exposition aux rayonnements ionisants. Au contraire, les sous-populations lymphocytaires résistantes à l'apoptose (lymphocytes NK) survivent beaucoup plus longtemps (Philippé et coll., 1997). De plus, les lymphocytes B et T, irradiés *in vitro*, subissent des altérations des glycoprotéines surfaciques et de la topologie de la membrane plasmique qui sont plus accentuées avec le temps et qui semblent précéder la perte de viabilité cellulaire (Anderson et coll., 1977). Afin de vérifier cette conjecture, il serait intéressant d'étudier l'évolution de la fluidité membranaire après irradiation sur chacune des sous-populations lymphocytaires engagée dans le processus apoptotique.

La seconde hypothèse est la spécificité de l'apoptose radio-induite par rapport à l'apoptose spontanée en termes de modifications des propriétés biophysiques de la membrane. Nos résultats confirmeraient alors le rôle prépondérant de la membrane dans les processus d'induction de l'apoptose. En effet, de nombreuses études suggèrent qu'un signal apoptotique puisse être induit par l'interaction des rayonnements ionisants avec la membrane. Haimovitz-Friedman et coll. (1994) ont montré que l'irradiation induit l'hydrolyse des sphingomyélinases membranaires en céramides qui déclenchent le processus apoptotique. De plus, Ojeda et coll. (1994) ont constaté que la protéine kinase C (PKC), associée à la membrane, joue un rôle important dans les processus apoptotiques radio-induits. En effet, elle est impliquée dans la transduction du signal de la membrane vers le noyau où elle induit à terme la fragmentation de l'ADN (Ojeda et coll., 1992). Ce mécanisme serait la conséquence de la lipoperoxydation radio-induite au niveau membranaire. Ces dommages membranaires provoqueraient l'hydrolyse du phosphatidylinositolbiphosphate en inositoltriphosphate et diacylglycérol qui sont responsables respectivement de la mobilisation du calcium et de l'activation des PKC. Nakajima & Yukawa (1999) suggèrent que le radical hydroxyl généré lors d'une irradiation active la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol qui conduit à la synthèse du diacylglycérol et par conséquent à l'activation des PKC. Nishizuka (1992) a observé que l'acide arachidonique est un second

Chapitre 4 :
Etudes *in vivo* des effets d'une irradiation
sur la membrane cellulaire

Ce travail a pour objectif de comprendre les interconnexions entre altérations radio-induites de fluidité membranaire, composition lipidique membranaire, et stress oxydatif sur un modèle *in vivo* : le rat. Nous avons alors sensibilisé les membranes plasmiques à la lipoperoxydation en diminuant artificiellement la capacité de défense anti-oxydante de la cellule et en modifiant la composition en acides gras des lipides. A cet effet, des régimes alimentaires spécifiques ont été élaborés et différents paramètres ont été étudiés après irradiation : la vitamine E, la composition lipidique membranaire, la fluidité membranaire et l'apoptose.

I. Résultats

I.1. Protocole expérimental

Des rats ont été nourris *ad libitum* pendant 5 semaines avec trois régimes alimentaires différents dont les compositions sont décrites dans le paragraphe suivant (I.2.Type de régimes). Les animaux ont été ensuite irradiés corps entier aux doses de 1,5 Gy et 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les échantillons sanguins ont été prélevés au niveau de l'aorte abdominale sous anesthésiant 1, 24, 48 et 72 heures après une exposition aux rayons gamma du ^{60}Co . Les animaux ont ensuite été euthanasiés. Sur chaque prélèvement sanguin, les principaux éléments figurés du sang ont été dénombrés en utilisant un automate d'hématologie (ADVIA 120, Bayer, France). Sur le plasma, la vitamine E a été dosée par CLHP. Sur les hématies, les mesures de fluidité membranaire ont été réalisées, en cytométrie de flux, en incorporant le 6 et le 9-AS dans les membranes. Les phospholipides membranaires ont été dosés par CLHP à partir d'échantillons de membranes d'hématies. Les analyses de la composition en acides gras ont ensuite été réalisées par CPG sur chaque classe de phospholipide membranaire. Sur les lymphocytes, les mesures de fluidité membranaire ont été effectuées en cytométrie de flux en incorporant le TMA-DPH et le 6-AS dans les membranes. Les mesures simultanées de viabilité cellulaire et de fluidité membranaire après un triple marquage à l'acridine orange, au bromure d'éthydiu et au TMA-DPH ont été également réalisées sur les lymphocytes par cytométrie en flux.

I.2. Type de régimes

La composition des trois régimes alimentaires qui ont été administrés *ad libitum* pendant 5 semaines aux animaux est décrite dans le tableau 19.

	Régime 1	Régime 2	Régime 3
Lipides	3 %	9 %	9 %
Composition en huiles		Olive 63,5 % Tournesol 8 % Lipromega 28,5 %	Olive 63,5 % Tournesol 8 % Lipromega 28,5 %
Protéines (caséine)	16 %	22 %	22 %
Glucides	Amidon 45 %	Amidon 43 %	Amidon 43 %
Vitamine E (mg/Kg)	30 ± 10	≤ 15	200

Tableau 19 : Composition des différents régimes.

Le régime 1 correspond au régime UAR 04 qui est généralement administré en entretien aux animaux. Les régimes 2 et 3 diffèrent uniquement par leur composition en vitamine E. Ils ont été élaborés à l'INRA (Jouy en Josas, France) à partir de deux huiles végétales raffinées (olive et tournesol) et d'une huile de poisson (lipromega) qui comporte 18 % d'EPA et 12 % de DHA. L'huile lipromega est fabriquée à partir de la sardine et de l'anchois par la société POLARIS (Quimper, France). Elle est riche en acides gras de type (n-3).

Le profil des acides gras composant ces différents régimes est présenté dans le tableau 20. Il a été obtenu en dosant les acides gras directement dans les aliments.

Acides gras	Régime 1	Régime 2	Régime 3
14:0	0,57	2,82	2,87
15:0	0,14	0,19	0,19
16:0	17,56	12,02	12,23
17:0	0,13	0,16	0,16
18:0	1,79	2,21	1,94
20:0	0,21	0,28	0,19
22:0	0,22	0,11	0,10
24:0	0,52	0,06	0,05
16:1n-9	0,24	0,19	0,21
16:1n-9	0,83	3,40	3,49
18:1n-9	17,75	53,41	53,83
18:1n-7	1,50		
20:1n-9	0,96	0,48	0,47
20:1n-9	0,07	0,16	0,11
22:1n-9	0,20	0,30	0,30
22:1n-9	0,16	0,09	0,11
24:1n-9	0,10	0,13	0,12
18:2n-6	53,53	12,28	12,29
18:3n-6	0,37	0,31	0,16
20:2n-6	0,15	0,09	0,06
20:3n-6	0,00	0,07	0,05
20:4n-6	0,23	0,34	0,31
22:4n-6	0,00	0,02	0,03
22:5n-6	0,03	0,09	0,09
18:3n-3	0,05	0,85	0,75
18:4n-3	0,13	0,88	0,77
20:5n-3	0,97	5,46	5,45
22:5n-3	0,14	0,60	0,63
22:6n-3	1,44	2,98	3,03
Saturés	21,14	17,85	17,73
Monoinsaturés	21,81	58,17	58,64
(n-6)	54,31	13,20	12,99
(n-3)	2,73	10,78	10,64
(n-6) + (n-3)	57,04	23,98	23,63
n-6/n-3	19,87	1,22	1,22
[(n-6) + (n-3)]/saturés	2,70	1,34	1,33

Tableau 20 : Profil en acides gras des différents régimes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la totalité des acides gras dosés dans l'échantillon. (16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA))

Pour les régimes 2 et 3, les acides gras polyinsaturés sont exclusivement représentés par 12 % d'acide linoléique et 11 % d'acides gras en (n-3) à longues chaînes, notamment en EPA et DHA

(tableau 20). Par contre, la totalité des acides gras polyinsaturés (54 %) dans le régime 1 est constituée d'acide linoléique.

I.3. Effets des régimes sur les animaux en l'absence d'irradiation

I.3.1. Croissance et prise alimentaire

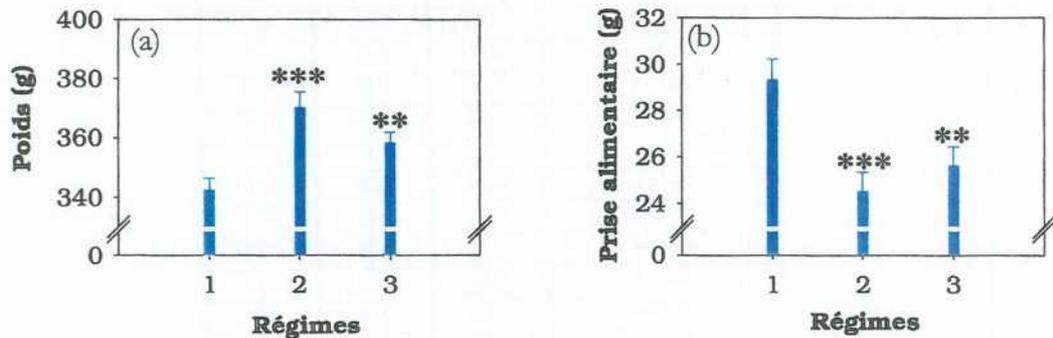


Figure 59 : Effet des régimes sur la croissance et la prise alimentaire des animaux témoins. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 20 à 27 observations indépendantes. Différences significatives par rapport au régime 1, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Les animaux nourris avec les régimes 2 et 3 pendant 5 semaines ont eu une croissance plus importante que ceux qui ont suivi le régime 1 bien que leur prise alimentaire soit plus faible. En effet, ils ont un poids supérieur respectivement de 8,2 % ($p < 0,001$) et de 4,7 % ($p = 0,004$) (figure 59a). Par contre, leur prise alimentaire est inférieure respectivement de 16,4 % ($p < 0,001$) et 12,6 % ($p = 0,003$) (figure 59b). Ces résultats s'expliquent par un apport calorifique plus important dans les rations alimentaires des régimes 2 et 3.

messager qui participe également à l'activation des PKC. Hallahan et coll. (1994) ont montré que l'inhibition de la PLA2 diminue l'activation radio-induite des PKC et le relargage d'acide arachidonique. Ces résultats démontrent que l'hydrolyse des acides gras est une étape précoce dans les signaux activés par les rayonnements ionisants et qu'elle est indépendante des dommages nucléaires (Hallahan et coll., 1994). En outre, l'activation de la PLA2 est associée à une diminution de la fluidité membranaire (Sevanian et coll., 1988). Or, notre étude sur l'effet d'une irradiation sur les propriétés biophysiques de la membrane des lymphocytes a montré que les rayonnements ionisants induisaient une diminution de la fluidité membranaire. Ces résultats confortent donc notre hypothèse sur l'importance du rôle des dommages membranaires (biochimiques et biophysiques) dans le processus d'apoptose radio-induite.

Il existe des molécules inhibant les voies de signalisation membranaire conduisant à la mort cellulaire radio-induite. Le trolox est un analogue de la vitamine E qui pénètre rapidement dans la membrane cellulaire et inhibe la fragmentation de l'ADN après irradiation (Ramakrishnan et coll., 1993 ; McClain et coll., 1995). Härtel et coll. (1998) ont observé que de fortes concentrations de cholestérol protègent les cellules contre l'apoptose radio-induite.

Il serait sans aucun doute intéressant d'utiliser ces anti-apoptotiques (trolox, inhibiteurs des céramides, inhibiteurs de la PLA2) des voies de signalisation membranaire conjointement à notre méthode de mesure simultanée de la fluidité membranaire et de l'état de viabilité cellulaire pour confirmer l'importance des dommages membranaires dans l'induction radio-induite de l'apoptose.

En conclusion de ce premier chapitre, nous pouvons résumer les résultats obtenus par un schéma récapitulatif représenté figure 58. L'irradiation induit des dommages membranaires au niveau de la composition en acides gras des phospholipides des érythrocytes qui seraient la résultante de la réacylation des phospholipides par de nouveaux acides gras durant le processus de réparation membranaire. Ces dommages membranaires sont susceptibles d'induire des modifications des propriétés biophysiques des membranes d'érythrocytes. L'absence de variation de la composition en lipides de la membrane des lymphocytes pourrait être attribuée à l'existence d'un processus de « réparation membranaire fidèle » et/ou d'un système de protection des lipides plus efficace. Bien qu'aucune modification structurelle des constituants lipidiques de la membrane des lymphocytes n'ait été mise en évidence après irradiation, nous avons tout de même observé des altérations de leur fluidité membranaire après irradiation. Nous avons donc émis l'hypothèse du rôle prépondérant du cholestérol et la production radio-induite d'oxystérols dans la modulation des propriétés biophysiques de la membrane des lymphocytes. En outre, nos résultats indiquent que les atteintes des propriétés biophysiques de la membrane des lymphocytes s'amplifient au fur et à mesure que les cellules progressent dans le processus apoptotique. Ces altérations se localisaient tout d'abord au centre de la bicouche pour ensuite atteindre l'ensemble de la région hydrocarbonée. De plus, nos études montrent que les modifications des propriétés biophysiques

de la membrane sont spécifiques de l'apoptose radio-induite. Ces résultats confortent l'importance du rôle des dommages membranaires (biochimiques et biophysiques) dans les processus de mort cellulaire radio-induite. Ainsi, ces études *in vitro* mettent en évidence que la membrane cellulaire est une cible sensible des radiations ionisantes qui joue un rôle primordial dans le développement des dommages cellulaires.

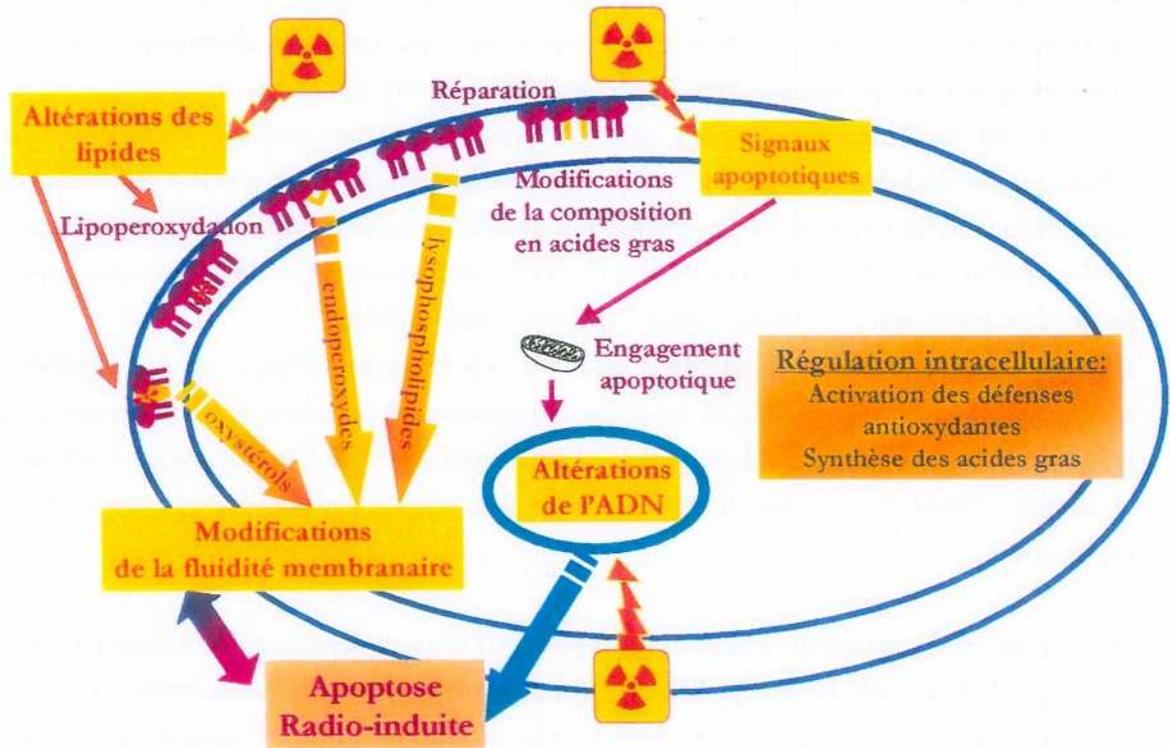


Figure 58 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans les études *in vitro*.

I.3.2. Dosage de la vitamine E plasmatique

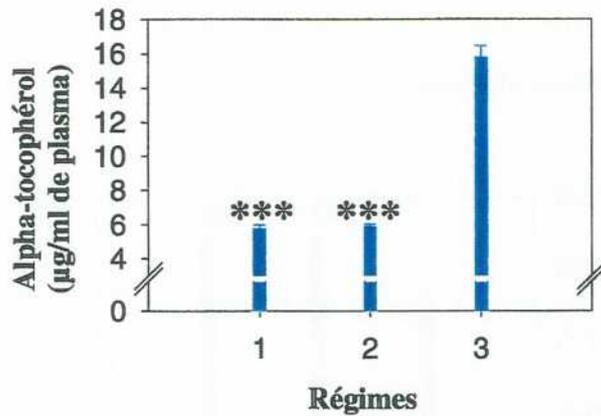


Figure 60 : Effet des régimes sur la concentration plasmatique en vitamine E des échantillons sanguins provenant d'animaux témoins. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 24 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport au régime 3, *** $p < 0,001$.

Les régimes modifient la concentration plasmatique en α -tocophérol conformément à la teneur en vitamine E des différents régimes élaborés. La concentration plasmatique en α -tocophérol des animaux nourris avec le régime 1 et 2 est inférieure respectivement de 63,5 % ($p < 0,001$) et de 63 % ($p < 0,001$) à celle obtenue pour les rats ayant suivi le régime 3 (figure 60). Par ailleurs, la concentration plasmatique en α -tocophérol des animaux qui ont suivi le régime 1 ($5,75 \pm 0,2$) et 2 ($5,83 \pm 0,18$) est la même.

I.3.3. Résultats obtenus sur les hématies

I.3.3.1. Numération cellulaire

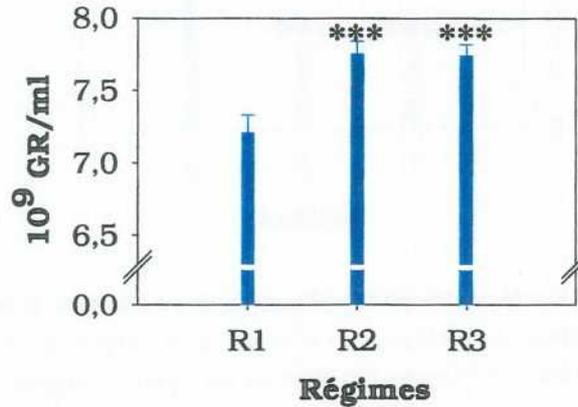


Figure 61 : Effet des régimes sur la concentration en hématies des échantillons sanguins provenant d'animaux témoins. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 24 observations indépendantes. Différences significatives par rapport au régime 1, *** $p < 0,001$.

Les régimes modifient le nombre de globules rouges présents dans le sang. La concentration sanguine en hématies des animaux nourris avec le régime 2 et 3 est supérieure respectivement de 7,5 % ($p = 0,001$) et de 7,4 % ($p < 0,001$) à celle obtenue pour les rats ayant suivi le régime 1 (figure 61).

I.3.3.2. Fluidité membranaire

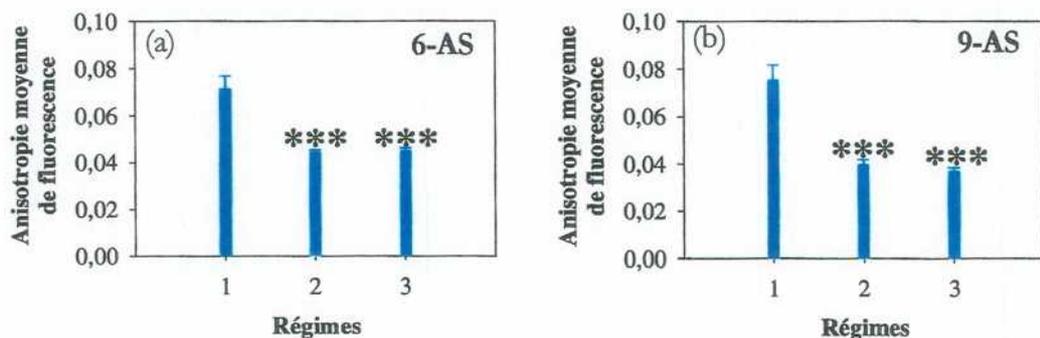


Figure 62 : Effet des régimes sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6-AS (a) et du 9-AS (b) incorporé dans les membranes d'hématies d'échantillons sanguins provenant de rats témoins. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 24 observations indépendantes. Différences significatives par rapport au régime 1, *** $p < 0,001$.

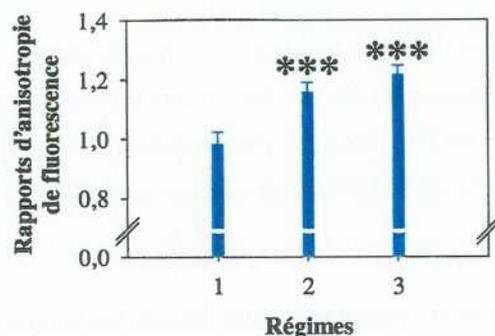


Figure 63 : Effet des régimes sur les valeurs du rapport d'anisotropie de fluorescence $\langle r \rangle_{6-AS} / \langle r \rangle_{9-AS}$ dans les membranes d'hématies d'échantillons sanguins provenant de rats témoins. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 24 observations indépendantes. Différences significatives par rapport au régime 1, *** $p < 0,001$.

Nous constatons que les régimes modifient la fluidité membranaire des hématies. Les valeurs d'anisotropie du 6-AS des animaux nourris avec les régimes 2 et 3 sont inférieures respectivement de 38,2 % ($p < 0,001$) et de 37,5 % ($p < 0,001$) à celles obtenues pour les rats ayant suivi le régime 1 (figure 62a). Des résultats similaires sont observés lorsque la fluidité membranaire est mesurée en incorporant le 9-AS dans les membranes d'hématies (figure 62b).

Le calcul du rapport d'anisotropie de fluorescence du 6-AS/9-AS (figure 63) confirme les résultats précédents (figure 62). Ses valeurs augmentent de 17,8 % ($p < 0,001$) et de 23,9 % ($p < 0,001$) respectivement pour les régimes 2 et 3 en comparaison de celles mesurées pour les animaux nourris avec le régime 1.

I.3.3.3. Composition en phospholipides membranaires

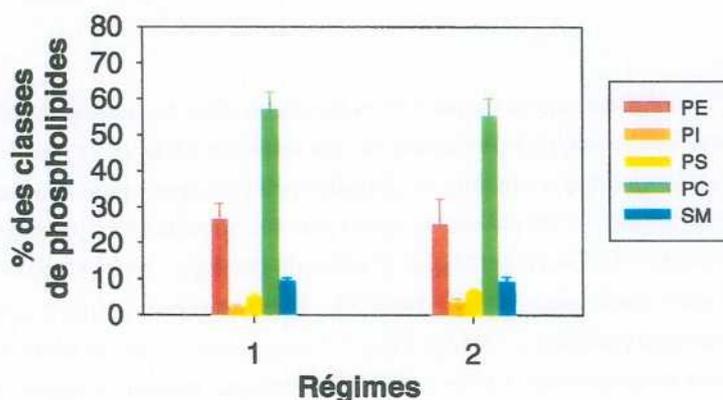


Figure 64 : Effet des régimes sur la composition en phospholipides des membranes d'hématies d'échantillons sanguins provenant de rats témoins. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 5 à 9 expériences indépendantes.

Les régimes ne modifient pas la composition en phospholipides des membranes d'hématies (figure 64). Quel que soit le régime, la classe des phospholipides la plus représentée est celle des PC (56,8 %). Les proportions de PE (26,5 %) sont supérieures à celles obtenues pour les SM (9,3 %). Par ailleurs, la classe des phospholipides minoritaire est celle des PI (2,1 %).

I.3.3.4. Composition en acides gras membranaires totaux

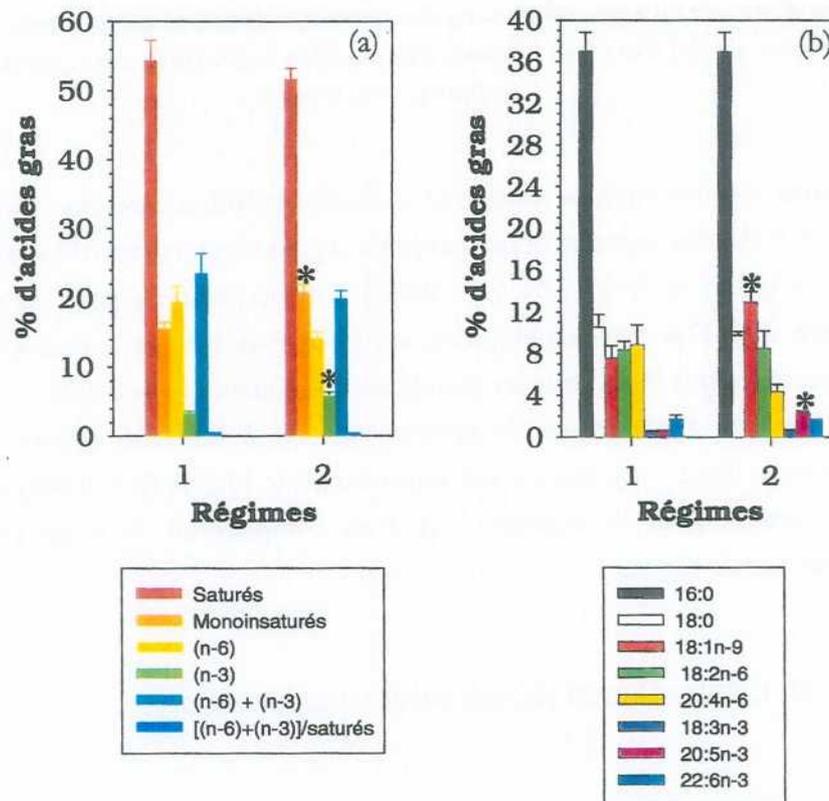


Figure 65 : Effet des régimes sur la composition en acides gras des phospholipides des membranes d'hématies d'échantillons sanguins provenant de rats témoins. La figure (a) représente la proportion des principales classes d'acides gras qui constituent les phospholipides des membranes d'hématies de rats témoins. La figure (b) représente la proportion des principaux acides gras qui constituent les phospholipides des membranes d'hématies de rats témoins (16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 5 à 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport au régime 1, * $p < 0,05$.

Les régimes modifient la composition en acides gras totaux des membranes d'érythrocytes (figure 65).

Les phospholipides des membranes d'hématies de rats nourris avec le régime 1 sont constitués majoritairement d'acides gras saturés car les valeurs du rapport $[(n-6) + (n-3)] / \text{Saturés}$ sont inférieures à 1. En particulier, l'acide gras le plus représenté est l'acide palmitique (40 %). D'autre part, la proportion d'acides gras polyinsaturés en (n-6) est 8,7 fois supérieure à celle en (n-3). Plus précisément, l'acide gras polyinsaturé prépondérant est l'acide arachidonique (8,8 %). Son pourcentage est 18 et 5,2 fois supérieur à celui mesuré respectivement pour l'EPA et le DHA.

En comparaison des résultats obtenus avec le régime 1, les pourcentages d'acides gras monoinsaturés et d'acides gras polyinsaturés en (n-3) mesurés pour le régime 2 sont supérieurs respectivement de 33,1 % ($p = 0,029$) et de 77,4 % ($p = 0,029$) (figure 65a). Plus spécifiquement, ces résultats se traduisent par des proportions d'acide oléique et d'EPA plus importantes respectivement de 71,1 % ($p = 0,029$) et de 375,5 % ($p = 0,016$) (figure 65b).

I.3.3.5. Composition en acides gras de chaque classe de phospholipides

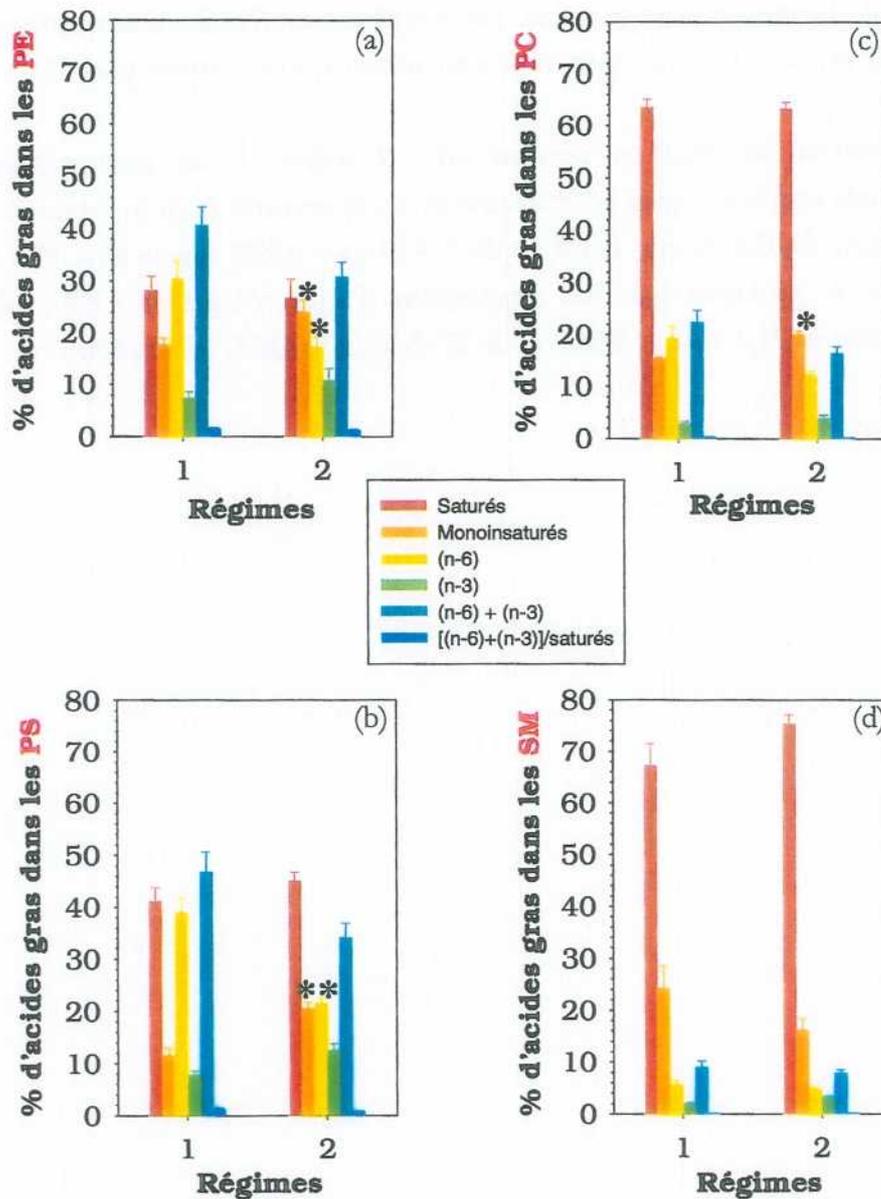


Figure 66 : Effet des régimes sur la composition en acides gras des principales classes de phospholipides des membranes d'hématies d'échantillons sanguins provenant de rats témoins. Les 4 figures (a), (b), (c) et (d) représentent la proportion des principales classes d'acides gras mesurés respectivement dans la classe des PE, PS, PC et SM. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 5 à 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport au régime 1, * $p < 0,05$.

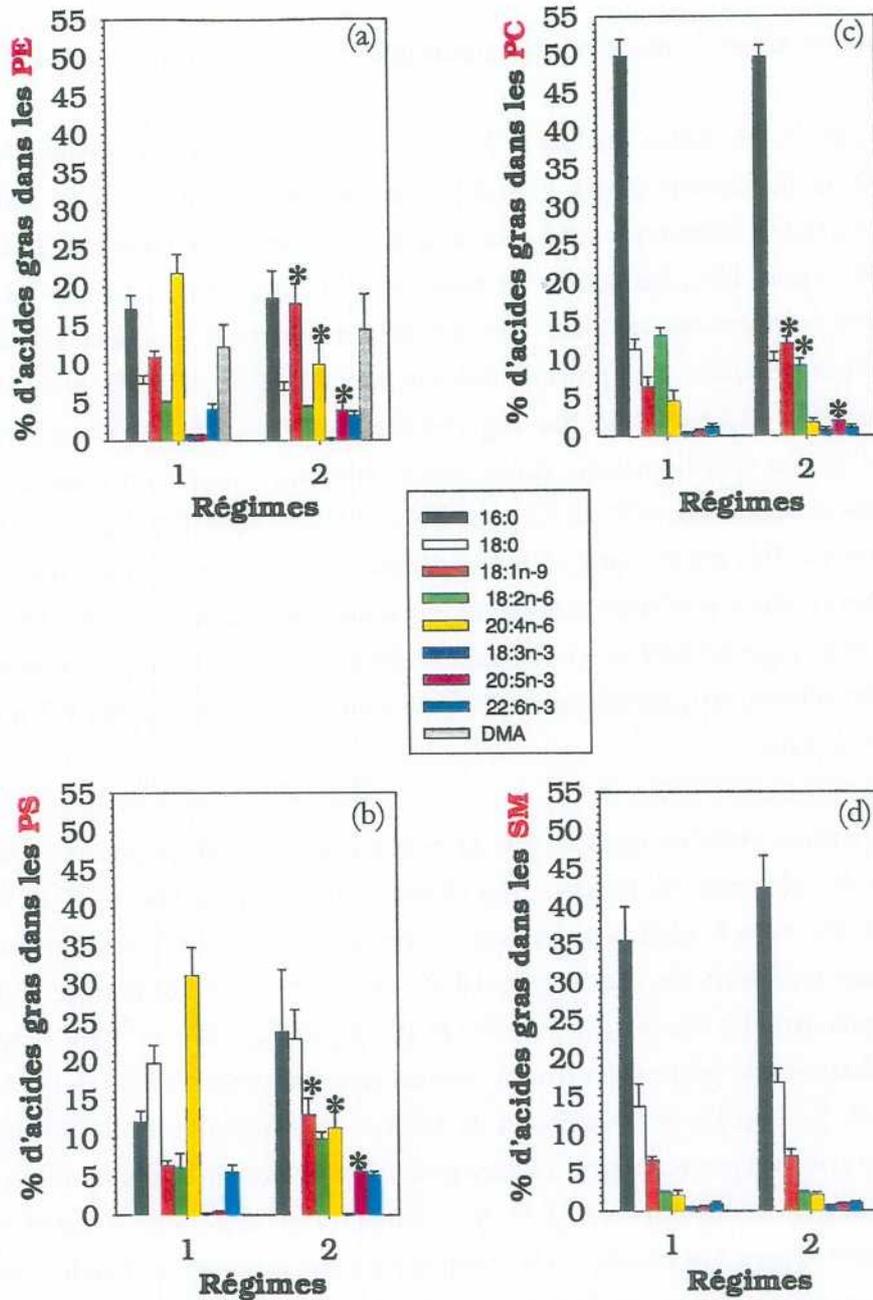


Figure 67 : Effet des régimes sur la composition des principaux acides gras des différentes classes de phospholipides des membranes d'hématies d'échantillons sanguins provenant de rats témoins. Les 4 figures (a), (b), (c) et (d) représentent la proportion des principaux acides gras mesurés respectivement dans la classe des PE, PS, PC et SM (DMA diméthyl acétal ; 16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 5 à 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport au régime 1, * $p < 0,05$

Les régimes modifient la répartition en acides gras dans les différentes classes de lipides (figure 66 et 67).

Pour le régime 1, les classes des SM et PC sont constituées majoritairement d'acides gras saturés car les valeurs du rapport $[(n-6) + (n-3)] / \text{Saturés}$ dans ces classes sont inférieures à 1. Plus précisément, l'acide palmitique est l'acide gras le plus représenté dans ces classes (49,67 % pour PC et 35,44 % pour SM). Par contre, les classes des PE et des PS sont composées principalement d'acides gras polyinsaturés car pour ces classes ce rapport est supérieur à 1. Elles comportent principalement des acides gras polyinsaturés en (n-6) (30,52 % pour PE et 39,11 % pour PS) car leur proportion est 4,2 fois et 5,1 fois supérieure respectivement pour PE et PS à celles obtenues pour les (n-3). Plus spécifiquement, l'acide gras polyinsaturé majoritaire dans les classes des PE et PS est l'acide arachidonique (21,68 % pour PE et 31,1 % pour PS). En effet, son pourcentage, dans la classe des PE, est 33,9 et 5,41 fois supérieur à celui obtenu respectivement pour l'EPA et le DHA. Des résultats similaires sont également observés pour la classe des PS où la proportion d'acide arachidonique est 69,1 et 5,6 fois supérieure à celle mesurée respectivement pour l'EPA et le DHA. Par ailleurs, les plasmalogènes (DMA) sont caractéristiques des PE membranaires des érythrocytes de rats.

Cependant, aucune variation significative du pourcentage des acides gras mesurés dans la classe des SM n'a été observée en fonction des régimes suivis (figure 66d et 67d). Par rapport aux animaux qui ont suivi le régime 1, les rats nourris avec le régime 2 ont des taux d'acides gras monoinsaturés supérieurs de 35,6 % ($p = 0,038$), de 31,5 % ($p = 0,016$) et de 77,4 % ($p = 0,036$) respectivement dans les classes des PE, PC et PS (figure 66a, 66c et 66b). Principalement, ces résultats traduisent une proportion d'acide oléique plus importante de 64 % ($p = 0,019$) pour les PE, de 89,7 % ($p = 0,019$) pour les PC et de 100,9 % ($p = 0,032$) pour les PS (figure 67a, 67c et 67b). D'autre part, les pourcentages d'acides gras en (n-6) obtenus dans les classes des PE et PS sont inférieurs respectivement de 43,1 % ($p = 0,036$) et de 44,6 % ($p = 0,029$) à ceux mesurés pour le régime 1 (figure 66a et 66b). Cela correspond à une proportion d'acide arachidonique plus faible dans ces mêmes classes (de 54,6 % ($p = 0,016$) pour les PE et de 63,5 % ($p = 0,029$) pour les PS) (figure 67a et 67b). Parallèlement, nous constatons que le pourcentage d'EPA est supérieur dans les classes de PE, PC et PS (de 493,8 % ($p = 0,016$) pour les PE, de 268,6 % ($p = 0,038$) pour les PC et de 1137,8 % ($p = 0,036$) pour les PS) (figure 67a, 67c et 67b). Par ailleurs, uniquement dans la classe des PC, le taux d'acide linoléique est supérieur à celui obtenu pour le régime 1 (de 30,4 % ; $p = 0,032$) (figure 67c).

