



HAL
open science

Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l’ozone : Effets de l’âge et d’une supplémentation en oméga-3

Stéphane Servais

► **To cite this version:**

Stéphane Servais. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l’ozone : Effets de l’âge et d’une supplémentation en oméga-3. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2004. Français. NNT: . tel-00012031

HAL Id: tel-00012031

<https://theses.hal.science/tel-00012031>

Submitted on 24 Mar 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Présentée devant

l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 25 avril 2002)

Présentée et soutenue publiquement le 28 Avril 2004

Par

SERVAIS STÉPHANE

TITRE:

**ALTÉRATIONS MITOCHONDRIALES ET STRESS OXYDANT
PULMONAIRE EN RÉPONSE À L'OZONE :
EFFETS DE L'ÂGE ET D'UNE SUPPLÉMENTATION EN OMÉGA-3**

Directeurs de thèse:

Monsieur le Docteur FAVIER Roland

et

Monsieur le Professeur PEQUIGNOT Jean-Marc

JURY:

Mr le Professeur BARRÉ Hervé , Président LYON 1	Université Claude Bernard
Mr le Docteur FAVIER Roland , Directeur Grenoble	Université Joseph Fourier
Mr le Professeur PEQUIGNOT Jean-Marc , Directeur LYON 1	Université Claude Bernard
Mme le Professeur CILLARD Josiane , Rapporteur Rennes	Faculté de Pharmacie,
Mr le Docteur PINCEMAIL Joël , Rapporteur Belgique	Université de Liège - CHU,
Mme le Docteur DESQUEYROUX Hélène , examinateur	ADEME, Paris

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
PUBLICATIONS	6
LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX	7
LISTES DES ABREVIATIONS	11
AVANT-PROPOS	12
INTRODUCTION & RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	13
I. L'OZONE, POLLUANT ATMOSPHERIQUE	14
I.1. Nature et formation	14
I.2. Pollution par l'ozone	14
I.3. Effets sur la santé	15
I.3.1. Ozone et fonction respiratoire:.....	16
I.3.2. Populations sensibles.....	16
I.3.3. Mécanismes d'action de l'ozone.	17
II. LE STRESS OXYDANT CELLULAIRE	19
II.1. Définitions	19
II.2. Sources endogènes des dérivés réactifs de l'oxygène	20
II.2.1. L'auto-oxydation de petites molécules.....	20
II.2.2. Peroxysome.....	20
II.2.3. Réticulum endoplasmique.....	20
II.2.4. Xanthine oxydase	21
II.2.5. Lipoxygénase et acide arachidonique.....	21
II.2.6. NADPH oxydase.....	21
II.2.7. Mitochondrie.....	21
II.2.7.a. Structure de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP synthase	22
II.2.7.b. Fonctionnement mitochondrial et production de ROS	23
II.2.7.c. Modulation de l'activité mitochondriale	25
II.2.7.d. Effets des ROS sur la mitochondrie	27

II.3. Systèmes antioxydants	28
II.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	28
II.3.1.a. Superoxyde dismutase (SOD)	28
II.3.1.b. Glutathion peroxydase (GPx)	29
II.3.1.c. Catalase (CAT)	30
II.3.1.d. Peroxyredoxines	30
II.3.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques.....	30
II.4. Dégâts oxydatifs cellulaires	31
II.4.1. Peroxydation lipidique.....	31
II.4.2. Oxydation des protéines	32
II.4.2.a. Rôle des protéines de stress	32
II.4.3. Dommages oxydatifs de l'ADN.....	33
II.4.3.a. Oxydation directe	33
II.4.3.b. Modification de base par fixation de produits secondaires formation d'adduits de l'ADN	34
II.4.3.c. Systèmes de réparation de l'ADN	35
III. MODULATION DE LA BALANCE PRO/ANTIOXYDANT PAR L'AGE ET L'O₃ AU NIVEAU PULMONAIRE	35
III.1. Effet de l'âge sur la balance pro/antioxydant	35
III.1.1. Période de maturation.....	35
III.1.2. Vieillesse.....	36
III.2. Effets de l'O₃ sur la balance pro/antioxydant pulmonaire	37
III.2.1. Effets sur la mitochondrie pulmonaire.....	38
III.2.2. Réponse des systèmes antioxydants.....	38
III.2.3. Dégâts oxydatifs.....	39
IV. LUTTE CONTRE LE STRESS OXYDANT PULMONAIRE PAR LES OMEGA-3	39
IV.1. Définition	39
IV.2. Origine des propriétés anti-inflammatoire des ω₃	40

V.	HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE THE..	41
	MATERIEL & METHODES	42
I.	Animaux	43
II.	Protocole d'exposition à l'O₃	44
III.	La supplémentation en huile de poisson	44
IV.	Etude du fonctionnement respiratoire par plethysmographie	45
V.	Prélèvements et analyses biochimiques	46
V.1.	Isolement des mitochondries	46
V.2.	Mesure de la consommation mitochondriale d'O₂ par oxygraphie	47
V.3.	Mesure de la production mitochondriale d'H₂O₂ par fluorimétrie	47
V.4.	Dosages spectrophotométriques des activités de la SOD, GPx et CAT	48
	V.4.1. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase	48
	V.4.2. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase	49
	V.4.3. Dosage de l'activité de la catalase	50
V.5.	Détermination du contenu en HSP₇₂	50
V.6.	Dosages par HPLC-EC et HPLC-MS/MS des dommages de l'ADN	51
	V.6.1. Principe de la spectrométrie de masse en tandem couplé à l'HPLC	51
	V.6.2. Extraction de l'ADN	52
	V.6.3. Quantification de la 8-oxodGuo par HPLC avec détection électrochimique	53
	V.6.4. Quantification des éthenobases, M1dGuo et 4-HNE-Guo par HPLC couplée avec un spectromètre de masse en tandem (HPLC-MS/MS)	54
VI.	Analyses statistiques	54
	RESULTATS & DISCUSSION	55
	ETUDE I	56
	Résultats	56
I.1.	Evolution de la masse corporelle (MC) chez les rats âgés des groupes contrôle et supplémentés en ω3 exposés à l'O₃ (O₃ω3)	56
I.2.	Paramètres ventilatoires	56

I.2.1. Ventilation en condition basale (normoxie)	56
I.2.2. Réponse ventilatoire à l' hypoxique (10 % O ₂)	57
I.3. Consommation mitochondriale d'O ₂	58
I.4. Production mitochondriale d'H ₂ O ₂	58
I.5. Activités des enzymes antioxydantes dans le poumon.....	59
I.5.1. Effet de l'âge.....	59
I.5.2. Effet de l'exposition à l'O ₃	59
I.6. Contenu pulmonaire en HSP ₇₂	61
I.7. Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn pulmonaire	61
I.8. Contenu en adduits issues de la peroxydation lipidique dans l'ADNn pulmonaire.....	62
Discussion	63
Conclusions de l'étude I	71
ETUDE II	72
Résultats	72
II.1. Evolution de la masse corporelle (MC) chez les rats immatures contrôle et le rats immatures supplémentés en ω3 exposés à l'O ₃ (O ₃ ω3).	72
II.2. Paramètres ventilatoires	72
II.2.1. En condition basale (normoxie)	72
II.2.2. Ventilation en condition hypoxique (10 % O ₂)	73
II.3. Production et élimination des ROS au niveau pulmonaire.....	73
II.3.1. Consommation d'O ₂ et production d'H ₂ O ₂ mitochondriale.....	73
II.3.2. Activités des enzymes antioxydantes	74
II.3.3. Contenu en HSP ₇₂ pulmonaire.....	74
II.3.4. Dommages oxydatifs de l'ADNn.....	74
II.3.4.a. Contenu en 8-oxodGuo.....	74
II.3.4.b. Contenu en adduits de l'ADN issues de la peroxydation lipidique.....	75
II.4. Susceptibilité au stress oxydant au niveau hépatique.....	76
II.4.1. Oxydation de l'ADNn hépatique.....	76
II.4.2. Activités des enzymes antioxydantes.....	76

II.4.3. Fonctionnement mitochondrial hépatique	77
Discussion	77
Conclusions de l'étude II	83
ETUDE III	84
Résultats	84
III.1. Evolution de la masse corporelle	84
III.2. Paramètres ventilatoires	84
III.2.1. En condition basale (normoxie)	84
III.2.2. Ventilation en condition hypoxique (10 % O₂)	85
III.3. Production et élimination des ROS au niveau pulmonaire	85
III.3.1. Consommation d'O₂ et production d'H₂O₂ mitochondriale	85
III.3.2. Activités des enzymes antioxydantes	86
III.3.3. Dommages oxydatifs de l'ADNn	87
<i>III.3.3.a. Contenu en 8-oxodGuo</i>	87
<i>III.3.3.b. Contenu en adduits de l'ADN issues de la peroxydation lipidique</i>	87
III.4. Susceptibilité au stress oxydant au niveau hépatique	89
III.4.1. Oxydation de l'ADNn hépatique	89
III.4.2. Activités des enzymes antioxydantes	89
III.4.3. Fonctionnement mitochondrial hépatique	90
Discussion	90
Conclusion de l'étude III	94
DISCUSSION GENERALE	95
CONCLUSIONS GENERALES	101
PERSPECTIVES	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107
ANNEXES	128
Age-related sensitivity to lung oxidative stress during mild ozone exposure.....	129
Communications orales et affichées.....	161

PUBLICATIONS

Publications traitant des résultats de Thèse

- **Servais S.**, Boussouar A., Molnar A., Douki T., Pequignot J.M. and Favier R. *Age-related sensitivity to lung oxidative stress during mild ozone exposure*. Soumis à Free radical Research.

Autres Publications

- Couturier K, **Servais S**, Koubi H, Sempore B, Sornay-Mayet MH, Cottet-Emard JM, Bruno Guigas, Lavoie JM, Favier R. *Metabolic and Hormonal Responses to Exercise in the Anti-Obese Lou/C Rats*. Int J Obes Relat Metab Disord. *In press*.
- **Servais S**, Couturier K, Koubi H, Rouanet JL, Desplanches D, Sornay-Mayet MH, Lavoie JM, Favier R. *Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria*. Free Rad. Biol. Med. 2003; 35(1):24-32.
- Couturier K, **Servais S**, Koubi H, Sempore B, Sornay-Mayet MH, Cottet-Emard JM, Lavoie JM, Favier R. *Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C)*. Obes. Res. 2002;10(3):188-95.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Introduction & rappels bibliographiques

- Figure 1.** Schéma de formation de l'ozone (O₃)..... verso p13
- Figure 2.** Concentrations d'O₃ maximum mesurées le 12 août 2003 en France et simulation sur l'Europe..... verso p14
- Figure 3.** Schéma d'action de l'O₃ au niveau pulmonaire..... verso p16
- Figure 4.** Mitochondrie et structure de la chaîne respiratoire mitochondriale..... verso p21
- Figure 5.** Site d'action des substrats et inhibiteurs au niveau de la chaîne Respiratoire..... verso p22
- Figure 6.** Production de ROS au niveau des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale..... verso p24
- Figure 7.** Représentation schématique de la balance prooxydant/antioxydant cellulaire..... verso p28
- Figure 8.** Formation des principaux adduits de l'ADN à partir de produits secondaires issues de la peroxydation lipidique..... verso p33
- Figure 9:** Conversion des acides linoléique et α linoléique en AGPI à longue chaîne..... verso p38
- Figure 10:** Interaction de l'EPA avec l'ARA dans la synthèse des eicosanoides pro-inflammatoires..... verso p39

Matériel & méthodes

- Figure 11.** Schéma du caisson d'exposition à l'O₃..... verso p43
- Figure 12.** Schéma du plethysmographe barosensible..... verso p44
- Figure 13.** Représentation des différentes étapes de l'analyse des adduits de l'ADN issus de la peroxydation lipidique par HPLC couplée au spectromètre de masse en tandem..... verso p50

Résultats & discussion

ETUDE I

- Figure 14.** Evolution de la masse corporelle (MC) des rats immatures (a), adultes verso p55

(b) et âgés (c) exposés ou non à 0,5 ppm d'O₃.....

Figure 15. Débit ventilatoire (\dot{V}_e) spécifique en normoxie (Nx) et en hypoxie (Hx) chez les rats immatures (haut), adultes (milieu) et âgés (bas) exposés ou non à l'O₃..... verso p56

Figure 16. Activités de la superoxyde dismutase (SOD) pulmonaire chez des rats immatures, adultes et âgés exposés ou non à l'O₃..... verso p58

Figure 17. Activités de la glutathion peroxydase (GPx) et de la catalase (CAT) pulmonaires chez des rats immatures, adultes et âgés exposés ou non à l'O₃..... p60

Figure 18. Contenu pulmonaire en HSP₇₂ chez des rats immatures, adultes et âgés exposés ou non à l'O₃..... verso p60

Figure 19. Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn pulmonaire chez des rats immatures, adultes et âgés exposés ou non à l'O₃..... p61

ETUDE II

Figure 20. Evolution de la masse corporelle (MC) chez les rats immatures contrôle et les rats immatures supplémentés en $\omega 3$ exposés à l'O₃ (O₃ $\omega 3$)..... verso p71

Figure 21: Débit ventilatoire (\dot{V}_e) spécifique chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en $\omega 3$ (O₃ $\omega 3$)..... verso p72

Figure 22: Activité de la superoxyde dismutase (SOD) pulmonaire chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en $\omega 3$ (O₃ $\omega 3$)..... verso p73

Figure 23: Activités de la glutathion peroxydase (GPx) et de la catalase (CAT) pulmonaires chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en $\omega 3$ (O₃ $\omega 3$)..... p74

Figure 24: Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn pulmonaire chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en $\omega 3$ (O₃ $\omega 3$)..... verso p74

Figure 25: Contenu en HNE-dGuo et M1dGuo dans l'ADNn pulmonaire chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en $\omega 3$ (O₃ $\omega 3$)..... p75

Figure 26: Contenu en éthénobases ϵ dGuo et ϵ dAde dans l'ADNn pulmonaire chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à p76

l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3).....

Figure 27: Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn hépatique chez les rats immatures des groupes contrôle et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3)..... verso p75

Figure 28: Contenu en adduits issues de la peroxydation lipidique dans l'ADNn hépatique, chez les rats immatures des groupes contrôle et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3)..... verso p76

ETUDE II

Figure 29. Evolution de la masse corporelle (MC) chez les rats âgés des groupes contrôle et supplémentés en ω3 exposés à l'O₃ (O₃ω3)..... verso p83

Figure 30: Débit ventilatoire (V̇e) spécifique chez les rats âgés des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3)..... verso p84

Figure 31: Activité de la superoxyde dismutase (SOD) pulmonaire chez les rats âgés des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3)..... p86

Figure 32: Activité de la glutathion peroxydase (GPx) et catalase (CAT) pulmonaire chez les rats âgés des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3)..... verso p86

Figure 33: Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn pulmonaire, chez des rats âgés contrôle et supplémentés en ω3 exposés à l'O₃..... p87

Figure 34: Contenu en M1dGuo, εdGuo et εdAde dans l'ADNn pulmonaire chez les rats âgés des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3)..... p88

Figure 35: Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn hépatique chez les rats âgés des groupes contrôle et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3)..... P89

Figure 36: Contenu en adduits issues de la peroxydation lipidique dans l'ADNn hépatique, chez les rats âgés des groupes contrôle et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3)..... verso p88

TABLEAUX

Introduction & rappels bibliographiques

Tableau 1 : Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote..... verso p18

Tableau 2: Principaux acides gras polyinsaturés..... verso p38

Résultats & discussion

ETUDE I

Tableau 3. Effets ventilatoires de l'exposition à l'O₃ chez les rats immatures, adultes et âgés..... p57

Tableau 4. Effet de l'âge et de l'O₃ sur la consommation d'O₂ et production d'H₂O₂ mitochondriale pulmonaire en présence de succinate..... verso p57

Tableau 5. Effets de l'exposition à l'O₃ sur le contenu en adduits issus de la peroxydation lipidique dans l'ADNn pulmonaire chez les rats immatures, adultes et âgés..... verso p61

Résultats & discussion

ETUDE I

Tableau 3. Effets ventilatoires de l'exposition à l'O₃ chez les rats immatures, adultes et âgés..... p57

Tableau 4. Effet de l'âge et de l'O₃ sur la consommation d'O₂ et production d'H₂O₂ mitochondriale pulmonaire en présence de succinate..... verso p57

Tableau 5. Effets de l'exposition à l'O₃ sur le contenu en adduits issus de la peroxydation lipidique dans l'ADNn pulmonaire chez les rats immatures, adultes et âgés..... verso p61

ETUDE III

Tableau 10. Effets conjugués de l'exposition à l'ozone et la supplémentation en ω3 sur les paramètres ventilatoires chez le rat âgés..... verso p84

Tableau 11. Effets conjugués de l'exposition à l'ozone et la supplémentation en ω3 sur la consommation d'O₂ et la production maximale d'H₂O₂ mitochondriale dans le poumon et le foie de rats âgés..... verso p85

Tableau 12. Effets conjugués de l'exposition à l'O₃ et la supplémentation en ω3 sur les activités des principales enzymes antioxydantes dans le foie de rat âgé..... verso p89

Tableau 13. Effets conjugués de l'exposition à l'O₃ et la supplémentation en ω3 sur le fonctionnement des mitochondries hépatiques de rat âgé..... verso p89

LISTES DES ABREVIATIONS

4-HNE:	4-hydroxynonéal	HSP:	<i>heat shock protein</i> , protéine de stress
8-oxodGuo:	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine	M1dGuo:	pyrimido-[1,2 α]purin-10(3 <i>H</i>)-un
AA:	antimycine A	MYXO:	myxothiazol
ADNmt:	acide désoxyribonucléique mitochondrial	NAD(H):	nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (réduit)
ADNn:	acide désoxyribonucléique nucléaire	O₃:	ozone
ADP:	adénosine 5'diphosphate	OPR:	<i>oxidative phosphorylation rate</i> , vitesse de phosphorylation oxydative
AGPI:	acide gras polyinsaturés	PHGPx:	GPx phospholipide-hydroperoxyde
ARA:	acide arachidonique	ppm:	part par million
ARNm:	acide ribonucléique messenger	PRx:	peroxyredoxine
ATP:	adénosine 5'triphosphate	RCR:	rapport de contrôle respiratoire
BSA:	albumine sérique bovine	ROS:	<i>reactive oxygen species</i> , espèces réactives de l'oxygène
CAT:	catalase	ROT:	roténone
DHA:	acide docosahexanoïque	SODcyto:	superoxyde dismutase cytosolique
EDTA:	acide éthylènediamine tétra-acétique	SOD-EC:	superoxyde dismutase extracellulaire
EPA:	acide eicosapentanoïque	SODmito:	superoxyde dismutase mitochondriale
ETC:	<i>electron transport chain</i> , chaîne de transport des électrons	Tris:	tris (hydroxyméthyl) aminométhane
F:	fréquence	UCP:	<i>uncoupling protein</i> , protéine découplante
FAD(H₂):	flavine adénine dinucléotide oxydé (réduit)	Vt:	volume courant
FCCP:	carbonylcyanide-p-trifluorométhoxy-phenylhydrazone	Ÿe:	débit ventilatoire
GPx:	glutathion peroxydase	UV:	rayonnement solaire Ultra -violet
HNE-dGuo:	6-(1-hydroxyhexanyl)-8-hydroxy-1,N ² -propano-2'-deoxyguanosine	εdAde:	1,N ⁶ -Ethenodeosyadenosine
HPLC-MS/MS:	chromatographie liquide à haute performance couplé à la spectrométrie de masse en tandem	εdGuo:	1,N ² -Ethenodeoxyguanosine
HPLC:	chromatographie liquide à haute performance		

AVANT-PROPOS

Il y a un siècle les concentrations troposphériques en ozone (O_3) étaient 5 fois plus faibles qu'actuellement. Le taux d'augmentation de la teneur de ce polluant est de 1 à 3 % par an depuis 30 ans (Conseil Supérieur D'hygiène Publique De France, 1996). La prise de conscience des effets délétères de l' O_3 sur l'Homme et son environnement a permis de mettre en place des mesures politiques ayant pour but de limiter la formation des précurseurs chimiques de l' O_3 . Les effets sanitaires de l'inhalation d' O_3 concernent principalement le poumon. Les effets délétères associés à l'inhalation d' O_3 sont liés à ses capacités à provoquer un stress oxydant pulmonaire en lien avec une surproduction de dérivés réactifs de l'oxygène. Le stress oxydant pourrait avoir des conséquences à long terme pour les cellules pulmonaires s'il conduit à une altération des bases de l'ADN. L'oxydation de l'ADN ou la fixation de produits secondaires de l'oxydation des lipides sont impliqués dans les phénomènes de cancérisation s'ils ne sont pas pris en charge par des systèmes de réparation spécifiques.

La plus grande sensibilité respiratoire à l' O_3 observée chez les individus jeunes et âgés laisse penser à une plus grande susceptibilité cellulaire au stress oxydant au niveau pulmonaire. La lutte contre le stress oxydant par l'alimentation est une stratégie qui permet à l'organisme de se protéger de dégâts oxydatifs intenses. L'alimentation riche en acides gras polyinsaturés de la famille des $\omega 3$ est un moyen reconnu pour limiter les phénomènes inflammatoires pulmonaires, et pourrait donc limiter les effets de l' O_3 au niveau de l'organisme.

Nous avons ainsi étudié, sur modèle animal, les effets d'une exposition à l' O_3 , sur les éléments cellulaires majeurs influençant la régulation du stress oxydant, ceci chez des populations jeunes et âgées. Dans un deuxième temps les bienfaits d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés $\omega 3$ lors d'une exposition à l'ozone ont été évalués.

Afin de placer les travaux présentés dans ce manuscrit dans un contexte général et scientifique, nous aborderons dans l'introduction les connaissances actuelles sur i) l'ozone, sa formation, l'exposition humaine et les effets connus sur l'organisme, ii) le maintien de l'équilibre entre production de dérivés réactifs de l'oxygène et leur élimination au niveau cellulaire, iii) les effets d'une supplémentation en acide gras polyinsaturés $\omega 3$ lors d'un stress oxydant. Puis, la stratégie expérimentale, les résultats et les conclusions de ces travaux seront développés.

INTRODUCTION
&
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

III. L'OZONE, POLLUANT ATMOSPHERIQUE

III.1. Nature et formation.

L'ozone (O_3) est l'une des espèces moléculaires les plus réactives auxquelles sont exposés les êtres vivants. L'ozone est un polluant photochimique secondaire formé majoritairement à partir de polluants primaires dont le monoxyde d'azote (NO) et les composés organiques volatils (COV) (Conseil Supérieur D'hygiène Publique De France, 1996). Les rayonnements solaires transforment les COV en radicaux peroxydes qui réagissent avec le NO pour former du dioxyde d'azote (NO_2). Les rayonnements solaires (UV) provoquent la dissociation du NO_2 qui forme le NO. Cette réaction libère un atome d'oxygène qui s'associe immédiatement à l' O_2 pour former l' O_3 [Fig.1].

Les sources identifiées d'émissions d'oxydes d'azote sont les combustions d'énergie fossile: parmi ces sources, la circulation routière est responsable de 50 % des émissions, l'industrie et la production d'énergie de 23 %. Les COV sont émis à 25 % par les véhicules à moteur, à 29 % par l'utilisation de solvants ou de peintures et à 21 % par des sources agricoles ou naturelles (arbres, végétation...).

Si la concentration d' O_3 est en relation directe avec l'ensoleillement, elle n'est pas proportionnelle à la quantité de précurseurs (CO, NO_x et COV). En effet, si la concentration en NO est trop importante, le NO réagit avec l' O_3 et provoque ainsi une dégradation de l' O_3 et une baisse de la concentration environnementale ($NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2$) [Fig. 1].

III.2. Pollution par l'ozone

Du fait de sa relation directe avec l'ensoleillement, l' O_3 est un polluant photochimique dont les concentrations les plus importantes sont mesurées pendant la période estivale (mai-septembre). Si l'origine de l' O_3 est localisée dans les grandes agglomérations, la pollution par l' O_3 concerne aussi leurs périphéries et les zones rurales. En effet, le transport de polluants primaires par le vent, et l'absence de destruction de l' O_3 par de fortes concentrations en NO en zone périurbaine et rurale, font qu'il y est observé une pollution de fond (moyenne annuelle) plus élevée qu'en grande agglomération. Cependant, les taux maximum (pics) sont, en majorité, mesurés en zone urbaine.

Le seuil d'information de la population, défini par la directive européenne du 21 septembre 1992 (92/72/CEE) est de $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne horaire. Une directive européenne plus récente (2002/3/CE appliquée à partir du mois d'octobre 2003) a fait passer le seuil d'alerte à la population de $360 \mu\text{g}/\text{m}^3$ moyenne horaire à $240 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour 3 heures consécutives. En 2001, des stations urbaines en France ont cependant mesuré des concentrations moyennes horaires de $387 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Elichegaray, 2002). Pour l'été 2003, marqué par des conditions climatiques particulières, un exemple des concentrations mesurées est présenté dans la figure 2. Le maximum enregistré pendant l'été 2003 fut de $417 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sur l'étang de Berre (Bouche du Rhône) contre $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en région parisienne. L'analyse des données de pollution atmosphérique entre 1991 et 2001, réalisée par l'ADEME (Elichegaray, 2002) a évalué qu'environ 1,6 millions d'habitants avaient été soumis à plus de 30 dépassements du seuil d'information.