I.3.4. Résultats obtenus sur les lymphocytes

La composition en lipides des membranes de lymphocytes n'a pu être analysée pour des raisons techniques. En effet, le volume de sang maximal pouvant être prélevé sur les animaux était de 10 ml. Le nombre de lymphocytes était alors insuffisant pour réaliser en parallèle les dosages de lipides et les mesures de fluidité membranaire. Nous avons donc privilégié les mesures de fluidité membranaire car c'est le sujet principal de ce travail.

I.3.4.1. Numération cellulaire

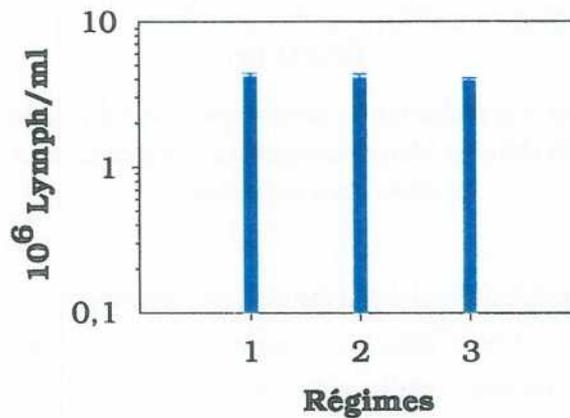


Figure 68 : Effet des régimes sur la concentration en lymphocytes des échantillons sanguins provenant d'animaux témoins. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 24 observations indépendantes.

Dans nos conditions expérimentales, les régimes n'ont pas d'effet sur la concentration sanguine en lymphocytes (figure 68). Quel que soit le régime, elle est égale à $4 \cdot 10^6$ cellules/ml.

I.3.4.2. Viabilité cellulaire

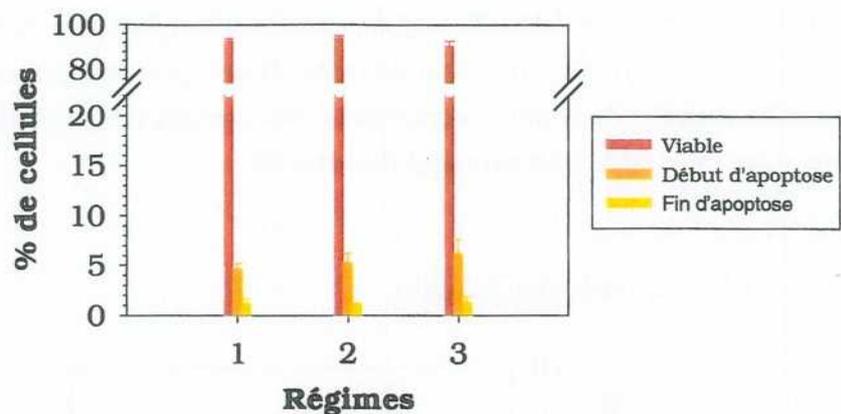


Figure 69 : Effet des régimes sur le pourcentage de lymphocytes viables, en début et en fin d'apoptose dans les échantillons sanguins de rats témoins. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 18 observations indépendantes.

Dans nos conditions expérimentales, les régimes ne modifient pas les pourcentages de lymphocytes viables, en début et en fin d'apoptose (figure 69). Ces pourcentages sont compris entre 90,4 et 93,8 pour les lymphocytes viables, entre 4,7 et 6,2 pour les lymphocytes en début d'apoptose et entre 1,1 et 1,3 pour les lymphocytes en fin d'apoptose.

I.3.4.3. Fluidité membranaire

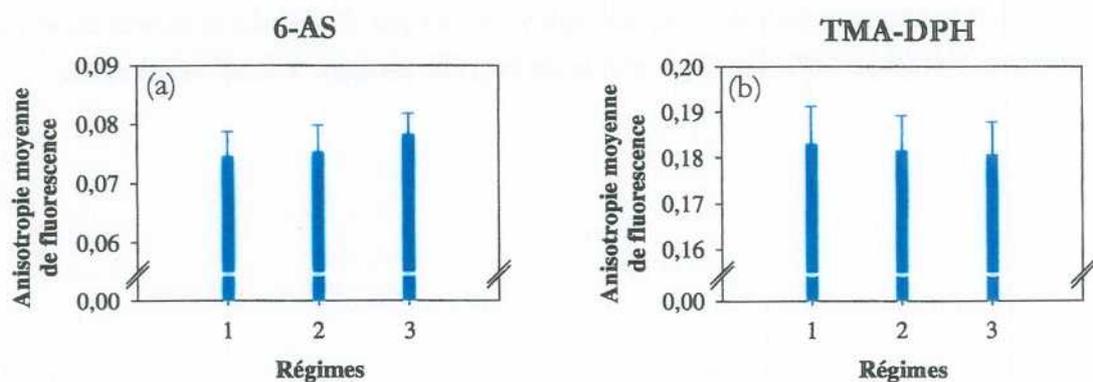


Figure 70 : Effet des régimes sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6-AS (a) et du TMA-DPH (b) incorporés dans les membranes de lymphocytes d'échantillons sanguins provenant de rats témoins. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 10 observations indépendantes.

Dans nos conditions expérimentales, les régimes n'ont pas d'effet sur la fluidité membranaire des lymphocytes, quel que soit la sonde utilisée (figure 70). Les valeurs d'anisotropie de fluorescence

du 6-AS et du TMA-DPH sont respectivement comprises entre 0,074 et 0,078 et entre 0,180 et 0,183.

I.3.4.4. Fluidité membranaire des différents états de viabilité cellulaire

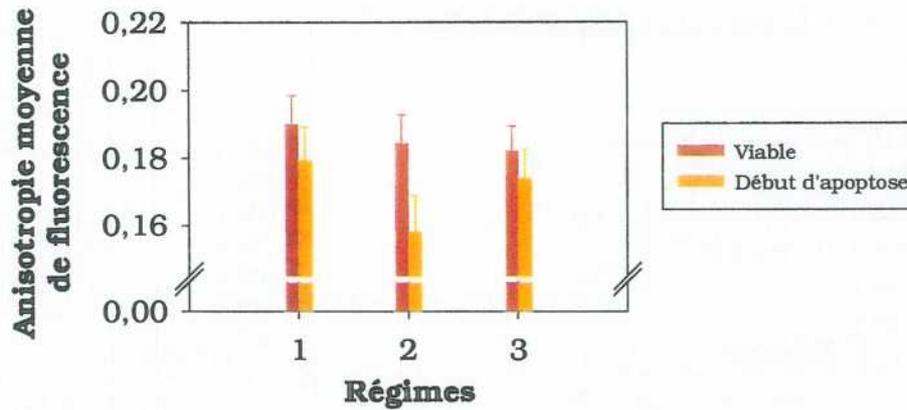


Figure 71 : Effet des régimes sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH incorporé dans les membranes de lymphocytes d'échantillons sanguins provenant de rats témoins en fonction des différents états de viabilité cellulaire. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 18 observations indépendantes.

Nous constatons que les régimes ne modifient pas la fluidité membranaire des lymphocytes viables et en début d'apoptose (figure 71). Les valeurs d'anisotropie du TMA-DPH sont comprises entre 0,182 et 0,190 pour les cellules viables et entre 0,158 et 0,179 pour les cellules en début d'apoptose. Quel que soit le régime, les valeurs d'anisotropie du TMA-DPH mesurées dans les lymphocytes en début d'apoptose sont inférieures à celles obtenues pour les lymphocytes viables, mais cette diminution est non significative.

I.4. Effets de l'irradiation sur les animaux

I.4.1. Croissance et prise alimentaire

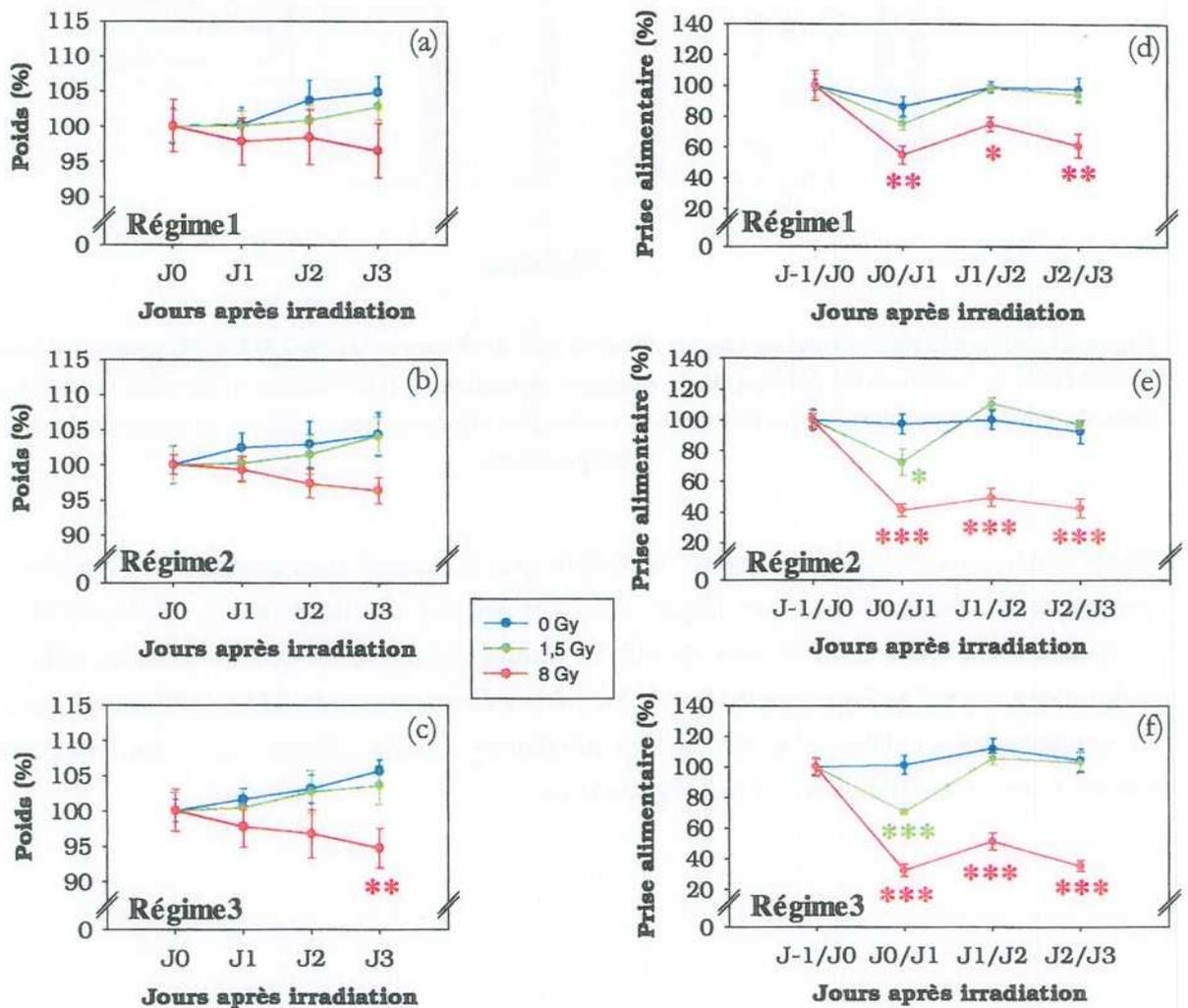


Figure 72 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur la croissance et la prise alimentaire des animaux. Les animaux ont été irradiés corps entier aux doses de 1,5 et 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Le poids et la prise alimentaire des animaux ayant été nourris avec le régime 1 (a et d), 2 (b et e) et 3 (c et f), ont été suivis avant et 3 jours après irradiation. Les points bleus, rouges et verts résultent des valeurs moyennes \pm SEM de 5 à 7 observations indépendantes. Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Quel que soit le régime suivi, les animaux exposés à une dose de 1,5 Gy diminuent leur prise alimentaire uniquement un jour après irradiation (figure 72d à 72f). Nous constatons que cette baisse est plus importante pour les animaux ayant suivi les régimes 2 et 3 en comparaison de ceux ayant suivi le régime 1 (12,8 %, 25,6 % $p = 0,048$ et 30,2 % $p = 0,001$ respectivement pour les régimes 1, 2 et 3). Mais cela n'a aucun effet sur la croissance des rats qui est comparable à celle obtenue pour les animaux non irradiés (figure 72a à 72c).

Lorsque la dose délivrée est de 8 Gy, la chute de la prise alimentaire observée dès le premier jour après irradiation persiste jusqu'au troisième jour (figure 72d à 72f). Mais cette diminution est plus marquée pour les régimes 2 et 3 (pour J2/J3 : 37,8 % $p = 0,009$, 54,1 % $p < 0,001$ et 66,2 % $p < 0,001$ respectivement pour les régimes 1, 2 et 3). Cette baisse de la prise alimentaire est corrélée à une diminution de la croissance des animaux qui se manifeste dès J1 et continue à décroître jusqu'à J3 (figure 72a à 72c).

I.4.2. Dosage de la vitamine E plasmatique

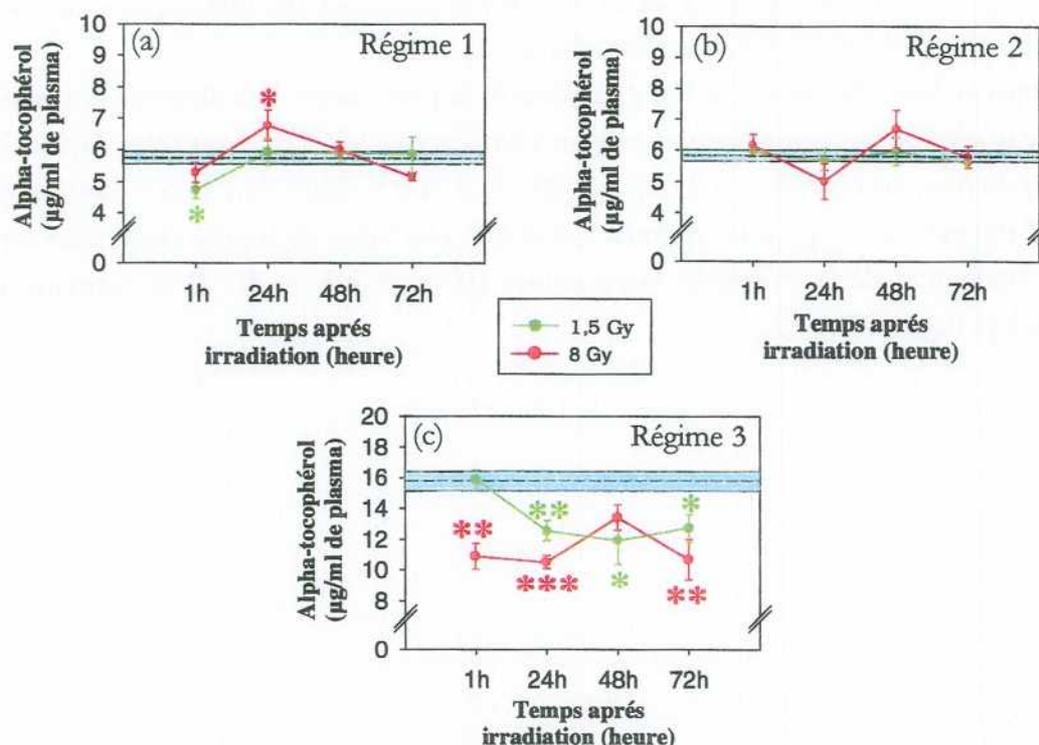


Figure 73 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur la concentration plasmatique en vitamine E. Les animaux ont été irradiés corps entier aux doses de 1,5 et 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures d' α -tocophérol ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a), le régime 2 (b) et le régime 3 (c). Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) d'au moins 24 observations indépendantes. Les points rouges et verts résultent de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 6 observations indépendantes. Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Des variations de la concentration plasmatique en α -tocophérol après irradiation sont observables uniquement pour les régimes 1 et 3 (figure 73). De plus, ces modifications radio-induites sont plus importantes pour le régime 3 qui comporte le plus grand taux de vitamine E (200 mg/kg).

Pour le régime 1, les animaux irradiés à une dose de 1,5 Gy présentent une diminution du taux d' α -tocophérol uniquement la première heure après irradiation (17,9 % ; $p = 0,019$) (figure 73a). Par contre, lorsque la dose délivrée est de 8 Gy, seule une augmentation de la concentration plasmatique en vitamine E est observable 24 heures après irradiation (17,7 % ; $p = 0,035$).

Pour le régime 3, nous constatons une diminution du taux de vitamine E qui est d'autant plus importante et plus précoce que la dose est plus forte (figure 73c). Ce taux chute dès 24 heures après une dose de 1,5 Gy et se stabilise jusqu'à 72 heures (19,3 % ; $p = 0,041$). Les animaux irradiés à une dose de 8 Gy diminuent leur concentration plasmatique en α -tocophérol dès la première heure (31,1 % ; $p = 0,002$). Cette baisse persiste jusqu'à 24 heures et 72 heures suite à une exposition aux rayonnements ionisants (32,3 % ; $p = 0,005$).

I.4.3. Résultats obtenus sur les hématies

I.4.3.1. Numération cellulaire

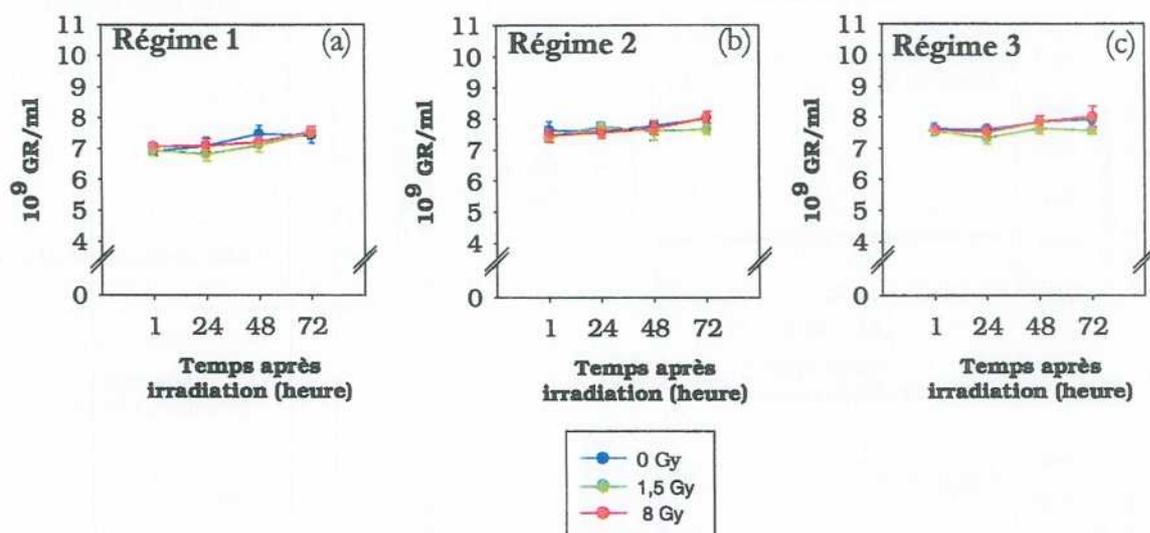


Figure 74 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur la concentration sanguine en hématies. Les animaux ont été irradiés corps entier aux doses de 1,5 et 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les numérations ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a), le régime 2 (b) et le régime 3 (c). Chaque point représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes.

Comme attendu, compte tenu de la durée de vie des hématies, aucune variation significative de la concentration sanguine en hématies n'a été observée après irradiation quel que soit le régime suivi (figure 74).

I.4.3.2. Fluidité membranaire

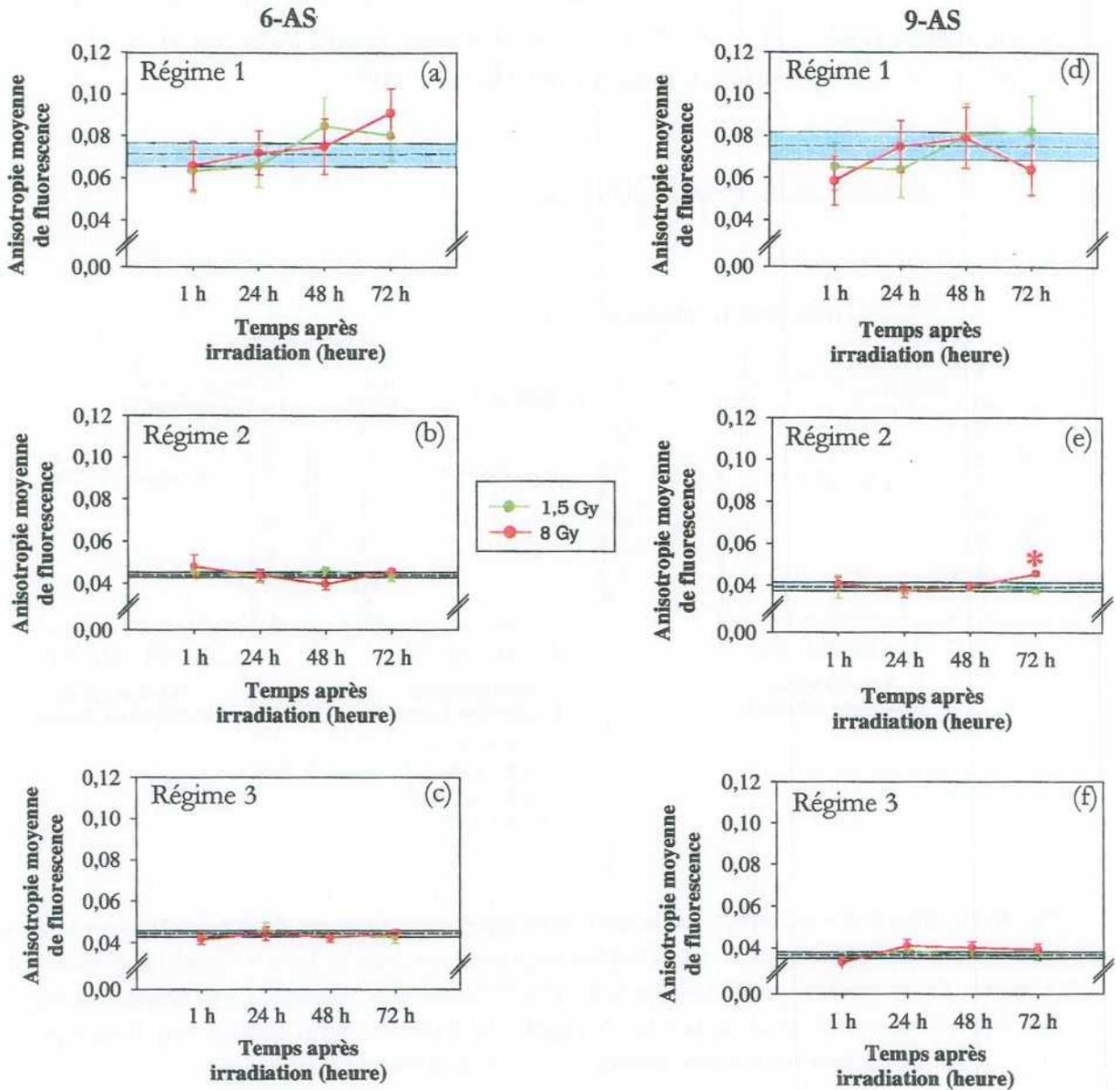


Figure 75 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6-AS (a, b et c) et du 9-AS (d, e et f) incorporés dans les membranes d'hématies. Les animaux ont été irradiés corps entier aux doses de 1,5 et 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min.

Les mesures ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a, d), le régime 2 (b, e) et le régime 3 (c, f). Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 24 observations indépendantes. Les points rouges et verts résultent de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 6 observations indépendantes. Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$.

Dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative des valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6-AS et du 9-AS n'a pu être observée après une exposition aux rayonnements ionisants, quel que soit le régime suivi (figure 75).

L'expression des résultats sous forme du rapport d'anisotropie 6-AS/9-AS permet d'estimer localement le gradient de fluidité membranaire existant dans la bicouche lipidique (figure 76).

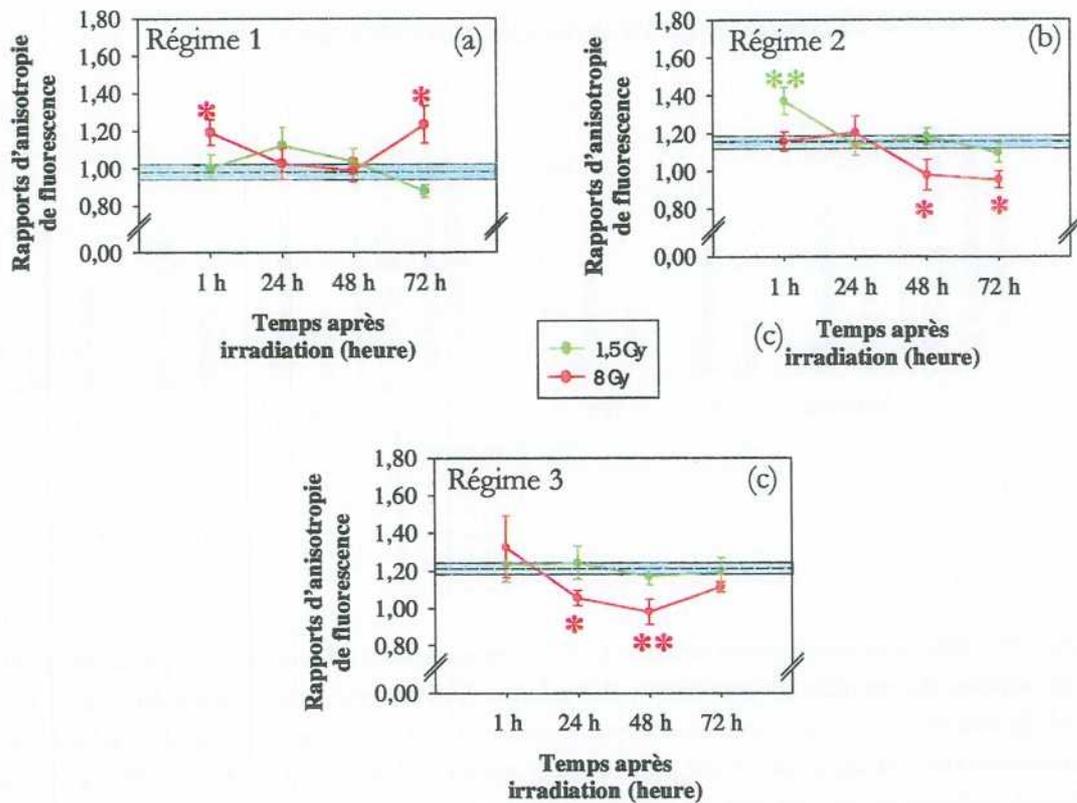


Figure 76 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur les valeurs du rapport d'anisotropie de fluorescence $\langle r \rangle_{6\text{-AS}} / \langle r \rangle_{9\text{-AS}}$ incorporés dans les membranes d'hématies. Les animaux ont été irradiés corps entier aux doses de 1,5 et 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a), le régime 2 (b) et le régime 3 (c). Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 24 observations indépendantes.

Les points rouges et verts résultent de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 6 observations indépendantes.

Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Dans ce cas, des modifications du gradient de fluidité membranaire peuvent être observées après irradiation lorsque les animaux ont été exposés à une dose de 8 Gy, quel que soit le régime suivi (figure 76). D'autre part ces variations sont différentes selon le régime considéré.

En effet, pour le régime 1, les valeurs du rapport 6-AS/9-AS augmentent 1 heure et 72 heures après irradiation (21,7 % $p = 0,03$ et 25,7 % $p = 0,023$ respectivement pour 1 heure et 72 heures)

(figure 76a). Par contre, pour les régimes 2 et 3, les valeurs du rapport 6-AS/9-AS diminuent après une exposition à une dose de 8 Gy : elles chutent 48 heures après irradiation et cette baisse persiste jusqu'à 72 heures (17,6 % ; $p = 0,018$) pour les animaux nourris avec le régime 2 (figure 76b) ; pour les rats ayant suivi le régime 3, cette diminution est plus précoce (24 heures après irradiation) et se maintient jusqu'à 48 heures (19,3 % ; $p = 0,002$) (figure 76c).

I.4.3.3. Composition en phospholipides membranaires

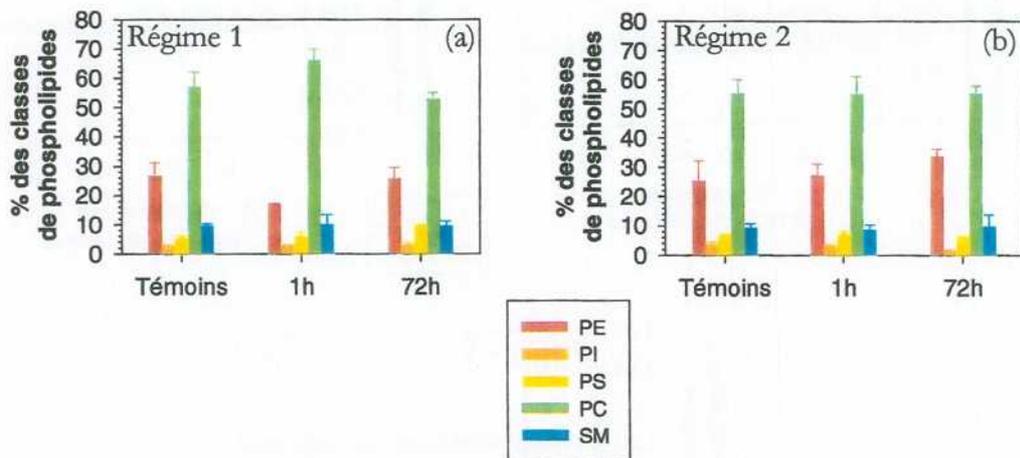


Figure 77 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur la composition en phospholipides des membranes d'hématies. Les animaux ont été irradiés corps entier à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a) et le régime 2 (b). Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 5 à 9 expériences indépendantes.

Aucune variation significative des pourcentages des différentes classes de phospholipides n'a été constatée après irradiation, quel que soit le régime suivi (figure 77).

I.4.3.4. Composition en acides gras membranaires totaux

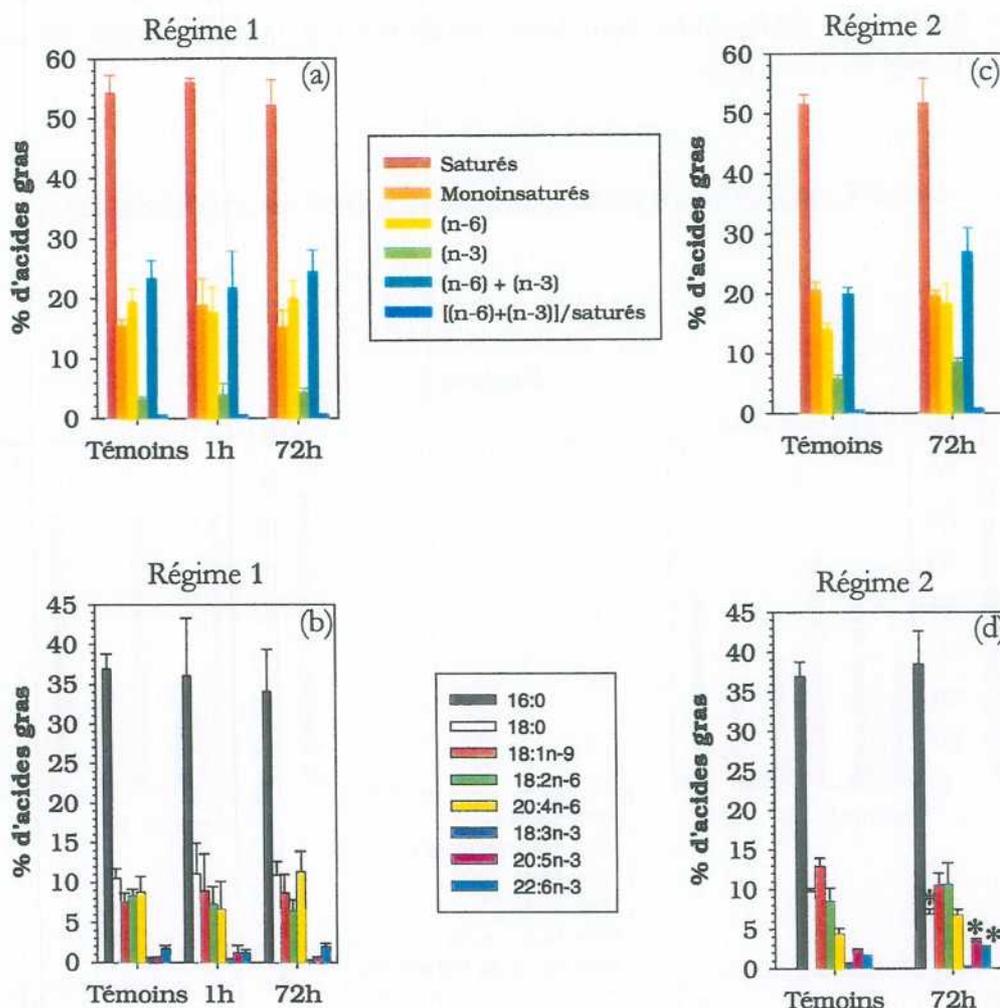


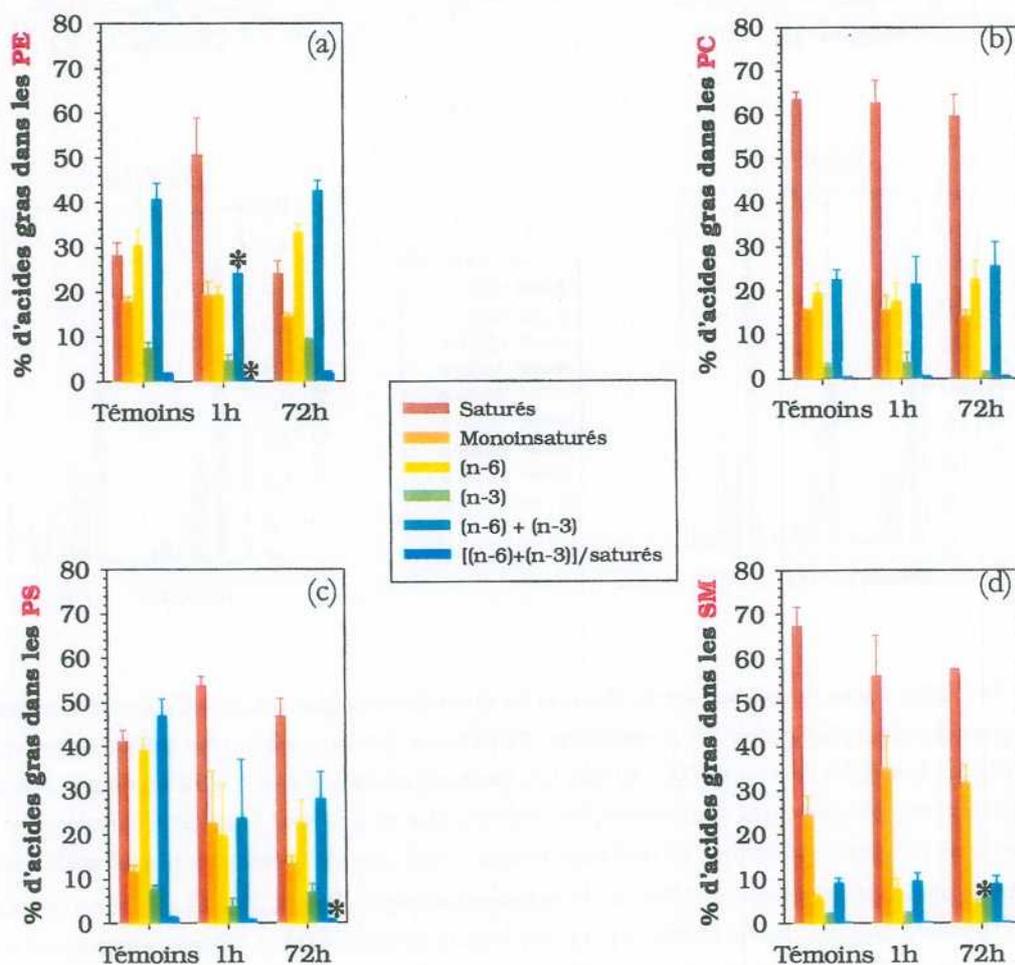
Figure 78 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur la composition en acides gras des phospholipides des membranes d'hématies. Les animaux ont été irradiés corps entier à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a et b) et le régime 2 (c et d) (16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 5 à 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux témoins (0 Gy) * $p < 0,05$.

De même, aucune variation significative de la proportion des différentes classes d'acides gras n'a été observée après irradiation (figure 78a et 78c). Cependant, lorsque nous considérons la composition en acides gras particuliers (figure 78b et 78d), nous remarquons des modifications de

leur pourcentage 72 heures après irradiation, uniquement pour le régime 2 (figure 78d). En effet, les proportions d'EPA et de DHA augmentent respectivement de 45,5 % ($p = 0,029$) et de 57,5 % ($p = 0,029$). Ces déséquilibres sont alors compensés par une diminution du taux d'acide stéarique de 29,6 % ($p = 0,029$).