III.3. Effets sur la santé

Plusieurs approches ont permis de cerner les effets sanitaires de l' O_3 . De nombreuses études épidémiologiques ont tenté de faire le lien entre pic d' O_3 et les taux d'hospitalisation voire de mortalité [(Vedal, 2003) et pour revue (Brunekreef, 2002)]. Dans l'agglomération de Vancouver (Canada), il a été observé une corrélation directe entre le taux de mortalité et les pics d' O_3 pendant la période estivale. L'augmentation de la mortalité pendant les périodes de pollution était alors essentiellement liée à des problèmes cardiovasculaires et respiratoires. Le même constat a été fait par des études épidémiologiques aux Etats-Unis. En Europe, sur l'ensemble de la population de la France, l'Autriche et l'Allemagne réunies, le nombre de décès dû à la pollution atmosphérique a été évalué à 40.000, dont la moitié est due à des polluants spécifiques du trafic routier. Cependant ces analyses restent complexes du fait qu'il existe de nombreux polluants outre l' O_3 , utilisé comme marqueur de pollution photochimique, tels que le NO, le dioxyde de soufre (SO_2) et le monoxyde de carbone (CO).

Malgré ces biais, les études épidémiologiques ont principalement montré que les effets de l' O_3 étaient localisés au niveau de la première zone de contact avec l'air en dehors de l'épiderme: le poumon (Koken, 2003; Mudway, 2000). Les études chez l'Homme et l'utilisation de protocoles expérimentaux sur modèles animaux ont permis de confirmer que le système pulmonaire était la principale cible de l' O_3 , et d'éclaircir le mode d'action de ce polluant.

III.3.1. Ozone et fonction respiratoire:

Chez l'Homme, les études spirométriques en atmosphère contrôlée (de 0,04 à 0,12 ppm d'O₃) ont montré une baisse de la capacité vitale forcée et du volume d'expiration chez les sujets inhalant l'O₃ (Mudway, 2000; Paz, 1997). Les effets ventilatoires dépendent de la dose inhalée (McDonnell, 1997). Toutefois, lors d'une exposition répétée à 0,12 ppm 6,6 heures/jour pendant 5 jours, ces modifications respiratoires tendent à disparaître, alors que la sensibilité à la métacholine est accentuée et maintenue pendant toute la période d'exposition (Folinsbee, 1994). Si la majorité des effets ventilatoires semblent disparaître lors d'expositions répétées et prolongées, il y a donc persistance de légers dysfonctionnements ventilatoires (Frank, 2001).

Des altérations ventilatoires ont été aussi observées chez des rats inhalant de l'O₃. Ainsi des rats adultes exposés à l'O₃ (de 0,1 à 2 ppm) présentent une hypoventilation marquée (Arito, 1997; Shore, 2002). Ce mécanisme de défense qui est directement relié à la dose d'O₃ (Mautz, 1989) résulte d'une augmentation de la fréquence ventilatoire, et d'une baisse du volume courant. Cette bradypnée serait la résultante d'une stimulation des fibres de l'irritation dites fibres C (Takebayashi, 1998). Les conséquences ventilatoires d'une exposition modérée et répétée s'apparenteraient à un syndrome obstructif des voies respiratoires (Costa, 1995). Lors d'une exposition alternée à 0,5 ppm pendant 5 jours, une adaptation ventilatoire est alors observée, dans le sens d'une disparition des modifications des paramètres ventilatoires, alors que les dommages de l'épithélium pulmonaire augmentent progressivement pendant les 5 jours d'expositions (Tepper, 1989). Les conséquences de l'inhalation d'un gaz irritant tel que l'O₃ sur la réponse ventilatoire sont considérées comme qualitativement similaires chez l'Homme et le rat (Mauderly, 1984).

Ajoutons à ces conséquences ventilatoires, l'hyperréactivité bronchique aux allergènes observée chez l'Homme et différents modèles animaux exposés à l'O₃ qui pourrait être impliquée dans le développement de l'asthme (Parnia, 2002).

III.3.2. Populations sensibles

Les populations présentant des pathologies respiratoires sont plus sensibles à l'O₃. Les asthmatiques et les patients porteurs de pathologies pulmonaires obstructives chroniques sont plus touchés par l'inhalation d'O₃ (Desqueyroux, 2002). Ainsi, sur Paris, les pics d'O₃ sont

corrélés avec l'augmentation des admissions à l'hôpital de patients souffrant de pathologies respiratoires. Une exacerbation de l'obstruction chronique pulmonaire est observée à des concentrations en O₃ faibles. Enfin, les patients fumeurs atteints de bronchopneumopathie obstructive sont encore plus sensibles aux pics d'O₃ (Desqueyroux, 2002).

Il semble que l'âge des individus soit discriminant pour les effets délétères de l'O₃. Ainsi, la plus grande susceptibilité des jeunes individus à l'O₃ a été montrée à la fois chez l'Homme et l'animal (Hoppe, 2003; Shore, 2002). Shore *et al.* (2002) ont observé que chez les très jeunes rats la réponse ventilatoire à l'O₃ (hypoventilation) est absente, ce qui pourrait augmenter les dégâts pulmonaires. La viabilité des cellules pulmonaires après exposition à l'O₃ est fortement réduite chez les rats âgés de 13 jours comparés à des rats adultes (Gunnison, 1992). De plus, la période postnatale chez le rat est la période de maturation du tissu pulmonaire (Burri, 1974). Les individus âgés représentent, eux aussi, une population plus fragile vis à vis de l'O₃ (Kelly, 2003; Mustafa, 1985).

III.3.3. Mécanismes d'action de l'ozone.

L'utilisation de modèles expérimentaux a permis d'étudier précisément les voies par lesquelles l'O₃ affecte à la fois la fonction respiratoire, et d'autres tissus.

Les effets imputés à l'O₃ sont liés à son fort pouvoir oxydant (Menzel, 1994; Mustafa, 1990). L'O₃ oxyde les biomolécules qu'il rencontre ce qui explique que le système respiratoire soit le premier affecté. Les oxydations accrues provoquent une augmentation de la perméabilité pulmonaire, qui facilite à son tour l'action de l'O₃ (Bhalla, 1999). L'O₃ provoque donc l'oxydation des lipides constituant les membranes des cellules épithéliales pulmonaires et des biomolécules présentes dans le surfactant pulmonaire (Putman, 1997). Ces processus d'oxydation accrue déclenchent la stimulation des cellules épithéliales et des macrophages qui libèrent alors les médiateurs de l'inflammation (leucotriène, prostaglandine..). Les cellules inflammatoires (neutrophiles et leucocytes polymorphonucléaires) sont alors recrutées et activées [Fig. 3]. Quand les cellules inflammatoires sont activées, elles sont une source importante de dérivés réactifs de l'oxygène. L'O₃ provoquerait donc un stress oxydant i) en oxydant directement lipides et protéines et ainsi en formant des produits de dégradation à forte activité radicalaire, qui sont à l'origine d'une réaction en chaîne. ii) par l'activation des cellules inflammatoires qui produisent elles-même des dérivés réactifs de l'oxygène [Fig. 3]

Ainsi l'altération des capacités ventilatoires pourrait être liée à la stimulation des fibres afférentes bronchiques C via la synthèse de prostaglandine E2 (PGE2).

Le stress oxydant pulmonaire déclenche des réactions d'oxydations en chaîne et la libération de cytokines pro-inflammatoires qui, par l'intermédiaire du système sanguin, pourraient perturber l'équilibre pro/antioxydant et provoquer un stress oxydant sur un grand nombre de tissus (Laskin, 1994).

En effet, l'O₃ peut ainsi modifier l'activité catécholaminergique dans différentes structures du système nerveux central et périphérique chez des rats exposés à 0,5 ppm (Cottet-Emard, 1997). Après 1 heure d'exposition à 1 ppm, le métabolisme des monoamines dans le système nerveux central est affecté chez le rat adulte (Gonzalez-Pina, 1997). Ces impacts biochimiques peuvent être associés à des dysfonctionnements du système nerveux. En effet, 3 heures d'exposition à 1 ppm chez le rat réduit fortement la durée de sommeil paradoxal en relation avec une augmentation de la sérotonine pontique (Paz, 1996). Cette altération du sommeil peut-être observée chez des animaux exposés à l'O₃ pendant la période de gestation (Paz, 1997). De plus, une exposition à long terme (30 jours) à 0,3 ppm chez la souris adulte induit des modifications neuro-comportementales (Sorace, 2001). Même si la susceptibilité à l'O₃ est importante dans le système nerveux central du fait de son contenu important en acides gras polyinsaturés, d'autres tissus sont aussi touchés. Ainsi, la production de NO par les hépatocytes est augmentée chez des rats adultes exposés de façon aiguë à 1-2 ppm d'O₃ (Laskin, 1994). Le muscle cardiaque n'est pas non plus épargné par les effets délétères de l'exposition à l'O₃, comme le montre l'augmentation de la peroxydation lipidique chez le rats après 5 jours d'exposition à 0,25 ppm (Rahman, 1992). A une dose plus élevée (0,7 ppm), il y a apparition d'un œdème au niveau cardiaque (Rahman, 1992).

Le mécanisme essentiel qui sous-tend les effets de l'O₃ aux niveaux pulmonaire et extra-pulmonaire est lié à une surproduction de dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive oxygen species, ROS) extracellulaire qui provoquerait un déséquilibre cellulaire entre la production de ROS endogènes et leur élimination. Ce déséquilibre conduirait à l'apparition d'un stress oxydant dont les effets pourraient être délétères pour les cellules.

IV. LE STRESS OXYDANT CELLULAIRE

IV.1. Définitions

Pour définir le stress oxydant il faut avant tout définir ce que sont les radicaux libres. Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis à vis d'autres molécules. Celle-ci est variable selon la nature du radical. Parmi ceux formés chez les êtres vivants, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le NO sont peu réactifs mais peuvent déclencher des réactions en chaînes qui formeront des radicaux libres beaucoup plus réactifs [Tab. 1]. Les radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}) et hydroxyles (OH^{\bullet}) sont très réactifs et sont issus respectivement de l'oxydation des lipides (peroxydation) et du clivage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la réaction de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$). Il existe aussi d'autres espèces dérivées de l'oxygène comme l' H_2O_2 , l'oxygène singulet (1O_2) et l'acide peroxy-nitrique (ONOOH), qui, s'ils ne sont pas des radicaux libres au sens propre, sont très réactifs et peuvent donc conduire à l'oxydation de molécules.

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' O_2 , les espèces réactives de l'oxygène (ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également les composés non radicalaires (hydroperoxydes ROOH et H_2O_2). L' H_2O_2 , produit de la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$, est beaucoup plus stable que ce dernier et a la capacité de diffuser à travers les membranes biologiques (contrairement à l' $O_2^{\bullet-}$).

Nous abordons ainsi le paradoxe de l' O_2 : il est indispensable au fonctionnement cellulaire mais est aussi la source de ROS qui peuvent oxyder des macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides. Mais nous devons ajouter que les ROS sont des produits essentiels au fonctionnement cellulaire. Ainsi les ROS seraient impliqués dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée et agiraient comme second messager (Droge, 2002; Thannickal, 2000).

L'équilibre - avoir des ROS en quantité nécessaire pour le bon fonctionnement cellulaire et pas en excès pour ne pas trop oxyder - est maintenu au sein de la cellule par des systèmes d'élimination des ROS.

Dans la cellule il existe donc un équilibre entre la production de ROS et leur élimination. Le stress oxydant est classiquement défini comme un déséquilibre en faveur de la production de ROS qui conduit donc à une oxydation accrue des composants cellulaires

essentiels. Ce déséquilibre pro/antioxydant peut avoir une origine exogène: toxine, molécule oxydante comme l'O₃, ou une origine endogène telle que des dysfonctionnements de certaines sources de production ou des systèmes d'élimination de ROS.

IV.2. Sources endogènes des dérivés réactifs de l'oxygène

Dans l'organisme il y a de nombreuses sources de ROS dont l'importance varie selon les tissus. La réaction chimique de Fenton produit des ROS dans la cellule. Les autres sources cellulaires de ROS sont enzymatiques et non-enzymatiques. (Droge, 2002; Thannickal, 2000)

IV.2.1. L'auto-oxydation de petites molécules

Une importante source de ROS cellulaires est liée à l'auto-oxydation de molécules comme la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'anion superoxyde. L'impact de ces auto-oxydations sur la régulation du stress oxydant n'est pas encore clairement défini.

IV.2.2. Peroxysome

Le peroxysome est une source importante dans la production cellulaire de H₂O₂ car cet organelle contient de nombreuses enzymes générant du H₂O₂. Toutefois ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie et le rein. Il semble cependant que seule une faible quantité de H₂O₂ produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

IV.2.3. Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent des réactions pour détoxifier les drogues liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques et produit ainsi des ROS. Il semble que cette production radicalaire régule les fonctions du réticulum comme par exemple la sécrétion de protéines.

IV.2.4. Xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme soluble qui génère des ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Harrison, 2002). Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires et de façon très importante dans le foie, et les intestins. La localisation cellulaire de la xanthine oxydase est principalement cytoplasmique. La production de ROS par la xanthine oxydase est faible en condition basale, mais jouerait un rôle important lors de l'ischémie - reperfusion.