I.4.3.5. Composition en acides gras de chaque classe de phospholipides

Régime 1



Régime 2

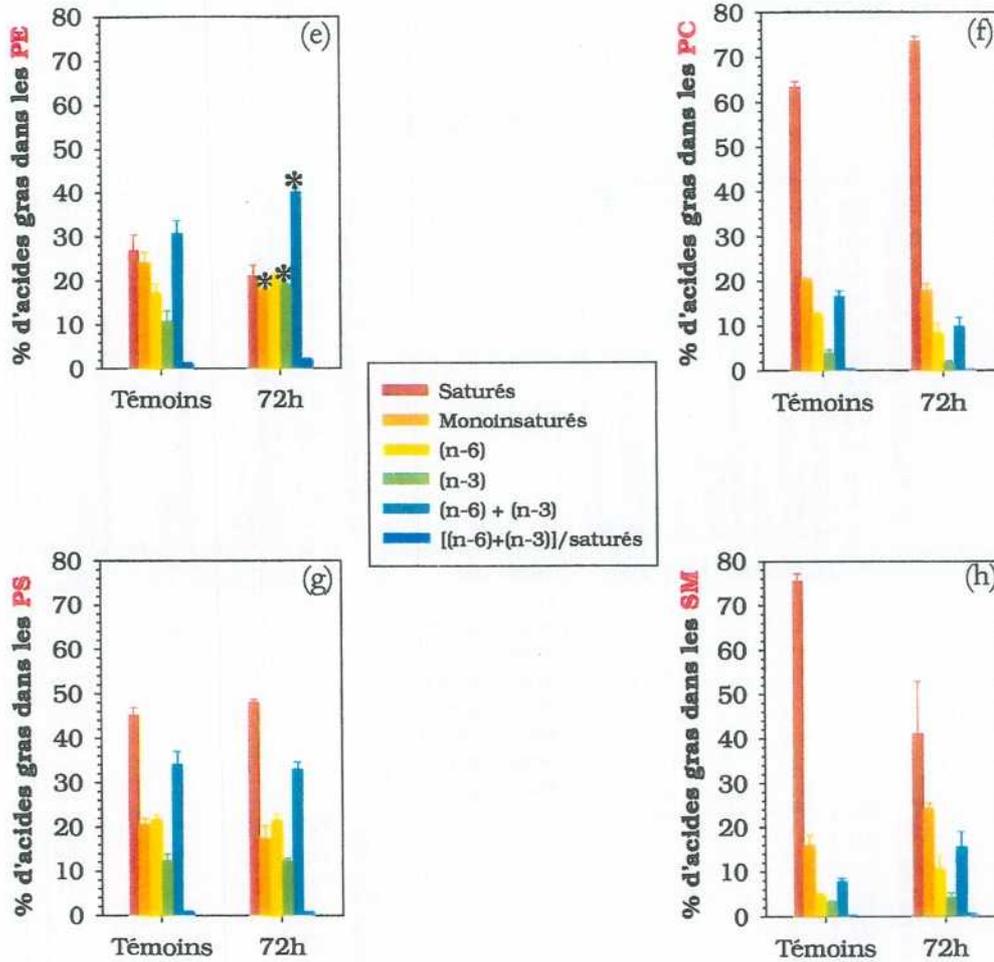
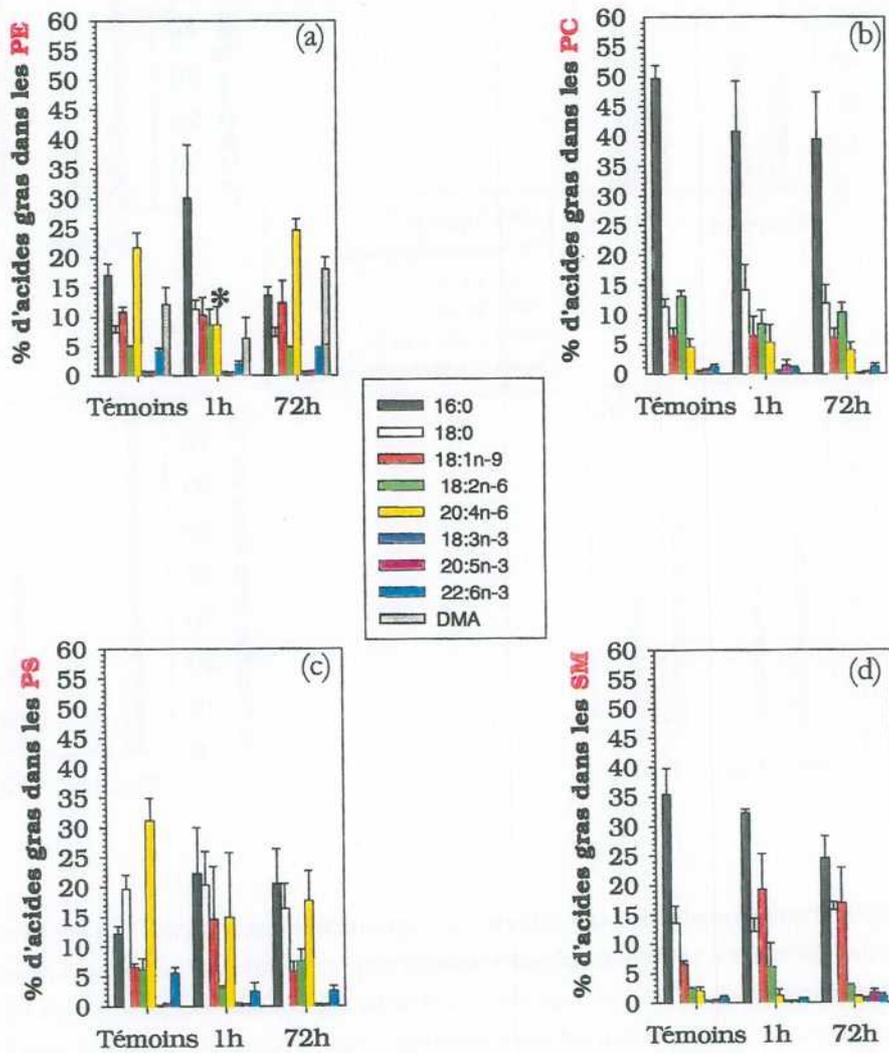


Figure 79 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides des membranes d'hématies. Les animaux ont été irradiés corps entier à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a, b, c et d) et le régime 2 (e, f, g et h). Les 8 figures (a et e), (b et f), (c et g) et (d et h) représentent la proportion des principales classes d'acides gras mesurés respectivement dans la classe des PE, PS, PC et SM. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 5 à 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux témoins (0 Gy) * $p < 0,05$.

Régime 1



Régime 2

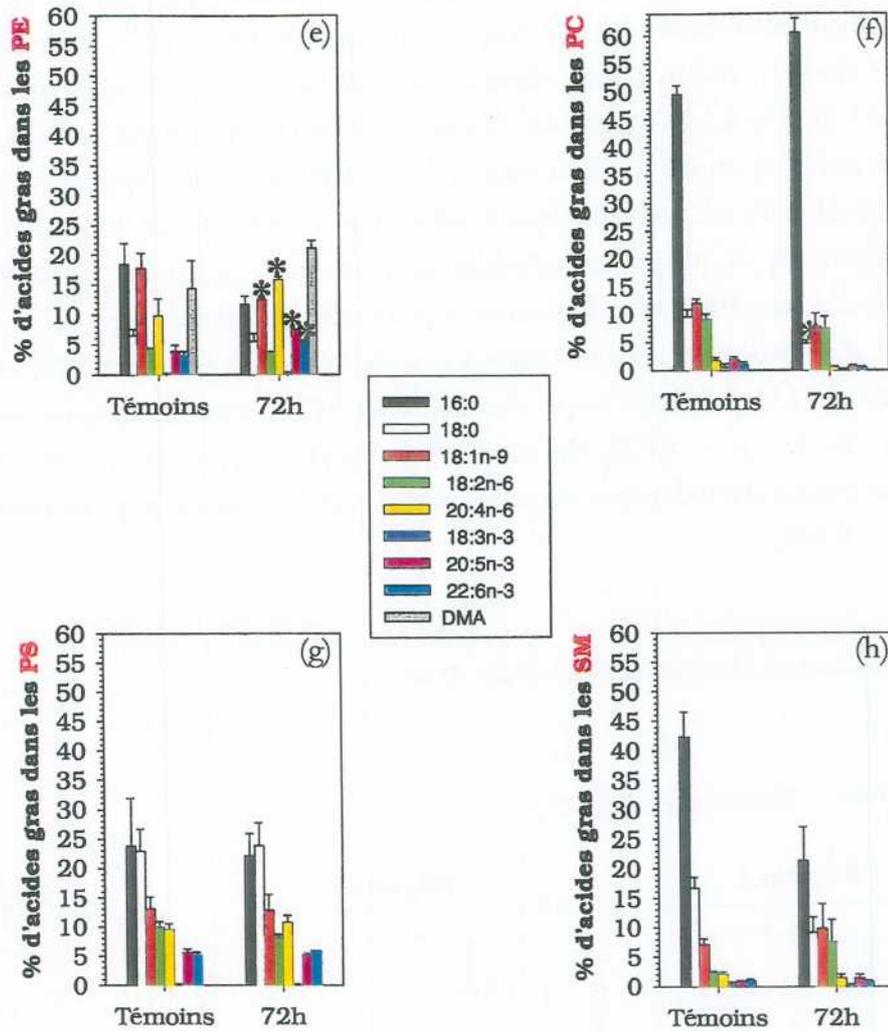


Figure 80 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur la composition des acides gras des différentes classes de phospholipides des membranes d'hématies. Les animaux ont été irradiés corps entier à une dose de 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a, b, c et d) et le régime 2 (e, f, g et h). Les 8 figures (a et e), (b et f), (c et g) et (d et h) représentent la proportion des principaux acides gras mesurés respectivement dans la classe des PE, PS, PC et SM (DMA diméthyl acétal ; 16:0 acide palmitique ; 18:0 acide stéarique ; 18:1n-9 acide oléique ; 18:2n-6 acide linoléique ; 20:4n-6 acide arachidonique (AA) ; 18:3n-3 acide α linoléique ; 20:5n-3 acide éicosapentaénoïque (EPA) ; 22:6n-3 acide docosahexaénoïque (DHA)). Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM de 5 à 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux témoins (0 Gy) * $p < 0,05$.

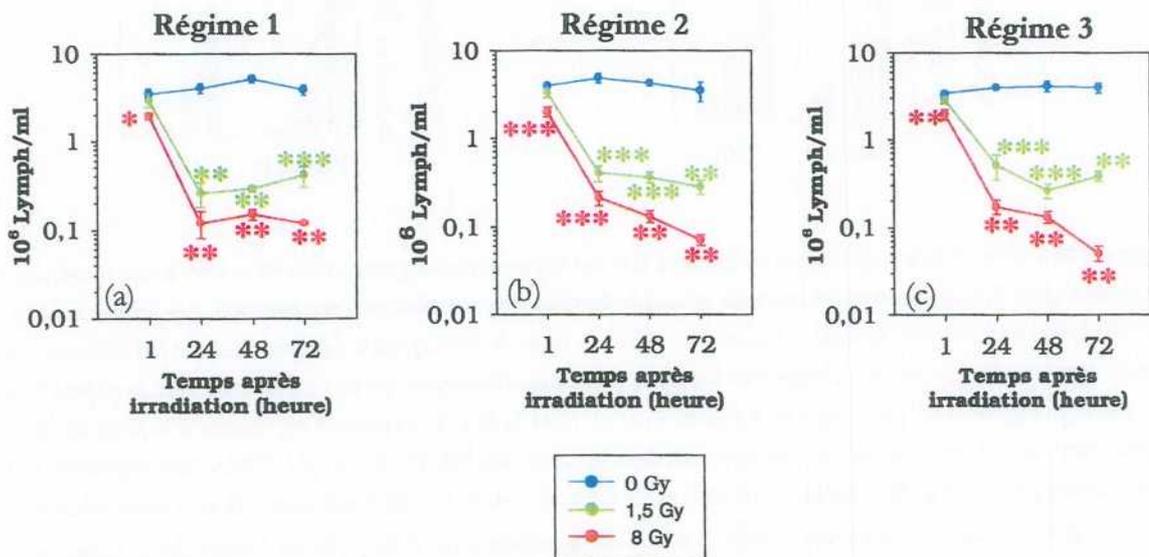
Nous constatons des variations de la composition en acides gras après irradiation principalement dans la classe des PE, quel que soit le régime suivi (figure 79 et 80).

Les animaux nourris avec le régime 1 présente des modifications de leur composition en acides gras uniquement dans l'heure qui suit l'exposition aux rayonnements ionisants (figure 79a et 80a). Le rapport $[(n-6) + (n-3)]/\text{Saturés}$ diminue de 66,2 % ($p = 0,036$) pour atteindre une valeur inférieure à 1 ($0,52 \pm 0,14$) (figure 79a). Ces résultats sont confirmés par la chute du taux d'acides gras polyinsaturés en (n-6) + (n-3) de 40,8 % ($p = 0,036$). Plus spécifiquement, cela se traduit par une baisse du taux d'acide arachidonique de 60,6 % ($p = 0,036$) (figure 80a).

Pour le régime 2, la proportion d'acides gras en (n-3) augmente (74,8 % ; $p = 0,029$) conjointement à une diminution du pourcentage d'acides gras monoinsaturés (26,5 % ; $p = 0,029$) (figure 79e). En particulier, nous constatons une augmentation du taux d'EPA et de DHA (95,3 % $p = 0,029$ et 79 % $p = 0,029$ respectivement pour l'EPA et le DHA) après irradiation, et une diminution (29 % ; $p = 0,029$) de la quantité d'acide oléique (figure 80e). Par ailleurs, le pourcentage d'acide arachidonique augmente aussi après l'exposition aux rayonnements ionisants (59,9 % ; $p = 0,029$).

I.4.4. Résultats obtenus sur les lymphocytes

I.4.4.1. Numération cellulaire



La diminution du nombre de lymphocytes après irradiation est d'autant plus importante et d'autant plus précoce que la dose est élevée (figure 81).

Les animaux exposés à une dose de 1,5 Gy présentent une chute de la concentration sanguine en lymphocytes dès 24 heures qui se stabilise jusqu'à 72 heures (89,4 % $p < 0,001$, 91,9 % $p = 0,002$ et 90,3 % $p = 0,002$ respectivement pour les régimes 1, 2 et 3) après irradiation, quel que soit le régime.

Lorsque la dose délivrée est de 8 Gy, quel que soit le régime suivi, nous constatons une baisse du nombre de lymphocytes dès 1 heure qui s'accroît à 24 heures (97 % $p = 0,002$, 95,6 % $p < 0,001$ et 95,7 % $p = 0,002$ respectivement pour les régimes 1, 2 et 3) et persiste jusqu'à 72 heures après irradiation. Cependant, cette diminution est plus marquée 72 heures suite à une exposition à une dose de 8 Gy pour les régimes 2 et 3 en comparaison du régime 1 (différences par rapport au régime 1 : $p = 0,008$ et $p < 0,001$ respectivement pour les régimes 2 et 3).

I.4.4.2. Viabilité cellulaire des lymphocytes

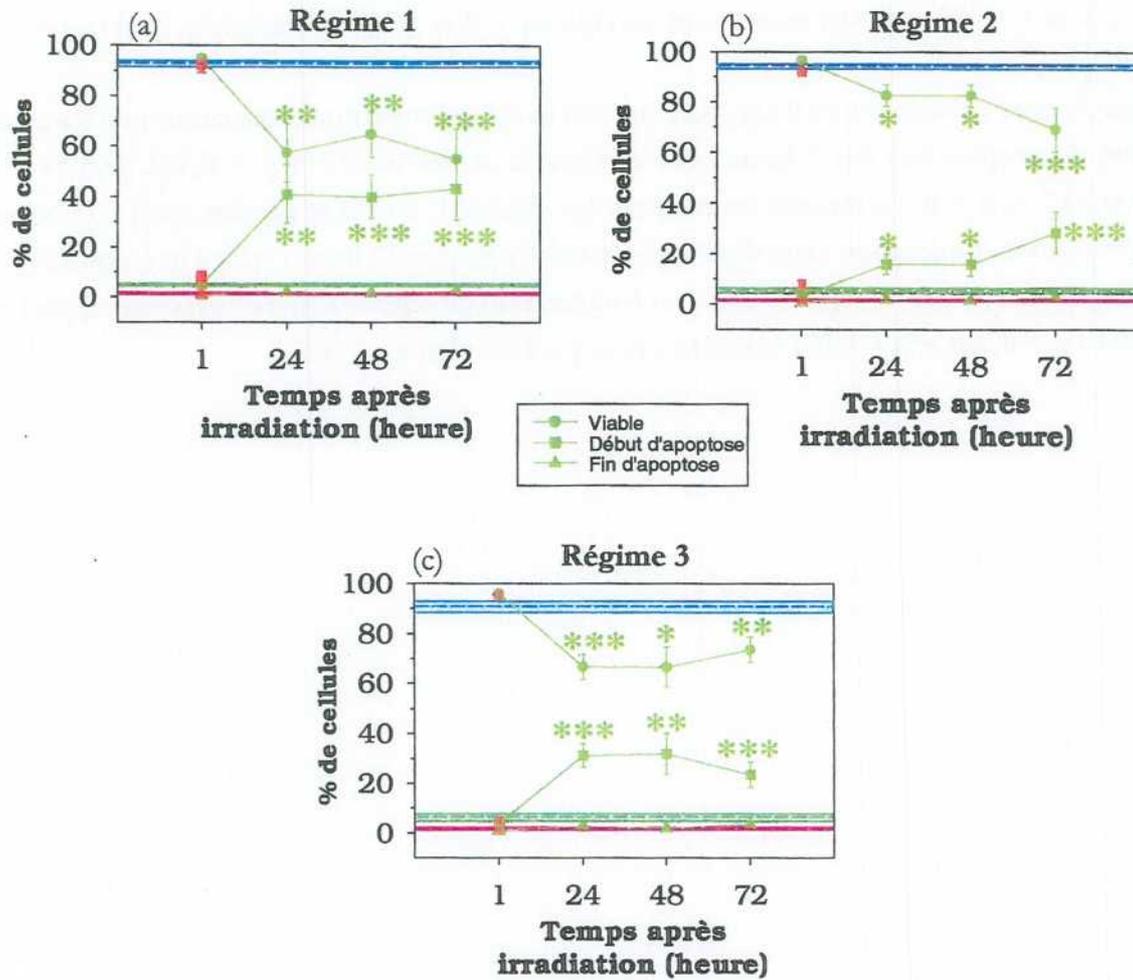


Figure 82 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur le pourcentage de lymphocytes viables, en début et en fin d'apoptose. Les animaux ont été irradiés corps entier aux doses de 1,5 et 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a), le régime 2 (b) et le régime 3 (c). Les rectangles bleus, verts et roses ont été établis à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy respectivement sur les lymphocytes viables, en début et fin d'apoptose. Ils représentent la valeur moyenne (lignes en pointillés) \pm SEM (lignes continues) d'au moins 18 observations indépendantes. Les points rouges et verts résultent de la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes réalisées respectivement pour des doses de 8 Gy et 1,5 Gy. Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Pour les animaux irradiés à une dose de 8 Gy, la discrimination des différents états de viabilité des lymphocytes n'a pu être étendue à des temps supérieurs à 1 heure, à cause de la lymphopénie. Quel que soit le régime, le pourcentage de cellules viables diminue à partir de 24 heures (de 38 % $p = 0,005$ pour le régime 1, de 12,1 % $p = 0,02$ pour le régime 2 et de 26,5 % $p < 0,001$ pour le

régime 3) et reste stable jusqu'à 72 heures après une irradiation à une dose de 1,5 Gy (figure 82). Ces résultats sont corrélés à une augmentation du nombre de lymphocytes en début d'apoptose dès 24 heures (de 777,7 % $p = 0,003$ pour le régime 1, de 195,1 % $p = 0,013$ pour le régime 2 et de 401 % $p = 0,001$ pour le régime 3) qui persiste également jusqu'à 72 heures après irradiation, quel que soit le régime suivi. Cependant, nous constatons que, suite à une exposition aux rayonnements ionisants, la baisse du pourcentage de lymphocytes viables est plus importante pour le régime 1 (figure 82a) en comparaison des résultats obtenus pour les régimes 2 et 3 (figure 82b et 82c). Réciproquement, ces observations sont aussi valables pour l'augmentation du nombre de lymphocytes en début d'apoptose.

Quant au nombre de cellules en fin d'apoptose, il ne varie pas après irradiation quel que soit le régime suivi par les animaux.

I.4.4.3. Fluidité membranaire

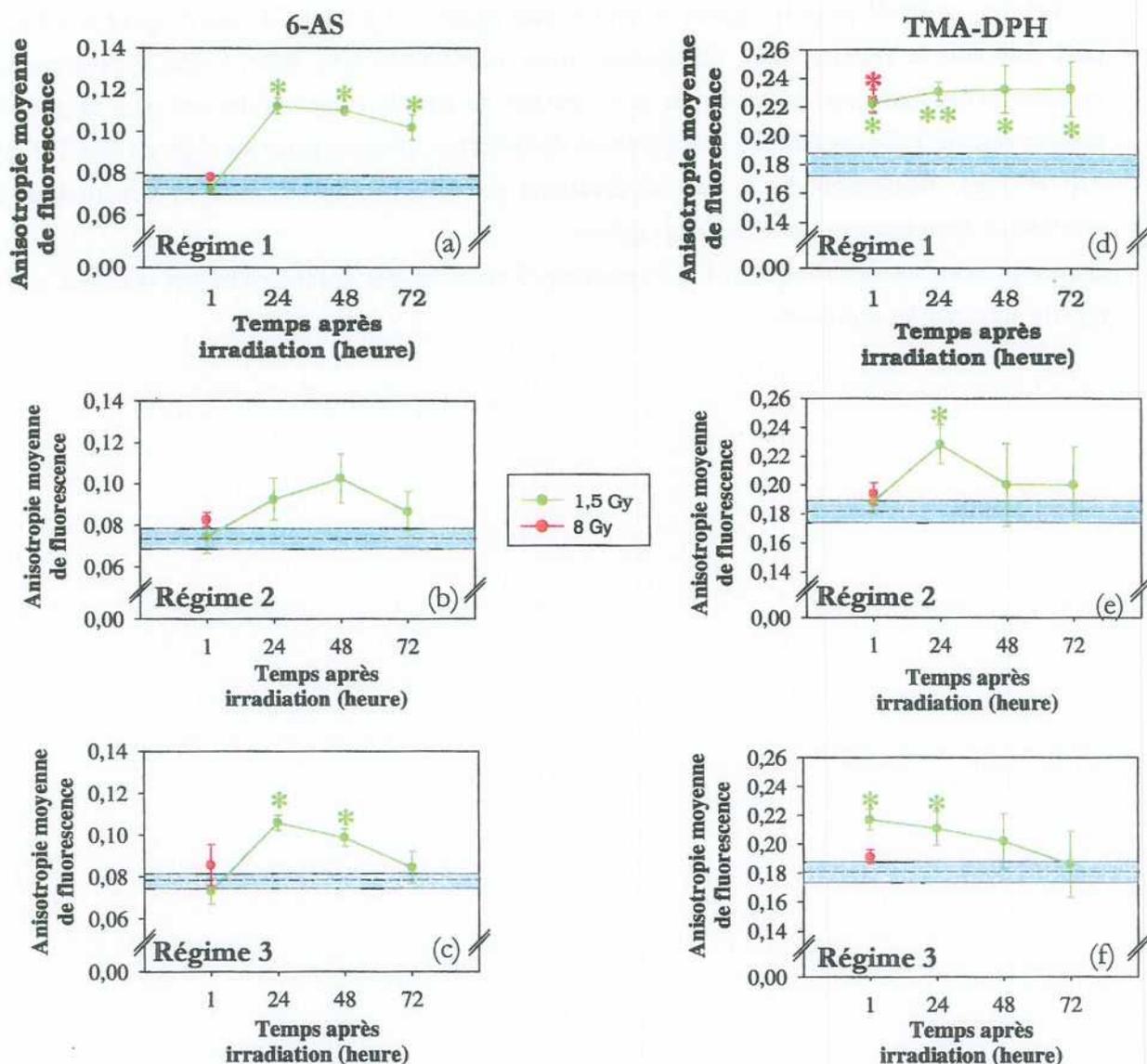


Figure 83 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6-AS (a, b et c) et du TMA-DPH (d, e et f) incorporés dans les membranes de lymphocytes. Les animaux ont été irradiés corps entier aux doses de 1,5 et 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a, d), le régime 2 (b, e) et le régime 3 (c, f). Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 24 observations indépendantes. Les points rouges et verts résultent de la valeur moyenne \pm SEM de 6 observations indépendantes. Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

L'irradiation à une dose de 1,5 Gy induit une augmentation des valeurs d'anisotropie du 6-AS et du TMA-DPH quel que soit le régime suivi (figure 83). Ces variations sont plus précoces lorsque

les mesures sont réalisées avec le TMA-DPH. En effet, les valeurs d'anisotropie du TMA-DPH augmentent dès 1 heure après irradiation (de 23,7 % $p = 0,017$ et de 21,7 % $p = 0,032$ respectivement pour les régimes 1 et 3) à l'exception du régime 2 (figure 83d à 83f). Par contre, pour la sonde 6-AS, ces variations sont observables à partir de 24 heures (de 50,5 % $p = 0,041$ pour le régime 1 et de 35,3 % $p = 0,012$ pour le régime 3) (figure 83a à 83d). D'autre part, ces modifications radio-induites sont plus importantes pour le régime 1 où elles restent stables jusqu'à 72 heures après irradiation, quelle que soit la sonde utilisée (figure 83a et 83d).

Les mesures d'anisotropie de fluorescence pour les animaux irradiés à une dose de 8 Gy n'ont pu être étendues à des temps supérieurs à 1 heure à cause de la lymphopénie.

I.4.4.4. Fluidité membranaire des différents états de viabilité cellulaire

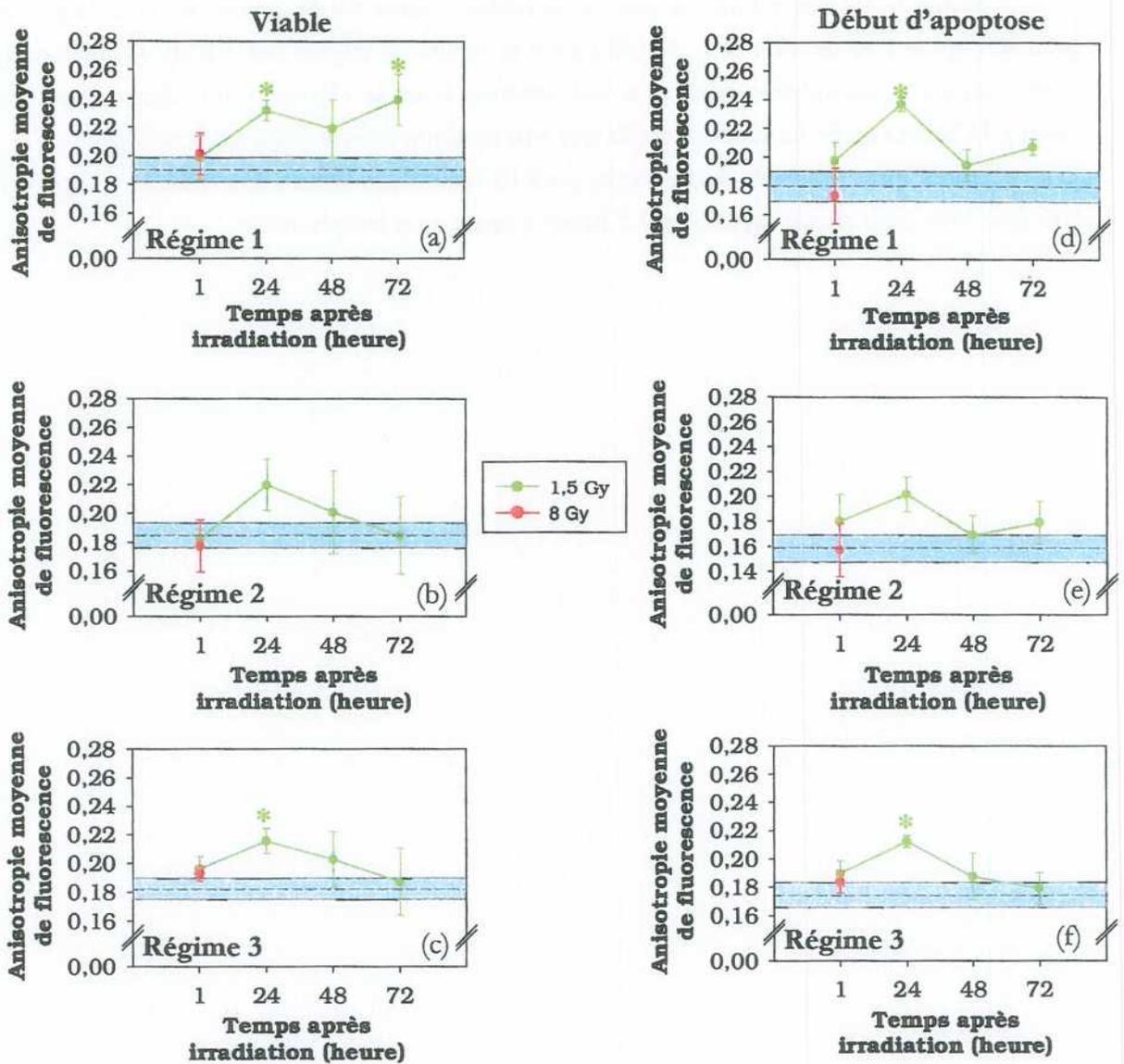


Figure 84 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH incorporés dans les membranes de lymphocytes viables (a, b et c) et en début d'apoptose (d, e et f). Les animaux ont été irradiés corps entier aux doses de 1,5 et 8 Gy, et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation sur les échantillons sanguins provenant d'animaux qui ont été nourris avec le régime 1 (a, e), le régime 2 (b, f) et le régime 3 (c, g). Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 24 observations indépendantes. Les points rouges et verts résultent de la valeur moyenne \pm SEM de 6 observations indépendantes. Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$.

Quel que soit le régime suivi, 24 heures après irradiation, nous constatons une augmentation des valeurs d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH mesurées dans les lymphocytes viables et en

début d'apoptose (figure 84). Cependant, cette augmentation est plus importante lorsque les animaux sont nourris avec le régime 1, uniquement pour les cellules viables, car elle persiste jusqu'à 72 heures après irradiation (25,8 % ; $p = 0,033$) (figure 84a).

II. Discussion

Nous avons montré dans le chapitre 3 qu'une irradiation *in vitro* induisait des altérations d'une part des lipides membranaires (liées aux processus de lipoperoxydation) et d'autre part des propriétés biophysiques de la membrane qui influent sur la mort cellulaire radio-induite. Ces mécanismes ainsi mis en évidence s'affranchissaient de l'influence éventuelle d'une régulation physiologique de la composition en lipides des membranes. Dans ce chapitre notre objectif a été d'étudier si la présence d'une régulation physiologique influait sur l'expression des dommages membranaires radio-induits. A cet effet, nous avons voulu modifier artificiellement la composition en lipides des membranes. Ainsi, nous avons élaboré trois régimes alimentaires qui diffèrent de part leur composition en lipides et en vitamine E. Ces régimes ont été administrés à des rats afin d'étudier le rôle des lipides et des défenses anti-oxydantes dans les altérations membranaires suite à une irradiation *in vivo* de ces animaux.

- Dans un premier temps, la validité de notre modèle a été vérifiée en répondant aux questions suivantes :
 - La composition en lipides des membranes reflètent-elle celle des régimes ?
 - Si les régimes modifient la composition lipidique membranaire, ont-ils une influence sur les propriétés biophysiques des membranes ?
 - Est-ce que les régimes ont un effet sur le niveau basal de défenses anti-oxydantes (*i.e.* la vitamine E) ?
- Par la suite, nous avons observé l'influence des régimes sur l'effet d'une exposition *in vivo* aux rayonnements ionisants en se focalisant sur les différents points énumérés ci-dessous :
 - Les défenses anti-oxydantes sont-elles mobilisées après irradiation (cas de la vitamine E) ?
 - Est-ce que l'irradiation modifie la composition en lipides des membranes ?
 - Quel est le rôle des modifications (si elles existent) de la composition en lipides des membranes et/ou des défenses anti-oxydantes dans les altérations radio-induites de fluidité membranaire ?

- Quelles sont les conséquences des effets membranaires radio-induits (s'ils existent) (modifications biophysiques et/ou biochimiques et/ou de la capacité de défenses anti-oxydantes), dans les mécanismes de mort cellulaire radio-induite ?

Comme dans le chapitre 3, ces études ont été réalisées sur deux modèles cellulaires, l'érythrocyte et le lymphocyte, qui se différencient par leur sensibilité à une régulation physiologique. L'érythrocyte étant anucléé et ses capacités de régulation enzymatique étant limitées, il serait plus sous l'influence d'une régulation physiologique que le lymphocyte.

Validation de notre modèle

En comparaison de la composition obtenue pour les membranes d'érythrocytes humains, nos résultats montrent que les membranes d'érythrocytes de rats ont un taux de PC plus élevé et des taux de SM et PS plus faibles. Roelofsen et coll. (1981) ont constaté des différences similaires dans le profil en phospholipides des membranes d'hématies provenant d'échantillons humains et de rats. Pour un même type cellulaire, la composition en phospholipides diffère d'une espèce animale à une autre (Leterrier & Gary-Bobo, 1989). Par ailleurs, la proportion des différentes classes de phospholipides de la membrane d'érythrocytes de rats n'est pas modifiée par le régime 2, riche en acides gras polyinsaturés de type (n-3) à longues chaînes. Williams & Maunder (1992) ont montré que la composition en phospholipides des membranes d'érythrocytes de rats n'était pas altérée en réponse à des changements de la composition en lipides des régimes alimentaires. Des résultats semblables ont été observés, chez l'Homme, sur des membranes d'érythrocytes pour des régimes de type (n-3) (Popp-Snijders et coll., 1986b). La composition des phospholipides membranaires serait déterminée génétiquement. En effet, les tissus se caractérisent par des profils en phospholipides spécifiques qui reflètent les fonctions des différentes cellules et organes (Wahle, 1983). Ainsi, les régimes lipidiques se différencient par des compositions variées en acides gras qui agiraient principalement sur la composition en acides gras des phospholipides sans modifier le profil en phospholipides membranaires.

La proportion d'acides gras polyinsaturés de type (n-3) augmente dans les membranes d'érythrocytes de rats nourris pendant 5 semaines avec un régime enrichi en acides gras polyinsaturés à longues chaînes de type (n-3) (régime 2). Ces résultats sont identiques à ceux observés par van den Boom et coll. (1996) sur des membranes d'érythrocytes de lapins consécutivement à l'application d'un régime de même type que le régime 2. En particulier, nous constatons une augmentation du taux d'EPA. Des observations similaires ont été constatées chez le rat sur la composition en acides gras de tissus tels que le foie et le rein (Hu et coll., 1989) et sur le profil en acides gras de membranes d'hépatocytes de rats (Clamp et coll., 1997) à la suite de

l'utilisation de régimes enrichis en huile de poisson (de type n-3). Dans des conditions expérimentales identiques, Popp-Snijders et coll. (1986a) ont montré un enrichissement en EPA de la composition en acides gras de membranes d'érythrocytes humains. Cependant, contrairement à ces auteurs nous n'observons pas un enrichissement en DHA. L'une des explications possibles est que le régime 2 comporte un taux d'EPA supérieur à celui du DHA. Or le DHA s'accumule dans la plupart des tissus, mais en particulier dans la rétine et le cerveau (Spector, 1992). Comme la proportion de DHA dans le régime 2 est faible, son incorporation s'effectuera donc préférentiellement dans la rétine et le cerveau au dépend des autres tissus. Nos résultats indiquent également que la proportion d'acides gras monoinsaturés est augmentée dans les membranes d'érythrocytes de rats nourris avec le régime 2. En particulier, c'est le taux d'acide oléique qui est responsable de cette augmentation. En effet, comme la composition en lipides du régime 2 comporte un taux élevé d'acide oléique, cet acide gras se retrouve incorporé dans les membranes des érythrocytes. Il existe un renouvellement continu des groupements des chaînes acyles contenus dans les lipides des phospholipides membranaires (Spector, 1992). Si des acides gras sont présents dans l'albumine, ils s'échangeront avec les acides gras intracellulaires. Donc la composition en acides gras des membranes d'érythrocytes de rats reflète celle des régimes lipidiques. A travers ce processus, la composition intracellulaire en acides gras, incluant les acides gras des phospholipides des membranes, peut changer et refléter le type d'acide gras disponible dans le régime.

L'analyse de la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides des membranes d'érythrocytes de rats nourris avec le régime de type (n-3) (régime 2) montre que la proportion d'EPA augmente dans les classes de PE, de PS et de PC mais qu'il s'incorpore préférentiellement dans PE et PS en comparaison de PC. Ces résultats confirment ceux de Cartwright et coll., (1985) obtenus sur des membranes d'érythrocytes humains. En outre, cette augmentation s'accompagne dans les classes de PE et PS d'une diminution du taux d'acide arachidonique, et dans la classe des PC d'une augmentation du pourcentage d'acide linoléique. Des observations similaires ont été obtenues par Abel et coll. (1997) sur des membranes plasmiques de foie de rats. Ces auteurs suggèrent qu'il existe des différences dans les cinétiques de remplacement des acides gras de la membrane plasmique. L'accumulation d'acide linoléique n'est pas reflétée dans la classe des PE et PS bien que le taux d'acide arachidonique soit significativement abaissé dans ces compartiments membranaires. Cela est dû à l'augmentation du remplacement de l'acide arachidonique par l'EPA (Abel et coll., 1997). Ce mécanisme peut être justifié par le fait que l'EPA est incorporé de façon plus étendue dans les fractions de PE et PS en comparaison des PC (Abel et coll., 1997). L'augmentation de l'acide linoléique dans la fraction des PC a probablement pour origine l'inhibition des activités des delta-6 et delta-5 désaturases (Abel et coll., 1997). Il existe dans le réticulum endoplasmique des cellules du foie un mécanisme de synthèse des acides gras à longues chaînes de type (n-6) et (n-3) à partir de l'élongation et de la

désaturation respectivement des chaînes des acides linoléique et α -linoléinique (Hernell & Bläckberg, 1992) (figure 85).