IV.2.5. Lipoxygénase et acide arachidonique

L'acide arachidonique, provenant de l'hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A2, est le substrat de la lipoxygénase pour la synthèse des leucotriènes. Cette synthèse met en jeu une série d'oxydations qui implique la production de ROS qui pourrait jouer un rôle important dans le cadre de l'initiation de la réponse inflammatoire pulmonaire.

IV.2.6. NADPH oxydase

C'est une oxydase liée à la membrane plasmique. Elle a été initialement décrite dans les cellules phagocytaires où elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire dans la lutte contre les micro-organismes. Il semble qu'il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire.

La NADPH oxydase phagocytaire représente une source majeure de production de ROS dans le poumon dans le cadre de la réponse immunitaire (Piotrowski, 2000).

IV.2.7. Mitochondrie

La mitochondrie est un organite intracellulaire qui est responsable de la majorité de la production de l'énergie sous forme d'ATP pour la cellule et représente donc une structure cruciale du fonctionnement cellulaire. Elle est considérée comme une des principales sources de ROS dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Même si elle est une source de ROS plus spécifique dans certains tissus (tissus post-mitotiques), elle reste, dans l'ensemble des tissus, une cible privilégiée des ROS.

La mitochondrie possède un système de double membrane (interne et externe) qui délimite l'espace matriciel mitochondrial [Fig. 4a] dans lequel se trouve, entre autre, les enzymes des voies métaboliques de Krebs et de la β -oxydation.

Le catabolisme des glucides, acides gras et acides aminés s'accompagne de la production d'équivalents réduits que sont le NADH et le FADH₂. L'oxydation de ces équivalents réduits par l'O₂ a lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et aboutit à la formation d'énergie.

IV.2.7.a. Structure de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP synthase [Fig. 4b]

Les quatre complexes qui constituent la chaîne respiratoire mitochondriale sont la résultante de l'association d'une cinquantaine de polypeptides. Chaque complexe est indépendant et contient des groupements prosthétiques engagés dans une série de réactions d'oxydo-réduction. En terme de flux d'électrons les complexes sont disposés en fonction de leur potentiel d'oxydo-réduction.

- *Complexe I : NADH-Ubiquinone oxydoréductase*

Le transfert initial d'électrons nécessite le cofacteur équivalent réduit NADH. Ce dernier est oxydé sur la face matricielle de la membrane par la NADH-deshydrogénase. Le complexe I catalyse le transfert de 2 électrons du NADH à l'ubiquinone, couplé à l'expulsion de protons de la matrice à l'espace intermembranaire. Le complexe I peut être inhibé par la roténone [Fig. 5].

- *Complexe II : Succinate-ubiquinone oxydoréductase*

Le complexe II catalyse la ré-oxydation du succinate en fumarate, qui permet le transfert de deux électrons au complexe b-c1 (complexe III) par l'intermédiaire de l'oxydation du FADH₂ et d'un pool d'ubiquinone. Ce transfert d'électrons n'est pas couplé à l'efflux de protons. L'utilisation de malonate permet d'inhiber l'activité de ce complexe [Fig. 5].

- *Complexe III : Complexe b-c1 (ubiquinol-cytochrome C réductase)*

Les ubiquinones sont des transporteurs libres d'électrons du complexe I et II vers le complexe III. Ce dernier permet un transfert d'électrons à un deuxième transporteur mobile

situé dans l'espace intermembranaire, le cytochrome c, qui le relie au dernier complexe de la chaîne respiratoire. Ce transfert d'électrons de l'ubiquinone au cytochrome c est un processus associé à un efflux de protons. L'antimycine A et le myxothiazol inhibent le complexe III à des étapes différentes du transfert d'électrons [Fig. 5].

- *Complexe IV : Cytochrome c oxydase*

Le complexe IV catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction qui réduit l'O₂ en H₂O par 4 électrons. Le transfert des électrons est irréversible contrairement à celui ayant lieu au complexes I et III. Ce transfert d'électrons est associé à un efflux de protons vers l'espace intermembranaire. Le cyanure est un inhibiteur de la cytochrome c oxydase [Fig. 5]

- *L'ATP synthase : F₀F₁-ATP synthase*

L'ATP synthase couple la diffusion facilitée des protons à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi et permet donc de transformer la différence de potentiel électrochimique de protons en énergie chimique. L'ATP synthase est inhibée par l'oligomycine qui bloque le transport de protons.

IV.2.7.b. Fonctionnement mitochondrial et production de ROS

Selon la théorie chimio-osmotique de Mitchell (Mitchell, 1961), les oxydations des équivalents réduits (NADH et FADH₂) dans l'ETC sont couplées à un efflux de protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire. Comme la membrane interne mitochondriale est peu perméable aux protons, un gradient électrochimique (Δ potentiel électrique et Δ pH) est généré. Ce gradient de protons représente donc une force poussant les protons à retourner dans la matrice mitochondrial. Quand ces protons retournent dans la matrice par l'ATP synthase, l'énergie alors libérée permet la synthèse d'ATP (phosphorylation). Les oxydations et les phosphorylations sont donc couplées. Nous verrons que ce couplage peut être plus ou moins efficace. Selon la disponibilité en ADP il a été défini des états respiratoires:

- *état respiratoire de repos (état 4)*: en absence de phosphorylation, les oxydations sont limitées (couplage) par l'accumulation de H⁺ dans l'espace intermembranaire. Cet état correspond à la consommation basale d'oxygène.

- *état respiratoire stimulé (état 3)*: la présence d'ADP permet les phosphorylations et donc la synthèse d'ATP par l'ATP synthase.

La situation rencontrée au sein d'une cellule est celle d'un état intermédiaire entre les états 4 et 3, plus proche de l'état 4.

Une des premières études ayant mise en évidence la production de H_2O_2 par des mitochondries intactes a été réalisée par Boveris *et al.* en 1972. C'est le fonctionnement même de la chaîne respiratoire qui produit des ROS en conditions physiologiques. Rapidement, il a été montré que cette production d' H_2O_2 est directement liée à la dismutation de l'anion superoxyde. Selon certains auteurs, le pourcentage d' O_2 qui entre dans la chaîne respiratoire pour donner des ROS est de 1 à 4 %. Mais ces estimations ont été réalisées à partir de mesures *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production de ROS mitochondriale *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,2 à 0,4%) (Hansford, 1997).

Le débit de production de ROS est fonction du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et du degré de réduction des transporteurs d'électrons. Mais la production de ROS semble moins liée au flux d'électrons qu'au potentiel de membrane. En effet, une relation directe a été mise à jour entre le potentiel de membrane et la production d'anion superoxyde (Korshunov, 1997).

Ainsi, l'inhibition de la chaîne respiratoire augmente l'état de réduction des transporteurs d'électrons du côté du substrat, alors que le reste de la chaîne respiratoire (coté oxygène) est très oxydé. De même, si l'état respiratoire 4 est associé à un fort potentiel membranaire et donc un état réduit élevé des transporteurs d'électrons, c'est dans ces conditions que la production de ROS est la plus importante. L'ajout d'ADP, qui déclenche l'état actif mitochondrial, provoque une oxydation accrue des transporteurs d'électrons et donc une réduction drastique de la production de ROS (Boveris, 1972; Herrero, 1997; Servais, 2003). L'effet est comparable avec l'utilisation d'un découplant tel que le carbonylcyanide-p-trifluorométhoxy-phénylhydrazone (FCCP).

Par l'utilisation d'inhibiteurs et d'agents découplants, de nombreux travaux ont recherché le ou les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale responsables de la production d' $O_2^{\bullet-}$. Si Boveris *et al.* (1972) avaient déjà pointé les complexes I et III comme producteurs de ROS, l'amélioration des techniques de mesure des ROS sur mitochondries ou sur particules submitochondriales ont permis d'étudier plus précisément les mécanismes de cette production. En effet, la réactivité du H_2O_2 et du $O_2^{\bullet-}$ ainsi que la faible quantité de ROS

produite par les mitochondries rendent difficile l'approche expérimentale. Aussi les études ont principalement porté sur l'état respiratoire de repos 4.

L'évolution des concepts a permis de confirmer l'importance des complexes I et III dans la production de ROS à l'état 4 (Barja, 1999). Ces deux complexes contiennent des quinones qui sont potentiellement des sources importantes de ROS. Pour certains auteurs, le complexe I est la principale source de $O_2^{\bullet-}$ par le groupe flavine mononucléotidique (Liu, 2002). Mais d'autres désignent le site ubiquinone du complexe III comme le site majeur de production de ROS (Chen, 2003). En effet, ce site catalyse la conversion de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde par le transfert d'un électron de l'oxygène moléculaire. Expérimentalement, si le succinate est utilisé comme substrat en l'absence de roténone, la production de H_2O_2 est très importante, ce qui a mis à jour l'importance du flux inverse d'électrons du complexe II au complexe I. Ce flux inverse d'électrons est dû au fait qu'en absence d'ADP (état 4), les électrons dérivés du succinate peuvent remonter au complexe I (parce que le potentiel de membrane est une force) et réduire le NAD^+ en NADH (Liu, 2002).

St Pierre *et al.* (2002) ont étudié la topologie de production de l'anion superoxyde au niveau de la membrane interne. Pour cela, ils ont mesuré la production de H_2O_2 sur mitochondrie intacte en présence de différents substrats et inhibiteurs, avec ou sans SOD exogène ajoutée. Si la production de H_2O_2 a lieu sur la face cytoplasmique de la membrane interne, l'ajout de SOD exogène va augmenter la dismutation du $O_2^{\bullet-}$ et provoquer une augmentation de la production d' H_2O_2 . Par contre, si la production de H_2O_2 se fait du côté matriciel de la membrane interne mitochondriale, l'anion superoxyde sera dismuté en H_2O_2 par la SOD mitochondriale, le H_2O_2 diffuse ensuite à l'extérieur, et donc la SOD exogène n'aura pas d'effet. Ces auteurs ont pu observer que le complexe I produit l'anion superoxyde sur la face matricielle de la membrane interne. Une autre équipe de recherche a récemment décrit, en utilisant d'autres méthodes, la production d'anion superoxyde au niveau du complexe III sur la face cytoplasmique de la membrane interne mitochondriale (Chen, 2003). La fuite de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale est schématisée dans la figure 6.

IV.2.7.c. Modulation de l'activité mitochondriale:

Il est important de noter que la production de ROS mitochondriale est variable selon les tissus étudiés. Ce sont les mitochondries des tissus post-mitotiques (muscle squelettique, cardiaque...) qui présentent la production de ROS la plus élevée (Papa, 1997b).

La production de ROS au niveau mitochondrial à l'état 4 est faible, elle n'est pas toujours mesurable. Ainsi, plusieurs auteurs ont montré que la production de H_2O_2 sur mitochondrie intacte (cœur, muscle squelettique et foie) n'est quasiment pas détectable en présence de pyruvate/malate (fournissant du NADH) et de succinate + roténone (fournissant du $FADH_2$) (Liu, 2002; St-Pierre, 2002). La production mitochondriale d' H_2O_2 devient largement détectable lorsque des inhibiteurs spécifiques du transfert d'électron sont utilisés : la roténone pour les substrats liés au NADH et l'antimycine A pour les substrats liés au $FADH_2$. Mais l'utilisation du succinate seul en absence de roténone, permet aussi d'avoir une production élevée due au flux inverse d'électrons remontant du complexe II au I, ce retour qui est générateur important d' H_2O_2 .

Comme nous l'avons rappelé précédemment, la fuite mitochondriale de H_2O_2 est liée au potentiel de membrane et au flux d'électrons à travers l'ETC. Bien que la membrane interne mitochondriale soit fortement imperméable aux protons, cette imperméabilité n'est pas absolue, et permet donc à une faible quantité de protons de retourner dans la matrice mitochondriale. Cette fuite de protons à travers la membrane est appelée *proton leak*. Le couplage oxydation-phosphorylation n'est donc pas parfait. La composition lipidique de la membrane est un élément capital de la perméabilité aux protons (Fontaine, 1996; Pehowich, 1999). En plus de cette perméabilité aux protons que nous qualifierons de basale, il existe une perméabilité inductible. Ainsi la présence de protéines enchâssées dans la membrane mitochondriale participe à la perméabilité aux protons. Ces protéines découplantes (uncoupling protein, UCP) permettent, du fait qu'elles fonctionnent comme des transporteurs de protons, la dissipation de l'énergie liée au potentiel électrochimique. Si la présence d'UCP1 dans le tissu adipeux brun des mammifères a été principalement étudiée pour son rôle thermogène (Nicholls, 2001), la famille des protéines découplantes s'agrandit régulièrement et comporte des isoformes avec une expression tissulaire variable et des fonctions autres que la production de chaleur. Ainsi, UCP2, qui a une expression ubiquitaire, et UCP3, qui est exprimée plus spécifiquement dans les tissus adipeux et le muscle squelettique, joueraient un rôle plus spécifique dans la régulation de la production mitochondriale de ROS (Negre-Salvayre, 1997; Vidal-Puig, 2000). Certains auteurs (Brand, 2000; Skulachev, 1998) avancent l'hypothèse selon laquelle le rôle du *proton leak* serait de réguler la production de ROS mitochondrial. La présence d'UCP dans tous les organismes vivants, qu'ils soient bactériens, végétaux, animaux (ecto et endothermes), suppose que la fonction primaire des ces protéines n'est pas la thermorégulation (Brand, 2000). Dans des macrophages surexprimant UCP2 la production d' H_2O_2 est réduite (Negre-Salvayre, 1997). De plus les macrophages de souris dont

le gène UCP2 a été invalidé, produisent plus de ROS que les souris sauvages (Arsenijevic, 2000). Le groupe de Brand (Echtay, 2002) rapporte une activation directe d'UCP2 par l'anion superoxyde. UCP3 présenterait aussi une activité régulatrice de la production de H₂O₂ mitochondriale. Ainsi des mitochondries isolées de muscle squelettique chez des souris dont le gène codant pour UCP3 a été invalidé présentent un couplage et une production de ROS accrue comparativement aux souris sauvages (Vidal-Puig, 2000).