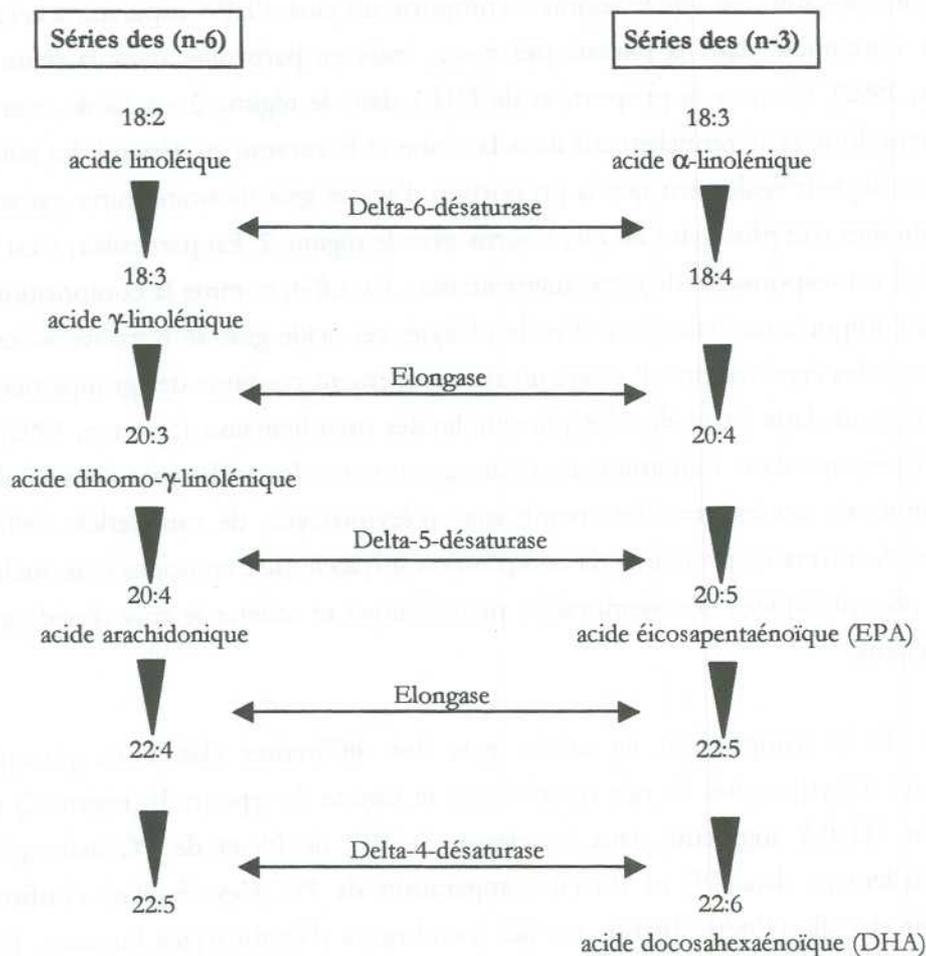


Figure 85 : Synthèse des acides gras à longues chaînes des séries de type (n-6) et (n-3) (Hernell & Bläckberg, 1992).

Or, Garg et coll. (1990) ont montré que les régimes de type (n-3), et en particulier l'EPA, inhibent la désaturation des chaînes de l'acide linoléique en agissant comme un analogue de l'acide arachidonique. Les régimes en (n-3) régulent donc l'activité de la delta-6-désaturase hépatique (Garg et coll., 1990). De plus, l'EPA présent dans les huiles de poisson exerce un effet inhibiteur sur l'activité de la delta-5-désaturase, c'est à dire sur le métabolisme de l'acide linoléique : la désaturation de l'acide dihomo- γ -linoléinique en acide arachidonique (Nassar et coll., 1986). La différence dans les cinétiques de remplacement des acides gras entre la PC et, les PE et PS, aurait pour origine la localisation de ces phospholipides dans la bicouche lipidique (Abel et coll., 1997).

En effet, la PC se localise dans le feuillet externe de la membrane plasmique tandis que les PS et PE se situent dans le feuillet interne (Roelofsen et coll., 1996). Cela implique que le taux d'acide linoléique soit moins affecté dans PE et PS que dans PC qui se situe dans le feuillet externe de la membrane plasmique, en raison des interactions entre le plasma et la PC membranaire (Abel et coll., 1997).

A ce stade de la discussion, nos résultats indiquent que la composition en acides gras des phospholipides des membranes d'érythrocytes de rats reflète la composition en lipides des régimes. En particulier, pour le régime enrichi en huile de poisson (régime 2), nous avons observé une augmentation du nombre d'acides gras polyinsaturés de type (n-3) reliée à une augmentation de la proportion d'EPA. Or nous avons constaté dans le chapitre 3 que la composition en lipides des phospholipides pouvait influencer sur les propriétés biophysiques des membranes. Nous nous sommes donc interrogés sur l'influence de ces modifications de la composition en acides gras membranaires sur les propriétés biophysiques des membranes.

Nous avons comparé les mesures de fluidité membranaire dans les membranes d'érythrocytes de rats nourris avec les régimes enrichis en acides gras de type (n-3) à longues chaînes (régimes 2 et 3) à celles obtenues pour le régime d'entretien (régime 1). Nos résultats ont mis en évidence une augmentation de la fluidité de la région hydrophobe de la membrane des érythrocytes pour les animaux nourris avec les régimes 2 et 3. Ces études confirment celles de Cartwright et coll. (1985) et Popp-Snijders et coll. (1986b) réalisées sur des membranes d'érythrocytes humains. Des résultats similaires ont été observés par Abel et coll. (1997) sur des membranes plasmiques de cellules de foie de rats en utilisant le DPH comme sonde fluorescente. Stubbs & Smith (1984) ont suggéré que les acides gras à longues chaînes de type (n-3) comportant 20 (ou plus) atomes de carbone jouent un rôle essentiel dans l'augmentation de la fluidité membranaire. En effet, l'EPA est un acide gras pourvu de 5 doubles liaisons. Son incorporation dans la bicouche augmente le degré d'insaturation des acides gras des phospholipides (Cartwright et coll., 1985) et introduit des perturbations de l'ordre membranaire à tous les niveaux de la bicouche car leurs doubles liaisons sont aussi localisées près des têtes des phospholipides (Smith et coll., 1985).

Cependant, contrairement aux résultats observés sur les érythrocytes, nous n'avons pas constaté de modifications de la fluidité membranaire des lymphocytes de rats nourris avec les régimes de type (n-3) (régimes 2 et 3) en comparaison du régime d'entretien (régime 1). Une des hypothèses qui peut être émise est que les régimes de type (n-3) ne modifient pas la composition en lipides des membranes de phospholipides. Or Yaqoob et coll. (2000) ont montré que des régimes en (n-3) administrés à des patients modifient la composition en acides gras des membranes des cellules mononucléaires du sang périphérique : augmentation du taux d'EPA corrélé à une diminution du taux d'acide arachidonique. Des résultats similaires ont été observés par Sirtori et coll. (1990) sur des membranes de monocytes humains. Donc il est raisonnable de supposer que les régimes en

(n-3) modifient la composition en lipides des membranes de lymphocytes. Calder et coll. (1994) ont observé *in vitro* une augmentation de la fluidité membranaire conjointement à des modifications de la composition en lipides sur des cultures cellulaires de lymphocytes de rats dont le milieu était supplémenté en acides gras polyinsaturés de type (n-3). Cependant, des études *in vivo* sur des lymphocytes de la rate de rats ont mis en évidence que les régimes enrichis en huile de poisson induisaient des changements de la composition en lipides des membranes plasmiques mais aucune altération de la fluidité membranaire (Yaqoob et coll., 1995). Ces expériences confirment nos résultats obtenus sur les mesures de fluidité membranaire dans les membranes de lymphocytes. En outre, Clamp et coll. (1997) n'ont observé sur des membranes d'hépatocytes de rats aucune modification de la fluidité des membranes plasmiques à la suite de régimes de type (n-3) bien qu'ils aient constaté des altérations de la composition en acides gras. Ils suggèrent que la fluidité membranaire ne soit pas influencée par les régimes lipidiques à cause de l'existence d'un processus d'adaptation homéovisqueuse. Ce processus doit être impliqué dans le réglage fin de la fluidité membranaire en régulant le contenu de la membrane en cholestérol, la distribution des classes de phospholipides, et/ou les activités des enzymes de désaturase et élongase liées à la membrane (Clamp et coll., 1997). Edwards-Webb & Gurr (1988) ont émis l'hypothèse que tout régime qui induit des changements de la composition en acides gras des membranes biologiques et sembleraient influencer les propriétés physiques et physiologiques de la membrane peut être contrecarré par une redistribution du cholestérol dans la membrane afin de maintenir constante les propriétés physiques et par conséquent physiologiques. Or, Kobatake et coll. (1983) ont montré que les régimes de type (n-3) administrés à des rats induisent une déplétion du taux de cholestérol total présent dans le sérum et une augmentation de la proportion de cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité (HDL-cholestérol). Ils ont également constaté que le rapport HDL-cholestérol/cholestérol total augmente dans les mêmes proportions que le pourcentage d'acides gras polyinsaturés présents dans les régimes. Ces résultats suggèrent que les régimes enrichis en huile de poisson diminuent la biosynthèse du cholestérol et augmentent son incorporation dans les tissus (Kinsella et coll., 1990). Wahnon et coll. (1992) ont observé, à la suite de régimes de type (n-3), dans les membranes de microvillosités intestinales de rats, des changements de la composition en acides gras mais aucune modification de la fluidité membranaire mesurée avec le DPH. Ces résultats étaient accompagnés d'une augmentation du rapport molaire cholestérol/phospholipides dans les membranes qui supposent une accumulation du cholestérol dans les membranes pour les régimes de type (n-3) (Wahnon et coll., 1992). Ces auteurs suggèrent que l'augmentation de ce rapport compense la fluidification due à l'augmentation de la proportion d'acides gras polyinsaturés de type (n-3). Jusqu'à un certain taux de lipides des régimes, des mécanismes de régulation induisent des altérations biochimiques qui minimisent les changements de fluidité et par conséquent maintiennent l'homéoviscosité de la membrane. Afin de vérifier cette conjecture, il serait nécessaire de doser conjointement la composition des membranes de lymphocytes en acides gras et en cholestérol.

Le fort taux de vitamine E présent dans le régime supplémenté en vitamine E (régime 3) élève notablement la concentration plasmatique en alpha-tocophérol en comparaison des taux obtenus pour les régimes 1 et 2 qui comportaient un faible taux de vitamine E. Nous avons constaté un taux de vitamine E plasmatique égal à 16 µg/ml pour le régime 3 supplémenté en vitamine E dans les proportions de 200 mg/Kg de régime. Ces résultats sont en accord avec ceux de Javouhey-Donzel et coll. (1993). En effet, ils ont montré qu'après adjonction de 130 à 140 mg/Kg de vitamine E à un régime de type (n-3) similaire au régime 2 et 3, le taux de vitamine E plasmatique des rats est égal à 11 µg/ml.

Donc nous avons montré que l'enrichissement en vitamine E du régime 3 augmente la concentration plasmatique en α -tocophérol. Par ailleurs, les régimes élaborés à partir d'huile de poisson modifient la composition en acides gras des membranes d'érythrocytes de rats en augmentant le taux d'EPA au dépend de l'acide arachidonique. Ces modifications de la composition biochimique de la membrane influent sur les propriétés biophysiques membranaires. En effet, nous avons constaté une augmentation de la fluidité des régions hydrophobes de la bicouche lipidique des érythrocytes de rats. Cependant, les propriétés biophysiques des membranes de lymphocytes ne sont pas altérées par les régimes. Nous suggérons que ces différences observées entre ces deux modèles cellulaires proviennent de l'existence ou non d'une régulation homéovisqueuse qui dépendrait de la présence ou non d'une régulation génique. En effet, chez le lymphocyte, il existerait des processus permettant de maintenir l'homéoviscosité membranaire en augmentant le taux de cholestérol dans les membranes.

Effets de l'irradiation

Nous allons maintenant observer l'influence des modifications des propriétés biochimiques et biophysiques des constituants des membranes et des capacités de défense anti-oxydantes de l'organisme, apportées par les régimes, sur les altérations membranaires induites par une irradiation *in vivo* des animaux. Dans un premier temps, nous allons étudier le rôle de la composition en lipides des membranes dans les atteintes radio-induites des constituants et de la fluidité membranaire, ainsi que dans la mort cellulaire. Pour cela, nous comparerons les résultats obtenus en nourrissant les animaux avec le régime enrichi en acides gras polyinsaturés de type (n-3) à longues chaînes et déplété en vitamine E (régime 2) au régime d'entretien (régime 1). Dans un deuxième temps, nous examinerons l'influence des défenses anti-oxydantes (*i.e.* la vitamine E) en se basant sur les données observées pour le régime enrichi en vitamine E (régime 3) et le régime appauvri en vitamine E (régime 2) mais dont la composition en lipide est la même, c'est à dire de type (n-3).

Nous avons analysé, après irradiation, la composition en phospholipides des membranes d'érythrocytes de rats nourris avec le régime enrichi en acides gras à longues chaînes de type (n-3) (régime 2) et le régime d'entretien (régime 1). Nos résultats indiquent que le profil des différentes classes de phospholipides est inchangé, après irradiation, quel que soit le régime suivi. Ces observations sont identiques à celles obtenues dans le chapitre 3 suite à une exposition *in vitro* au rayonnement gamma. Or nous avons montré précédemment que les régimes ne modifiaient pas la composition en phospholipides des membranes d'érythrocytes de rats. Donc nous suggérons que les régimes ne modifient pas la sensibilité à l'irradiation des têtes de phospholipides car la cible principale des rayonnements ionisants semblent être leurs chaînes d'acide gras. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons étudié l'effet d'une irradiation sur la composition en acides gras des membranes d'érythrocytes.

Les rats étant nourris avec le régime d'entretien ne présentent pas de modifications radio-induites de la composition en acides gras totaux des membranes d'érythrocytes. Cependant, nous constatons que seule la composition en acides gras des PE membranaires est altérée après irradiation. En effet, nos résultats mettent en évidence une diminution de la proportion d'acides gras polyinsaturés et en particulier une baisse du taux d'acide arachidonique. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'effet d'une irradiation *in vivo* sur la composition en acides gras des membranes d'érythrocytes. Seules les compositions en acides gras de certains tissus ont été analysées après une exposition totale aux rayonnements ionisants. Une diminution de la proportion d'acide arachidonique dans la rate (Ramanathan & Misra, 1979) et dans le foie (Ramanathan & Misra, 1976) ont été observées après une irradiation totale de rats à une dose de 12 Gy. Nos résultats sont conformes à ceux obtenus *in vitro* dans le chapitre 3. Ces modifications sont générées par un système de réparation membranaire catalysé par la PLA2 qui hydrolyse les acides gras peroxydés de la membrane et en particulier l'acide arachidonique qui est la cible des réactions de lipoperoxydation initiées par l'irradiation. Kergonou et coll. (1981) ont exposé, corps entier, au rayonnement gamma, des rats à une dose de 8 Gy, et ont constaté une augmentation de la lipoperoxydation dans les érythrocytes. Ces observations confirment donc le rôle essentiel de la lipoperoxydation dans les atteintes des constituants lipidiques membranaires.

La composition en acides gras totaux des membranes d'érythrocytes de rats nourris avec le régime enrichi en acides gras de type (n-3) à longues chaînes (régime 2) est modifiée après irradiation. Nos résultats ont mis en évidence une augmentation des proportions d'EPA et de DHA qui est corrélée à une diminution des pourcentages d'acide stéarique. En outre, la composition en acides gras des PE membranaires présente une augmentation des taux d'acides gras polyinsaturés de type (n-3) et (n-6). En effet, les quantités d'acides gras polyinsaturés augmentent dans l'ordre suivant : EPA>DHA>acide arachidonique. Cette augmentation est compensée par une diminution des acides gras monoinsaturés et en particulier de l'acide oléique.

Ces résultats sont contraires à ceux que nous attendions c'est à dire à la diminution de la proportion des acides gras polyinsaturés reflétant une lipoperoxydation. La sensibilité des cellules à un stress oxydant est influencée par la composition en acide gras de la membrane (Reaven & Witzum, 1996). Les cellules enrichies en acides gras polyinsaturés augmentent leur susceptibilité à un dommage oxydatif car, une fois les radicaux libres formés, leur propagation est accélérée par la lipoperoxydation dans des membranes enrichies en acides gras polyinsaturés (Reaven & Witzum, 1996). Plusieurs études ont montré que les régimes de type (n-3) à longues chaînes augmentaient la sensibilité à la lipoperoxydation induite *in vitro* dans des tissus extraits de rats nourris avec des régimes enrichis en huile de poisson (du type régime 2) tels que le foie (Hu et coll., 1989 ; Leibovitz et coll., 1990), le cœur (Leibovitz et coll., 1990) et le rein (Hu et coll., 1989). La lipoperoxydation était initiée par un stress oxydant non radio-induit de type Fe^{2+} (Hu et coll., 1989) ou tert-butyl hydroperoxyde (t-BHP) (Leibovitz et coll., 1990). Cependant aucune expérience n'a été réalisée sur l'étude de l'influence des régimes de type (n-3) sur les modifications de la composition lipidique membranaire des érythrocytes après une irradiation *in vivo*. Nous suggérons plusieurs hypothèses afin d'expliquer l'augmentation des acides gras polyinsaturés dans les membranes érythrocytes après une irradiation *in vivo*. La première suppose que l'acide oléique soit un anti-oxydant dont l'activité est similaire à celle de la vitamine E (Horrobin, 1990). En effet, les membranes d'érythrocytes de rats nourris avec le régime enrichi en (n-3) comportent une grande proportion d'acide oléique. D'autre part, les proportions d'acides stéariques diminuent après irradiation. L'acide stéarique est converti en acide oléique par l'activité delta-9-désaturase (Neoptolemos et coll., 1991) qui est tout de suite dégradé car nous avons observé une baisse de la proportion d'acide oléique après irradiation dans les membranes d'érythrocytes. Alexander-North et coll. (1994) ont montré que la réponse de cellules endothéliales à un stress oxydant de type Fe^{2+} , dont le milieu de culture est enrichi en acides gras de type (n-3) et en acide oléique, est réversible. Ils ont suggéré que l'acide oléique joue un rôle protecteur vis à vis d'un stress oxydant. En outre, l'augmentation de la proportion d'acides gras polyinsaturés (EPA, DHA et acide arachidonique) peut être reliée à une diminution de la lipoperoxydation dans les membranes d'érythrocytes (Neoptolemos et coll., 1991). Les autres hypothèses se basent sur l'influence des régimes en (n-3) dans la régulation physiologique. Nous supposons tout d'abord qu'il y ait dans un premier temps lipoperoxydation des acides gras polyinsaturés. Ensuite ces peroxydes lipidiques sont hydrolysés par la phospholipase A2 et les lysophospholipides ainsi générés sont réacylés avec des acides gras polyinsaturés. De cette manière, nous ne constaterions pas une diminution radio-induite des acides gras polyinsaturés. Pour cela, nous suggérons que les activités des delta-5, et delta-6-désaturases présentes dans le foie qui étaient inhibées par les régimes en (n-3) soient réactivées par l'irradiation. Or cette hypothèse est peu probable car Aiyar & De (1978) ont montré qu'une irradiation-X corps entier de rats provoque l'accumulation des lipides dans le foie corrélée à un transport défectueux des triglycérides à partir du foie. De plus, ils ont constaté que, dans ce tissu, cette accumulation induisait une diminution de la lipogénèse et

augmentait le catabolisme des lipides. Il serait donc intéressant de mesurer l'activité des désaturases présentes dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes après irradiation *in vivo* de rats nourris avec un régime enrichi en huile de poisson. La troisième hypothèse suggère que l'analyse de la composition en acides gras des membranes d'érythrocytes soit perturbée artificiellement par une modification de la représentation cellulaire des érythrocytes. Suite à une irradiation gamma corps entier de rats à des doses comprises entre 1,5 Gy et 4 Gy, Becker et coll. (1987) ont observé une chute du pourcentage de réticulocytes après irradiation dont le minimum est détecté 48 heures après irradiation. De plus, la durée de ce minimum est dose dépendante (Becker et coll., 1987). Pour une dose de 2 Gy, un pic de réticulocyte apparaît à partir du troisième jour après irradiation et atteint une valeur maximale voisine de 5 % supérieure à la valeur obtenue avant irradiation (2 %) (Frelat, 1991). D'autre part, les membranes de réticulocytes comportent un taux plus élevé d'acides gras polyénoïques (acides gras polyinsaturés) (Kuhn & Brash, 1990). Leur dégradation enzymatique par une lipoxygénase est considérée comme une étape dans les processus de dégradation protéolytique des organites intracellulaires qui aboutirait à la maturation des globules rouges (Kuhn & Brash, 1990). Par ailleurs, Dominguez & Bosch (1994) ont mis en évidence des modifications de l'érythropoïèse lorsque des rats sont nourris avec des régimes enrichis en huile de poisson. Morshchakova (1990) a montré que les prostaglandines de type PGE1 stimule la production d'érythropoïétine. Or l'érythropoïétine augmente le pool des progéniteurs érythroblastiques CFU-E et abaisse leurs temps de maturation. L'EPA et l'acide arachidonique lorsqu'ils sont dégradés par la cyclooxygénase sont la source des voies métaboliques conduisant à la synthèse des prostaglandines respectivement de la série 1 et 2 (Cohen, 1985). Le métabolisme des écosanoïdes est assimilé à la voie de dégradation de l'acide arachidonique (Cohen, 1985). Fisher & Black (1991) ont montré que les régimes en (n-3) appliqués à des souris diminuent les taux plasmatiques des prostaglandines de type PGE2. Ces régimes suppriment le métabolisme des écosanoïdes car l'EPA agit comme un substrat compétitif de l'acide arachidonique des cyclooxygénases en bloquant la synthèse des PGE2 (Fisher & Black, 1991) et en induisant la production des prostaglandines de type PGE1 (Baronzio et coll., 1995). Ces résultats confortent nos observations sur l'augmentation du nombre de globules rouges présents dans le sang de rats nourris avec les régimes de type (n-3) en comparaison de la numération cellulaire obtenue pour les animaux ayant suivi le régime d'entretien. Nous supposons donc que pour des rats nourris avec des régimes de type (n-3) le pic de réticulocyte apparaîtrait plus tôt après irradiation, c'est à dire à 72 heures, car ces régimes stimulent l'érythropoïèse. Cependant, il serait intéressant de dénombrer le pourcentage de réticulocytes et les taux de prostaglandines de type PGE1 dans des échantillons de sang de rats irradiés *in vivo*, nourris avec un régime de type (n-3).

Donc nos résultats ont mis en évidence que les régimes lipidiques influent sur les modifications de la composition en lipides des membranes d'érythrocytes après une irradiation corps entier *in*

in vivo. Or nous avons vu dans le chapitre 3 que les modifications de la composition en lipides de la membrane après une irradiation *in vitro* agissaient sur les propriétés biophysiques. Afin de vérifier *in vivo* les liens susceptibles d'exister entre fluidité membranaire et composition en lipides de la membrane, nous avons étudié l'évolution des propriétés biophysiques de la membrane après une irradiation *in vivo*. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle étude est réalisée.

Nos résultats indiquent que seul le gradient de fluidité 6-AS/9-AS est altéré après une exposition corps entier des animaux au rayonnement gamma, quel que soit le régime suivi par les rats. Ces résultats mettent en évidence que les propriétés biophysiques de la membrane des érythrocytes sont altérées après une irradiation *in vivo*.

Nous avons vu précédemment que le régime d'entretien induit des modifications de la composition en lipides des membranes similaires à celles observées *in vitro*. Cependant, contrairement aux résultats obtenus *in vitro*, c'est à dire une fluidification des membranes d'érythrocytes radio-induites, nous observons des modifications des propriétés biophysiques membranaires beaucoup moins importantes. Ces différences entre l'*in vivo* et l'*in vitro* peuvent s'expliquer par l'existence *in vivo* d'une régulation physiologique. Feurgard et coll. (1998) ont observé, 2 jours après l'exposition corps entier de rats à un rayonnement mixte (gamma / neutrons) et à une dose de 4 Gy, une augmentation de la concentration en cholestérol dans les lipoprotéines de haute densité (HDL). Ces observations suggéreraient une accumulation du cholestérol dans les membranes d'érythrocytes. Or le cholestérol exerce un effet rigidifiant sur la fluidité membranaire (Yeagle, 1985). Nous émettons l'hypothèse que l'accroissement de la proportion de HDL-cholestérol plasmatique radio-induite compense l'augmentation radio-induite de la fluidité des membranes d'érythrocytes de telle manière que globalement nous observons de faibles altérations des propriétés biophysiques.

L'irradiation totale de rats nourris avec le régime enrichi en acides gras polyinsaturés de type (n-3) et déplété en vitamine E induit une augmentation radio-induite de la proportion d'acides gras polyinsaturés des membranes d'érythrocytes. Ces résultats suggèrent une fluidification de la bicouche lipidique en raison de la forte augmentation du nombre d'insaturations. Or, nous n'observons que de faibles variations des propriétés biophysiques des membranes après irradiation. Les globules rouges étant anucléés, ils sont limités dans leur capacité métabolique. Nous émettons l'hypothèse que l'apport exogène d'acides gras polyinsaturés par l'albumine pourrait induire une rigidification de la membrane qui compense la fluidification provoquée par l'augmentation du nombre d'acides gras polyinsaturés. Bojesen & Bojesen (1998) supposent que l'incorporation des acides gras dans la membrane d'érythrocyte s'effectue par des liaisons entre les acides gras insaturés anioniques et une protéine intégrale, suivi de la canalisation de la forme neutre entre les sites de liaisons opposés de la protéine à travers les lipides annulaires encerclant la protéine. Le transfert des acides gras à travers la membrane se déroule par un processus de diffusion dans des domaines de lipides annulaires de la protéine et non par l'intermédiaire d'un

transporteur (Bojesen & Bojesen, 1999). Or, ces auteurs ont montré que l'incorporation des acides gras comportant des doubles liaisons dans les membranes diminuent la flexibilité des chaînes carbonées de la bicouche lipidique.

Nous avons également étudié l'évolution de la fluidité des membranes de lymphocytes après l'irradiation *in vivo* des animaux. Nos résultats montrent une rigidification de la bicouche lipidique, quel que soit le régime. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus *in vitro*. En outre, la composition en lipides des membranes de lymphocytes n'a pas pu être dosée conjointement avec les mesures de fluidité membranaire en raison du nombre limité de cellules. Nous suggérons donc que l'irradiation provoque l'oxydation des cholestérols membranaires en oxystérols qui diminuent la fluidité membranaire de la bicouche lipidique (cf. chapitre 3). Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait doser les dérivés oxydés du cholestérol et étudier si la composition en lipides des membranes de lymphocytes est modifiée après une irradiation *in vivo*.

Nous avons donc montré qu'une irradiation *in vivo* induit une rigidification des membranes de lymphocytes. Or, les expériences réalisées *in vitro* ont mis en évidence que les modifications des propriétés biophysiques et/ou biochimiques des constituants membranaires des lymphocytes influent sur la mort cellulaire radio-induite. Nous avons donc étudié l'effet des altérations de ces propriétés dans les mécanismes de mort cellulaire induite par une irradiation *in vivo*.

Le taux de lymphocytes en début d'apoptose est plus élevé lorsque les rats sont nourris avec le régime d'entretien en comparaison du régime enrichi en acides gras de type (n-3) à longues chaînes après une exposition corps entier des animaux au rayonnement gamma. Ces observations peuvent s'expliquer par un taux d'acide arachidonique beaucoup plus élevé dans les membranes des cellules de rats nourris avec le régime d'entretien par rapport à celui obtenu pour le régime de type (n-3). En effet, l'acide arachidonique est un second messager qui, libéré des membranes par l'action de la phospholipase A₂, active les PKC associées aux membranes qui sont impliquées dans la transduction des signaux apoptotiques radio-induits de la membrane vers le noyau (cf. chapitre 3). Or, Fonteh et coll. (2001) ont constaté que durant le processus apoptotique (non radio-induit), les taux d'acide arachidonique, mais non celui des autres acides gras insaturés, sont corrélés au pourcentage de cellules apoptotiques. En outre, Kishida et coll. (1998) ont montré que le DHA est le seul acide gras ayant la capacité de réduire l'apoptose induite par la voie des sphingosines (métabolisme des céramides) alors que l'acide arachidonique et l'EPA n'ont pas cette faculté.

L'étude de l'évolution de la fluidité membranaire des lymphocytes en début d'apoptose a mis en évidence des modifications des propriétés biophysiques membranaires à partir de 24 heures après l'irradiation *in vivo* des animaux, quel que soit le régime. Comme pour les expériences réalisées *in vitro*, nous constatons une rigidification de la bicouche lipidique qui est détectée lorsque les taux d'apoptose radio-induite sont significativement élevés. Ces résultats confirment ceux obtenus

dans le chapitre 3 : les modifications des propriétés biophysiques de la membrane sont spécifiques du type d'inducteur d'apoptose : apoptose spontanée ou apoptose radio-induite.

Nos résultats indiquent que les régimes influent sur les modifications radio-induites de la composition en lipides des membranes d'érythrocyte et sur l'engagement dans le processus apoptotique après une irradiation *in vivo*. De plus, l'existence d'une régulation physiologique agirait sur les altérations radio-induites des propriétés biophysiques des membranes d'érythrocytes et non sur celles des membranes de lymphocytes. Nous allons maintenant examiner le rôle des modifications de la capacité des défenses anti-oxydantes (la vitamine E) induites par les régimes sur les altérations radio-induites des concentrations de vitamine E plasmatique, des propriétés biophysiques membranaires, et de la mort cellulaire par apoptose. Nous avons choisi d'étudier le rôle de la vitamine E sur les effets membranaires radio-induits car elle est le seul anti-oxydant liposoluble de type piègeur de radicaux localisé dans les membranes cellulaires et le sang.

L'effet d'une exposition aux rayonnements ionisant des animaux nourris avec un régime dont l'apport en vitamine E est très modéré (régime 1 : 30 mg/Kg) montre une diminution de la concentration plasmatique en vitamine E dès 1 heure. La vitamine E plasmatique est alors consommée à cause de la formation de radicaux libres générés par l'irradiation. De plus, 24 heures après l'irradiation, sa concentration augmente traduisant une mobilisation des réserves de vitamine E liée à une augmentation des lipides plasmatiques. En effet, Feurgard et coll. (1998) ont observé une augmentation des différentes fractions des lipides plasmatiques après l'irradiation mixte (gamma / neutrons) *in vivo* de rats à une dose de 4 Gy. L'irradiation diminue donc les stocks de vitamine E (Feurgard et coll., 1998). Après absorption intestinale, la vitamine E est transportée via la voie lymphatique par les chylomicrons et stockée à 90 % principalement dans le foie et le tissu adipeux chez le rat (Drevon, 1991). Elle est sécrétée dans le plasma à partir du foie en association avec les lipoprotéines plasmatiques.

La concentration plasmatique en vitamine E des animaux ayant suivi un régime appauvri en vitamine E (régime 2 : ≤ 15 mg/Kg) est inchangée après irradiation. Le taux de vitamine E étant très faible les réserves de vitamine E sont quasi inexistantes, et donc aucune mobilisation de cet antioxydant n'a été observée.

Après irradiation, les rats ayant suivi un régime enrichi en vitamine E (régime 3 : 200 mg/Kg) présentent une diminution de la concentration en vitamine E d'autant plus importante et plus précoce que la dose est forte. Cette baisse persiste tout au long de la durée de l'expérience. Paranich et coll. (1990) ont observé, à la suite d'une irradiation gamma totale de rats, une baisse de la concentration en vitamine E et une augmentation de la lipoperoxydation dans le plasma, le

cerveau et le foie. La vitamine E est donc recrutée contre la formation de radicaux libres dans tous les compartiments de l'organisme et en parallèle toutes les réserves disponibles, qui sont importantes dans ce régime, sont mobilisées afin d'approvisionner constamment les tissus en antioxydant.

Les modifications de la composition en vitamine E des régimes n'influent ni sur la fluidité membranaire, ni sur la mort cellulaire par apoptose, après exposition corps entier des animaux au rayonnement gamma. Une des explications possibles est que d'une part la supplémentation des régimes en vitamine E n'augmenterait que très faiblement les proportions de vitamine E présentes dans les membranes des cellules sanguines. En effet, van den Boom et coll. (1996) ont mesuré une concentration en vitamine E, dans les membranes d'érythrocytes de lapins, faible en comparaison du degré d'enrichissement des régimes de type (n-3) en vitamine E. D'autre part, nous suggérons que la vitamine E ne soit pas le principal anti-oxydant qui protège les membranes d'une attaque radicalaire. Kergonou et coll. (1986) ont observé une augmentation de la lipoperoxydation dans des érythrocytes de rats irradiés corps entier à une dose de 8 Gy qu'ils ont relié essentiellement à une diminution des activités superoxyde-dismutase et glutathion-réductase, et à une baisse de la concentration en glutathion réduit. Il serait donc intéressant de doser la vitamine E dans les membranes d'érythrocytes, après une irradiation *in vivo*, ainsi que les enzymes participant au système de défense anti-oxydante afin de déterminer lequel de ces composés joue un rôle primordial dans la capacité de défense des érythrocytes contre la lipoperoxydation.

En conclusion, nous avons montré que les régimes lipidiques élaborés à partir d'huile de poisson modifient la composition en acides gras membranaires des érythrocytes et ainsi agissent sur leurs propriétés biophysiques. Cependant, en raison de l'existence d'une régulation homéovisqueuse chez le lymphocyte, leur fluidité membranaire n'est pas altérée par les régimes lipidiques. L'exposition totale des animaux à une irradiation modifie la composition en acides gras des membranes d'érythrocytes dont la nature des dommages dépend du type de régime administré. En outre, l'irradiation *in vivo* des animaux induit de très faibles variations des propriétés biophysiques des membranes d'érythrocytes en comparaison des résultats observés *in vitro* en raison de l'existence d'une régulation physiologique. Les membranes de lymphocytes se rigidifient suite à l'exposition totale des rats au rayonnement gamma. Ces variations des propriétés biophysiques membranaires des lymphocytes sont similaires à celles observées *in vitro*. Par conséquent, le lymphocyte serait faiblement dépendant d'une régulation physiologique. Par ailleurs, nous observons que la composition en acides gras des régimes influence sur la sensibilité des lymphocytes à l'apoptose radio-induite. De plus, nous constatons que les variations des propriétés biophysiques des membranes de lymphocytes sont spécifiques du type d'inducteur d'apoptose, quel que soit le régime appliqué. Par ailleurs, les régimes supplémentés en vitamine E

modifient les concentrations plasmatiques en vitamine E. Cependant, cet enrichissement n'a aucun effet sur les altérations radio-induites des propriétés biophysiques membranaires et sur le processus apoptotique radio-induit. Donc, nos résultats indiquent que la composition en lipides des membranes joue un rôle majeur dans la sensibilité membranaire aux effets de l'irradiation. Par ailleurs, ces observations réalisées après une irradiation *in vivo* confortent l'importance d'une régulation physiologique dans le développement des dommages membranaires radio-induits. Le schéma récapitulatif (figure 58) obtenu dans le chapitre 3 peut alors être complété afin d'obtenir la figure 86. Ces études *in vivo* confirment donc que la membrane est une cible sensible des rayonnements ionisants qui joue un rôle primordial dans le développement des dommages cellulaires radio-induits.

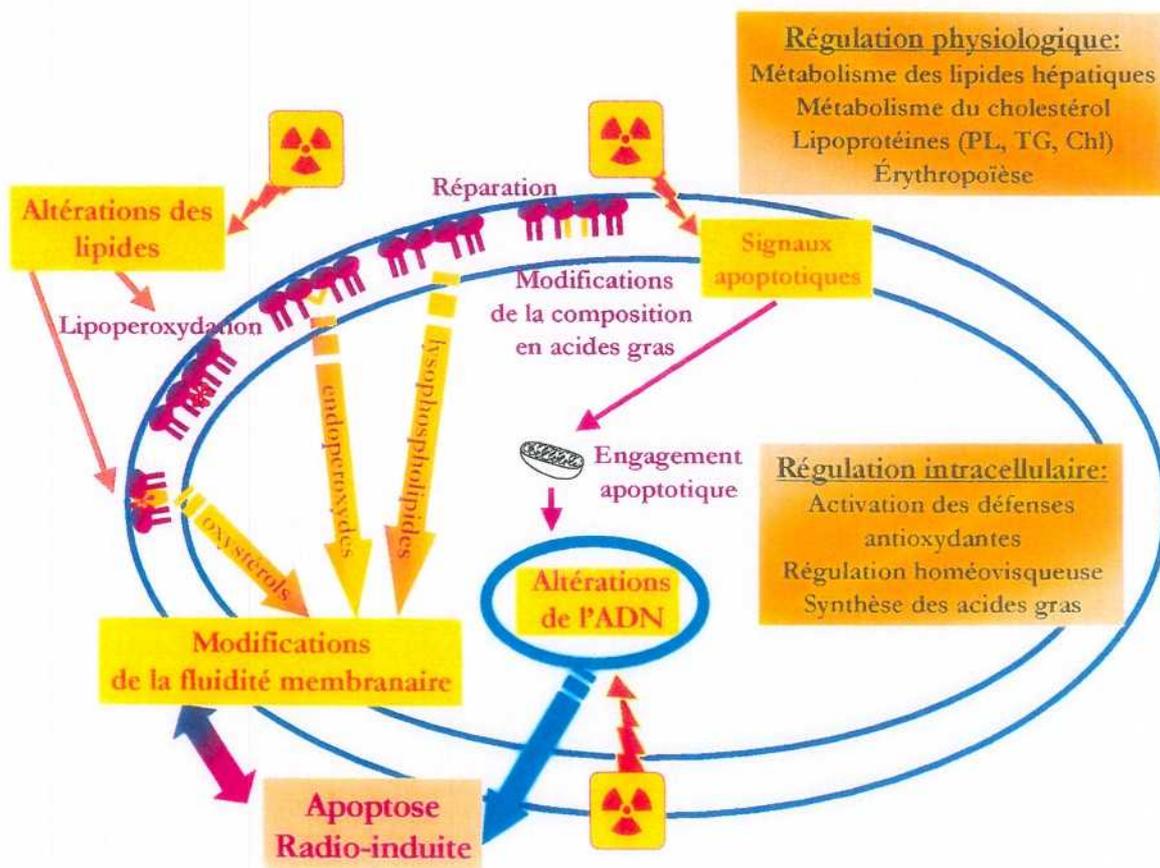


Figure 86 : Schéma récapitulatif des résultats observés *in vitro* et *in vivo*.

Chapitre 5 :
L'index de fluidité membranaire comme
bio-indicateur d'une exposition à une
irradiation

Dans les deux chapitres précédents, nous avons montré que la membrane est une cible sensible des rayonnements ionisants et que la mesure de l'index de fluidité membranaire permettait d'obtenir une vision intégrée des dommages membranaires. Précédemment, des études réalisées dans notre laboratoire ont montré que des modifications des propriétés biophysiques de la membrane plasmique après irradiation, étaient observables, *in vitro*, sur différents modèles cellulaires (lymphocytes et membranes d'érythrocytes) pour des doses comprises entre 0 et 8 Gy qui sont compatibles avec nos préoccupations de dosimétrie biologique. De plus, ces effets persistaient dans le temps, jusqu'à 24 heures après irradiation. Dans ce dernier chapitre, notre objectif est donc d'évaluer l'index de fluidité membranaire comme indicateur biologique potentiel des effets des rayonnements ionisants en cas de suspicion d'irradiation.

Dans un premier temps, nous avons défini les bases de la mesure de l'index de fluidité membranaire, c'est à dire la technique spectroscopique, la méthode de mesure et la sonde fluorescente la plus adaptée à la détection des altérations de fluidité membranaire radio-induites dans l'optique d'une dosimétrie biologique.

Il existe plusieurs techniques spectroscopiques de fluorescence, autres que la polarisation de fluorescence, permettant d'évaluer les différents mouvements des constituants membranaires au sein de la bicouche lipidique. Nous avons choisi d'appliquer la méthode de formation d'excimères intermoléculaires afin de tester la sensibilité de cette technique à détecter les dommages membranaires radio-induits sur des cellules de lymphoblastes. C'est une technique qui permet d'estimer la cohésion de la membrane plasmique des cellules. Elle mesure le mouvement de diffusion latérale d'une sonde fluorescente extrinsèque dans le plan de la membrane. Ce phénomène rend compte de la cohésion membranaire, et peut donc être relié au concept de fluidité membranaire. Nous avons donc comparé la technique de formation d'excimères intermoléculaires à la polarisation de fluorescence dans leur sensibilité à détecter les dommages membranaires radio-induits dans l'optique d'une dosimétrie biologique.

Nous avons ensuite comparé la sensibilité de détection des dommages membranaires radio-induits, sur deux types cellulaires accessibles par prélèvement sanguin : érythrocyte et lymphocyte, en fonction de la localisation de la sonde fluorescente utilisée et de la méthode de mesure appliquée : spectrofluorimétrie et cytométrie de flux.

La mesure de la fluidité membranaire pouvant être réalisée sur tout type cellulaire, dans la perspective d'un accident d'irradiation hétérogène et l'éventualité d'une biopsie tissulaire, nous avons évalué les altérations radio-induites des propriétés biophysiques membranaires de cellules entières de fibroblastes. Plusieurs sondes qui se localisent à différentes profondeurs de la bicouche lipidique ont été ainsi testées.

Dans un deuxième temps, l'utilisation de la fluidité membranaire comme bio-indicateur de dose a été évaluée sur des modèles *in vivo* tels que le rat et le singe. Nous avons alors comparé les

résultats obtenus *in vitro* à ceux mesurés *in vivo* pour vérifier si les réponses biologiques étaient similaires.

Finalement, afin de compléter cette étude, la technique de polarisation de fluorescence a été testée sur des échantillons de sang de patients ayant subi une irradiation corporelle totale, en utilisant comme modèle cellulaire le globule rouge.

I. Résultats

I.1. Variations de l'index de fluidité membranaire en fonction du type cellulaire et du modèle considéré

Afin de fixer les valeurs basales, nous avons comparé les valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques et du TMA-DPH incorporés dans les membranes des hématies et des lymphocytes en fonction des différents modèles étudiés (tableau 21).

Type cellulaire	Modèles	3-AS	6-AS	9-AS	12-AS	TMA-DPH
Hématies	Homme	0,086 ± 0,004	0,083 ± 0,003	0,068 ± 0,003	0,060 ± 0,002	
	Rat		0,071 ± 0,006	0,075 ± 0,007		
	Singe		0,079 ± 0,013	0,078 ± 0,011		
Lymphocytes	Homme	0,096 ± 0,002	0,086 ± 0,003	0,077 ± 0,002	0,063 ± 0,001	0,220 ± 0,006
	Rat		0,074 ± 0,004			0,180 ± 0,008
	Singe		0,073 ± 0,009			0,130 ± 0,014

Tableau 21 : Valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques et du TMA-DPH incorporés dans les membranes d'hématies et de lymphocytes en fonction des différents modèles étudiés. Les mesures ont été réalisées en cytométrie de flux. Les résultats résultent de la valeur moyenne ± SEM d'au moins six expériences indépendantes.

Dans un premier temps, nous avons comparé les valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques obtenues dans les membranes d'hématies et de lymphocytes humains (tableau 21). Ces résultats indiquent que seules les valeurs du 9-AS incorporé dans les membranes de lymphocytes augmentent de 13,7 % ($p = 0,011$) par rapport aux valeurs mesurées dans les membranes d'hématies.

Dans un deuxième temps, la comparaison des valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques et du TMA-DPH obtenues dans les hématies et les lymphocytes a été réalisée en fonction du modèle considéré (tableau 21). Dans nos conditions expérimentales, aucune variation

significative des valeurs d'anisotropie du 6-AS et du 9-AS n'a été observée entre les différents modèles étudiés lorsque les mesures sont réalisées dans les membranes d'hématies. Cependant, nous constatons une diminution de 13,4 % ($p = 0,04$) des valeurs du 6-AS obtenues dans les membranes de lymphocytes de rats par rapport à celles mesurées sur des lymphocytes humains. D'autre part, nous observons une diminution de 18,2 % ($p < 0,001$) et de 40,8 % ($p < 0,001$) des valeurs d'anisotropie du TMA-DPH obtenues respectivement dans les membranes de lymphocytes de rats et de singes en comparaison de celles mesurées à partir de lymphocytes humains. De plus, les résultats du tableau 21 mettent en évidence une diminution ($p = 0,007$) de 27,6 % des valeurs du TMA-DPH incorporé dans les membranes de lymphocytes de singes par rapport à celles obtenues sur des lymphocytes de rats.

I.2. Etudes *in vitro*

I.2.1. Les lymphoblastes

I.2.1.1. Protocole expérimental

Les cellules de lymphoblastes arrivées à confluence ont été irradiées à 37 °C, dans des flasques, aux débits de dose de 0,1 et 1 Gy/min, et à des doses d'irradiation comprises entre 2 et 8 Gy. Les mesures de formation d'excimères intermoléculaires ont été réalisées, au spectrofluorimètre, en incorporant l'acide 1-pyrènedécanoïque (APD) dans les suspensions cellulaires, 1 heure après incubation à 37 °C. Les valeurs de l'index de diffusion latérale ont été calculées en effectuant le rapport de l'intensité maximale (I_E) du spectre d'émission des excimères sur celle (I_M) du spectre d'émission des monomères.

I.2.1.2. Résultats

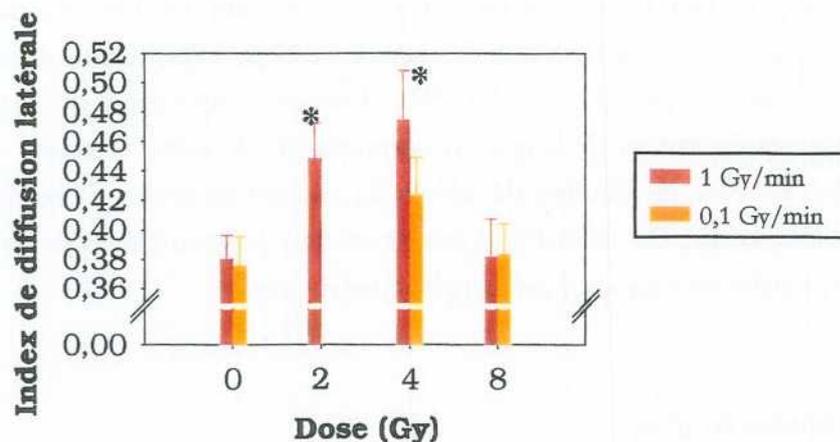


Figure 87 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs de l'index de diffusion latérale mesuré dans les cellules de lymphoblastes. Les suspensions cellulaires ont été incubées 1 heure à 37 °C après une irradiation aux débits de dose de 1 et 0,1 Gy/min. A 0 Gy, chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 12 observations indépendantes. A 2, 4 et 8 Gy, chaque histogramme résulte de la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 6 observations indépendantes. Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$.

Lorsque les suspensions cellulaires sont exposées à un débit de dose de 1 Gy/min, nous observons une augmentation de l'index de diffusion latérale de 17,9 % ($p = 0,047$) à 2 Gy et de 24,7 % ($p = 0,012$) à 4 Gy. Pour une dose délivrée de 8 Gy les valeurs mesurées sont semblables à celles obtenues pour les témoins. Cependant, dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative du rapport I_E/I_M n'a été observée après une irradiation au débit de dose de 0,1 Gy/min.

I.2.2. Les fibroblastes

I.2.2.1. Protocole expérimental

Les cellules de fibroblastes arrivées à confluence ont été irradiées à 8 Gy, au débit de dose de 1 Gy/min et à température ambiante. Ces suspensions cellulaires ont ensuite été incubées à 37 °C 1, 24 et 48 heures après irradiation. Les mesures de polarisation de fluorescence ont été réalisées, au spectrofluorimètre, en utilisant plusieurs sondes fluorescentes : les acides stéariques (3, 6, 9 et 12-AS), le TMA-DPH et l'ANS.

I.2.2.2. Résultats

Dans un premier temps, nous avons comparé les valeurs d'anisotropie des différents marqueurs fluorescents incorporés dans les membranes de fibroblastes non irradiés à leur localisation théorique dans la matrice lipidique (figure 88).

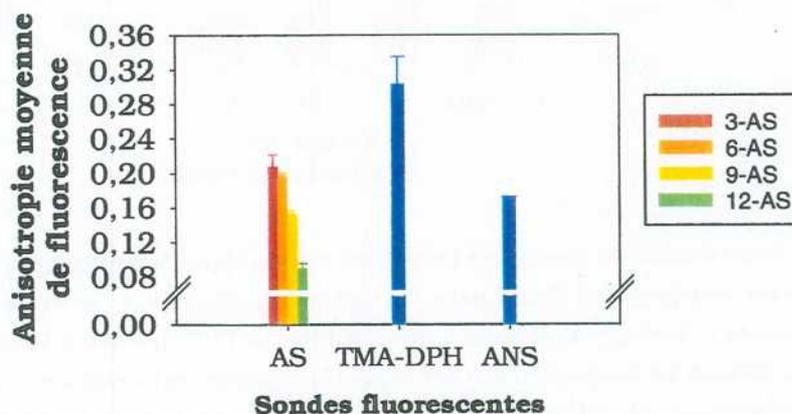


Figure 88 : Comparaisons des valeurs d'anisotropie de fluorescences de différentes sondes incorporées dans les membranes de fibroblastes. Les suspensions cellulaires n'ont pas été exposées aux rayonnements ionisants. Chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 18 expériences indépendantes.

Les résultats obtenus avec les acides stéariques (AS) montrent qu'il existe un gradient de fluidité membranaire dans les cellules de fibroblastes. En effet, les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 9-AS et du 12-AS sont inférieures ($p < 0,001$) respectivement de 26,6 % et de 56,7 % par rapport à celles mesurées avec le 3-AS. Par ailleurs, nous observons une diminution ($p < 0,001$) de 22,6 % et de 54,3 % des valeurs d'anisotropie obtenues d'une part avec le 9-AS et d'autre part avec le 12-AS en comparaison de celles mesurées avec le 6-AS. De plus, les valeurs du 12-AS sont inférieures ($p < 0,001$) de 41 % par rapport à celles obtenues pour le 9-AS.

Les résultats de la figure 86 indiquent également que les valeurs d'anisotropie de fluorescence de l'ANS sont supérieures de 12,7 % ($p = 0,003$) à celles obtenues pour le 9-AS mais inférieures ($p < 0,001$) de 12,7 % à celles mesurées avec le 6-AS.

Quant au TMA-DPH, ses valeurs d'anisotropie augmentent de 46,3 % ($p < 0,001$) et de 54,3 % ($p < 0,001$) par rapport à celles obtenues respectivement pour le 3-AS et le 6-AS.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet d'une irradiation sur la cohésion membranaire des cellules de fibroblastes (figure 89).

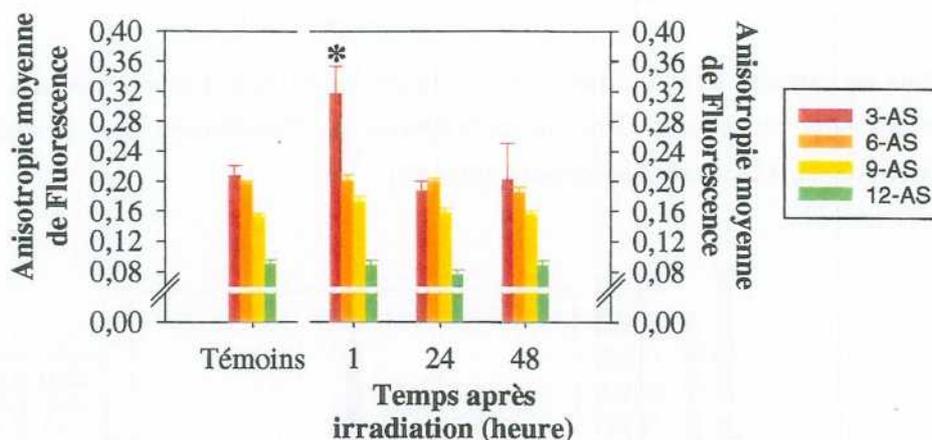


Figure 89: Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes de fibroblastes. Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 1 Gy/min, puis incubées 1, 24, et 48 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Pour les témoins, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 18 expériences indépendantes. 1h, 24h et 48h après irradiation, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

Nous avons observé, une heure après l'exposition aux rayonnements ionisants, une augmentation de 52,8 % ($p = 0,012$) des valeurs d'anisotropie du 3-AS obtenues à 8 Gy par rapport à celles mesurées à 0 Gy (figure 89). Nous constatons également une augmentation non significative des valeurs du 9-AS une heure après irradiation ($0,152 \pm 0,004$ à 0 Gy et $0,171 \pm 0,009$ à 8 Gy). Par ailleurs, aucune variation significative des valeurs mesurées n'a été obtenue, dans nos conditions expérimentales, 24 et 48 heures après irradiation, quelle que soit la sonde utilisée.

Le gradient de fluidité membranaire existant dans les membranes de fibroblastes peut être exprimé sous forme de rapports d'anisotropie de fluorescence (figure 90).

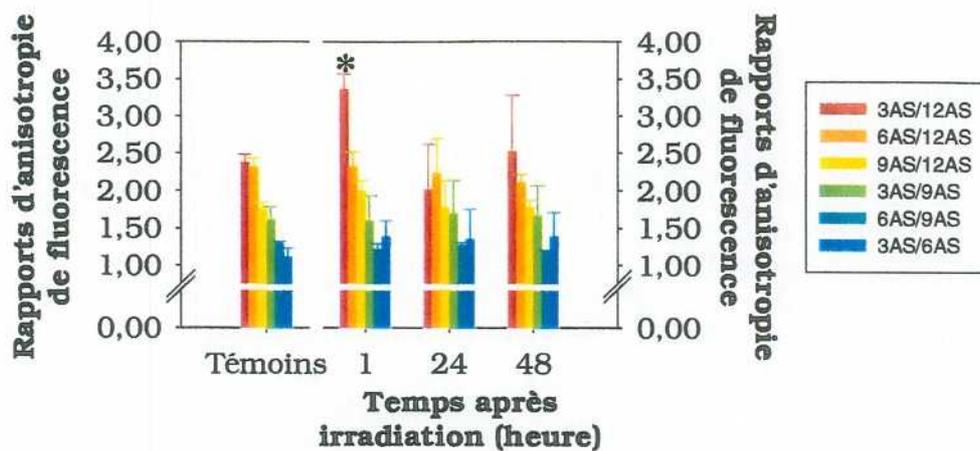


Figure 90 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs des rapports d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes de fibroblastes. Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 1 Gy/min puis incubées, 1, 24, et 48 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Pour les témoins, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 18 expériences indépendantes. 1h, 24h et 48h après irradiation, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

Une heure après irradiation, une augmentation de 41,8 % ($p = 0,017$) des valeurs du rapport 3-AS/12-AS mesurées à 8 Gy a été notée (figure 90). Par contre, dans nos conditions expérimentales, nous ne constatons aucune variation significative des valeurs mesurées 24 et 48 heures après une exposition aux rayonnements ionisants, quel que soit le rapport considéré.

Les résultats obtenus en incorporant le TMA-DPH dans les membranes de fibroblastes sont présentés figure 91.

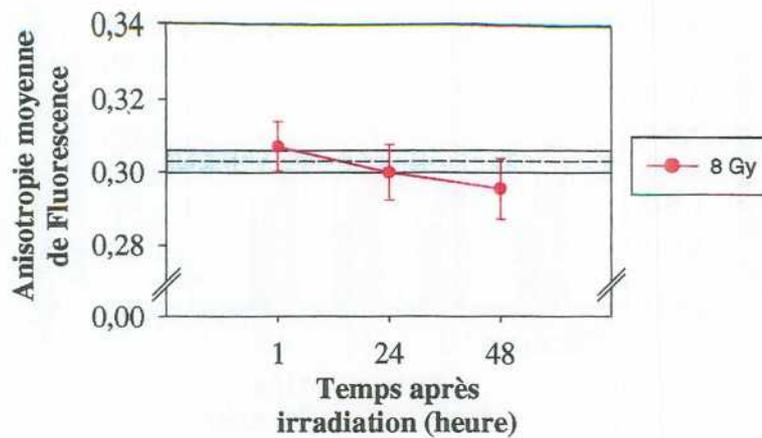


Figure 91 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH incorporé dans les membranes de fibroblastes. Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 1 Gy/min, puis incubées 1, 24, et 48 heures à 37 °C. Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 18 expériences indépendantes. Les points rouges représentent la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes obtenues à 8 Gy.

Dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative de l'index de fluidité membranaire n'a été observée, quel que soit le temps écoulé après une irradiation à une dose de 8 Gy. Cependant, nous observons une tendance à la diminution des valeurs d'anisotropie du TMA-DPH au fur et à mesure que le délai écoulé après irradiation augmente (figure 91).

Les résultats obtenus en incorporant l'ANS dans les membranes de fibroblastes sont présentés figure 92.

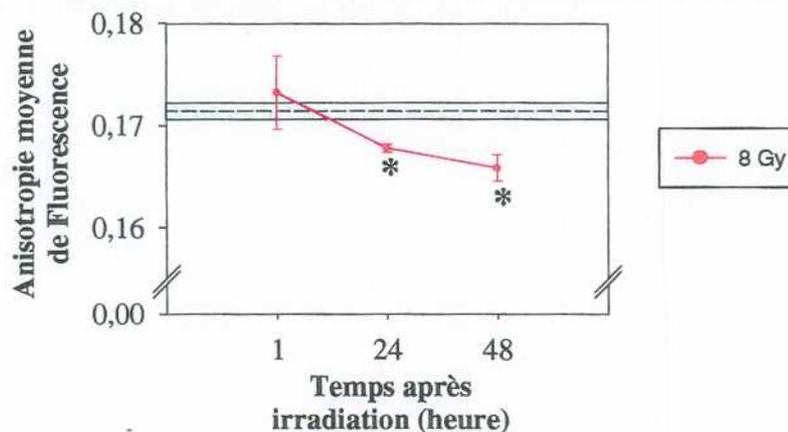


Figure 92 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence de l'ANS incorporé dans les membranes de fibroblastes. Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 1 Gy/min, puis incubées 1, 24, et 48 heures à 37 °C. Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 18 expériences indépendantes. Les points rouges représentent la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes obtenues à 8 Gy. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

Suite à une exposition à une dose de 8 Gy, nous constatons une diminution de 2,1 % ($p = 0,022$) et de 3,3 % ($p = 0,011$) des valeurs obtenues respectivement 24 heures et 48 heures après irradiation en comparaison des valeurs mesurées à 0 Gy (figure 92).

I.2.3. Echantillons sanguins

I.2.3.1. Protocole expérimental

Les échantillons sanguins ont été irradiés à 37 °C, au débit de dose de 0,5 Gy/min et à 8 Gy, par une source gamma de ^{60}Co . Les mesures de polarisation de fluorescence ont été réalisées sur les hématies et les lymphocytes, au spectrofluorimètre et en cytométrie de flux, 1 et 24 heures après incubation à 37 °C. Les sondes utilisées pour ces deux types cellulaires étaient les acides stéariques (3, 6, 9 et 12-AS).

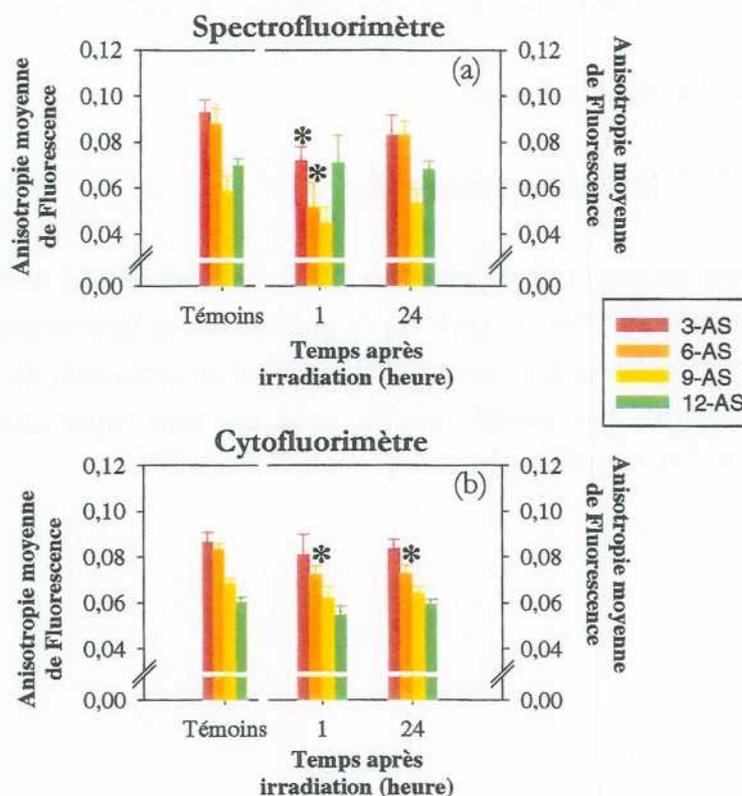
I.2.3.2. Hématies

Figure 93 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes d'hématies. Les mesures ont été réalisées au spectrofluorimètre (a) et en cytométrie de flux (b). Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubées 1 et 24 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Pour les témoins, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 12 expériences indépendantes. 1h et 24h après irradiation, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

En spectrofluorimétrie, les résultats présentés figure 93a montrent que, une heure après l'exposition aux rayonnements ionisants, les valeurs d'anisotropie du 3-AS et du 6-AS diminuent respectivement de 23 % ($p = 0,048$) et de 41 % ($p = 0,042$) à 8 Gy en comparaison des valeurs témoins. Cependant, dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative des valeurs mesurées n'a été observée 24 heures après irradiation en utilisant cette technique.

En cytométrie de flux, les résultats de la figure 93b mettent en évidence une diminution des valeurs du 6-AS de 12,9 % ($p = 0,042$) et de 12,1 % ($p = 0,048$) respectivement 1 heure et 24 heures après une exposition gamma à une dose de 8 Gy.

Nous avons déterminé l'effet d'une irradiation sur le gradient de fluidité membranaire des hématies en utilisant les acides stéariques (figure 94).

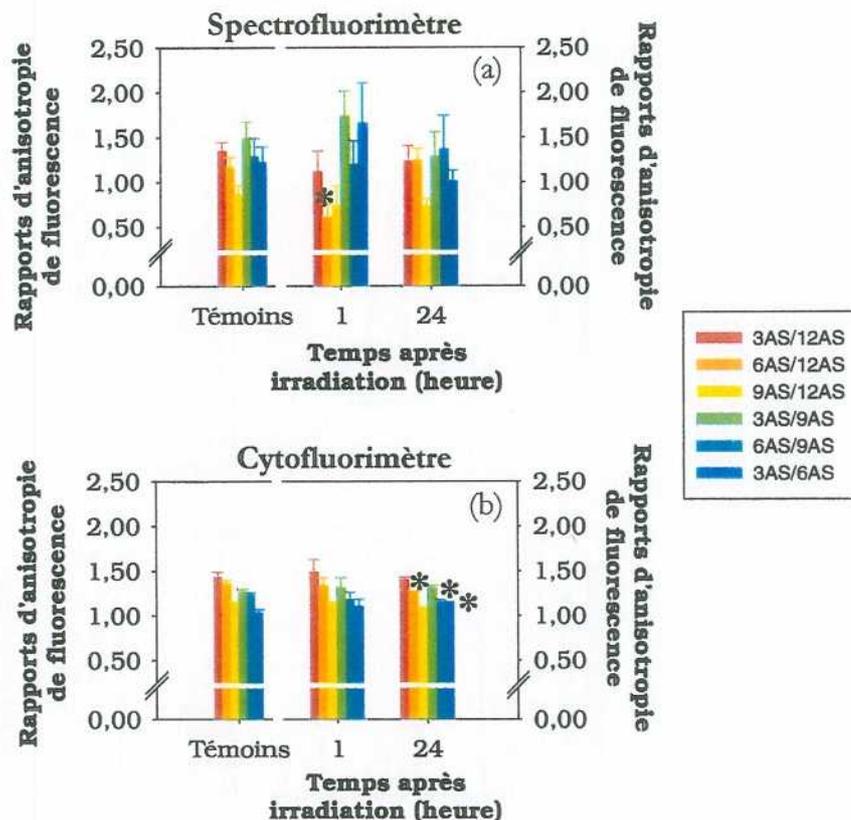


Figure 94 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs des rapports d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes d'hématies. Les mesures ont été réalisées au spectrofluorimètre (a) et en cytométrie de flux (b). Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubées 1 et 24 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Pour les témoins, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 12 expériences indépendantes. 1et 24 heures après irradiation, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

En spectrofluorimétrie, les résultats présentés figure 94a indiquent que des variations significatives du gradient de fluidité membranaire ne sont observables qu'une heure après irradiation. En effet, en comparaison des valeurs témoins, nous constatons une diminution de 47,8 % ($p = 0,048$) des valeurs du rapport 6-AS/12-AS mesurées à 8 Gy.

En cytométrie de flux, les valeurs des rapports 6-AS/12-AS et 6-AS/9-AS diminuent respectivement de 8,1 % ($p = 0,033$) et de 7,4 % ($p = 0,037$), 24 heures après une exposition à 8 Gy par rapport aux valeurs obtenues à 0 Gy. De plus, nous observons également 24 heures après irradiation, une augmentation de 9,4 % ($p = 0,042$) des valeurs du rapport 3-AS/6-AS.

Cependant, dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative des valeurs mesurées 1 heure après irradiation en utilisant cette technique n'a été constatée (figure 94b).

I.2.3.3. Lymphocytes

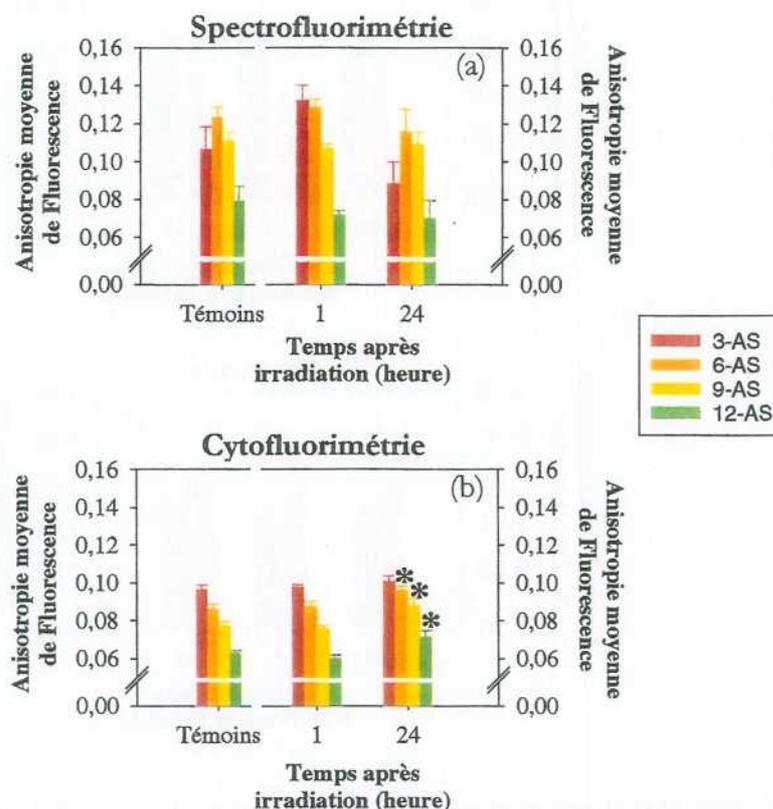


Figure 95 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes de lymphocytes. Les mesures ont été réalisées au spectrofluorimètre sur toute la suspension cellulaire (a) et en cytométrie de flux sur la région R1 (b). Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubées 1 et 24 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Pour les témoins, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 12 expériences indépendantes. 1h et 24h après irradiation, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

En spectrofluorimétrie, dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative des valeurs mesurées après irradiation n'a été observée quels que soient le temps écoulé et la sonde utilisée (figure 95a).

En cytométrie de flux, des variations significatives ont été notées uniquement 24 heures après une exposition aux rayonnements ionisants. En effet, les valeurs d'anisotropie de fluorescence du

6-AS, du 9-AS et du 12-AS mesurées à 8 Gy sont supérieures respectivement de 11,6 % ($p = 0,015$), de 13,8 % ($p = 0,026$) et de 13,2 % ($p = 0,028$) aux valeurs témoins (figure 95b).

Nous avons également déterminé l'effet d'une irradiation sur le gradient de fluidité membranaire des lymphocytes en utilisant les acides stéariques (figure 96).

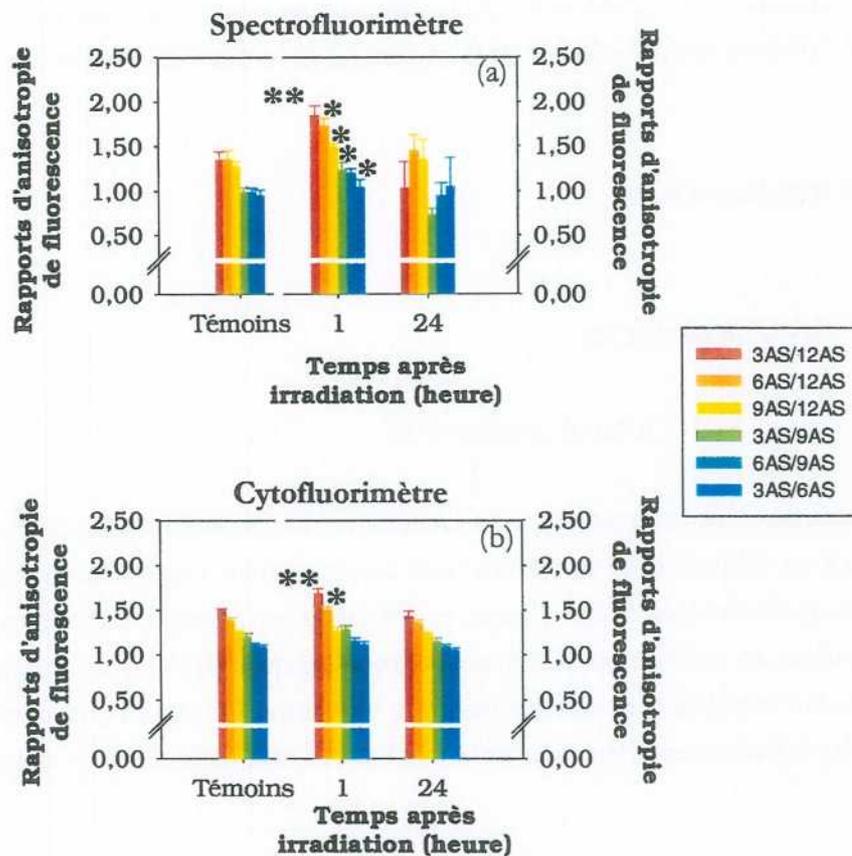


Figure 96 : Effet d'une irradiation gamma sur les valeurs des rapports d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes de lymphocytes. Les mesures ont été réalisées au spectrofluorimètre sur toute la suspension cellulaire (a) et en cytométrie de flux sur la région R1 (b). Les suspensions cellulaires ont été irradiées à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min, puis incubées 1 et 24 heures à 37 °C. Les valeurs témoins ont été établies à partir des valeurs obtenues à 0 Gy. Pour les témoins, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM d'au moins 12 expériences indépendantes. 1et 24 heures après irradiation, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

En spectrofluorimétrie, les résultats obtenus indiquent qu'il existe une augmentation des rapports 3-AS/12-AS, 6-AS/12-AS et 9-AS/12-AS respectivement de 37,1 % ($p = 0,006$), de 27,6 % ($p = 0,028$) et de 16,9 % ($p = 0,02$) une heure suite à une exposition à une dose de 8 Gy par rapport aux valeurs mesurées à 0 Gy. De plus, nous constatons aussi, une heure après une irradiation à 8

Gy, une augmentation de 24,9 % ($p = 0,021$) et de 22,1 % ($p = 0,013$) des valeurs respectives des rapports 3-AS/9-AS et 6-AS/9-AS. Cependant, dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative n'a été constatée 24 heures après irradiation (figure 96a).

En cytométrie de flux, les variations du gradient de fluidité membranaire ne sont également observables qu'une heure après une exposition aux rayonnements ionisants. En effet, les valeurs des rapports 3-AS/12-AS et 6-AS/12-AS mesurées à 8 Gy augmentent respectivement de 12,1 % ($p = 0,004$) et de 8,8 % ($p = 0,044$) en comparaison des valeurs témoins (figure 96b).

I.3. Etudes *in vivo*

I.3.1. Le modèle rat

I.3.1.1. Protocole expérimental

Les animaux ont été irradiés corps entier avec une source gamma de ^{60}Co aux doses de 1,5 et 8 Gy et à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les échantillons sanguins ont été prélevés 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation. Sur chaque prélèvement les principaux éléments figurés du sang ont été dénombrés en utilisant un automate d'hématologique (ADVIA 120, Bayer, France). Les mesures de fluidité membranaire ont été réalisées, en cytométrie de flux, en incorporant le 6 et le 9-AS dans les membranes d'hématies, et le TMA-DPH et le 6-AS dans les membranes de lymphocytes.

I.3.1.2. Numération cellulaire

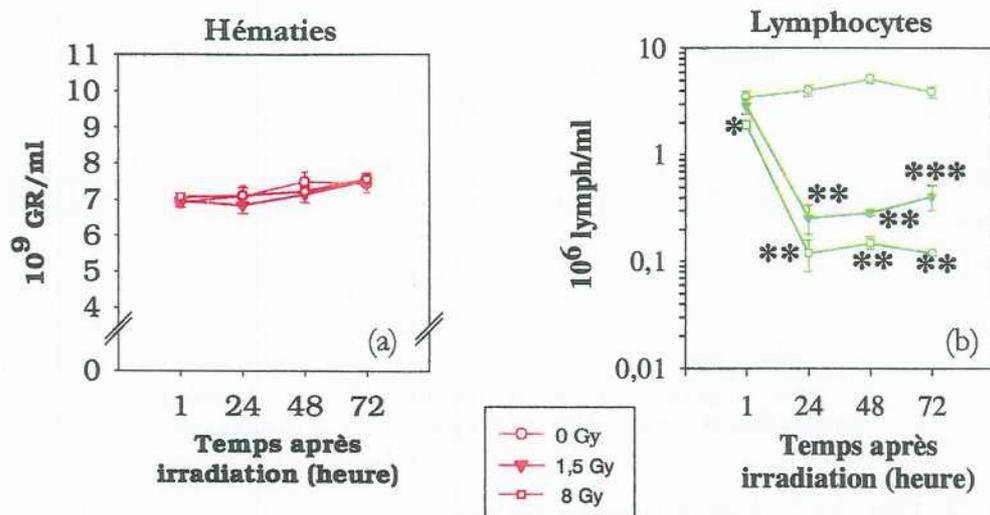


Figure 97 : Variations de la concentration sanguine en hématies (a) et en lymphocytes (b), chez le rat, après une exposition totale aux rayonnements gamma du ^{60}Co . Les animaux ont été irradiés aux doses de 1,5 et 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les numérations ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation. Chaque point représente la valeur moyenne \pm SEM de six expériences indépendantes. Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Comme attendu, quel que soit la dose appliquée, nous constatons que le nombre moyen d'hématies chez le rat ne varie pas au cours de l'expérience (figure 97a).

La diminution du nombre de lymphocytes après irradiation est d'autant plus importante et d'autant plus précoce que la dose est élevée (figure 97b). Les animaux exposés à une dose de 1,5 Gy présentent une chute de la concentration sanguine en lymphocytes dès 24 heures de 93,6 % ($p = 0,002$) qui se stabilise jusqu'à 72 heures après irradiation. Lorsque la dose délivrée est de 8 Gy, nous constatons une baisse du nombre de lymphocytes dès une heure de 44,5 % ($p = 0,041$) qui s'accroît à 24 heures (97 % ; $p = 0,002$) et persiste jusqu'à 72 heures (figure 97b).

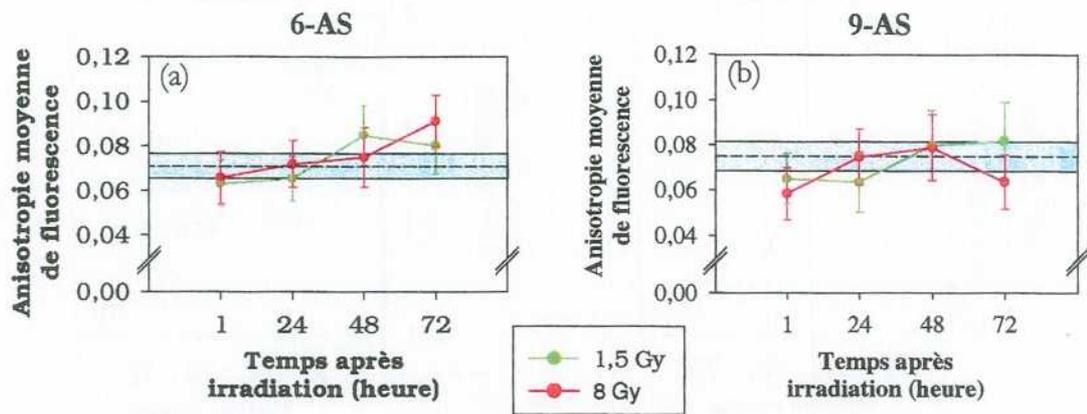
I.3.1.3. Hématies

Figure 98 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6-AS (a) et du 9-AS (b) incorporés dans les membranes d'hématies. Les animaux ont été irradiés aux doses de 1,5 et 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation. Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 24 observations indépendantes. Les points rouges et verts résultent des valeurs moyennes \pm SEM de six expériences indépendantes.

Dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative des valeurs mesurées du 6-AS et du 9-AS n'a été observée après une exposition aux rayonnements ionisants quels que soient la dose considérée et le temps écoulé.

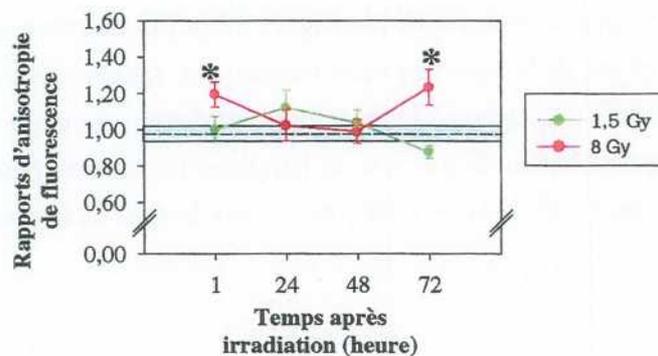


Figure 99 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur les valeurs du rapport d'anisotropie de fluorescence $\langle r \rangle_{6-AS} / \langle r \rangle_{9-AS}$ dans les membranes d'hématies. Les animaux ont été irradiés aux doses de 1,5 et 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation. Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 24 observations indépendantes. Les points rouges et verts résultent de la valeur moyenne \pm SEM de six expériences indépendantes. Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$.

Lorsque les animaux ont été exposés à une dose de 1,5 Gy, dans nos conditions expérimentales, aucune variation significative des valeurs mesurées n'a été observée. Cependant, les résultats obtenus figure 99 mettent en évidence une augmentation des valeurs du rapport 6-AS/9-AS de 21,7 % ($p = 0,03$) et de 25,7 % ($p = 0,023$) respectivement une heure et 72 heures après une irradiation à une dose de 8 Gy par rapport aux valeurs témoins.

I.3.1.4. Lymphocytes

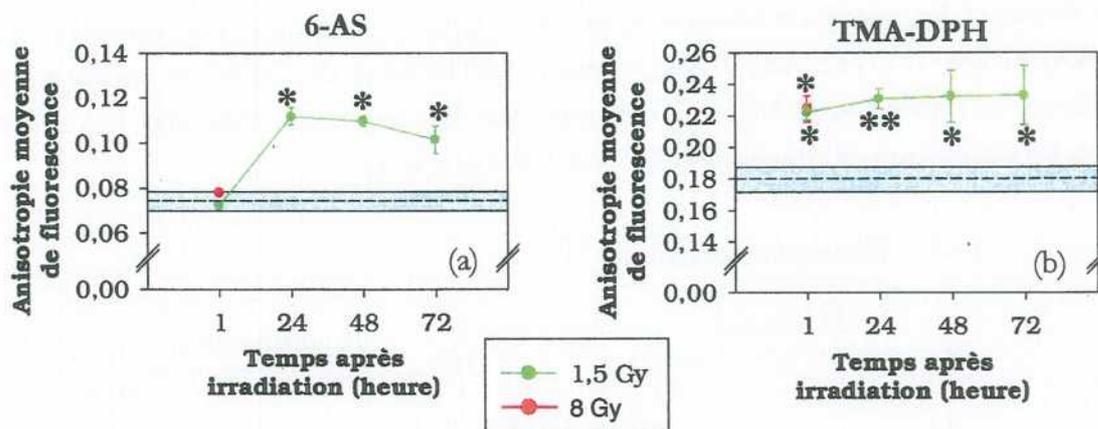


Figure 100 : Effet d'une exposition totale des rats au rayonnement gamma du ^{60}Co sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6-AS (a) et du TMA-DPH (b) incorporés dans les membranes de lymphocytes. Les animaux ont été irradiés aux doses de 1,5 et 8 Gy, à un débit de dose de 0,5 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation. Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 24 observations indépendantes. Les points rouges et verts résultent de la valeur moyenne \pm SEM de six expériences indépendantes. Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Nous observons une augmentation des valeurs d'anisotropie après une exposition à une dose de 1,5 Gy, quelle que soit la sonde fluorescente utilisée (figure 100b et 100a). Ces variations sont plus précoces lorsque les mesures sont réalisées avec le TMA-DPH. En effet, les valeurs d'anisotropie du TMA-DPH et du 6-AS augmentent respectivement dès 1 heure de 23,7 % ($p = 0,017$) et à partir de 24 heures après irradiation de 50,5 % ($p = 0,041$). De plus, ces modifications radio-induites persistent jusqu'à 72 heures après irradiation que ce soit pour les mesures réalisées avec le TMA-DPH ou le 6-AS.

Les mesures d'anisotropie de fluorescence n'ont pu être étendues à des temps supérieurs à 1 heure, pour les animaux irradiés à une dose de 8 Gy, à cause de la lymphopénie. Cependant, nous constatons également que, pour une exposition à 8 Gy, les valeurs d'anisotropie du TMA-DPH augmentent de 24,6 % ($p = 0,021$) 1 heure après irradiation tandis que les valeurs obtenues pour le 6-AS restent stables.

I.3.2. Le modèle singe

I.3.2.1. Protocole expérimental

Les animaux ont été exposés corps entier aux rayons gamma du ^{60}Co à une dose de 8 Gy et au débit de dose de 0,1 Gy/min. Les échantillons sanguins ont été prélevés avant irradiation puis 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation. Chaque animal est donc son propre témoin. Sur chaque prélèvement, les principaux éléments figurés du sang ont été dénombrés en utilisant un automate d'hématologie (ADVIA 120, Bayer, France). Les mesures de fluidité membranaire ont été réalisées, en cytométrie de flux, en incorporant dans les membranes d'hématies le 6 et le 9-AS, et dans les membranes de lymphocytes le TMA-DPH et le 6-AS.

I.3.2.2. Numération cellulaire

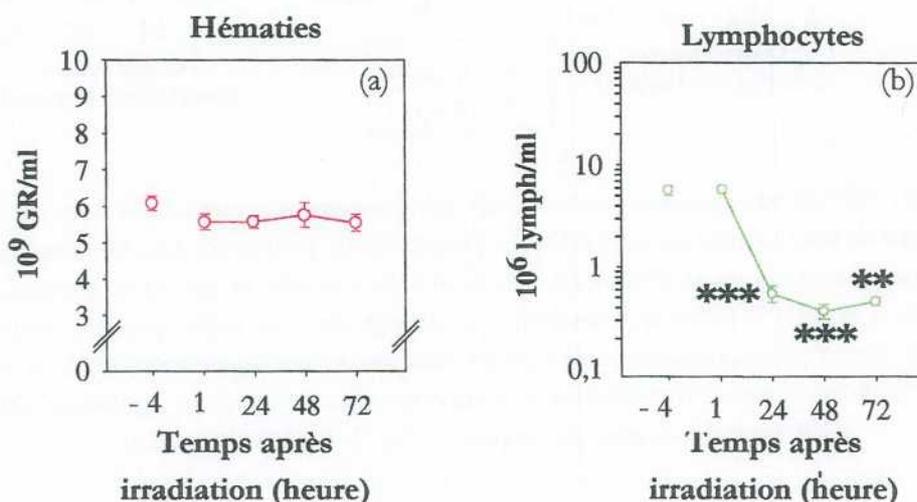


Figure 101 : Variations de la concentration sanguine en hématies (a) et en lymphocytes (b), chez le singe, après une exposition totale aux rayonnements gamma du ^{60}Co . Les animaux ont été irradiés à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,1 Gy/min. Les numérations ont été réalisées 4 heures avant irradiation et 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation. Chaque point représente la valeur moyenne \pm SEM de six expériences indépendantes.

Différences significatives par rapport aux valeurs témoins (0 Gy), *** $p < 0,001$ et ** $p < 0,01$.

Comme cela a été observé précédemment chez le rat, quel que soit la dose appliquée, nous constatons que le nombre moyen d'hématies chez le singe ne varie pas au cours de l'expérience (figure 101a).

Lorsque les animaux sont irradiés à une dose de 8 Gy, nous observons une chute de la concentration en lymphocytes dès 24 heures de 90,3 % ($p < 0,001$) qui se stabilise jusqu'à 72 heures après irradiation (91,9 % ; $p = 0,002$) (figure 101b).

I.3.2.3. Hématies

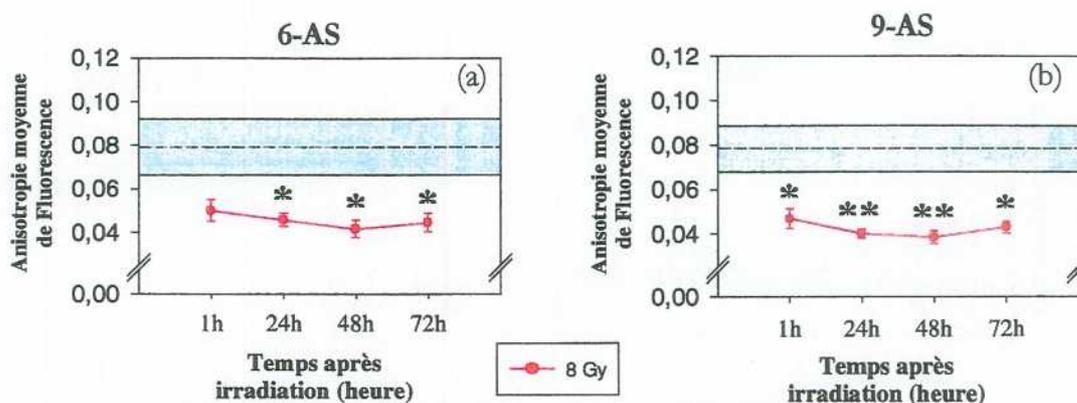


Figure 102 : Effet d'une exposition totale des singes au rayonnement gamma du ^{60}Co sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6-AS (a) et du 9-AS (b) incorporés dans les membranes d'hématies Les animaux ont été irradiés à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,1 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation. Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 6 observations indépendantes. Les points rouges représentent la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes obtenues à 8 Gy. Différences significatives par rapport aux témoins (0 Gy), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

L'exposition des animaux à une dose de 8 Gy induit une diminution des valeurs d'anisotropie du 6-AS et du 9-AS dès 1 heure après irradiation (figure 102a et 102b). De plus, quelle que soit la sonde considérée, ces variations persistent jusqu'à 72 heures après irradiation (43,8 % ($p = 0,029$) et 45,3 % ($p = 0,026$) respectivement pour le 6-AS et le 9-AS).

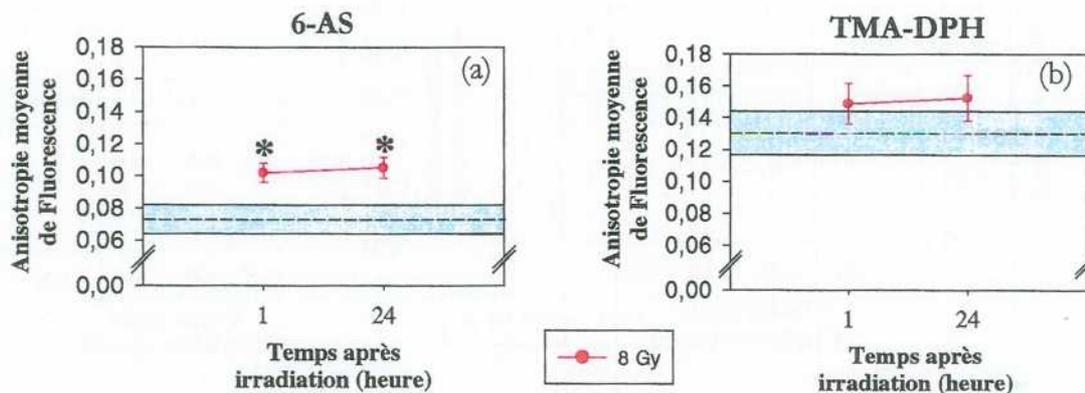
I.3.2.4. Lymphocytes

Figure 103 : Effet d'une exposition totale des singes au rayonnement gamma du ^{60}Co sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 6-AS (a) et du TMA-DPH (b) incorporés dans les membranes de lymphocytes. Les animaux ont été irradiés à une dose de 8 Gy, à un débit de dose de 0,1 Gy/min. Les mesures ont été réalisées 1, 24, 48 et 72 heures après irradiation. Le rectangle bleu a été établi à partir des valeurs témoins obtenues à 0 Gy. Il représente la valeur moyenne (ligne en pointillés) \pm SEM (lignes continues) de 6 observations indépendantes. Les points rouges représentent la valeur moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes obtenues à 8 Gy. Différences significatives par rapport aux témoins (0 Gy), * $p < 0,05$.

Les mesures d'anisotropie de fluorescence n'ont pu être étendues à des temps supérieurs à 1 heure pour les animaux irradiés à une dose de 8 Gy à cause de la lymphopénie.

Dans nos conditions expérimentales, nous n'observons des variations significatives uniquement lorsque les mesures sont réalisées avec le 6-AS (figure 103a). En effet, les valeurs d'anisotropie du 6-AS augmentent de 39,5 % ($p = 0,022$) et de 44 % ($p = 0,02$) respectivement 1 heure et 24 heures après une irradiation à une dose de 8 Gy en comparaison des valeurs témoins.

I.4. Etudes sur l'HommeI.4.1. Protocole expérimental

Cette étude a été réalisée sur des prélèvements de sang de patients ayant subi une irradiation corporelle totale. Les échantillons sanguins ont été obtenus avant et 16 heures après la première fraction de dose de 1,8 Gy. Sur chaque prélèvement les principaux éléments figurés du sang ont été dénombrés en utilisant un automate d'hématologie (Advia 120, Bayer, France). Les mesures de fluidité membranaire ont été réalisées, en cytométrie de flux, en incorporant les acides stéariques dans les membranes d'hématies.

I.4.2. Numération cellulaire

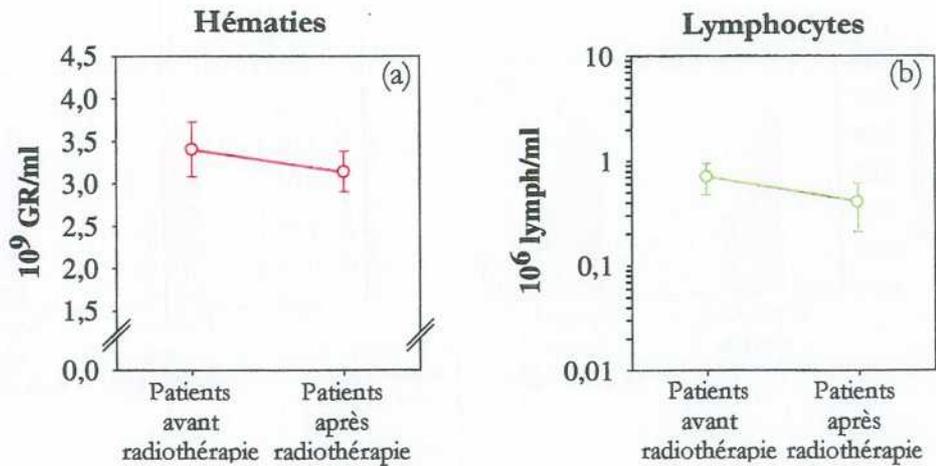


Figure 104 : Variations de la concentration sanguine en hématies (a) et en lymphocytes (b), chez des patients soumis à une irradiation totale corps entier. Les mesures ont été réalisées, avant et 16 heures après une première fraction de dose de 1,8 Gy. Chaque point représente la valeur moyenne \pm SEM de six observations indépendantes.

Tout d'abord nous constatons que la concentration sanguine en lymphocytes (figure 104b) mesurée avant traitement est faible par rapport à la valeur basale observée chez un adulte sain ($2 \cdot 10^6$ cellules/ml). D'autre part, le nombre d'hématies ($3,4 \pm 0,32 \cdot 10^6$ cellules/ml) et de lymphocytes ($0,72 \pm 0,24 \cdot 10^6$ cellules/ml) ne varient pas 16 heures après une première fraction de dose de 1,8 Gy.

I.4.3. Hématies

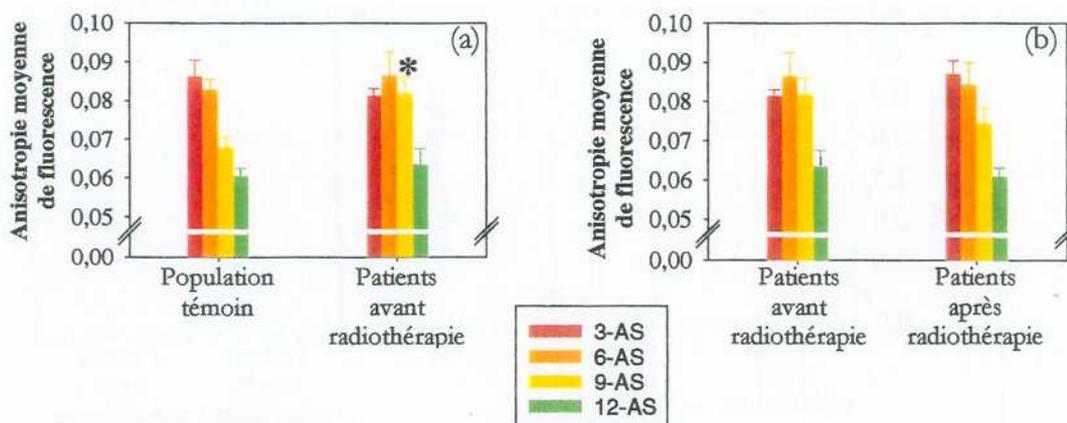


Figure 105 : Etude de l'effet d'une irradiation corporelle totale sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes d'hématies. Cette étude a été réalisée sur une population témoin et sur des patients avant radiothérapie et 16 heures après avoir reçu une première fraction de dose de 1,8 Gy.

Pour la population témoin, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 14 observations indépendantes. Pour les patients, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de six observations indépendantes. Différences significatives par rapport au bruit de fond, * $p < 0,05$.

Dans un premier temps, nous avons comparé les valeurs d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes d'hématies provenant de prélèvements sanguins d'une population témoin et de patients qui vont subir un traitement de radiothérapie (figure 105a).

Nos résultats indiquent qu'il existe un gradient de fluidité membranaire dans les membranes d'hématies provenant des échantillons sanguins des deux types de population. En effet, les valeurs d'anisotropie de fluorescence du 12-AS mesurées dans les membranes d'hématies des patients avant traitement sont significativement inférieures de 22,1 % ($p = 0,003$), de 28,3 % ($p = 0,012$) et de 22,5 % ($p = 0,012$) par rapport aux valeurs respectivement obtenues pour le 3-AS, le 6-AS et le 9-AS. Nous observons également une diminution significative de 30,1 % ($p < 0,001$), de 27,1 % ($p < 0,001$) et de 11,1 % ($p = 0,042$) des valeurs d'anisotropie du 12-AS mesurées dans les globules rouges de la population témoin en comparaison de celles obtenues respectivement avec le 3-AS, le 6-AS et le 9-AS (figure 105a). De plus, uniquement lorsque les mesures sont réalisées sur des hématies provenant d'échantillons sanguins d'une population témoin, les valeurs d'anisotropie du 9-AS sont significativement inférieures de 21,4 % ($p = 0,001$) et de 18 % ($p < 0,001$) à celles obtenues respectivement avec le 3-AS et le 6-AS.

D'autre part, les membranes de globules rouges recueillies à partir des échantillons sanguins provenant de patients non traités diffèrent de celles obtenues à partir de prélèvement témoins par une augmentation de 20,5 % ($p = 0,012$) des valeurs d'anisotropie du 9-AS.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet d'une irradiation corporelle totale sur la cohésion membranaire des hématies en utilisant les acides stéariques (figure 105b). Aucune variation significative des valeurs mesurées n'a pu être mise en évidence quelle que soit la sonde utilisée.

L'expression des résultats sous forme de rapports d'anisotropie de fluorescence a permis d'obtenir des informations supplémentaires.

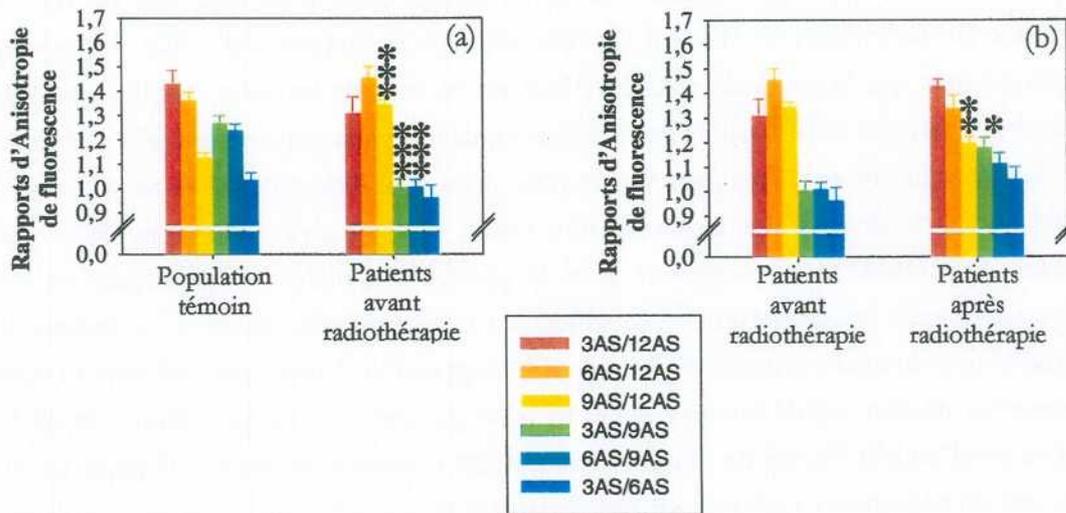


Figure 106 : Etude de l'effet d'une irradiation corporelle totale sur les valeurs des rapports d'anisotropie de fluorescence des acides stéariques incorporés dans les membranes d'hématies. Cette étude a été réalisée sur une population témoin et sur des patients avant radiothérapie et 16 heures après avoir reçu une première fraction de dose de 1,8 Gy. Pour la population témoin, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de 14 observations indépendantes. Pour les patients, chaque histogramme représente la valeur moyenne \pm SEM de six observations indépendantes. Différences significatives par rapport à 0 Gy, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Le calcul des rapports d'anisotropie de fluorescence (figure 106a) permet de mettre en évidence que le gradient de fluidité membranaire des hématies provenant d'échantillons sanguins de patients non traités est perturbé en comparaison de celui mesuré sur des globules rouges de prélèvements témoins. En effet, nous observons une diminution des rapports 3-AS/9-AS et 6-AS/9-AS respectivement de 20,8 % ($p < 0,001$) et de 18,8 % ($p < 0,001$). D'autre part, les valeurs du rapport 9-AS/12-AS augmentent de 19,2 % ($p < 0,001$) par rapport à celles mesurées dans les hématies de la population témoin.

De plus, nos résultats indiquent que l'exposition à une première fraction de dose de 1,8 Gy induit une diminution de 10,9 % ($p = 0,002$) et une augmentation de 17,4 % ($p = 0,012$) respectivement des rapports d'anisotropie du 9-AS/12-AS et du 3-AS/9-AS en comparaison de ceux mesurés avant traitement (figure 106b).

II. Discussion

Pour estimer la dose reçue lors d'une exposition accidentelle aux rayonnements ionisants, la dosimétrie biologique se base sur les effets dommageables de l'irradiation sur la molécule d'ADN en dénombrant la fréquence de dicentriques dans les lymphocytes circulants. Cependant, cette technique présente des limites dans les cas d'une irradiation hétérogène et localisée, dues essentiellement au type de matériel biologique utilisé. C'est pourquoi, afin de rechercher de nouveaux bio-indicateurs de dose, il est nécessaire de considérer des cibles des rayonnements ionisants autres que la molécule d'ADN. Nous avons vu dans les deux chapitres précédents que la membrane est une cible sensible des rayonnements ionisants que ce soit après une exposition *in vitro* ou *in vivo* au rayonnement gamma. De plus, nous avons montré que la mesure de l'index de fluidité membranaire permet d'obtenir une vision intégrée des dommages de la membrane cellulaire. Ces observations suggèrent donc la possibilité d'utiliser ce paramètre en dosimétrie biologique comme indicateur d'une exposition aux rayonnements ionisants. La mesure de l'index de fluidité membranaire présente l'avantage d'être applicable à tout type cellulaire et notamment d'obtenir un résultat rapide car les cellules ne sont pas mises en culture. Notre objectif dans ce chapitre est d'évaluer l'index de fluidité membranaire comme indicateur biologique potentiel des effets des rayonnements ionisants en cas de suspicion d'irradiation. Nous devons donc vérifier que l'index de fluidité membranaire permet d'obtenir des relations effet-dose, que son effet persiste dans le temps et qu'il est applicable à des modèles *in vivo*. Pour cela, notre démarche a été la suivante :

1°/ Nous avons comparé les valeurs de l'index de fluidité membranaire en fonction de la localisation du marqueur fluorescent, du type cellulaire et du modèle considéré.

2°/ Nous avons ensuite examiné les variations de la fluidité membranaire après une irradiation *in vitro* sur différents modèles cellulaires : échantillons sanguins et cultures cellulaires de fibroblastes ou de lymphoblastes.

3°/ Nous avons testé l'utilisation de l'index de fluidité membranaire comme bio-indicateur de dose suite à une exposition totale *in vivo*. Ces expériences ont tout d'abord été réalisées sur des modèles animaux tels que le rat et le singe. Puis, afin de finaliser ces études, nous avons évalué la faisabilité de la technique de polarisation de fluorescence sur des échantillons de sang de patients ayant subi une irradiation corporelle totale.

Evolution de l'index de fluidité membranaire en fonction de la localisation de la sonde, du type cellulaire et du modèle considéré

Les mesures de fluidité membranaire dépendent du type de sonde fluorescente utilisé. Nous avons donc comparé les valeurs d'anisotropie obtenues pour plusieurs marqueurs fluorescents incorporés dans un même type cellulaire : une lignée de fibroblastes. Nos résultats montrent qu'il existe un gradient de fluidité le long des chaînes hydrocarbonées des acides gras de la bicouche lipidique des fibroblastes lorsque nous utilisons les acides stéariques comme sondes fluorescentes. En outre, les valeurs d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH sont supérieures à celles obtenues pour les acides stéariques et l'ANS. En effet, le TMA-DPH se localise à l'interface eau-lipide de la membrane (Kuhry et coll., 1983), c'est à dire au niveau des têtes polaires des phospholipides qui sont caractérisées par une fluidité beaucoup plus faible que les régions hydrophobes de la membrane. De plus, nous avons montré que l'ANS présente des valeurs d'anisotropie comprises entre celles du 6-AS et du 9-AS. Or cette sonde se situe à l'interface lipide-protéine de la bicouche lipidique (Yonei & Kato, 1978). Donc l'ANS se positionne à l'interface lipide-protéine à mi-profondeur de la région hydrophobe. Ainsi, en utilisant plusieurs marqueurs fluorescents, nous pouvons cibler la mesure de la fluidité membranaire à différents niveaux de la bicouche lipidique et donc situer les altérations des propriétés biophysiques membranaires radio-induites. De plus, ces observations indiquent que la mesure de fluidité membranaire peut être réalisée sur des cellules de peau qui présentent un intérêt dans le cas d'une irradiation localisée.

Nous avons ensuite comparé les valeurs d'anisotropie de fluorescence de plusieurs sondes en fonction du type cellulaire (érythrocyte, lymphocyte et fibroblaste). Ces résultats ont mis en évidence que les membranes de fibroblastes sont plus rigides que les membranes de lymphocytes et d'érythrocytes, quelle que soit la sonde employée. Ces cellules appartiennent à des compartiments tissulaires différents et par conséquent n'exercent pas les mêmes fonctions cellulaires. Les fibroblastes sont des cellules adhérentes et non circulantes en comparaison des lymphocytes et érythrocytes. Les membranes de lymphocytes se distinguent de celles des érythrocytes par une rigidification du micro-environnement du 9-AS. Nous avons montré dans le chapitre 3 que les membranes de lymphocytes présentaient une composition en lipides différente de celle des érythrocytes. D'autre part, la membrane des érythrocytes a la particularité de s'adapter aux dimensions des vaisseaux sanguins, ce qui n'est pas le cas des lymphocytes. Cette adaptation confère à la membrane des hématies une plus grande flexibilité que celle des lymphocytes. Donc, il semblerait que les propriétés biophysiques des membranes plasmiques varient d'un type cellulaire à un autre car elles sont liées à la composition en lipides et protéines membranaires qui est caractéristique de la fonction cellulaire.

Finalement, nous avons comparé les valeurs d'anisotropie de fluorescence de plusieurs marqueurs obtenues pour un même type cellulaire (lymphocyte et érythrocyte) en fonction du modèle étudié

(Homme, singe et rat). Nous avons observé une rigidification du micro-environnement du 6-AS chez l'Homme en comparaison du rat, quel que soit le type cellulaire considéré. En outre, l'interface eau-lipide de la bicouche lipidique des lymphocytes est la plus fluide chez l'être humain et la plus rigide chez le singe. Ces résultats s'expliquent par une composition en lipides et protéines membranaires qui varie d'une espèce à une autre (Roelofsen et coll., 1981). En effet, nous avons constaté que la composition en lipides des membranes d'érythrocytes est différente chez le rat et l'Homme.

En résumé, nos résultats ont mis en évidence que l'utilisation de plusieurs marqueurs fluorescents permet l'évaluation complète de l'état de fluidité membranaire de la bicouche lipidique. En outre, les valeurs basales de fluidité membranaire varient d'un type cellulaire à un autre et selon le modèle considéré. Les bases des mesures de l'index de fluidité membranaire étant posées nous avons étudié les variations des propriétés biophysiques de la membrane après une irradiation *in vitro*.

Evolution de l'index de fluidité membranaire après une irradiation *in vitro*

Nous avons étudié les variations de fluidité membranaire après une exposition aux rayonnements ionisants de cellules de lymphoblastes en utilisant la technique de formation d'excimères intermoléculaires. Cette méthode permet d'estimer le mouvement de diffusion latérale des lipides dans le plan de la membrane (Galla & Hartmann, 1980). En particulier, elle présente l'intérêt de pouvoir rendre compte des interactions entre lipides et protéines car les mouvements des lipides sont contraints par la présence de protéines dans la bicouche lipidique (Galla & Hartmann, 1980). Nos résultats indiquent que la mobilité transversale des lipides augmente en fonction de la dose, une heure après une irradiation à 2 et 4 Gy et à un débit de dose de 1 Gy/min, mais retourne à la valeur basale lorsque la dose appliquée est de 8 Gy. Une augmentation des mouvements transverses des lipides a été également observée après une irradiation X de membranes d'érythrocytes (Yonei et coll., 1979) et de thymocytes (Kölling et coll., 1994) à des doses semblables. Kölling et coll. (1994) ont aussi constaté qu'à partir de 6 Gy, l'index de diffusion latérale diminue pour atteindre la valeur obtenue pour des échantillons non irradiés. Par ailleurs, les mesures réalisées au laboratoire par Berroud et coll. (1996) sur des cellules de lymphoblastes, dans des conditions expérimentales et d'irradiation similaires, ont mis en évidence des modifications de la fluidité membranaire radio-induites en utilisant la technique de polarisation de fluorescence. Ces auteurs ont observé une augmentation de la fluidité membranaire d'autant plus marquée que la dose est élevée et détectable jusqu'à 24 heures après une exposition aux rayonnements ionisants. Cependant, bien que les modifications de l'index de diffusion latérale ne

soient plus perceptibles lorsque le débit de dose est de 0,1 Gy/min, la technique de polarisation de fluorescence permet d'observer des altérations de fluidité membranaire d'autant plus importantes que le débit de dose est faible. Cette différence de sensibilité entre ces deux techniques a été également constatée par Kleinfeld et coll. (1981). Pour des débits de dose inférieurs à 1 Gy/min et pour des doses supérieures à 6 Gy, l'irradiation induit une fluidification membranaire dans des micro-domaines qui n'affecterait pas globalement la mobilité transverse des lipides. En effet, des modifications de fluidité peuvent être détectées dans des micro-domaines membranaires bien que la fluidité de l'ensemble de la bicouche, c'est à dire à plus grande échelle, ne soit pas altérée (Kleinfeld et coll., 1981). Ces résultats montrent que la méthode de mesure de l'index de fluidité membranaire par polarisation de fluorescence est plus sensible pour estimer les dommages membranaires radio-induits que la technique de formation d'excimères intermoléculaires car l'irradiation induit des perturbations de la fluidité membranaire dans des micro-domaines.

Nous avons étudié l'effet d'une exposition aux rayonnements ionisants à une dose de 8 Gy de fibroblastes jusqu'à 48 heures après irradiation en utilisant plusieurs marqueurs fluorescents. Des modifications du gradient de fluidité membranaire de l'ensemble de la bicouche (3-AS/12-AS) ont été détectées une heure après irradiation. Ces altérations radio-induites se traduisent par une rigidification de la partie haute de la région hydrocarbonée (3-AS). D'autre part, l'utilisation de l'ANS a permis de mettre en évidence une fluidification de l'interface lipide-protéine à partir de 24 heures après irradiation et qui persiste jusqu'à 48 heures. Ces résultats mettent en évidence que des dommages membranaires radio-induits des cellules de fibroblastes sont détectables précocement en utilisant le 3-AS et à plus long terme si les mesures sont réalisées avec l'ANS. L'utilisation de plusieurs sondes dont la localisation membranaire est différente permet de suivre l'évolution des atteintes membranaires radio-induites dans des micro-domaines plusieurs jours après irradiation. Par ailleurs, l'observation d'altérations de la fluidité membranaire après une exposition au rayonnement gamma de cellules de peau permet d'envisager l'utilisation de la technique de polarisation de fluorescence dans le cadre d'une irradiation localisée.

L'effet d'une irradiation sur des échantillons sanguins a été mesuré en utilisant les acides stéariques jusqu'à 24 heures après irradiation. Cette étude a été réalisée sur des lymphocytes et des érythrocytes. Nos résultats confirment que la cytométrie de flux est plus sensible que la spectrofluorimétrie dans la détection des dommages membranaires radio-induits, quel que soit le type cellulaire considéré. En effet, la cytométrie de flux permet d'observer ces altérations jusqu'à 24 heures après irradiation alors que la spectrofluorimétrie ne les détecte que dans les temps précoces c'est à dire une heure après irradiation. De plus, nos résultats indiquent que l'irradiation induit une fluidification du micro-environnement du 6-AS dans les membranes de globules rouges. Cela se traduit par des perturbations du gradient de fluidité membranaire principalement dans les régions profondes de la chaîne hydrocarbonée de la bicouche lipidique. Par ailleurs, suite à une exposition aux rayonnements ionisants, les lymphocytes présentent une rigidification des

régions profondes des chaînes d'acides gras membranaires qui sont détectables 24 heures après irradiation avec le 6-AS, le 9-AS et le 12-AS. Ces observations complètent les résultats obtenus par Benderitter et coll. (1999) sur des lymphocytes dans des conditions d'expérimentation et d'irradiation similaires. En effet, ils ont constaté une fluidification de l'interface lipide-protéine qui persistait jusqu'à 24 heures après irradiation. De plus, ils ont montré l'existence de relations effet-dose à partir de 1,5 Gy. L'index de fluidité membranaire peut donc être considéré comme un indicateur d'exposition aux rayonnements ionisants *in vitro* jusqu'à 24 heures après irradiation. D'autre part, comme les dommages membranaires se localisent dans des micro-domaines l'utilisation des acides stéariques et en particulier du 6-AS et du 9-AS permet de détecter les atteintes radio-induites du centre de la région hydrocarbonée des membranes d'érythrocytes. Tandis que pour le lymphocyte, ces dommages radio-induits se localisant à l'interface lipide-protéine et à partir du milieu de la région hydrophobe de la bicouche, ils peuvent être mesurés en utilisant le TMA-DPH et le 6-AS.

En résumé, *in vitro*, l'index de fluidité membranaire permet de mesurer la micro-désorganisation de la membrane après une irradiation. De plus, ce paramètre satisfait aux principaux critères d'un bio-dosimètre : existence d'une relation dose-effet quel que soit le type cellulaire étudié et stabilité de la mesure dans le temps jusqu'à 1 jour après irradiation.

Evolution de l'index de fluidité membranaire après une irradiation *in vivo* : modèles animaux

Afin d'évaluer l'utilisation de l'index de fluidité membranaire comme bio-indicateur de dose, des études ont été réalisées sur des prélèvements sanguins provenant de modèles animaux exposés corps entier au rayonnement gamma.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux résultats obtenus pour l'érythrocyte. L'étude sur le modèle rat montre que l'érythrocyte ne présente pas de modifications de l'index de fluidité membranaire mesuré avec le 6-AS et le 9-AS quelle que soit la dose appliquée. Cependant, l'irradiation induit des perturbations du gradient de fluidité du 6-AS/9-AS une heure et 72 heures après l'exposition des animaux. L'index de fluidité membranaire mesuré dans les hématies provenant d'échantillons sanguins de singes exposés corps entier à une dose de 8 Gy augmente dès 1 heure pour le 9-AS et dès 24 heures pour le 6-AS, et perdurent jusqu'à 72 heures après irradiation. Ces observations peuvent suggérer que les érythrocytes de singes soient plus radiosensibles que les globules rouges de rats au niveau membranaire. Les différences constatées entre l'*in vivo* et l'*in vitro*, dans l'expression des dommages membranaires de l'érythrocyte, peuvent s'expliquer par l'importance du rôle de la régulation physiologique dans les modèles *in vivo*.

Dans un deuxième temps, les résultats obtenus sur les lymphocytes de rats, après une irradiation à 1,5 Gy, indiquent une rigidification de l'interface lipide-protéine détectable dès 1 heure, et de la région hydrophobe de la membrane détectable dès 24 heures, mais qui toutes deux persistent jusqu'à 72 heures. Chez le singe, nous avons mis en évidence une rigidification de la région hydrophobe de la bicouche lipidique des lymphocytes perceptible à partir d'une heure et qui persiste jusqu'à 24 heures après irradiation. De plus, les variations obtenues sont beaucoup plus importantes que celles observées *in vitro*. Donc le lymphocyte semble donc être un bon modèle cellulaire car les dommages membranaires sont détectables à des temps très précoces et persistent jusqu'à 3 jours lorsque les animaux sont exposés à une faible dose. Cependant, une irradiation à une dose plus forte (8 Gy) induit une lymphopénie qui ne permet pas de réaliser les mesures de fluidité membranaire pour des délais supérieurs à 24 heures.