Cependant, les fuites de protons ne sont pas l'unique fait du *proton leak*. En effet, il existe des fuites de protons dues au patinage enzymatique des différentes pompes à protons de la chaîne respiratoire (complexe I, III et IV), appelé *slipping* ou *découplage intrinsèque*. En effet, une pompe à proton est un système enzymatique catalysant une réaction (substrat produit) couplée à un flux de protons. Ainsi, l'expulsion de protons pourrait ne pas être associée à la synthèse d'ATP au niveau de l'ATP synthase (*proton slipping*), ou alors au niveau des autres pompes à protons de la chaîne respiratoire, le passage d'électrons pourrait ne pas être couplé à un passage de protons (*redox slipping*) (Azzone, 1985; Fontaine, 1997). Toutefois, le patinage des pompes à protons comme paramètre de régulation de l'efficacité mitochondriale a été essentiellement rapporté au niveau de la cytochrome c oxydase (complexe IV) (Kadenbach, 2003) qui pourrait ainsi intervenir dans la régulation de la production mitochondriale de ROS (Papa, 1997a).

La variation du couplage oxydation – phosphorylation permettrait une adaptation rapide de l'organisme à l'environnement (production de chaleur, besoins énergétiques, stress...) (Nogueira, 2001).

IV.2.7.d. Effets des ROS sur la mitochondrie :

Si la mitochondrie est considérée comme l'une des principales sources de ROS intracellulaire, elle est surtout la principale cible.

Les ROS peuvent avoir une action directe sur l'activité mitochondriale. Ainsi, l'O₂^{•-} peut réagir avec l'oxyde d'azote (NO), et produire le peroxydinitrite (ONOO^{•-}) qui peut inhiber la chaîne respiratoire (Shiva, 2004) et endommager différents composants mitochondriaux (complexe de la chaîne respiratoire, membrane, ADN...). En effet, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est à proximité directe de la source de production, du fait qu'il est fixé à la membrane interne. L'ADNmt est fragile car il est dépourvu d'histones et ne semble pas avoir de systèmes de réparation aussi efficaces que celui de l'ADN nucléaire (ADNn) (Bohr, 2002a; Stevnsner, 2002).

Les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont codées en partie par l'ADNn et par l'ADNmt. Ainsi 13 sous-unités protéiques qui constituent l'ETC sont codées par l'ADNmt (7 sous-unités du complexe I, une du complexe III, 3 du complexe IV, et 2 pour l'ATPsynthase). Une altération de l'ADNmt pourrait donc altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire et déclencher un cercle vicieux augmentant la production de ROS et les dégâts oxydatifs mitochondriaux.

De même, une oxydation accrue des phospholipides membranaires mitochondriaux pourrait modifier le fonctionnement mitochondrial (Echtay, 2003).

IV.3. Systèmes antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants [Fig. 7]. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les antioxydants cellulaires sont non-enzymatiques et enzymatiques (Comhair, 2002; Droge, 2002; Mates, 1999).

IV.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. Plus récemment d'autres enzymes ayant des propriétés antioxydantes ont été révélées, les peroxyredoxines.

IV.3.1.a. *Superoxyde dismutase (SOD)*

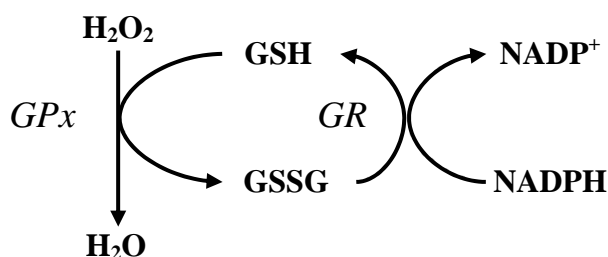
Cette enzyme catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 ($2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) qui pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. Il existe 3 isoformes de SOD chez les mammifères : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (SOD Cyto), une forme mitochondriale associée au manganèse (SOD Mn) et une forme extracellulaire (SOD-EC). La forme mitochondriale permet la dismutation quasi instantanée de l'anion superoxyde produit au niveau de l'ETC. Si la SOD Mn semble indispensable à la vie, ce n'est pas le cas pour la forme cytosolique, même si celle-ci joue un

rôle important dans l'élimination des ROS (Li, 1995). La SOD-EC est située sur la face externe de la membrane plasmique. Elle se retrouve dans les espaces interstitiels des tissus et dans les liquides extracellulaires (plasma, lymphe et synovie).

Si les formes mitochondriales et cytosoliques sont régulées par leurs substrats, la SOD-EC serait régulée par des cytokines plutôt que par les ROS (Mates, 1999).

IV.3.1.b. *Glutathion peroxydase (GPx)*

La GPx fait partie d'un système complet qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H_2O_2 . Ce système prend aussi en charge des lipides peroxydés. La GPx est l'enzyme clef du système et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. Le glutathion disulfite (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme donneur d'électron. Le rapport GSH/GSSG est un index de l'état d'oxydation dans la cellule.



Elimination du H_2O_2 par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR.

Il existe plusieurs isoformes de GPx contenant du sélénium (Comhair, 2002; Mates, 1999): i) la GPx cytosolique et mitochondriale, présente dans la plupart des tissus ; ii) la GPx phospholipide-hydroperoxyde (HPGPx) se trouve dans le cytosol et peut directement réduire les phospholipides hydroperoxydés, et les hydroperoxydes de cholestérol; iii) et enfin la GPx extracellulaire.

A la différence de la GPx qui n'est capable de réduire les peroxydes membranaires qu'après action de la phospholipase A2, et qui n'agit que sur les acides gras hydroperoxydés, la HPGPx réduit directement les hydroperoxydes du cholestérol, des cholestéryl-esters, et des phospholipides présents dans des membranes oxydées ou des lipoprotéines oxydées.

IV.3.1.c. Catalase (CAT)

La catalase réagit efficacement avec H_2O_2 pour donner de l'eau et de l' O_2 ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). La CAT est localisée principalement dans le peroxysome, mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme. La GPx et la CAT permettent ainsi l'élimination du H_2O_2 . Toutefois, la CAT semble jouer un rôle important en présence de forte concentration en H_2O_2 , alors que la GPx prend en charge les hydroperoxydes et H_2O_2 même en faible quantité. La GPx est ainsi considérée comme la source majeure de protection contre H_2O_2 et les hydroperoxydes.

IV.3.1.d. Peroxyredoxines

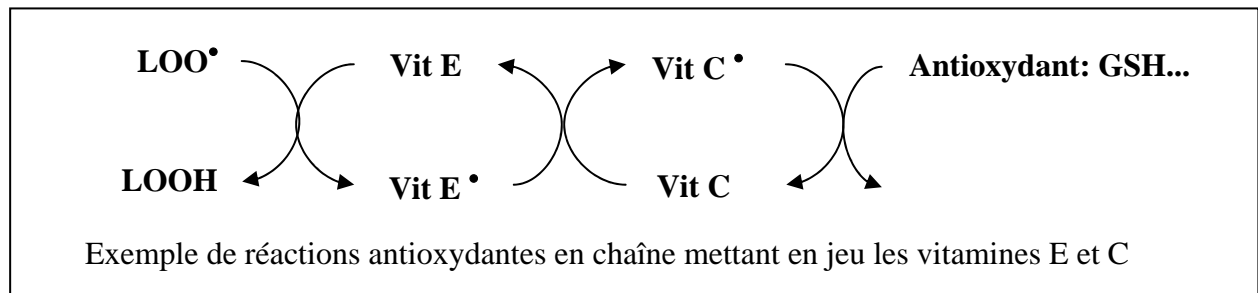
Les peroxyredoxines (Prx), ou thioredoxine peroxydase, ont été découvertes récemment et font l'objet de nombreux travaux concernant leurs fonctions antioxydantes (Wood, 2003). Elles sont au nombre de 6 chez les mammifères et sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes, associées au noyau et aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant dans la cellule à travers une activité peroxydase, où H_2O_2 , le peroxyde d'azote et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats. Malgré leur plus faible efficacité catalytique par rapport à la GPx et la CAT, ces protéines pourraient jouer un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes du fait de leur quantité importante (0,1 à 0,8 % de protéines solubles cellulaires) et de leur large distribution dans la cellule. De plus, les Prx joueraient un rôle significatif lors du développement du poumon et en réponse à un stress oxydant pulmonaire (Kim, 2001).

IV.3.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques

Les antioxydants non-enzymatiques réagissent directement avec les agents oxydants et les désactivent.

- **La vitamine E** (α -tocophérol) est fixée aux membranes et stoppe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique peroxyde (LOO^\bullet). La vitamine E devient alors à son tour un radical, moins réactif que le LOO^\bullet , qui pourra être pris en charge par une autre molécule antioxydante. Cependant, à forte concentration la vitamine E oxydée peut faire office de molécule pro-oxydante (Cillard, 1980).

- La **vitamine C** peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$ et l' OH^{\bullet} . Cette vitamine pourrait aussi avoir des propriétés prooxydantes.



A ces deux vitamines nous pouvons ajouter de nombreux autres antioxydants non-enzymatiques (ex: β -carotène, urate, glucose, bilirubine, taurine, albumine...)

Quand le fragile équilibre entre production et élimination des ROS est perturbé, le surplus de ROS va oxyder des biomolécules comme les protéines, les lipides et l'ADN, ce qui peut avoir un impact important sur le fonctionnement cellulaire [Fig. 7].

IV.4. Dégâts oxydatifs cellulaires

IV.4.1. Peroxydation lipidique

Les lipides ont de nombreux rôles: molécules énergétique, réserves d'énergie, molécules signal et font partie intégrante des membranes cellulaires. Parmi les lipides membranaires, les phospholipides sont les plus abondants. La partie hydrophobe des phospholipides est liée à la présence d'acides gras qui peuvent être saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés. Les acides gras polyinsaturés (polyunsaturated fatty acids, PUFA) sont plus susceptibles aux attaques radicalaires et génèrent des peroxydes lipidiques qui sont eux-même très réactifs. La peroxydation de lipides fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont été très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Marnett, 1999). Ces deux derniers produits réagissent avec les protéines et l'ADN. Une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule. Cependant, récemment le groupe de Brand (Echtay, 2003) a observé

que le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de ROS. Ce mécanisme pourrait être un moyen de régulation de la production de ROS par la mitochondrie lors d'une peroxydation lipidique afin de limiter la production de ROS.

IV.4.2. Oxydation des protéines

Les modifications oxydatives des protéines par les ROS provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} . Nous pouvons classer les réactions d'oxydation de protéines en deux catégories : d'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique, et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE. De telles modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002). Le rôle des protéines dans la cellule est tel que leur dysfonctionnement peut bouleverser le fonctionnement cellulaire (enzymes, protéines structurales...).

IV.4.2.a. Rôle des protéines de stress

Les protéines modifiées par l'oxydation vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (heat shock Protein, HSP). Ces HSP sont une famille de protéines remarquablement conservées au cours de l'évolution et la plupart des propriétés de ces dernières se retrouvent dans les organismes procaryotes et eucaryotes. Les HSP permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide. Initialement l'induction de ces protéines de stress a été mise en évidence en réponse à un stress thermique et ont donc été nommées "protéines de choc thermique". Chez les mammifères, les cellules surexpriment les HSP en réponse à une grande variété de stress cellulaires en plus du choc thermique, ce qui a conduit à employer le terme de protéine de stress (SP) (Parsell, 1994). Toutefois, il est important de noter que certaines HSP sont exprimées de façon constitutive dans les cellules.

Les HSP sont habituellement classées selon leur poids moléculaire apparent sur gel d'électrophorèse (en KiloDaltons, Kda), leur principaux agents inducteurs et leur fonctions (Subjeck, 1986).