En résumé, les expériences réalisées *in vivo* suggèrent que l'index de fluidité membranaire puisse être un bio-indicateur de l'exposition aux rayonnements ionisants. Parmi les deux modèles cellulaires considérés, le plus intéressant est le globule rouge car ne comportant pas de noyau et sa durée de vie étant de 120 jours nous n'observons pas une chute de sa concentration sanguine après irradiation contrairement aux lymphocytes. De plus, il a la propriété de s'adapter à la dimension des capillaires sanguins et donc d'atteindre les extrémités du corps et en particulier les mains. Contrairement au lymphocyte, ce modèle cellulaire serait donc utilisable dans le cadre d'une irradiation localisée des extrémités. Par ailleurs, son nombre étant 1000 fois plus élevé que celui des lymphocytes, il suffit d'un volume minimal de 500 µl de sang pour pouvoir réaliser les mesures de fluidité membranaire.

Faisabilité de l'utilisation de l'index de fluidité membranaire chez l'Homme

Afin de se placer dans la configuration la plus favorable à l'évaluation de l'index de fluidité membranaire comme bio-marqueur d'une exposition à une irradiation, nous avons collaboré avec le service de radiothérapie de l'Institut Gustave Roussy pour obtenir des prélèvements sanguins de patients ayant subi une irradiation corporelle totale. La mesure de l'index de fluidité membranaire a été réalisée en incorporant les acides stéariques dans les membranes de globules rouges. Les patients étudiés présentaient des pathologies de type : leucémie lymphoblastique aiguë, leucémie myéloïde chronique, leucémie myéloïde aiguë ou myélome. L'âge moyen des patients participant à cette étude était de 43 ans.

Les mesures d'anisotropie de fluorescence réalisées sur des globules rouges entiers de 14 témoins, qui constituent la population saine, sont stables et conformes aux valeurs obtenues par Muller (1988). Nos résultats ont mis en évidence tout d'abord que de façon basale le gradient de fluidité

membranaire des érythrocytes de patients avant radiothérapie est totalement perturbé en comparaison de celui mesuré pour une population saine. Ces altérations se traduisent principalement par une rigidification des parties profondes de la région hydrocarbonée. En effet, les patients ont subi un traitement de chimiothérapie permettant la rémission de leur maladie avant d'être irradiés corps entier. Les molécules utilisées lors de ce traitement sont la cyclophosphamide ou le busulfan (Gilson & Taylor, 1997). Subramaniam et coll. (1994) ont montré que le traitement du cancer du sein avec plusieurs anticancéreux dont la cyclophosphamide induisait des altérations de la structure membranaire des globules rouges. Ces auteurs ont observé, en particulier, une augmentation du rapport molaire cholestérol/phospholipides et une diminution de la fluidité de la bicouche lipidique. Après la première fraction de dose du traitement de radiothérapie, le gradient de fluidité des membranes d'hématies des patients est modifié à tous les niveaux de la bicouche lipidique. Donc bien que le traitement de chimiothérapie modifie les propriétés biophysiques de la membrane des globules rouges, l'index de fluidité membranaire permet de détecter des dommages membranaires induit par une irradiation corporelle totale à 1,8 Gy. Cependant, les valeurs du gradient de fluidité obtenues après l'irradiation corporelle totale sont semblables à celles mesurées dans les membranes d'érythrocytes d'une population saine. Les résultats obtenus chez l'Homme ne sont donc pas concluants pour se prononcer sur la faisabilité de l'utilisation de l'index de fluidité membranaire comme bio-indicateur d'une exposition aux rayonnements ionisants. En effet, cette étude met en évidence la nécessité de connaître la valeur basale de l'index de fluidité membranaire avant irradiation.

Le tableau 22 récapitule les caractéristiques principales d'un dosimètre biologique. Nous avons pu ainsi vérifier si l'index de fluidité membranaire remplissait les conditions requises pour être un bio-indicateur de dose en comparant les résultats observés à ceux obtenus pour la technique de référence en dosimétrie biologique : le dénombrement des aberrations chromosomiques instables.

Caractéristiques d'un bio-indicateur de dose	Mesure de l'index de fluidité membranaire	Dénombrement des dicentriques
• Relations dose-effet ;	++ (<i>In vitro</i> : 2 à 8 Gy)	+++
• Facilité d'obtention et de dosage ;	++	+
• Spécificité de l'effet dû aux rayonnements ionisants ;	+/-	+++
• Reproductibilité ;	++	+++
• Sensibilité ;	+/- (<i>In vitro</i> : 1,5 Gy) +/- (<i>In vivo</i> : 1,5 Gy)	+++ (0,1 Gy)
• Stabilité dans le temps ;	+/- (<i>In vitro</i> : 24 h) + (<i>In vivo</i> : 72 h)	+++ (3 à 6 mois)
• Possibilité de traiter un nombre suffisant de cas ;	+++	+
• Capacité de s'adapter aux différents types d'exposition ;	-	+++
• Reconstitution <i>a posteriori</i> de l'exposition.	non	+/-

Tableau 22 : Comparaison des caractéristiques requises par un bio-indicateur de dose entre l'index de fluidité membranaire et le dénombrement des dicentriques.

Il n'existe pas en dosimétrie biologique un bio-indicateur de dose idéal qui vérifie tous les critères requis. L'index de fluidité membranaire répond à certaines caractéristiques requises pour être un bioindicateur de dose mais il n'est pas utilisable en dosimétrie opérationnelle car il présente un certain nombre d'inconvénients. Tout d'abord, bien qu'il réagisse à une irradiation, il n'est pas spécifique d'une exposition aux rayonnements ionisants. En effet, plusieurs facteurs sont connus pour induire des variations de l'index de fluidité membranaire. Les patients atteints d'alcoolisme chronique présentent une augmentation de la fluidité membranaire de leurs globules rouges (Hrelia et coll., 1986). Une augmentation de la cohésion membranaire de globules rouges a été également observée chez des patients diabétiques par Bara et coll. (1979) et Otsuji et coll. (1981). Par ailleurs, en utilisant les acides stéariques comme sondes fluorescentes, Caimi (1997) a constaté une diminution de la fluidité membranaire des érythrocytes chez des patients présentant une hypertension essentielle. D'autre part, la persistance des dommages membranaires radio-induits étant relativement courte (3 jours), des problèmes d'acheminement des échantillons se poseraient en cas d'une suspicion d'irradiation. Enfin, dans nos études, la valeur témoin de fluidité membranaire mesurée avant irradiation était toujours connue, ce qui n'est pas le cas pour une suspicion d'exposition aux rayonnements ionisants. Cette valeur basale pourrait être obtenue avant irradiation dans le cadre du suivi d'une population à risque c'est à dire pour les travailleurs de l'industrie nucléaire. Cependant, dans les cas d'exposition d'une population non sensée être à risque comme le public, pour obtenir cette valeur basale, il faudrait soit la mesurer quelques

Conclusion générale et perspectives

Lors d'une exposition accidentelle aux rayonnements ionisants, l'estimation de la dose reçue en dosimétrie biologique est réalisée en dénombrant les aberrations chromosomiques de type dicentrique, dans les lymphocytes circulants, par une technique de cytogénétique conventionnelle. Cette méthode se base sur les effets dommageables des rayonnements ionisants sur la molécule d'ADN. Néanmoins, cette technique présente certaines limites dans les cas d'une irradiation hétérogène et localisée. C'est pourquoi, dans le but d'évaluer le plus précisément la dose, il est nécessaire de rechercher de nouveaux bio-indicateurs de dose qui tiennent compte d'autres paramètres biophysiques et biochimiques. Lors d'une irradiation, les rayonnements ionisants déposent leur énergie dans tout le volume de la cellule. Bien que l'ADN, support de l'information génétique, soit considéré comme la cible principale des rayonnements ionisants par ses effets létaux et mutagènes, un ensemble de travaux scientifiques récents, y compris dans notre laboratoire, ont montré que la membrane plasmique est aussi le siège de modifications biophysiques radio-induites.

L'objectif de cette étude a été tout d'abord d'approfondir les mécanismes conduisant aux altérations radio-induites des propriétés biophysiques membranaires et leur impact sur une fonction cellulaire, la mort cellulaire, afin de démontrer que la membrane est une cible sensible des rayonnements ionisants. Pour réaliser ces travaux, nous avons sélectionné deux modèles cellulaires différents de par l'existence ou non d'une régulation génique : le lymphocyte et l'érythrocyte dans le but de mettre en évidence une spécificité de la membrane dans la réponse cellulaire à une irradiation *in vitro*. Nos résultats indiquent que l'irradiation induit des dommages membranaires au niveau de la composition en acides gras des phospholipides des érythrocytes. Ces dommages membranaires sont susceptibles d'induire des modifications des propriétés biophysiques des membranes d'érythrocytes. L'absence de variation de la composition en lipides de la membrane des lymphocytes résulterait de l'existence d'un processus de « réparation membranaire fidèle » et/ou d'un système efficace de protection des lipides inductibles car sous la dépendance directe d'une régulation génique. Bien qu'aucune modification structurelle des constituants lipidiques de la membrane des lymphocytes n'ait été mise en évidence après irradiation, nous avons observé des altérations de leur fluidité membranaire après irradiation. Il existerait donc des mécanismes de régulation des propriétés biophysiques membranaires beaucoup plus sensibles que la composition lipidique des membranes tels que le métabolisme du cholestérol. Par ailleurs, les modifications des propriétés biophysiques de la membrane des lymphocytes s'amplifient au fur et à mesure que les cellules progressent dans le processus apoptotique et sont spécifiques de l'apoptose radio-induite. Ces différentes observations montrent donc que la mesure de la fluidité membranaire permet d'obtenir une vision intégrée des dommages de la membrane cellulaire qui est une cible sensible des radiations ionisantes dont le rôle est primordial dans le développement des dommages cellulaires.

Nous avons ensuite étudié si l'expression des dommages membranaires radio-induits pouvait être influencée par l'existence d'une régulation physiologique. Ainsi, nous avons élaboré plusieurs régimes qui ont été administrés à des rats afin d'évaluer l'importance du rôle des lipides et des défenses anti-oxydantes dans les altérations membranaires suite à une exposition *in vivo* des animaux aux rayonnements ionisants. L'exposition totale des animaux à une irradiation modifie la composition en acides gras des membranes d'érythrocytes dont la nature des dommages dépend du type de régime administré. En outre, l'irradiation *in vivo* des animaux induit de très faibles variations des propriétés biophysiques des membranes d'érythrocytes en comparaison des résultats observés *in vitro* en raison de l'existence d'une régulation physiologique extracellulaire. La similitude des atteintes radio-induites de la fluidité membranaire des lymphocytes entre les expériences *in vitro* et *in vivo* suggère que ce modèle cellulaire soit faiblement dépendant de cette régulation physiologique extracellulaire. Par ailleurs, la composition en acides gras des régimes influe sur la sensibilité des lymphocytes à l'apoptose radio-induite. L'étude sur le rôle des défenses antioxydantes a montré que les régimes supplémentés en vitamine E modifient les concentrations plasmatiques en vitamine E. Cependant, dans nos conditions expérimentales, cet enrichissement n'a aucun effet sur les altérations radio-induites des propriétés biophysiques membranaires et sur le processus apoptotique radio-induit. En conclusion, la composition en lipides des membranes joue un rôle important dans la sensibilité membranaire aux effets de l'irradiation. Cependant, ce facteur peut être modulé par la présence d'une régulation physiologique extracellulaire.

Nous avons donc montré que la membrane plasmique est une cible sensible des rayonnements ionisants que ce soit après une irradiation *in vitro* ou *in vivo*. D'autre part, l'index de fluidité membranaire permet d'obtenir une vision intégrée des dommages membranaires et peut être mesuré sur tout type cellulaire. C'est pourquoi la possibilité d'utiliser ce paramètre en dosimétrie biologique comme indicateur d'une exposition aux rayonnements ionisants a été évaluée dans cette dernière partie. La stabilité des mesures dans le temps et l'existence de relations dose-effet après l'irradiation *in vitro* de modèles cellulaires permettent d'envisager l'utilisation de l'index de fluidité membranaire comme un bio-dosimètre. Les expériences réalisées sur des modèles *in vivo* suggèrent également que l'index de fluidité membranaire puisse être un bio-indicateur d'une exposition aux rayonnements ionisants. En effet, les altérations radio-induites sont plus importantes qu'*in vitro* et détectables jusqu'à 3 jours après irradiation. Afin de finaliser cette étude, nous avons testé l'utilisation de ce paramètre comme bio-indicateur de dose sur des prélèvements sanguins de patients ayant subi une irradiation corporelle totale. Ces observations ont mis en évidence que l'effet de la première fraction de dose du traitement de radiothérapie a été difficilement observable en raison du traitement de chimiothérapie qui perturbe les mesures de l'index de fluidité membranaire. Cette étude réalisée sur l'Homme n'est donc pas concluante pour se prononcer sur la faisabilité de l'utilisation de l'index de fluidité membranaire comme bio-

indicateur d'une exposition aux rayonnements ionisants. De plus, elle laisse supposer que l'utilisation de l'index de fluidité membranaire en dosimétrie biologique présenterait certains inconvénients. En effet, bien que l'index de fluidité membranaire soit sensible à une irradiation, il n'est pas spécifique d'une exposition aux rayonnements ionisants. D'autre part, son utilisation en dosimétrie opérationnelle reste difficilement envisageable en raison d'une part de la nécessité de se référer à une valeur basale obtenue avant irradiation ; et d'autre part du délai relativement court (3 jours) pendant lequel ce paramètre serait sensible à une irradiation. Néanmoins, la mesure de l'index de fluidité membranaire étant rapide, elle pourrait être utilisée en complément de la technique de cytogénétique conventionnelle afin d'effectuer un premier tri pour le traitement d'une large population en cas d'accident de grande envergure.

En conclusion, bien que l'index de fluidité membranaire ne soit pas un bio-indicateur d'une exposition à une irradiation utilisable en dosimétrie biologique, il se révèle être un excellent outil dans le cadre d'études plus fondamentales pour évaluer les dommages radio-induits et leur impact au niveau cellulaire mais également tissulaire. La membrane plasmique est une interface entre le milieu extra et intracellulaire et joue un rôle majeur dans la régulation de la transmission des signaux extracellulaires. Des expériences récentes ont mis en évidence que l'expression des lésions tissulaires radio-induites est la résultante d'un « bystander effect ». Ainsi, il serait particulièrement intéressant d'étudier le rôle des altérations radio-induites des propriétés biophysiques membranaires dans les voies de signalisation inter et intracellulaire de l'apoptose. Par ailleurs, l'importance d'une régulation physiologique dans l'expression des dommages membranaires radio-induits *in vivo* suggèrent de réaliser des études afin de mieux comprendre l'impact des rayonnements ionisants sur cette régulation physiologique.

Références bibliographiques

Abel S., Gelderblom W.C.A., Smuts C.M. and Kruger M.

Thresholds and kinetics of fatty acid replacement in different cellular compartments in rat liver as a function of dietary n-6/n-3 fatty acid content.

Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1997, 56, 1, 29-39

Adams D.A., Freauff S.J. and Erickson K.L.

Plasma membrane isolation and fatty acid analysis of membrane lipids from murine lymphocytes.

Analytical Biochemistry, 1985, 144, 228-232

Aiyar A.S. and De A.K.

Mechanism of liver lipid accumulation in x-irradiated rat.

Strahlentherapie, 1978, 154, 208-16

Albanese J. and Dainiak N.

Ionizing radiation alters Fas antigen ligand at the cell surface and on exfoliated plasma membrane-derived vesicles: implications for apoptosis and intercellular signaling.

Radiation Research, 2000, 153, 49-61

Alexander-North L.S., North J.A., Kiminyo K.P., Buettner G.R. and Spector A.A.

Polyunsaturated fatty acids increase lipid radical formation induced by oxidant stress in endothelial cells.

J. Lipid. Res., 1994, 35, 10, 1773-85

Anderson R.E., Standefer J.C. and Scaletti J.V.

Radiosensitivity of defined populations of lymphocytes.

Cellular Immunology, 1977, 33, 45-61

Andre J.C., Bouchy M. and Viriot M.L.

La fluorescence moléculaire. Son application à l'étude des mouvements à l'échelle moléculaire dans les membranes lipidiques.

In: Techniques avancées en hémothéologie / ed. eds. par DPIC-INPL

Nancy: 1983(a).- vol.-p. 708-752

Andre J.C. and Donner M.

Mouvements de translation dans les membranes biologiques.

In: Techniques avancées en hémothéologie / ed. eds. par DPIC-INPL

Nancy: 1983(b).- vol.-p. 361-401

Anel A., Naval J., Gonzalez B., Uriel J. and Pineiro A.

Fatty acid metabolism in human lymphocytes. II. Activation of fatty acid desaturase-elongase systems during blastic transformation.

Biochimica Biophysica Acta, 1990, 1044, 332-339

Balasubramanian K.A., Manohar M. and Mathan V.I.

An unidentified inhibitor of lipid peroxydation in intestinal mucosa.

Biochim. Biophys. Acta., 1988, 962, 1, 51-8

Bara Y., Kai M., Kamada T., Setoyama S. and Otsuji S.

Higher levels of erythrocyte membrane microviscosity in diabetes.

Diabetes, 1979, 28, 1138

Barber D.J.W. and Thomas J.K.

Reactions of radicals with lecithin bilayers.

Radiation Research, 1978, 74, 51-65

Baronzio G.F., Solbiati L., Ierace T., Barzaghi F., Suter F., Airoidi M., Belloni G., Ravagnani F., Notti P., Gramaglia A. et al.

Adjuvant therapy with essential fatty acids (EFAs) for primary liver tumors: some hypotheses.

Medical Hypotheses, 1995, 44, 149-154

Becker K.J., Eder H. and Wiemer U.

Effect of single ⁶⁰Co whole-body irradiation on the absolute count and degree of maturity distribution of reticulocytes in the rat.

Strahlenther. Onkol., 1987, 163, 11, 748-52

Benderitter M., Vincent-Genod L., Berroud A., Muller S., Donner M. and Voisin P.

Radio-induced structural membrane modification: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure ?

Int. J. Radiat. Biol., 1999, 75, 8, 1043-1053

Benderitter M., Vincent-Genod L., Berroud A. and Voisin P.

Simultaneous analysis of radio-induced membrane alteration and cell viability by flow cytometry.

Cytometry, 2000, 39, 151-157

Benderitter M., Vincent-Genod L. and Voisin P.

The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparametric investigation.

soumis à Free Radical Biology and Medicine, 2001,

Béréziat G., Chambaz J., Colard O. and Plonovski J.

Rôle et métabolisme des phospholipides membranaires dans les cellules animales.

In: Biologie des lipides chez l'Homme / ed. eds. par Douste-Blazy L. and Mendy F.

Médicales Internationales, 1988.- vol.-p. 81-89

Berkovic D., Gründel O., Berkovic K., Wildfang I., Hess C.F. and Schmoll H.J.

Synergistic cytotoxic effects of ether phospholipid analogues and ionizing radiation in human carcinoma cells.

Radiotherapy and Oncology, 1997, 43, 293-301

Berroud A., Le Roy A. and Voisin P.

Membrane oxydative damage induced by ionizing radiation detected by fluorescence polarisation.

Radiat. Environ. Biophys., 1996, 35, 4, 289-295

Bligh E.G. and Dyer W.G.

A rapid method of total lipid extraction and purification.

Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37, 911-917

Blomstrand R.

Fatty acid synthesis in human lymphocytes.

Acta Chim. Scand., 1966, 20, 4, 1122-8

Blondel C. and Linard A.

Méthode d'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

Cah. Techn. I.N.R.A., 1996, 37, 9-14

Böck G., Huber L.A., Wick G. and Traill K.N.

Use of a Facs III for fluorescence depolarization with DPH.

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1989, 37, 11, 1653-1658

Boivin P.

Intéactions moléculaires des protéines de la membrane et déformabilité érythrocytaire.

Path. Biol., 1984, 32, 6, 717-735

Bojesen I.N. and Bojesen E.

Nature of the elements transporting long-chain fatty acids through the red cell membrane.
J. Membr. Biol., 1998, 163, 3, 169-81

Bojesen I.N. and Bojesen E.

Sheep erythrocyte membrane binding and transfer of long-chain fatty acids.
J. Membr. Biol., 1999, 171, 2, 141-9

Bonnefont-Rousselot D.

Irradiation des membranes cellulaires.
J Chim Phys, 1994, 91, 968-983

Bratton D.L., Fadok V.A., Richter D.A., Kailey J.M., Guthrie L.A. and Henson P.M.

Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase.
The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272, 42, 26159-26165

Bretscher M.

Les molécules de la membrane cellulaire.
Pour la Science, 1985, Décembre, 66-78

Brosche T. and Platt D.

The biological significance of plasmalogens in defense against oxidative damage.
Exp. Gerontol., 1998, 33, 5, 363-369

Brown D.A. and London E.

Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 240, 1, 1-7

Caimi G.

Erythrocyte, platelet and polymorphonuclear leukocyte membrane dynamic properties in essential hypertension.
Clinical Hemorheology and Microcirculation, 1997, 17, 199-208

Calder P.C., Yaqoob P., Harvey D.J., Watts A. and Newsholme E.A.

Incorporation of fatty acids by concavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity.

Biochem. J., 1994, 300, 509-508

Cantafora A., Ceccarini M., Guidoni L., Ianzini F., Minetti M. and Viti V.

Effects of gamma-irradiation on the erythrocyte membrane: ESR, NMR and biochemical studies.

Int. J. Radiat. Biol., 1987, 51, 1, 59-69

Cao G. and Prior R.L.

Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum.

Clin. Chem., 1998, 44, 1309-1315

Cartwright I.J., Pockley A.G., Galloway J.H., Greaves M. and Preston F.E.

The effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on erythrocyte membrane phospholipids, erythrocyte deformability and blood viscosity in healthy volunteers.

Atherosclerosis, 1985, 55, 3, 267-281

Chalpin D.B. and Kleinfeld A.M.

Interaction of fluorescence quenchers with the *n*-(9-anthroyloxy) fatty acid membrane probes.

Biochim. Biophys. Acta., 1983, 731, 465-474

Chaudière J.

La glutathion peroxydase : un élément central du système de protection de nos cellules.

In: Biologie des lipides chez l'Homme. / ed. eds. par Douste-Blazy L. and Mendy F.

1988.- vol.-p. 137-154

Chen J.J. and Yu B.P.

Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products.

Free Radical Biology and Medicine, 1994, 17, 5, 411-418

Chen Q., Gong B. and Almasan A.

Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondria in genotoxic stress-induced apoptosis.

Cell Death Differ., 2000, 7, 227-233

Christie W.W.

Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection.

Journal of Lipid Research, 1985, 26, 507-512

Clamp A.G., Ladha S., Clark D.C., Grimble R.F. and Lund E.K.

The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane.

Lipids, 1997, 32, 179-184

Cohen M.M.

The arachidonic acid cascade.

In: Biological protection with prostaglandins / ed. eds. par Cohen M.M.

Boca Raton: CRC Press, 1985.- 1 vol.-p. 3-11

Collins J.M., Dominey R.N. and McLean Grogan W.

Shape of the fluidity gradient in the plasma membrane of living HeLa cells.

Journal of Lipid Research, 1990, 31, 261-270

Cooper R.A.

Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells.

J. Supramol. Struct., 1978, 8, 4, 413-30

Cregan S.P., Smith B.P., Brown D.L. and Mitchel R.E.J.

Two pathways for the induction of apoptosis in human lymphocytes.

Int. J. Radiat. Biol., 1999, 75, 9, 1069-1086

Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T. and Traganos F.

Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (Necrosis).

Cytometry, 1997, 27, 1-20

Davies K.J.A., Gilbert B.C. and Haywood R.M.

Radical-induced damage to proteins: ESR spin-trapping studies.

Free Radical research Communications, 1991, 15, 111-127

Davies K.J.A., Wiese A.G., Sevanian A. and Kim E.H.

Repair systems in oxydative stress.

Molecular Biology of Aging, 1990, 123-141

Dean R.T., Gieseg S. and Davies M.J.

Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins.

TIBS, 1993, 18, 437-441

Deby C.

La biochimie de l'oxygène.

La Recherche, 1991, 22, 56-64

Diaz C. and Schroit A.J.

Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry.

J. Membrane Biol., 1996, 151, 1-9

Dickens B.F., Snow T.R., Green V. and Weglicki W.B.

The effect of erythrocyte associated light scattering on membrane fluorescence polarization.

Molecular and cellular Biochemistry, 1988, 79, 91-94

Diplock A.T.

Antioxydants and free radical scavengers.

In: Free Radical Damage and its Control / ed. eds. par Rice-Evans C. A. and Burdon R. H.

Elsevier, 1994.- vol.-p. 113-130

Dise C.A., Clark J.M., Lambersten C.J. and D.B.P. G.

Hyperbaric hyperoxia reversibly inhibits erythrocyte phospholipid acid turnover.

J. Appl. Physiol., 1987, 62, 533

Dise C.A., Goodman D.B.P. and Rasmussen H.

Definition of the pathway for membrane phospholipid fatty acid turnover in human erythrocytes.

J. Lipid. Res., 1980, 21, 292-300

Dobretsov G.E., Borschevskaya T.A., Petrov V.A. and Vladimirov Y.A.

The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxydation.

FEBS Letters, 1977, 84, 1, 125-128

Dodge J.T., Mitchell C. and Hanahan D.J.

The preparation and chemical characteristics of haemoglobin-free ghosts of human erythrocytes.
Archives of Biochemistry and Biophysics, 1963, 100, 119-130

Dominguez Z. and Bosch V.

Dietary fish oil affects food intake, growth and hematologic values of weanling rats.
Arch. Latinoam. Nutr., 1994, 44, 2, 92-7

Drevon C.A.

Absorption, transport and metabolism of vitamin E.
Free Radic. Res. Commun., 1991, 14, 4, 229-246

Dudeja P.K. and Brasitus T.A.

Inactivation of rat small intestinal brush-border membrane alkaline phosphatase by oxygen free radicals.
Gastroenterology, 1993, 105, 357-366

Dutreix J., Bok B., Desgrez A. and Vinot J.-M.

Radiobiologie.
In: Biophysique des radiations et imagerie médicale / ed. eds. par
Paris: Masson, 1993.- vol.-p. 235

Edimecheva I.P., Kisel M.A., Shadyro O.I., Vlasov A.P. and Yurkova I.L.

The damage to phospholipids caused by free radical attack on glycerol and sphingosine backbone.
International Journal of Radiation Biology, 1997, 71, 555-560

Edwards J.C., Chapman D., Cramp W.A. and Yatvin M.B.

The effects of ionizing radiation on biomembrane structure and fonction.
Prog. Biophys. molec. Biol., 1984, 43, 71-93

Edwards-Webb J.D. and Gurr M.I.

The influence of dietary fats on the chemical composition and physical properties of biological membrane.
Nutrition Research, 1988, 8, 1297-1305

Eichenberger K., Böhni P., Winterhalter K.H., Kawato S. and Richter C.

Microsomal lipid peroxydation causes an increase in the order of the membrane lipid domain.
FEBS Letters, 1982, 142, 1, 59-62

Engelke M., Behman T., Ojeda F. and Diehl H.A.

Heterogeneity of microsomal membrane fluidity: evaluation using intrinsic tryptophan energy transfer to pyrene probes.
Chemistry and Physics of Lipids, 1994, 72, 35-40

Engelke M., Bojarski P., Diehl H.A. and Kubicki A.

Protein-dependent reduction of pyrene excimer formation in membranes.
The Journal of membrane biology, 1996, 153, 117-123

Feurgard C., Bayle D., Guézingar F., Sérougne C., Mazur A., Lutton C., Aigueperse J., Gourmelon P. and Mathé D.

Effects of ionizing radiation (neutrons/gamma rays) on plasma lipids and lipoproteins in rats.
Radiation Research, 1998, 150, 43-51

Fielding C.J.

Caveolae and signaling.
Curr. Opin. Lipidol., 2001, 12, 3, 281-287

Fielding C.J. and Fielding P.E.

Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships.
Biochim. Biophys. Acta., 2000, 1529, 1-3, 210-222

Fisher M.A. and Black H.S.

Modification of membrane composition, eicosanoid metabolism, and immunoresponsiveness by dietary omega-3 and omega-6 fatty acid sources, modulators of ultraviolet-carcinogenesis.
Photochemistry and Photobiology, 1991, 54, 3, 381-387

Fonteh A.N., LaPorte T., Swan D. and McAlexander M.A.

A decrease in remodeling accounts for the accumulation of arachidonic acid in murine mast cells undergoing apoptosis.
J. Biol. Chem., 2001, 276, 1439-1449

Fox M.H. and Delohery T.M.

Membrane fluidity measured by polarization using an EPICS V cells sorter.
Cytometry, 1987, 8, 20-25

Frelat G.

Cytométrie en flux et dosimétrie biologique.
Radioprotection, 1991, 26, Suppl.1, 185-204

Galla H.-J. and Hartmann W.

Excimer-forming lipids in membrane research.
Chemistry and Physics of Lipids, 1980, 27, 199-219

Galla H.-J. and Luisetti J.

Lateral and transversal diffusion and phase transitions in erythrocyte membranes. An excimer fluorescence study.
Biochimica Biophysica Acta, 1980, 596, 108-117

Galla H.-J. and Sackmann E.

Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes.
Biochemica et Biophysica Acta, 1974, 339, 103-115

Galli C., Mosconi C. and Marangoni F.

Long chain polyunsaturated fatty acid metabolism and cellular utilization: regulation and interactions.
In: Polyunsaturated Fatty Acids in Human Nutrition / ed. eds. par Bracco U. and Deckelbaum R.J.
New York: 1992.- 28 vol.-p. 81-92

Gamache D.A., Fawzy A.A. and Franson R.C.

Preferential hydrolysis of peroxidized phospholipid by lysosomal phospholipase C.
Biochim. Biophys. Acta., 1988, 958, 116-124

Garg M.L., Thomson A.B.R. and Clandinin M.T.

Interactions of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism.
J. Lipid. Res., 1990, 31, 271-277

Gilson D. and Taylor R.E.

Total body irradiation.

The British Journal of Radiology, 1997, 70, 1201-1203

Giusti A.M., Raimondi M., Ravagnan G., Sapora O. and Parasassi T.

Human cell membrane oxidative damage induced by a single and fractionned doses of ionizing radiation: a fluorescence spectroscopy study.

Int. J. Radiat. Biol., 1998, 74, 5, 595-605

Green D.R. and Reed J.C.

Mitochondria and apoptosis.

Science, 1998, 281, 1309-1312

Greenstock C.L.

Radiation and aging: Free radical damage, biological response and possible antioxydant intervention.

Medical Hypotheses, 1993, 41, 473-482

Grzelinska E., Bartosz G., Gwozdziński K. and Leyko W.

A spin label study of the effect of g-irradiation on erythrocyte membrane. Influence of lipid peroxydation on membrane structure.

Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1979, 36, 4, 325-334

Guille J., Raison J.K. and Gebicki J.M.

Radiation-induced lipid peroxidation and the fluidity of erythrocyte membrane lipids.

Free Radical Biology & Medicine, 1987, 3, 147-152

Gwozdziński K.

Ionizing radiation-induced structural modification of human red blood cells.

Radiat. Environ. Biophys., 1991a, 30, 45-52

Gwozdziński K.

Radiation-induced structural alterations in fish red blood cells.

Free Radical Biology and Medicine, 1991b, 11, 557-561

Haimovitz-Friedman A., Kan C.-C., Ehleiter D., Persaud R.S., McLoughlin M., Fuks Z. and Kolesnick R.N.

Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis.
J. Exp. Med., 1994, 180, 525-535

Hallahan D.E., Virudachalam S., Kuchibhotla J., Kufe D.W. and Weichselbaum R.R.

Membrane-derived second messenger regulates x-ray-mediated tumor necrosis factor α gene induction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 4897-4901

Halliwell B.

How to characterize an antioxidant: an update.
Biochem. Soc. Symp., 1995, 61, 73-101

Härtel S., Ojeda F. and Diehl H.

Cholesterol induced variations of membrane dynamics related to the induction of apoptosis in mouse thymocytes.
Int. J. Radiat. Biol., 1998, 74, 5, 607-615

Hernell O. and Bläckberg L.

Long chain fatty acids: intake, digestion, and absorption in newborn infants.
In: Polyunsaturated Fatty Acids in Human Nutrition / ed. eds. par Bracco U. and Deckelbaum R.J.
New York: 1992.- 28 vol.-p. 53-63

Hertveldt K., Philippé J., Thierens H., Cornelissen M., Vral A. and De Ridder L.

Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis *in vitro* in human peripheral blood lymphocytes.
Int. J. Radiat. Biol., 1997, 71, 4, 429-433

Horrobin D.F.

Lipid peroxidation in cancer.
In: Omega-6 essential fatty acids: pathophysiology and roles in clinical medicine / ed. eds. par Horrobin D.F.
New York: Alan R Liss, 1990.- vol.-p. 351-377

Hrelia S., Lercker G., Biagi P.L., Bordoni A., Stefanini F., Zunarelli P. and Rossi C.A.

Effect of ethanol intake on human erythrocyte membrane fluidity and lipid composition.

Biochemistry International, 1986, 12, 5, 741-750

Hu M.-L., Frankel E.N., Leibovitz B.E. and Tappel A.L.

Effect of dietary lipids and vitamine E on in vitro lipid peroxydation in rat liver and kidney homogenates.

J. Nutr., 1989, 119, 1574-1582

ICRP

Recommendations of the International Commission on Radiological Protection: Sources and effects of ionizing radiations.

New York: International Commission on Radiological Protection, 1991.-

Ikonen E.

Roles of lipid rafts in membrane transport.

Curr. Opin. Cell. Biol., 2001, 13, 4, 470-477

Ingrand S.S., Wahl A., Favrelière S., Barbot F. and Tallineau C.

Quantification of long-chain aldehydes by gas chromatography coupled to mass spectrometry as a tool for simultaneous measurement of plasmalogens and their aldehydic breakdown products.

Anal. Biochem., 2000, 280, 1, 65-72

Jacobson M.D.

Reactive oxygen species and programmed cell death.

TIBS, 1996, 21, 83-86

Jain S., Thoma M., Kumar G.P. and Laloraya M.

Programmed lipid peroxydation of biomembranes generating kinked phospholipids permitting local molecular mobility: a peroxydative theory of fluidity management.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 195, 2, 574-580

Javouhey-Donzel A., Guenot L., Maupoil V., Rochette L. and Rocquelin G.

Rat vitamin E status and heart lipid peroxydation: effect of dietary α -linoleic acid and marine (n-3) fatty acids.

Lipids, 1993, 28, 651-655

Joshi N., Swenberg C.E. and McCreery M.J.

Effects of ^{60}Co irradiation on erythrocyte ghosts using the fluorescent properties of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH).

In: 7th International Radiation Research Congress / ed. eds. par
1982.- vol.-p. B3-15

Kaler G.V., Lyskova T.I., Shadyro O.I., Samoilenko S.G., Edimecheva I.P., Aksentsev S.L. and Konev S.V.

Effect of γ -irradiated carbohydrates on isolated synaptic membranes.

Radiat Environ Biophys, 1993, 32, 345-355

Kempner E.S.

Damage to proteins due to the direct action of ionizing radiation.

Quarterly Reviews of Biophysics, 1993, 26, 27-48

Kergonou J.F., Bernard P., Braquet M. and Roquet G.

Effect of whole-body γ -irradiation on lipid peroxidation in rat tissues.

Biochimie, 1981, 63, 6, 555-9

Kergonou J.F., Thiriot C., Braquet M., Ducouso R. and Roquet G.

Influence of whole-body γ -irradiation upon rat erythrocyte: lipid peroxydation and osmotic fragility.

Biochimie, 1986, 68, 311-318

Kinsella J.E., Lokesh B. and Stone R.A.

Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms.

Am. J. Clin. Nutr., 1990, 52, 1, 1-28

Kishida E., Yano M., Kasahara M. and Masuzawa Y.

Distinctive inhibitory of docosahexaenoic acid against sphingosine-induced apoptosis.

Biochim. Biophys. Acta., 1998, 1391, 401-8

Kleinfeld A.M., Dragsten P., Klausner R.D., Pjura W.J. and Matayoshi E.D.

The lack of relationship between fluorescence polarization and lateral diffusion in biological membranes.

Biochim. Biophys. Acta., 1981, 649, 2, 471-80

Kobatake Y., Hirahara F., Innami S. and Nishide E.

Dietary effect of omega-3 type polyunsaturated fatty acids on serum and liver lipid levels in rats.
J. Nutr. Sci. Vitaminol., 1983, 29, 1, 11-21

Koizumi K., Shimizu S., Koizumi K.T., Nishida K.T., Sato C., Ota K. and Yamanata N.

Rapid isolation and lipid characterization of plasma membranes from normal and malignant lymphoid cells of mouse.
Biochimica et Biophysica Acta, 1981, 649, 393-403

Kolesnick R.N., Haimovitz-Friedman A. and Fuks Z.

The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis, Fas, and ionizing radiation.
Biochem. Cell. Biol., 1994, 72, 471-474

Kölling A., Maldonado C., Ojeda F. and Diehl H.A.

Membrane fluidity of microsomal and thymocyte membranes after X-ray and UV irradiation.
Radiat. Environ. Biophys., 1994, 33, 303-313

Konings A.W.T.

Role of membrane lipid composition in radiation-induced death of mammalian cells.
In: Prostaglandin and lipid metabolism in radiation injury / ed. eds. par Walden T.L. and Hughes H.N.
New-York: Plenum, 1987.- vol.-p. 29-43

Koolman J. and Röhm K.-H.

Les molécules biologiques.
In: Atlas de poche de Biochimie / ed. eds. par
Paris: Flammarion, 1994.- vol.-p. 30-85

Köteles G.J.

New aspects of cell membrane radiobiology and their impact on radiation protection.
Atomic Energy Review, 1979, 17, 1, 3-30

Köteles G.J.

Radiation effect on cell membranes.
Radiation and Environmental Biophysics, 1982, 21, 1-18

Kubasova T., Varga L.P. and Köteles G.J.

Surface alterations of mammalian cells upon ionizing radiation as detected by a lectin-binding technique.

International Journal of Radiation Biology, 1981, 40, 2, 175-186

Kuhn H. and Brash A.R.