Dans cette super-famille de protéines il y a la famille des protéines de stress de 70 Kda. Les membres de cette famille de HSP70 ont un rôle de protéines chaperonnes et prennent en charge les protéines dénaturées au cours du stress (participation à la restauration de la fonction des protéiques dénaturées), mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à la synthèse protéique, à l'importation des protéines vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). Elles contribuent de plus au repliement correct des protéines dans la lumière du réticulum et de la matrice mitochondriale. Dans la famille des HSP70 il y a la protéine de stress de 72 Kda (HSP₇₂) inductible par le stress et localisée dans le cytoplasme. Lors d'un stress, les HSP₇₂ migrent dans le noyau ou elles préviendraient l'agrégation des protéines nucléaires. De plus, les HSP₇₂ joueraient un rôle important dans le fonctionnement mitochondrial notamment via la régulation de l'apoptose (Polla, 1996). Les HSP₇₂ représentent une ligne de défense supplémentaire contre le stress oxydant. Lors d'un stress oxydant musculaire par exemple, les HSP₇₂ représentent des défenses complémentaires importantes (Smolka, 2000). Les HSP₇₂ auraient aussi un rôle anti-inflammatoire endogène (Ianaro, 2001). Au niveau pulmonaire, l'exposition *in vivo* à des gaz oxydants conduit à une augmentation du contenu pulmonaire en HSP₇₂ (Su, 1997).

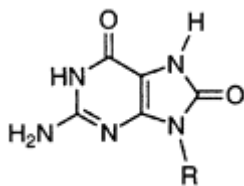
IV.4.3. Dommages oxydatifs de l'ADN

Comme nous l'avons signalé précédemment, il existe, au sein de la cellule, deux « types » d'ADN : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources de ROS cellulaire : la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADNmt par rapport à l'ADNn (Stevnsner, 2002).

Les réactions d'oxydation de l'ADN créent un grand nombre de dommages de l'ADN et peuvent être classées en deux catégories :

IV.4.3.a. Oxydation directe

Parmi ces dommages, nous pouvons citer les lésions des bases purines et pyrimidines. La plus abondante des bases oxydées est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) (Helbock, 1999), en effet la guanine est la cible privilégiée de nombreux oxydants tels que l'OH[•] et le peroxydinitrite (Cadet, 1999).



Structure de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
(8-oxodGuo)

La 8-oxodGuo est considérée comme une lésion pré-mutagénique car elle peut conduire, en l'absence de réparation, à une transversion (passage d'une base purique à une base pyrimidique) GC → TA.

IV.4.3.b. Modification de base par fixation de produits secondaires : formation d'adduits de l'ADN.

Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique (dont le MDA et le 4-HNE) peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN (Marnett, 1999; Nair, 1999) [Fig. 8].

Le MDA réagit avec les acides nucléiques et forme des adduits aux bases dG (M1dGuo, pyrimido-[1,2 α]purin-10(3*H*)-un), dA (M1dA, N⁶-(3-oxo-propenyl)deoxyadenosine) et dC (M1dC, N⁴-(3-oxo-propenyl)deoxycytidine) [Fig. 8]. Il semble que le M1dGuo soit l'adduit le plus souvent formé. Cependant, une formation de M1dGuo serait possible, indépendamment de la peroxydation lipidique, par oxydation directe de l'ADN (Marnett, 1999).

Le 4-HNE peut se fixer aux bases nucléotidiques pour former préférentiellement le 4-HNE-Guo (6-(1-hydroxyhexanyl)-8-hydroxy-1,N²-propano-2'-deoxyguanosine). De plus, le produit de l'époxydation de 4-HNE (2,3-époxy-4-HNE) par des hydroperoxydes peut se fixer sur les bases nucléotidiques pour donner des éthenobases. La réaction avec la guanine peut donner l' ϵ dGuo (1,N²-Ethenodeoxyguanosine), l'adénosine peut former l' ϵ dA (1,N⁶-Ethenodeosyadenosine) et la cytidine, l' ϵ dC (3,N⁴-Ethenodeoxycytidine). L'éthenobase majoritairement formée semble être l' ϵ dGuo (Feng, 2003).

Ces différents dommages de l'ADN semblent fortement impliqués entre autres dans les phénomènes de cancérisation (Feng, 2003; Nair, 1999) de même que les mutations de l'ADNmt pourraient être impliquées dans les phénomènes de mort cellulaire en altérant le fonctionnement mitochondrial (Bohr, 2002b).

IV.4.3.c. Systèmes de réparation de l'ADN

L'élimination des lésions oxydatives de l'ADN est un mécanisme important pour limiter leurs effets mutagènes et cytotoxiques (Cooke, 2003). Pour cela, de nombreux systèmes de réparation de l'ADN sont utilisés par la cellule (Croteau, 1997). Les bases oxydées ou modifiées sont éliminées essentiellement par deux mécanismes : la réparation par excision de base (BER, base excision repair) et un processus plus complexe pour les lésions contenant un oligonucléotide, appelé réparation par excision de nucléotide (NER, nucleotide excision repair). La BER est un mécanisme très important; parmi les enzymes qui effectuent cette activité nous pouvons citer les 8-oxoguanine glycosylases 1 et 2 (OGG1 et 2). Ces mécanismes sont présents au niveau de l'ADN nucléaire, mais des mécanismes similaires de réparation par BER semblent exister au niveau de l'ADNmt (Bohr, 2002a).

III. MODULATION DE LA BALANCE PRO/ANTIOXYDANT PAR L'AGE ET L'O₃ AU NIVEAU PULMONAIRE

L'O₃ est un oxydant puissant qui, comme nous l'avons rappelé, peut provoquer un stress oxydant pulmonaire, mais avant de détailler les effets spécifiques de l'inhalation de l'O₃ sur la mitochondrie, les systèmes antioxydants et les dommages oxydatifs, nous verrons que la susceptibilité du tissu pulmonaire au stress oxydant évolue en fonction de l'âge. L'âge des populations exposées à l'O₃ pourrait donc influencer les réponses de la balance pro/antioxydant pulmonaire.

III.1. Effet de l'âge sur la balance pro/antioxydant :

III.1.1. Période de maturation

L'équilibre entre oxydant/antioxydant est un processus continu de la vie embryonnaire à la sénescence. Quelques jours avant la naissance, qui va être le siège d'un passage en milieu relativement hyperoxique, les principales enzymes antioxydantes vont être mobilisées au niveau pulmonaire afin de faire face au stress oxydant lié à la naissance (Clerch, 1992). A

partir de la naissance jusqu'à l'âge adulte, période de maturation de l'organisme, les capacités antioxydantes pulmonaires vont croître. Il est intéressant de noter que les rats très jeunes sont plus résistants (taux de mortalité plus faible), à l'hyperoxie aiguë que des rats plus âgés (Laudert, 1994). A notre connaissance, il n'existe pas de travaux aux effets de la maturation pulmonaire sur le fonctionnement des mitochondries pulmonaires. L'influence de la maturation sur le contenu en HSP₇₂ n'a jamais été étudiée dans le poumon, mais au niveau cardiaque ce contenu décroît depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte (Lutsch, 1997).

Enfin chez des jeunes rats le contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn pulmonaire est plus faible que chez des animaux adultes (Schmerold, 2001).

Rappelons qu'à ces critères strictement reliés à la balance production/élimination des ROS, les rats immatures (âgés de 21 jours) n'hypoventilent pas sous O₃ et pourraient donc avoir subi de plus importants dégâts oxydatifs. En effet, la dose d'O₃ délivrée dans le poumon est fonction de la concentration en O₃, du temps d'exposition et du débit ventilatoire.

III.1.2. Vieillesse

Le vieillissement ne peut être qualifié de période de la vie, du fait que c'est un processus évolutif. Dans notre société actuelle, l'étude des phénomènes impliqués dans le vieillissement prend une place importante. Plusieurs théories ont essayé de comprendre le phénomène de vieillissement. L'une d'elle accorde un rôle central au stress oxydant, proposant même une théorie radicalaire du vieillissement (Harman, 1956). Cette théorie postulait initialement qu'au cours du vieillissement un stress oxydant s'installait et provoquait le dysfonctionnement des cellules. Depuis cette hypothèse a reçu beaucoup d'arguments expérimentaux et a évolué en intégrant la mitochondrie au centre du processus de vieillissement (Beckman, 1998).

L'effet du vieillissement sur la régulation de l'équilibre pro / antioxydant est très étudié sur de nombreux tissus tels que le cœur, le muscle squelettique (Drew, 2003), le cerveau (Floyd, 2002) et le foie (Anantharaju, 2002) mais relativement peu au niveau du tissu pulmonaire. Le poumon est toutefois un tissu présentant la particularité d'être exposé de façon continue à des pressions partielles en O₂ élevées par rapport aux autres tissus. Les travaux de Zychlinsky *et al* ont montré que l'activité des mitochondries pulmonaires est affectée par le vieillissement (Zychlinski, 1989). En effet, ces travaux rapportent une baisse drastique du couplage des oxydations phosphorylantes mitochondriales en présence de glutamate ou de succinate comme substrats dû à une diminution drastique de la consommation d'O₂ à l'état

respiratoire 3. Malheureusement, il n'y a pas de données disponibles sur la production de H_2O_2 par des mitochondries pulmonaires au cours du vieillissement. Sur d'autres tissus l'augmentation de la production mitochondriale de ROS est encore sujet à débat (Lopez-Torres, 2002). En effet, si certains auteurs ont montré une augmentation avec le vieillissement de la production de H_2O_2 par les mitochondries cardiaques (Kwong, 1998; Sohal, 1994), d'autres n'ont pas observé de modification (Hansford, 1997).

Si les niveaux pulmonaires des ARNm de la GPx et de la SOD cytosolique sont plus faibles chez les rats âgés de 24 mois que chez les animaux âgés de 6 mois les activités enzymatiques antioxydantes pulmonaires ne semblent pas altérées par le vieillissement (Gomi, 2002; Santa Maria, 1996). En effet, les travaux de Gomi *et al.* (2002) montrent que les activités de la SOD, GPx et CAT pulmonaire sont similaires chez des rats âgés de 6 et 24 mois. Il est donc possible que la traduction des ARNm des enzymes antioxydantes soit plus efficace chez les rats âgés.

Le vieillissement chez les mammifères est associé de façon générale à une réduction de l'expression cellulaire de HSP₇₂ en réponse au stress thermique (Demirel, 2003). Il en est de même pour les cellules pulmonaires qui ont une capacité d'expression des HSP₇₂ fortement réduite en réponse au stress thermique (Fagnoli, 1990).

Le bilan des altérations possibles de la balance pro/antioxydants ne montre pas d'augmentation du contenu en 8-oxodGuo dans l'ADN pulmonaire au cours du vieillissement (Hirano, 1996). De même, le contenu en MDA, marqueur de la peroxydation lipidique, ne semble pas augmenter au cours du vieillissement pulmonaire (Gomi, 2002). Aucune donnée n'est disponible sur les capacités de réparation de l'ADN pulmonaire au cours du vieillissement. Cependant, il a été observé, dans le foie, une baisse des activités de réparation de l'ADNmt et ADNn avec l'âge (Bohr, 2002a; Szczesny, 2003).

Ainsi, l'âge des populations (jeunes, adultes et âgés) pourrait influencer la réponse des systèmes produisant et éliminant les ROS, notamment au cours de l'exposition à l'O₃.

III.2. Effets de l'O₃ sur la balance pro/antioxydant pulmonaire:

III.2.1. Effets sur la mitochondrie pulmonaire:

Les seuls travaux qui aient étudié l'activité mitochondriale pulmonaire après exposition à l'O₃ ont utilisé des protocoles d'exposition aiguë ou subaiguë, avec des concentrations en O₃ élevées (de 0,8 ppm à 3 ppm). Ces études avaient un caractère plus toxicologique que

physiologique. Ainsi, une exposition aiguë à 2 ou 3 ppm d'O₃ pendant 8 heures provoque chez des rats adultes une baisse de l'activité mitochondriale pulmonaire quelque soit le substrat fournit (NADH et FADH₂), qui est associée à un découplage mitochondrial (Mustafa, 1973; Mustafa, 1974b; Zychlinski, 1989). Paradoxalement, si l'exposition est réalisée avec une concentration d'O₃ plus faible (0,8 ppm) mais prolongée (exposition chronique) la consommation d'O₂ mitochondriale est alors fortement augmentée. Les mêmes effets ont été retrouvés chez des rats âgés (Zychlinski, 1989), avec le même ordre de grandeur que chez les adultes. Il ne semble donc pas que le vieillissement ait une influence sur les conséquences mitochondriales pulmonaires d'une exposition à l'O₃. Du fait que le flux d'électrons à travers l'ETC et le potentiel de membrane sont de puissants régulateurs de la production de ROS, de telles modifications du fonctionnement mitochondrial semblent avoir des effets sur la production de ROS au niveau des mitochondries pulmonaires. Si aucune étude ne s'est intéressée spécifiquement à la production mitochondriale de ROS après exposition à l'O₃, les cellules épithéliales pulmonaires exposées *in vitro* à l'O₃ semblent produire plus de ROS (Chen, 1997).