Occurrence of lipoxygenase products in membranes of rabbit reticulocytes. Evidence for a role of the reticulocyte lipoxygenase in the maturation of red cells.

J. Biol. Chem., 1990, 265, 3, 1454-8

Kuhry J.-G., Fonteneau P., Duportail G., Maechling C. and Laustriat G.

TMA-DPH: A suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells.

Cell Biophysics, 1983, 5, 129-140

Kuo S.S., Saad A.H., Koong A.C., Hahn G.M. and Giacca A.J.

Potassium-channel activation in response to low doses of g-irradiation reactive oxygen intermediates in noncycytatory cells.

Proc. Natl. Acad. Sci., 1993, 90, 908-912

Kurzchalia T.V. and Parton R.G.

Membrane microdomains and caveolae.

Curr. Opin. Cell. Biol., 1999, 11, 4, 424-431

Langner M., Repasky A.E. and Hui S.-W.

Relationship between membrane lipid mobility and spectrin distribution in lymphocytes.

Federation of European Biochemical Societies, 1992, 305, 197-202

Lecoeur H. and Gougeon M.-L.

Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantification in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons. Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes.

Journal of Immunological Methods, 1996, 198, 87-99

Lehmann J. and Martin H.L.

Improved direct determination of alpha- and gamma- tocopherols in plasma and platelets by liquid chromatography, with fluorescence detection.

Clinical Chemistry, 1982, 28, 8, 1784-1787

Leibovitz B.E., Hu M.-L. and Tappel A.L.

Lipid peroxidation in rat tissue slices: effect of dietary vitamin E, corn oil-lard and menhaden oil.
Lipids, 1990, 25, 125-129

Lelong I., Luu B., Mersel M. and Rottem S.

Effects of 7 β -hydroxycholesterol on growth and membrane composition of *Mycoplasma capricolum*.
FEBS Lett, 1988, 232, 2, 354-358

Leterrier F. and Gary-Bobo C.

Constituants membranaires : les lipides.

In: Biologie membranaire / ed.^eds. par
Paris: Hermann, 1989.- vol.-p. 41-84

Leterrier F. and Viret J.

Le concept de fluidité membranaire.

In: Séminaire INSERM / ed.^eds. par Stoltz J.F., Donner M. and Puchelle E.
1986.- 143 vol.-p. 283-288

Leyko W. and Bartosz G.

Membrane effects of ionizing radiation and hyperthermia.

International Journal of Radiation Biology, 1986, 49, 743-770

Maerker G. and Jones K.C.

Unusual product ratios resulting from the gamma-irradiation of cholesterol in liposomes.

Lipids, 1991, 26, 2, 139-144

Majno G. and Joris I.

Review: Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death.

American Journal of Pathology, 1995, 146, 1, 3-15

Marinetti G.V. and Cattieu K.

Composition and metabolism of phospholipids of human leukocytes.

Chemistry and Physics of Lipids, 1982, 31, 169-177

Martin S.J., Amarante-Mendes G.P., Shi L., Chuang T.H., Casiano C.A., O'Brien G.A., Fitzgerald P., Tan E.M., Bokoch G.M., Greenberg A.H. *et al.*

The cytotoxic cell proteinase granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism.

Embo. J., 1996, 15, 2407-2416

Martin S.J., Reutelingsperger C.P.M., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C.A.A., LaFace D.M. and Green D.R.

Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl.

J. Exp. Med., 1995, 182, 1545-1556

McClain D.E., Kalinich J.F. and Ramakrishnan N.

Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4.

The FASEB Journal, 1995, 9, 1345-1354

Mignotte B., Zamzami N., Petit P., Vayssière J.-L. and Kroemer G.

Contrôle mitochondrial de l'apoptose : la mort cellulaire programmée est-elle apparue à la suite de l'évènement endosymbiotique à l'origine des mitochondries ?.

Médecine/Sciences, 1998, 14, 54-60

Morel Y. and Barouki R.

Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes.

Médecine/Sciences, 1998, 14, 713-721

Morrison W.R. and Smith L.M.

Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol.

Journal of Lipid Research, 1964, 5, 600-608

Morshchakova E.F.

The role of cyclis nucleotides and prostaglandins in the regulation of erythropoiesis.

Gematol. transfuziol., 1990, 35, 7, 23-5

Mower D.A., Peckham D.W., Illera V.A., Fishbaugh J.K., Stunz L.L. and Ashman R.F.
Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis.
Journal of Immunology, 1994, 152, 4832-4842

Muller S.
Applications de la polarisation de fluorescence en biologie cellulaire.-196p.
Th: Nancy: 1988

Muramatsu T.
Les sucres de la membrane cellulaire.
La Recherche, 1989, 20, 624-634

Nakajima T. and Yukawa O.
Mechanism of radiation-induced diacylglycerol production in primary cultured rat hepatocytes.
J. Radiat. Res., 1999, 40, 135-144

Nassar B.A., Huang Y.S., Manku M.S., Das U.N., Morse N. and Horrobin D.F.
The influence of dietary manipulation with n-3 and n-6 fatty acids on liver and plasma phospholipid fatty acids in rats.
Lipids, 1986, 21, 10, 652-656

Neoptolemos J.P., Husband D., Imray C., Rowley S. and Lawson N.
Arachidonic acid and docosahexaenoic acid are increased in human colorectal cancer.
Gut, 1991, 32, 278-281

Nishizuka Y.
Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C.
Science, 1992, 258, 607-614

Ojeda F., Diehl H.A. and Folch H.
Radiation induced membrane changes and programmed cell death: possible interrelationships.
Scanning Microscopy, 1994, 8, 3, 645-651

Ojeda F., Guarda M.I., Maldonado C., Folch H. and Diehl H.
Role of protein kinase-C in thymocyte apoptosis induced by irradiation.
Int. J. Radiat. Biol., 1992, 61, 5, 663-667

Okazaki T., Rice Okita J., MacDonald P.C. and Johnston J.M.

Substrate specificity of phospholipase A₂ in human fetal membranes.
Am. J. Obstet. Gynecol., 1978, 130, 432

Olivier R.

Flow cytometry technique for assessing effects of N-Acetylcysteine on apoptosis and cell viability of human immunodeficiency virus-infected lymphocytes.

In: Methods in enzymology / ed. eds. par
Academic Press, 1995.- 251 vol.-p. 270-278

Otsuji S., Bara Y. and Kamada T.

Erythrocyte membrane viscosity in diabetes.
Horm. Metab. Res., 1981, 11, Supp(97), 97-102

Pacifici R.E. and Davies K.J.A.

Protein degradation as an index of oxidative stress.
Methods in enzymology, 1991, 186, 485-502

Paranich A.V., Chaikina L.A. and Zharkov S.V.

Radiation-induced lipid peroxydation, a fish diet and modulation of the effects by vitamin E.
Radiobiologia, 1990, 30, 6, 808-813

Parasassi T., Ravagnan G., Sapora O. and Gratton E.

Membrane oxidative damage induced by ionizing radiation detected by diphenylhexatriene fluorescence lifetime distributions.

Int. J. Radiat. Biol., 1992, 61, 6, 791-796

Parasassi T., Sapora O., Giusti A.M., De Stasio G. and Ravagnan G.

Alterations in erythrocyte membrane lipids induced by low doses of ionizing radiation as revealed by 1,6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene fluorescence lifetime.

Int. J. Radiat. Biol., 1991, 59, 1, 59-69

Philippé J., Louagie H., Thierens H., Vral A., Cornelissen M. and De Ridder L.

Quantification of apoptosis in lymphocyte subsets and effect of apoptosis on apparent expression of membrane antigens.

Cytometry, 1997, 29, 242-249

Popp-Snijders C., Shouten J.A., van Blitterswijk W.J. and van der Veen E.A.

Change in membrane lipid composition of human erythrocytes after dietary supplementation of (n-3) polyunsaturated fatty acids. Maintenance of membrane fluidity.

Biochim. Biophys. Acta., 1986a, 854, 31-7

Popp-Snijders C., Shouten J.A., van der Meer J. and van der Veen E.A.

Fatty fish-induced changes in membrane lipid composition and viscosity of human erythrocyte suspensions.

Scan. J. Clin. Lab. Invest., 1986b, 46, 253-258

Pradhan D., Krahling S., Williamson P. and Schlegel R.A.

Multiple systems for recognition of apoptotic lymphocytes by macrophages.

Molecular Biology of the Cell, 1997, 8, 767-778

Purohit S.C., Bisby R.H. and Cundall R.B.

Structural modification of human erythrocyte membranes following gamma-irradiation.

Int. J. Radiat. Biol., 1980, 38, 2, 147-158

Radford I.R.

Review: Initiation of ionizing radiation-induced apoptosis: DNA damage-mediated or does ceramide have a role ?

Int. J. Radiat. Biol., 1999, 75, 5, 521-528

Ramakrishnan N., McClain D.E. and Catravas G.N.

Membrane as sensitive targets in thymocyte apoptosis.

Int. J. Radiat. Biol., 1993, 63, 6, 693-701

Ramanathan R. and Misra U.K.

Effect of whole body gamma irradiation on fatty acid composition of liver lipids of female rats and radioprotection by cystamine.

Strahlentherapie, 1976, 151, 555-561

Ramanathan R. and Misra U.K.

Spleen lipids: effect of whole body gamma irradiation and radioprotective chemicals.

Biochem. Exp. Biol., 1979, 15, 361-9

Reaven P.D. and Witzum J.L.

Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification.
Annu. Rev. Nutr., 1996, 16, 51-71

Rego A.C. and Oliveira R.

Dual effect of lipid peroxydation on the membrane order of retinal cells in culture.
Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, 321, 1, 127-136

Reno F., Burattini S. and Rossi S.

Phospholipid rearrangement of apoptotic membrane does not depend on nuclear activity.
Histochem Cell Biol, 1998, 110, 467-476

Rice-Evans C.A.

Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states.

In: Free radical damage and its control / ed.^eds. par Rice-Evans C.A. and Burdon R.H.
Elsevier, 1994.- vol.-p. 136-137

Rice-Evans C.A. and Hochstein P.

Alterations in erythrocyte membrane fluidity by phenylhydrazine-induced peroxydation of lipids.
Biochemical and biophysical research communications., 1981, 100, 4, 1537-1542

Richert L., Castagna M., Beck J.P., Rong S., Luu B. and Ourisson G.

Growth-rate-related and hydroxysterol induced changes in membrane fluidity of cultured hepatoma cells: correlation with 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984, 120, 1, 192-198

Roch-Arveiller M. and Couderc R.

Caveolae membrane domains, specialized transmembrane exchange zones implicated in cell signaling.
Ann. Biol. Clin., 2000, 58, 2, 141-146

Roelofsen B., Middelkoop E., Vermeulen W.P., Smith A.J. and Opden Kamp J.A.F.

Phospholipid flippases: neither exclusively, nor only involved in maintaining membrane phospholipid asymmetry.

In: Molecular Dynamics of Biomembranes / ed.^eds. par Op den Kamp J.A.F.
Heidelberg: 1996.- H 96 vol.-p. 369-382

Roelofsen B., van Meer G. and Opden Kamp J.A.F.

The lipids of red cell membranes. Compositionnal, structural and fonctionnal aspects.

Scan. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., 1981, 156, 111-5

Rooney M.W., Yachnin S., Kucuk O., Lis L.J. and Kauffman J.W.

Oxygenated cholesterol synergistically immobilize acyl chains and enhance protein helical structure in human erythrocyte membranes.

Biochim. Biophys. Acta., 1985, 820, 33-39

Sackmann E.

On the application of excimers as optical probes in membrane research.

Zeitschrift für Physikalische Chemie Neue Folge, 1976, Bd. 101, S.391-416

Sakanashi T., Sugiyama M., Suematsu T., Hidaka T. and Ogura R.

Delayed alteration of membrane fluidity in intact cultured B-16 melanoma cells affected by ultraviolet irradiation.

Biochemistry International, 1986, 12, 2, 341-346

Samuni A.M. and Barenholz Y.

Stable nitroxide radicals protect lipid acyl chains from radiation damage.

Free Radical Biology and Medicine, 1997, 22, 7, 1165-1174

Sato C., Kojima K. and Nishizawa K.

Target of X irradiation and dislocation of sialic acid in decrease of cell surface charge of erythrocytes.

Radiation research, 1977, 69, 367-374

Schlegel R.A., Stevens M., Lumley-Sapanski K. and Williamson P.

Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes.

Immunology Letters, 1993, 36, 283-288

Sevanian A. and Kim E.

Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membrane.

J. Free. Rad. Biol. Med., 1985, 1, 263-271

Sevanian A. and McLeod L.L.

Cholesterol autoxidation in phospholipid membrane bilayers.

Lipids, 1987, 22, 9, 627-636

Sevanian A., Wratten M.L., McLeod L.L. and Kim E.

Lipid peroxydation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation.

Biochim. Biophys. Acta., 1988, 961, 316-327

Sheng-Tanner X., Bump E.A. and Hedley D.W.

An oxydative stress-mediated death pathway in irradiated human leukemia cells mapped using multilaser flow cytometry.

Radiation Research, 1998, 150, 636-647

Shinitzky M. and Barenholz Y.

Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization.

Biochimica et Biophysica Acta, 1978, 515, 367-394

Simpson J.A., Narita S., Gieseg S., Gebicki S., Gebicki J.M. and Dean R.T.

Long-lived reactive species on free radical damaged proteins.

Biochemical journal, 1992, 282, 621-624

Sindelar P.J., Guan Z., Dallner G. and Ernster L.

The protective role of plasmalogens in iron induced lipid- peroxydation.

Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26, 3-4, 318-24

Singer S.J. and Nicolson G.L.

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.

Science, 1972, 175, 720-731

Sirtori C.R., Gatti E., Tremoli E., Galli C., Gianfranceschi G., Franceschini G., Colli S., Maderna P., Marangoni F. and Perego P.

Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms.

Am. J. Clin. Nutr., 1990, 53, 1, 1-28

Smith A.D., Conroy D.M., Belin J. and Stubbs C.D.

Membrane lipid modification and immune function.

Proc. Nutr. Soc., 1985, 44, 201-209

Smith R. and Oldfield E.

Dynamic structure of membranes by deuterium NMR.
Science, 1984, 225, 280-287

Spector A.A.

Fatty acids in human biology: past and future.

In: Polyunsaturated Fatty Acids in Human Nutrition / ed. eds. par Bracco U. and Deckelbaum R.J.

New York: 1992.- 28 vol.-p. 1-12

Stadtman E.R. and Oliver C.N.

Metalcatalysed oxidation of proteins.

Journal of biological chemistry, 1991, 266, 2005-2008

Stark G.

The effect of ionizing radiation on lipid membranes.

Biochimica et Biophysica Acta, 1991, 1071, 103-122

Stoltz J.F. and Donner M.

Intérêt de la polarisation de fluorescence en biologie cellulaire et en biologie clinique.

Innov. Tech. Biol. Med, 1985, 6, 4, 473-510

Stubbs C.D. and Smith A.D.

The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function.

Biochim. Biophys. Acta., 1984, 779, 1, 89-137

Subramaniam S., Subramaniam S., Jagadeesan M. and Devi C.S.

Alterations in erythrocyte membrane structure of breast cancer patients treated with CMF--a lipid profile.

Chemotherapy, 1994, 40, 6, 427-430

Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzani N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prévost M.-C., Alzari P.M. and Kroemer G.

Mitochondrial release of Caspase-2 and -9 during the apoptotic process.

J. Exp. Med., 1999, 189, 2, 381-393

Swartz H.M. and Swartz S.M.

Biochemical and biophysical applications of electron spin resonance.

Methods Biochem. Anal., 1983, 29, 207-323

Szostek R., Kucuk O., Lis L.J., Tracy D., Mata R., Dey T., Kauffman J.W., Yachnin S. and Westerman M.P.

Effect of inserted oxysterols on phospholipid packing in normal and sickle red blood cell membranes.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991, 180, 2, 730-734

Telford W.G., King L.E. and Fraker P.J.

Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry.

Cytometry, 1992, 13, 137-143

Thulborn K.R. and Sawyer W.H.

Properties and the locations of a set of fluorescent probes sensitive to the fluidity gradient of the lipid bilayer.

Biochimica Biophysica Acta, 1978, 511, 125-140

Thulborn K.R., Tilley L.M., Sawyer W.H. and Treloar F.E.

The use of *n*-(9-anthroyloxy) fatty acids to determine fluidity and polarity gradients in phospholipid bilayers.

Biochimica Biophysica Acta, 1979, 558, 166-178

Todd D.G. and Mikkelsen B.

Ionizing radiation induces a transient increase in cytosolic free [Ca²⁺] in human epithelial tumor cells.

Cancer Research, 1994, 54, 5224-5230

Tubiana M., Dutreix J. and Wambersie A.

Chimie sous rayonnements.

In: Radiobiologie / ed. eds. par

Paris: Hermann, 1986.- vol.-p. 23-31

Tyurina Y.Y., Shvedova A.A., Kawai K., Tyurin V.A., Kommineni C., Quinn P.J., Schor N.F., Fabisiak J.P. and Kagan V.E.

Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine.
Toxicology, 2000, 148, 2-3, 93-101

UNSCEAR

United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: Source and effects of ionizing radiations.

New York: UNSCEAR, 1993.-

Valeur B.

Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters.

In: Molecular luminescence spectroscopy / ed. eds. par Stephen G.

Schulman Chemical Analysis Series, 1993.- 77 vol.-p. 25-83

van den Boom M.A.P., Wassink M.G., Roelofsen B., de Fouw N.J. and Op den Kamp J.A.F.

The influence of a fish oil-enriched diet on the phospholipid fatty acid turnover in the rabbit red cell membrane *in vivo*.

Lipids, 1996, 31, 285-293

van Engeland M., Kuijpers H.J.H., Ramaekers F.C.S., Reutelingsperger C.P.M. and Schutte B.

Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis.

Experimental Cell Research, 1997, 235, 421-430

van Kujik F.J.G.M., Sevanian A., Handelman G.J. and Dratz E.A.

A new role for phospholipase A2: protection of membranes from lipid peroxidation damage.

TIBS, 1987, 12, 31-34

Verma S.P., Gebicki J.M. and Stocker R.

Structural changes in plasma membranes prepared from irradiated chinese hamster V79 cells as revealed by raman spectroscopy.

Radiation Research, 1991, 126, 27-35

Vossen R.C.R.M., van Dam-Mieras M.C.E., Hornstra G. and Zwaal R.F.

Differential effects of endothelial cell fatty acid modification on the sensitivity of their membrane phospholipids to peroxydation.

Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1995, 52, 341-347

Wahle K.W.J.

Fatty acid modification and membrane lipids.

Proceedings of the Nutrition Society, 1983, 42, 273-285

Wahnon R., Cogan U. and Mokady S.

Dietary fish oil modulates the alkaline phosphatase activity and not the fluidity of rat intestinal microvillus membrane.

J. Nutr., 1992, 122, 1077-1084

Williams C.M. and Maunder K.

Effect of dietary fatty acid composition on inositol-, choline- and ethanolamine-phospholipids of mammary tissue and erythrocytes in the rat.

British Journal of Nutrition, 1992, 68, 183-193

Wolf C.

Rôle des phospholipides dans la fluidité de la matrice lipidique membranaire.

In: Biologie des lipides chez l'Homme / ed. eds. par Douste-Blazy L. and Mendy F.

Médicales Internationales, 1988.- vol.-p. 91-100

Yaqoob P., Newsholme E.A. and Calder P.C.

Influence of cell culture conditions on diet-induced changes in lymphocyte fatty acid composition.

Biochim. Biophys. Acta., 1995, 1255, 333-340

Yaqoob P., Pala H.S., Cortina-Borja M., Newsholme E.A. and Calder P.C.

Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions.

Eur. J. Clin. Invest., 2000, 30, 3, 260-274

Yeagle P.L.

Cholesterol and the cell membrane.

Biochim. Biophys. Acta., 1985, 822, 267-287

Yonei S. and Kato M.

X-Ray-induced structural changes in erythrocytes membranes studied by use of fluorescent probes.

Radiation Research, 1978, 75, 31-45

Yonei S., Todo T. and Kato M.

Evidence for a change in the fluidity of erythrocyte membranes following X irradiation by measurement of pyrene excimer fluorescence.

Radiation Research, 1979, 80, 484-493

Zaleska M.M. and Wilson D.F.

Lipid hydroperoxides inhibit reacylation of phospholipids in neuronal membranes.

Journal of Neurochemistry, 1989, 52, 255-260

Zeidler U., Barth C. and Stark G.

Radiation-induced and free radical-mediated inactivation of ion channels formed by the polyene antibiotic amphotericin B in lipid membranes: effect of radical scavengers and single-channel analysis.

Int. J. Radiat. Biol., 1995, 67, 2, 127-134

Table des matières

Table des matières

Remerciements	
Avant-propos	
Sommaire	
Liste des abréviations	1
Introduction générale	5
Chapitre 1 : Etude Bibliographique	11
I. Les rayonnements ionisants.....	11
I.1. Les différents types de rayonnements ionisant	11
I.1.1. Définition des rayonnements ionisants	11
I.1.2. Le transfert linéique d'énergie (TLE).....	11
I.1.3. Les rayonnements « particulières »	12
I.1.3.1. Le rayonnement neutronique.....	12
I.1.3.2. Le rayonnement alpha.....	12
I.1.3.3. Le rayonnement bêta	12
I.1.4. Les rayonnements électromagnétiques	13
I.1.4.1. Le rayonnement gamma	13
I.1.4.2. Le cobalt-60 et le césium-137	13
I.2. Les grandeurs définies en radiobiologie	14
I.2.1. La dose absorbée (D) et le débit de dose absorbé	14
I.2.2. L'efficacité biologique relative (EBR)	14
I.2.3. La dose équivalente (HT).....	15
I.2.4. La dose efficace (E)	16
I.3. Les sources d'exposition aux rayonnements ionisants.....	17
I.3.1. Les sources d'irradiation naturelles	17
I.3.2. Les sources d'irradiation médicales	18
I.3.3. Les sources d'irradiation industrielles	18
I.3.3.1. L'industrie électronucléaire	18
I.3.3.2. L'industrie non électronucléaire	19
I.3.4. L'exposition d'origine professionnelle.....	19
II. L'accident radiologique.....	19
II.1. Le syndrome d'irradiation aiguë (SIA).....	20
II.2. Les différents types de dosimétrie.....	21
II.2.1. La dosimétrie clinique.....	21
II.2.2. La dosimétrie physique.....	21
II.2.3. La dosimétrie biologique.....	22
III. Atteintes moléculaires des constituants membranaires lors d'une irradiation	23
III.1. Structure moléculaire de la membrane plasmique	23
III.1.1. Les protéines membranaires.....	24
III.1.2. Les lipides.....	25
III.1.2.1. Les phospholipides	25
III.1.2.2. Les stérols.....	28
III.1.3. Les sucres	28
III.2. Les mécanismes de lésions moléculaires radio-induites	28
III.2.1. Effet direct.....	29

III.2.2. Effet indirect	29
III.3. Effets des rayonnements ionisants au niveau des protéines	30
III.4. Effets des rayonnements ionisants au niveau des lipides	32
III.5. Effets des rayonnements ionisants au niveau des sucres	33
IV. Les mécanismes de défenses cellulaires	34
IV.1. Les systèmes de défenses anti-oxydants membranaires.....	35
IV.1.1. Les systèmes de défenses enzymatiques	35
IV.1.1.1. La Superoxyde Dismutase (SOD).....	36
IV.1.1.2. La glutathion peroxydase et la catalase.....	36
IV.1.1.3. La glutathion peroxydase (GSHPx).....	36
IV.1.1.4. La catalase.....	37
IV.1.2. Les systèmes de défenses non enzymatiques	37
IV.1.2.1. La vitamine E (a-Tocophérol)	37
IV.1.2.2. La vitamine C (acide ascorbique)	38
IV.1.2.3. Les caroténoïdes	39
IV.1.2.4. Le glutathion (GSH)	39
IV.1.3. Autres composés.....	40
IV.2. Les systèmes de réparation membranaire	41
IV.2.1. Au niveau des protéines.....	41
IV.2.2. Au niveau des lipides	43
IV.3. Le système de balance anti-oxydante.....	45
V. Conséquences biologiques des rayonnements ionisants sur la membrane plasmique	46
V.1. Propriétés biophysiques de la membrane cellulaire	47
V.1.1. Dynamique moléculaire de la membrane plasmique.....	47
V.1.1.1. Mouvement des protéines.....	47
V.1.1.2. Mouvement des lipides.....	47
V.1.1.3. Les modulateurs intrinsèques de la fluidité membranaire.....	49
V.1.2. Techniques permettant la mesure de la fluidité membranaire	50
V.1.2.1. Principales techniques de fluorimétrie.....	50
V.1.2.1.1. Polarisation de fluorescence.....	50
V.1.2.1.2. La formation d'excimères intermoléculaires.....	53
V.1.2.2. Localisation dans la membrane cellulaire des marqueurs fluorescents	56
V.2. Altérations radio-induites des propriétés de la membrane cellulaire.....	57
V.2.1. Modifications radio-induites de la fluidité membranaire.....	58
V.2.2. Modifications radio-induites des fonctions et des propriétés membranaires	59
VI. Conséquences des rayonnements ionisants sur l'état cellulaire.....	61
VI.1. La mort cellulaire.....	62
VI.2. Apoptose et irradiation.....	66
VII. Conséquences des rayonnements ionisants au niveau tissulaire.....	67
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....	73
I. Etudes <i>in vitro</i>	73
I.1. Matériel biologique.....	73
I.1.1. Lignées cellulaires.....	73
I.1.1.1. Lymphoblastes	73
I.1.1.2. Fibroblastes	73
I.1.2. Echantillons sanguins	74
I.2. Préparation des échantillons sanguins.....	74
I.2.1. Séparation des lymphocytes du sang total.....	74

I.2.2. Préparation des membranes totales de lymphocytes	75
I.2.3. Obtention d'hématies intactes.....	75
I.2.4. Préparation des membranes d'hématies	75
I.3. Caractéristiques des irradiations	76
I.3.1. Cultures cellulaires	76
I.3.2. Sang Total	76
I.4. Préparation des échantillons biologiques pour les mesures de fluidité membranaire.....	77
I.4.1. Sondes fluorescentes	77
I.4.2. Marquage des suspensions cellulaires.....	77
I.5. Mesures de la fluidité membranaire par spectrofluorimétrie	78
I.5.1. Appareil de mesure	78
I.5.2. Etablissement des conditions spectrales de mesure.....	79
I.5.3. Principe de la mesure par la méthode de formation des excimères intermoléculaires	79
I.5.4. Principe de la mesure par la méthode de polarisation de fluorescence.....	80
I.6. Mesure de la fluidité membranaire par cytométrie de flux.....	81
I.6.1. Appareil de mesure	82
I.6.2. Principe de la mesure.....	83
I.7. Mesure de la fluidité membranaire et détection simultanée de la viabilité cellulaire par cytométrie de flux.....	86
I.7.1. Appareil de mesure.....	86
I.7.2. Principe de la mesure.....	88
I.8. Dosage des lipides membranaires par Chromatographie Liquide Haute Performance.....	90
I.8.1. Matériel biologique	90
I.8.2. Extraction des lipides totaux	90
I.8.3. Extractions des lipides polaires.....	91
I.8.4. Séparation des différentes classes de phospholipides par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	91
I.9. Analyse de la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....	94
I.9.1. Transméthylation des classes de phospholipides	94
I.9.2. Méthode d'analyse des acides gras par CPG.....	94
II. Etudes <i>in vivo</i>	97
II.1. Matériel biologique	97
II.1.1. Modèle rat.....	97
II.1.2. Modèle singe	97
II.1.3. Etudes sur l'Homme.....	97
II.2. Préparation des échantillons sanguins	98
II.2.1. Séparation du plasma.....	98
II.2.2. Séparation des lymphocytes du sang total	98
II.2.3. Obtention d'hématies intactes.....	98
II.2.4. Préparation des membranes d'hématies.....	98
II.3. Caractéristique des irradiations	99
II.3.1. Modèle rat.....	99
II.3.2. Modèle singe	99
II.3.3. Etudes sur l'Homme.....	99
II.4. Préparation des échantillons biologiques pour la mesure de fluidité membranaire.....	100
II.5. Mesure de la fluidité membranaire par cytométrie de flux	100

II.6. Mesure de la fluidité membranaire et détection simultanée de la viabilité cellulaire par cytométrie de flux.....	100
II.7. Dosage de la vitamine E plasmatique par CLHP.....	100
II.7.1. Matériel biologique.....	100
II.7.2. Principe de la méthode.....	100
II.7.3. Solutions standards.....	101
II.7.4. Extraction de la vitamine E.....	101
II.7.5. Quantification de la vitamine E.....	101
II.8. Dosage des lipides membranaires par CLHP.....	105
II.9. Analyse de la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides par CPG.....	105
III. Méthodes statistiques.....	105
Chapitre 3 : Etudes <i>in vitro</i> des effets d'une irradiation sur la membrane cellulaire.....	109
I. Résultats.....	110
I.1. Mise au point de la technique de mesure de la fluidité membranaire.....	110
I.1.1. Conditions optimales d'utilisation des sondes fluorescentes.....	110
I.1.1.1. Détermination des caractéristiques spectroscopiques du 9-AS pour des hématies irradiées et non irradiées.....	110
I.1.1.2. Cinétique d'incorporation du 9-AS dans une suspension cellulaire d'hématies irradiées et non irradiées.....	111
I.1.1.3. Influence de la concentration du 9-AS sur les valeurs d'intensité de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence dans les suspensions d'hématies.....	112
I.1.1.4. Influence de l'élimination des molécules de 9-AS libres sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence.....	114
I.1.2. Comparaison de la mesure de fluidité membranaire par spectrofluorimétrie et cytométrie de flux.....	115
I.1.2.1. Hématies.....	115
I.1.2.2. Lymphocytes.....	116
I.2. Influence d'une irradiation.....	117
I.2.1. Influence d'une irradiation sur la composition en phospholipides et en acides gras membranaires des érythrocytes et des lymphocytes.....	117
I.2.1.1. Protocole expérimental.....	117
I.2.1.2. Résultats obtenus sur les érythrocytes.....	118
I.2.1.2.1. Evolution après irradiation de la composition en phospholipides membranaires.....	118
I.2.1.2.2. Composition en acides gras totaux des membranes d'érythrocytes avant et après irradiation.....	119
I.2.1.2.3. Effet de l'irradiation sur la composition en acides gras de chaque classe de phospholipides dans les membranes d'érythrocytes.....	121
I.2.1.3. Résultats obtenus sur les lymphocytes.....	124
I.2.1.3.1. Evolution après irradiation de la composition en phospholipides membranaires.....	124
I.2.1.3.2. Composition en acides gras totaux des membranes de lymphocytes avant et après irradiation.....	125
I.2.1.3.3. Effet de l'irradiation sur la composition en acides gras de chaque classe de phospholipides dans les membranes de lymphocytes.....	127

I.2.2. Influence d'une irradiation sur les mesures de fluidité membranaire dans les membranes des érythrocytes et des lymphocytes.....	130
I.2.2.1. Protocole expérimental.....	130
I.2.2.2. Résultats obtenus sur les érythrocytes.....	130
I.2.2.3. Résultats obtenus sur les lymphocytes.....	132
I.2.3. Etude des liens éventuels entre fluidité membranaire et mort cellulaire radio-induite.....	133
I.2.3.1. Protocole expérimental.....	133
I.2.3.2. Résultats.....	134
II. Discussion.....	137
Chapitre 4 : Etudes <i>in vivo</i> des effets d'une irradiation sur la membrane cellulaire.....	155
I. Résultats.....	155
I.1. Protocole expérimental.....	155
I.2. Type de régimes.....	156
I.3. Effets des régimes sur les animaux en l'absence d'irradiation.....	158
I.3.1. Croissance et prise alimentaire.....	158
I.3.2. Dosage de la vitamine E plasmatique.....	159
I.3.3. Résultats obtenus sur les hématies.....	160
I.3.3.1. Numération cellulaire.....	160
I.3.3.2. Fluidité membranaire.....	160
I.3.3.3. Composition en phospholipides membranaires.....	161
I.3.3.4. Composition en acides gras membranaires totaux.....	162
I.3.3.5. Composition en acides gras de chaque classe de phospholipides.....	164
I.3.4. Résultats obtenus sur les lymphocytes.....	167
I.3.4.1. Numération cellulaire.....	167
I.3.4.2. Viabilité cellulaire.....	168
I.3.4.3. Fluidité membranaire.....	168
I.3.4.4. Fluidité membranaire des différents états de viabilité cellulaire.....	169
I.4. Effets de l'irradiation sur les animaux.....	170
I.4.1. Croissance et prise alimentaire.....	170
I.4.2. Dosage de la vitamine E plasmatique.....	172
I.4.3. Résultats obtenus sur les hématies.....	173
I.4.3.1. Numération cellulaire.....	173
I.4.3.2. Fluidité membranaire.....	174
I.4.3.3. Composition en phospholipides membranaires.....	176
I.4.3.4. Composition en acides gras membranaires totaux.....	177
I.4.3.5. Composition en acides gras de chaque classe de phospholipides.....	178
I.4.4. Résultats obtenus sur les lymphocytes.....	182
I.4.4.1. Numération cellulaire.....	182
I.4.4.2. Viabilité cellulaire des lymphocytes.....	184
I.4.4.3. Fluidité membranaire.....	186
I.4.4.4. Fluidité membranaire des différents états de viabilité cellulaire.....	188
II. Discussion.....	189
Chapitre 5 : L'index de fluidité membranaire comme bio-indicateur d'une exposition à une irradiation.....	207
I. Résultats.....	208

I.1. Variations de l'index de fluidité membranaire en fonction du type cellulaire et du modèle considéré.....	208
I.2. Etudes <i>in vitro</i>	209
I.2.1. Les lymphoblastes.....	209
I.2.1.1. Protocole expérimental.....	209
I.2.1.2. Résultats	210
I.2.2. Les fibroblastes.....	210
I.2.2.1. Protocole expérimental.....	210
I.2.2.2. Résultats	211
I.2.3. Echantillons sanguins.....	215
I.2.3.1. Protocole expérimental.....	215
I.2.3.2. Hématies	216
I.2.3.3. Lymphocytes	218
I.3. Etudes <i>in vivo</i>	220
I.3.1. Le modèle rat.....	220
I.3.1.1. Protocole expérimental.....	220
I.3.1.2. Numération cellulaire.....	221
I.3.1.3. Hématies	222
I.3.1.4. Lymphocytes	223
I.3.2. Le modèle singe.....	224
I.3.2.1. Protocole expérimental.....	224
I.3.2.2. Numération cellulaire.....	224
I.3.2.3. Hématies	225
I.3.2.4. Lymphocytes	226
I.4. Etudes sur l'Homme.....	226
I.4.1. Protocole expérimental	226
I.4.2. Numération cellulaire	227
I.4.3. Hématies.....	228
II. Discussion	230
Conclusion générale et perspectives	241
Références bibliographiques	247

Radio-induced membrane damages as biosensors of radiation exposure: Mechanisms studies and practical applications.

After an accidental overexposure, the assessment of the received dose in biological dosimetry is performed by a method based on the effects of irradiation on the DNA molecule. But this technique shows some limitations; therefore we tried to find new biosensors of radiation exposure. We have pointed out that membrane is a critical target of ionising radiation after an *in vitro* and *in vivo* overexposure. *In vitro*, these modifications were involved in the radio-induced apoptotic pathway. The measure of membrane fluidity allowed us to obtain an overall view of cellular membrane. Moreover, *in vivo*, by changing the lipid nutritional status of animals, our results displayed the important role played by membrane lipid composition in radio-induced membrane alterations. Besides, membrane effects were adjusted by the extracellular physiological control, and in particular by the damages on membrane fatty acid pattern. Finally, we have tested the use of membrane fluidity index as a biosensor of radiation exposure on *in vivo* models and blood samples from medical total body irradiated patients. The results achieved on animal models suggested that the membrane fluidity index was a biosensor of radiation exposure. Nevertheless, the observations realised on patients highlight that the effect of the first dose fraction of the radiotherapy treatment had some difficulties to be noticed. Indeed, the combined treatment: chemotherapy and radiotherapy disturbed the membrane fluidity index measures. To conclude, whereas this parameter was not a biosensor of irradiation exposure usable in biological dosimetry, it may allow us to assess the radio-induced damages and their cellular but also tissue impacts.

RESUME en français

Lors d'une exposition accidentelle aux rayonnements ionisants, l'estimation de la dose reçue en dosimétrie biologique est réalisée en se basant sur les dommages de la molécule d'ADN. Néanmoins, cette technique présente certaines limites, c'est pourquoi nous recherchons de nouveaux bio-indicateurs de dose. Nous avons montré que la membrane est une cible sensible des rayonnements ionisants suite à une exposition *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, l'irradiation induit des altérations de la composition en acides gras des phospholipides membranaires et conditionnent les propriétés biophysiques de la membrane. Ces atteintes participent au processus apoptotique radio-induit. La mesure de la fluidité membranaire permet ainsi d'obtenir une vision intégrée des dommages de la membrane cellulaire. D'autre part, *in vivo*, en modifiant l'état nutritionnel lipidique des animaux, nos résultats ont mis en évidence l'importance du rôle de la composition en lipides de la membrane dans les altérations membranaires radio-induites. De plus, la régulation physiologique extracellulaire module les effets membranaires radio-induits et en particulier les dommages au niveau du profil en acides gras membranaires. Finalement, nous avons testé l'utilisation de l'index de fluidité membranaire comme bio-indicateur de dose sur des modèles *in vivo* et des prélèvements sanguins de patients ayant subi une irradiation médicale corporelle totale. Les résultats obtenus sur des modèles animaux suggèrent que ce paramètre puisse être un bio-indicateur d'exposition. Cependant, les observations réalisées sur les patients sont difficilement interprétables en raison du traitement combiné : chimiothérapie et radiothérapie. En conclusion, bien que ce paramètre ne soit pas un bio-indicateur d'une exposition à une irradiation utilisable en dosimétrie biologique, il permettrait d'évaluer les dommages radio-induits et leur impact au niveau cellulaire mais également tissulaire.

DISCIPLINE

Radiobiologie

MOTS-CLES

Rayonnements ionisants, Fluidité membranaire, Apoptose radio-induite, Régimes lipidiques, Dosage des acides gras membranaires, Cytométrie de flux, Polarisation de fluorescence

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE OÙ LA THÈSE A ÉTÉ PRÉPARÉE :

Laboratoire de Dosimétrie Biologique Multiparamétrique
BP. 6 - 92265 Fontenay - aux - Roses cedex