III.2.2. Réponse des systèmes antioxydants:

Chez le rat adulte, 24 heures d'exposition à 0,4 ppm d'O₃ s'accompagnent d'une augmentation de l'activité pulmonaire de la GPx et GR (Van Bree, 1992). D'autres travaux (Rahman, 1991) ont permis de montrer qu'une exposition continue (5 jours à 0,7 ppm) provoque une augmentation des activités et du contenu en ARNm de la SOD, GPx et CAT pulmonaire chez des rats jeunes et adultes. Avec un temps d'exposition plus court (3 jours), la réponse des systèmes antioxydants n'est détectée que chez les rats d'âge supérieur à 50 jours (Mustafa, 1985).

L'expression des HSP₇₂ dans le tissu pulmonaire est fortement augmentée lors d'une exposition aiguë (Su, 1997) (0,4 ppm pendant 6 heures) (Su, 1997) mais aussi lors d'une exposition chronique intermittente (0,15 ppm, 4 heures /jour, 3 jours par semaine pendant 40 semaines) (Wong, 1996)

Le GSH pulmonaire semble aussi intervenir, en effet chez des primates exposés pendant 2 heures à l'O₃ (0,4 et 1 ppm) la concentration en GSH est diminuée (Plopper, 1998).

III.2.3. Dégâts oxydatifs :

Les études des dégâts oxydatifs liés à l'inhalation d'O₃ ont été réalisées généralement avec des doses toxicologiques. Si une exposition aiguë à l'O₃ (1 et 2 ppm) n'augmente pas le contenu en 8-oxodGuo dans les cellules de lavage broncho-alvéolaire, l'ADN semble subir des cassures de brin (Bornholdt, 2002). De même, la peroxydation lipidique est augmentée dans le fluide broncho-alvéolaire après exposition à l'O₃ (Kirichenko, 1996; Long, 2001).

IV. LUTTE CONTRE LE STRESS OXYDANT PULMONAIRE PAR LES OMEGA-3

Parce que la lutte contre le stress oxydant est un élément capital dans de nombreuses pathologies, des travaux se sont intéressés aux bienfaits d'une supplémentation en diverses substances antioxydantes. Pour ce qui est des pathologies pulmonaires, liées ou non à l'inhalation d'O₃, plusieurs études ont porté sur les bienfaits potentiels de suppléments en vitamines antioxydantes. Citons en exemple que lors d'une exposition à l'O₃, une supplémentation en vitamine C et E chez l'Homme limiterait les effets ventilatoires, sans empêcher la réponse inflammatoire (Romieu, 1998; Samet, 2001).

Une piste intéressante concerne des substances qui n'ont pas une fonction antioxydante à proprement parler. Ainsi le bienfait d'une supplémentation en acide gras polyinsaturés n-3 (ω 3) sur des pathologies pulmonaires liées à des phénomènes inflammatoires a été clairement démontré (Schwartz, 2000; Simopoulos, 2002).

IV.1. Définition

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des acides gras à chaîne longue (18 carbones) qui comportent au moins 2 doubles liaisons carbone-carbone. On détermine plusieurs familles en fonction de la position de la première double liaison par rapport à l'extrémité méthyle de la chaîne carbonée (Tab. 2). Ainsi sont définies les familles des ω 3 (ou n-3), ω 6 (n-6) et des ω 9 (n-9). Les AGPI indispensables sont l'acide linoléique (18:2 ω 6) et l'acide α -linoléique (18:3 ω 3) car ils ne peuvent provenir que de l'alimentation. Chez

l'homme et l'animal, l'ajout de doubles liaisons vers l'extrémité carboxyle et l'élongation des ces 2 AGPI indispensables conduit à la formation de nombreux autres AGPI [Fig. 9]. L'ensemble des dérivés obtenus, ajoutés aux deux acides gras indispensables précurseurs, constitue les deux familles d'acides gras essentiels. Les $\omega 3$ sont présents en grande quantité dans les huiles de poisson alors que l'huile de tournesol est constituée d'une grande quantité d' $\omega 6$.

IV.2. Origine des propriétés anti-inflammatoire des $\omega 3$

Plusieurs études ont montré que la supplémentation en acide gras eicosapentanoïque (EPA) et/ou docosahexanoïque (DHA) limite les phénomènes inflammatoires (Gil, 2002; Schwartz, 2000; Simopoulos, 2002). Les raisons de l'effet anti-inflammatoire des $\omega 3$ sont bien connues. Ainsi, c'est à partir de l'acide arachidonique (ARA, $\omega 6$) que s'effectue la synthèse d'eicosanoïdes pro-inflammatoires tels que les prostaglandine (PG), les thromboxanes (TX) et les leucotriènes (LT). La présence de ces éicosanoïdes va initier la mise en place de la réaction inflammatoire. Les $\omega 3$ entrent en compétition avec l'ARA et permettraient ainsi une réduction de production des cytokines pro-inflammatoires et une production de cytokines moins pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires [Fig. 10]. Par exemple, une supplémentation en EPA chez le rat traité à l'endotoxine réduit l'œdème pulmonaire, la libération de leucotriène B4 et de thromboxane B2 (Sane, 2000).

Mais la présence de doubles liaisons sur les acides gras polyinsaturés n-3 pourrait les rendre particulièrement susceptibles à la peroxydation lipidique. Des travaux ont mis en évidence une augmentation de la peroxydation lipidique dans le foie de rats supplémentés en $\omega 3$ (Yuan, 2003), alors que d'autres n'ont pas observé ce phénomène (Calviello, 1997). Dans cette dernière étude, la supplémentation était suffisante pour augmenter le contenu en EPA et diminuer le rapport n-6/n-3 dans les membranes lipidiques des cellules pulmonaires, sans augmentation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique. Les différences observées sont liées à la composition précise en $\omega 3$, à la présence d' $\omega 6$ ou/et de vitamine E, à la dose, à la durée de supplémentation ainsi qu'à l'âge de la population étudiée (Ando, 2000; Calviello, 1997; Suarez, 1996).

Une supplémentation en $\omega 3$ pourrait donc avoir des effets bénéfiques pour limiter l'inflammation, mais aussi des effets néfastes en augmentant la susceptibilité au stress oxydant, qui pourrait initier une chaîne de réactions radicalaires.

Ces éléments suggèrent donc que les $\omega 3$ pourraient jouer un rôle ambivalent lors d'une exposition à l' O_3 . En effet, la réponse inflammatoire pulmonaire à l' O_3 pourrait être atténuée, mais l'augmentation de la peroxydation lipidique des AGPI $\omega 3$ doit être envisagée. A notre connaissance l'effet d'une supplémentation en $\omega 3$ chez des animaux exposés à l' O_3 n'a pas, à ce jour, été étudié.

V. HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE LA THESE

Du fait des évolutions anatomiques et physiologiques du poumon au cours de la maturation et du vieillissement, les rats immatures et âgés peuvent représenter deux populations particulièrement sensibles aux oxydations induites par l'ozone.

Le premier objectif de ces travaux était de définir les atteintes mitochondriales et les modifications de la balance pro/anti-oxydant pulmonaire lors d'une exposition subchronique à l' O_3 se rapprochant au mieux de l'exposition humaine chez des rats adultes (Etude I).

Le deuxième objectif était de déterminer l'influence de l'âge sur les conséquences d'une telle exposition à l' O_3 , en étudiant trois groupes d'âge distincts et caractéristiques: des rats immatures (21 jours), adultes (6 mois) et âgés (20 mois) (Etude I).

Enfin, les acides gras polyinsaturés de la famille des $\omega 3$ pourraient permettre de lutter contre les effets délétères de l' O_3 , le dernier objectif de ces travaux était d'évaluer si une supplémentation en acide gras polyinsaturés $\omega 3$ peut i) limiter les effets liés au fort pouvoir oxydant de l' O_3 et ii) s'accompagner ou non d'une augmentation de la peroxydation lipidique dont les effets pourraient être délétères pour l'organisme. Nous avons émis l'hypothèse que les $\omega 3$ pourraient avoir des effets bénéfiques chez les populations fragiles mais pourraient être aussi associés à des effets néfastes tels que des modifications de base liées à des produits issus de la peroxydation lipidique (Etudes II et III).

MATERIEL

&

METHODES

Ces travaux de thèse reposent sur trois protocoles expérimentaux. La première étude (Etude I) évalue les perturbations fonctionnelles pulmonaires et la modification de la balance pro/antioxydant pulmonaire chez des rats immatures, adultes et âgés, exposés ou non à l'O₃.

L'analyse des résultats de l'étude I a permis de définir les études II et III. Ainsi l'étude II s'intéresse aux effets, sur les paramètres mesurés lors de l'étude I, d'une combinaison d'une supplémentation en ω 3 pendant l'exposition à l'O₃ chez les rats immatures. Enfin, l'étude III évalue les effets d'une même supplémentation en ω 3 lors d'une exposition à l'O₃ chez des rats âgés de 20 mois.

VII. Animaux:

Ces expérimentations sont menées chez le rat de souche Sprague Dawley selon les recommandations de la Convention Européenne de Protection des Animaux Vertébrés utilisés dans un but Expérimental et Scientifique (Conseil Européen n°123, Strasbourg 1985).

Les rats immatures, adultes et âgés ont été fournis par Harlan (Gannat, France). Nous avons déterminé l'âge des groupes immatures et âgés de la façon suivante :

- à 28 jours les rats ont développé $\frac{1}{4}$ de leur surface alvéolaire, nous avons donc choisi des rats âgés de 21 jours (immédiatement après le sevrage) pour constituer notre groupe de rats immatures.

- la durée maximale de vie d'un rat Sprague Dawley nourri *ad libitum* est de 36 mois et sa durée de vie moyenne (avec 50 % de survie) est de 27 mois (Charles Rivers, domaine des Oncins, France). Le rat âgé peut être défini comme un rat dont l'âge a dépassé la moitié du maximum de durée de vie, nous avons ainsi choisi des rats âgés de 20 mois.

- des rats âgés de 6 mois constituent le groupe adulte.

Les rats sont maintenus dans des conditions d'élevage standards : alimentation (OA3 et OA4, UAR, France) et eau *ad libitum*, à température contrôlée (22-25°C) avec un cycle jour-nuit 12h : 12h.

Dans toutes les expérimentations les rats de chaque groupe d'âge sont répartis aléatoirement en deux groupes : témoin (contrôle) et exposé à l'ozone (ozone).

VIII. Protocole d'exposition à l'O₃ :

Les rats sont maintenus dans des cages en plexiglas alimentées par un débit d'air constant. Après une semaine d'acclimatation en caisson, le groupe ozone est exposé à 0,5 +/- 0,05 ppm (partie par million) d'O₃, 12 heures par jour, pendant la période nocturne, pendant une durée de 7 jours. Les groupes contrôles sont placés simultanément dans une cage similaire avec de l'air filtré, au même débit que la cage ozone [Fig.11].

Le système de synthèse d'ozone est constitué d'une lampe à UV à travers laquelle passe le flux d'air [Fig.11]. Le passage de l'air au contact des UV provoque la formation d'O₃. La concentration en O₃ est mesurée en continu pendant les périodes d'exposition à l'aide d'un analyseur d'O₃ (environnement SA, COPARLY). La régulation du taux d'O₃ dans la cage se fait par la modulation du flux d'air passant à travers la lampe UV.

Chaque jour, pendant la période diurne (période de non-exposition), la nourriture et l'eau sont changées et les animaux pesés.

La teneur en ozone, utilisée lors de ces expérimentations, répond à plusieurs critères:

- nous nous sommes basés sur les travaux déjà effectués au laboratoire qui avaient montré qu'une exposition à raison de 0,5 ppm d'O₃ pendant 5 jours, 20 heures par jour, provoquait chez des rats adultes des modifications significatives de l'activité des structures catécholaminergiques périphériques et centrales (Cottet-Emard, 1997).

- afin de nous rapprocher de l'exposition à laquelle l'Homme est soumis dans l'environnement urbain, nous avons choisi une exposition intermittente, 12 heures par jour, la nuit pendant la période d'activité du rongeur. La dose utilisée (0,5 ppm) peut paraître élevée, en effet les concentrations d'O₃ observées lors de pics de pollution en milieu urbain sont au maximum de 300 - 400 µg/m³ et une pollution de fond inférieure à 100 µg/m³, alors que 0,5 ppm représentent 980 µg/m³. Pourtant il faut prendre en compte le fait que pour observer une réponse inflammatoire similaire chez l'Homme et le rat, il faut une dose d'O₃ chez le rat au minimum 5 fois supérieure à celle de l'homme (Hatch, 1994).

IX. La supplémentation en huile de poisson

Pour les études II et III, les groupes exposés à l'O₃ sont supplémentés en huile de poisson spécifiquement enrichie en EPA et DHA produite par la société PRONOVA Biocare (Sandefjord, Norvège) et commercialisée par la société POLARIS (Pleuven, France)

Composition de l'huile de poisson (EPAX 4510 EE):

Ac. Gras saturés	8%
Ac. Gras monoinsaturés	17%
Ac. Gras polyinsaturés	70%
Ac. Eicosapentanoïque (EPA)	45 % 20:5ω3
Ac. Docosanexanoïque (DHA)	10 % 22:6ω3
Ac. Eicosatétraénoïque	1,6 % 20:4 ω 3
Ac. Arachidonique (ARA)	2,6 % 20:4 ω 6
α -Tocophérol (VitE)	3,5 mg/g

Afin de contrôler parfaitement la quantité d'huile de poisson ingérée, les rats sont supplémentés par gavage oro-gastrique à l'aide d'une sonde, après avoir été habitués au gavage. Pour les rats immatures (Etude II), afin de ne pas trop perturber la période précédant le sevrage, l'habitué est effectuée 4 jours avant l'exposition, et la supplémentation en ω 3 deux jours avant la période d'exposition à l'O₃ (7 jours). Pour les rats âgés (Etude III) l'habitué peut être débutée deux semaines avant l'exposition à l'O₃. La supplémentation est initiée une semaine avant l'exposition à l'O₃.

Les rats contrôles sont gavés avec l'excipient de l'huile, le carboxyméthylcellulose (CMC; 0,5 %). La dose d'huile de poisson (1,5 g/Kg/j dans un même volume de CMC) correspond à l'ingestion de 675 mg/Kg/j d'EPA.

X. Etude du fonctionnement respiratoire par pléthysmographie :

Afin de déterminer si notre modèle d'exposition et la supplémentation en ω 3 lors de l'exposition à l'O₃ avaient des effets fonctionnels pulmonaires, nous avons mesuré, par pléthysmographie barosensible, les paramètres ventilatoires des rats des différents groupes. Cette mesure a été effectuée le 6^{ème} jour d'exposition, en condition basale (normoxie) et en condition hypoxique (stimulation du système ventilatoire par une hypoxie 10 % d'O₂) (Roux, 2000)

Les mesures de ventilation en condition basale et hypoxique sont réalisées chez le rat éveillé, libre de mouvement, grâce à un pléthysmographe barosensible dans une chambre en plexiglas saturée en vapeur d'eau à 30 ± 1°C [Fig.12]. La chambre est alimentée avec de l'air

humidifié et connectée à une chambre de référence de même taille. La température et la concentration en CO₂ et O₂ sont mesurées de façon constante. La chambre est préalablement calibrée par l'injection d'1 ml d'air. Une fois l'animal calme, le flux d'air est interrompu et les entrées et sorties dans la chambre fermées. Dans ces conditions, les fluctuations de pressions sont le reflet direct de la respiration du rat, et sont enregistrées avec un capteur de pression différentiel (Celesco, Californie, USA). Le volume courant (V_T), la fréquence respiratoire (F) ainsi que le débit ventilatoire (V_e) sont calculés sur 50 cycles respiratoires.

Les mesures en hypoxie sont réalisées en alimentant la chambre pléthysmographique avec un gaz composé de 10 % d'O₂ et 90 % de N₂. Quand le taux d'oxygène dans la chambre atteint 10 %, la mesure ventilatoire est effectuée après 1, 4 et 10 minutes d'exposition.

XI. Prélèvements et analyses biochimiques:

Après 7 jours d'exposition à l'O₃ les rats sont euthanasiés. Les poumons sont rapidement prélevés, rincés soigneusement à plusieurs reprises dans du sérum physiologique. Lors des études II et III, le foie est aussi prélevé. Une partie des tissus est congelée dans l'azote liquide afin de réaliser les dosages ultérieurs. Le reste est utilisé immédiatement pour l'extraction des mitochondries. Pour avoir suffisamment de tissu pulmonaire pour toutes les analyses, les rats immatures sont regroupés par 4 (36 rats de 21 jours).

XI.1. Isolement des mitochondries :

L'isolement des mitochondries est basé sur le principe de centrifugation différentielle. Toutes les opérations se déroulent à 4°C.

Après plusieurs rinçages dans du tampon d'isolement (poumon : sucrose 250 mM, Tris base 20 mM, EGTA 10 mM ; foie : identique sauf EGTA 5 mM, à pH 7,4) les tissus sont broyés dans un potter en verre avec un piston en Téflon. Les homogénats sont débarrassés des noyaux et débris cellulaires par une centrifugation à 800 g pendant 10 minutes. Le surnageant est alors filtré et centrifugé à 8000 g pendant 10 minutes. Le culot mitochondrial ainsi obtenu est ensuite remis en suspension dans du tampon d'isolement puis centrifugé à nouveau à 8000 g pendant 10 minutes. Un dernier rinçage identique est effectué, et le culot est finalement resuspendu dans le tampon d'isolement. Après avoir déterminé la quantité de protéine, par la

méthode de Biuret avec l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard, la concentration en protéines mitochondriales est ajustée à 20 mg/mL.

XI.2. Mesure de la consommation mitochondriale d'O₂ par oxygraphie

La consommation d'O₂ mitochondriale est mesurée avec un oxygraphe (Gilson 5/6H) à l'aide d'une électrode de Clark sensible à l'oxygène. Les mesures sont réalisées à 30°C dans un tampon de respiration (200 mM sucrose, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM Tris base à pH 7.4) avec une concentration finale en BSA délipidée de 0,1 %.

Nous avons choisi d'étudier le fonctionnement mitochondrial avec le succinate comme substrat, pour déterminer en parallèle la production de H₂O₂ liée aux complexes III et I (retour des électrons depuis le complexe II au complexe I).

L'état respiratoire de repos (4) est donc mesuré en présence de succinate [5 mM] + roténone [5 µM]. L'état activé (3) est déclenché par l'ajout d'ADP [100 µM].

L'état de couplage des mitochondries isolées peut être évalué par le calcul du rapport de contrôle respiratoire (RCR, Respiratory control ratio) en divisant la consommation d'O₂ à l'état 3 par celle mesurée à l'état 4. Le RCR permet de mesurer le degré de contrôle imposé sur les oxydations par les phosphorylations.

Le calcul du rapport ADP/O est effectué en divisant la quantité d'ADP ajoutée par la quantité totale d'O₂ consommée au cours de l'état III. Ce rapport est une mesure relative du couplage stœchiométrique P/O des oxydations - phosphorylantes.

La vitesse de phosphorylation oxydative (OPR, oxidative phosphorylation rate) est calculée en multipliant le rapport ADP/O par la consommation d'O₂ à l'état III. L'OPR s'exprime en nmole d'ATP.min⁻¹.mg prot⁻¹ (protéine mitochondriale)

XI.3. Mesure de la production mitochondriale d'H₂O₂ par fluorimétrie :

La méthode de mesure de la production de H₂O₂ sur mitochondries isolées a déjà été utilisée au laboratoire dans le cadre d'autres expérimentations (Servais, 2003). Cette méthode utilise l'acide homovanilique (acide 4-hydroxy-3-methoxy-phenylacetique, HVA) qui réagit avec le H₂O₂ sous l'influence de la peroxydase du raifort (HRP) pour former un dimère hautement fluorescent (λ excitation: 312 nm, λ émission: 420 nm). Les mesures sont effectuées dans les mêmes conditions que celles utilisées en oxygraphie (30°C, agitation constante et même tampon). Après avoir ajouté les mitochondries [0,2 mg/ml prot], HVA [0.1

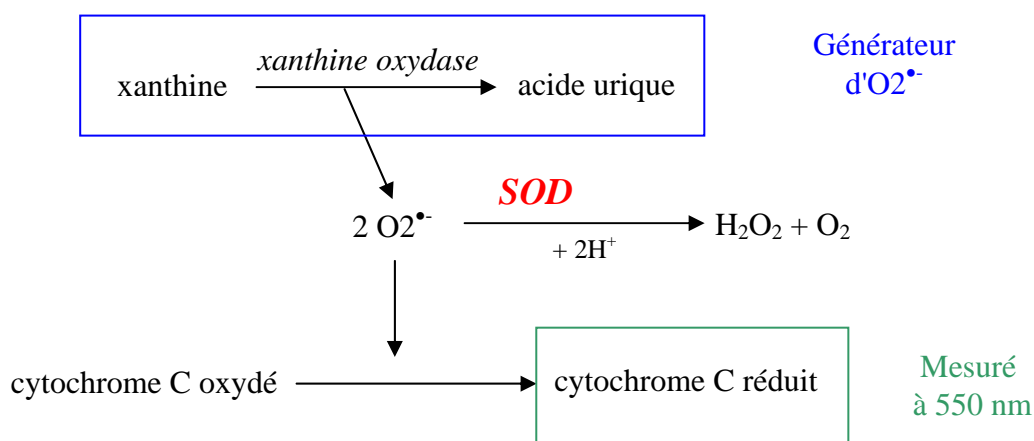
mM] et HRP [6 U/ml], aucune augmentation de fluorescence n'est observée. Le succinate est ensuite ajouté [5 mM], et la fluorescence est détectée à l'aide d'un fluorimètre SFM 25 (Kontron, France). Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de H₂O₂ à 30% (v/w). Nous n'avons détecté aucune augmentation de fluorescence en absence de substrat ou de mitochondrie. La fluorescence mesurée en présence de catalase diminue de façon dose-dépendante, ce qui montre que le signal mesuré est bien dû à l'H₂O₂. L'ajout de roténone [5 µM] provoque une réduction drastique du signal de fluorescence au point que la production de H₂O₂ n'est plus mesurable

XI.4. Dosages spectrophotométriques des activités de la SOD, GPx et CAT

Les échantillons (50-100 mg) sont broyés dans un potter en verre Elvehjem à 4°C, dans un tampon de broyage (KH₂PO₄ [100 mM], DTT [1mM], EDTA [2 mM], pH 7,4). Après avoir été centrifugé à 3000 g pendant 5 minutes, le surnageant est récupéré pour le dosage des activités enzymatiques. La concentration de protéine totale est déterminée sur le surnageant par la méthode spectrophotométrique de Lowry.

XI.4.1. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase

La méthode spectrophotométrique utilisée permet une mesure de l'activité de la SOD de manière indirecte, en utilisant le système xanthine / xanthine oxydase comme producteur d'O₂^{•-}, et le cytochrome c oxydé (Flohe, 1984). La réduction du cytochrome c par l'O₂^{•-} est mesurée à 550 nm. La SOD issue des extraits entre en compétition pour l'utilisation du O₂^{•-} et donc limite la réduction du cytochrome c.

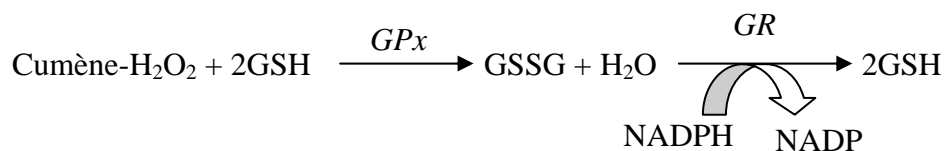


La mesure est effectuée dans un tampon de réaction (xanthine [0,5 mM], cytochrome c [0,2 mM], KH_2PO_4 [50 mM], EDTA [0,1 mM], pH 7,8) à 25°C. Le volume de xanthine oxydase à ajouter (0,01 U), pour avoir une réduction du cytochrome C oxydé suffisante, est ajusté préalablement pour que la réduction du cytochrome c sans extrait provoque une diminution de la DO de 0,025/minute.

La SOD cytosolique a la particularité d'être inhibée par le cyanure [1 mM]. Ainsi nous distinguons les deux isoformes par une mesure en présence et en absence de cyanure, sans séparer les mitochondries du cytosol. L'activité de la forme cytosolique est calculée en retranchant l'activité de la SOD mitochondriale de l'activité SOD totale. Une gamme étalon de SOD est effectuée dans les mêmes conditions. Une unité d'activité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber de 50 % la réduction du cytochrome c oxydé. Les activités sont exprimées en U/100 mg de protéines totales.

XI.4.2. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase

L'activité GPx est déterminée via la formation du glutathion oxydé (GSSG) à partir de glutathion réduit (GSH) (Tappel, 1978). Le système nécessite la présence d'un oxydant (cumène- H_2O_2) et de la glutathion réductase (GR) qui réduit le GSSG, en oxydant le NADPH en NADP.



La mesure consiste donc à suivre, par spectrophotométrie, la disparition du NADPH à 340 nm à 37°C dans un tampon réactionnel contenant: GSH [0,25 mM], NADPH [0,12 mM], GR [1 U/ml] et NaCN [10 mM]. Une mesure en présence du tampon réactionnel et de cumène- H_2O_2 [1 mg/ml] est préalablement effectuée. L'extrait est ensuite ajouté et la DO enregistrée. Le calcul de l'activité est fait à partir du coefficient d'extinction molaire (ϵ) du NADPH = $6,22 \cdot 10^3$ l/mol/cm. L'activité est exprimée en U/100 mg de protéines totales.

XI.4.3. Dosage de l'activité de la catalase

La méthode utilisée est basée sur la propriété de la catalase à dégrader le peroxyde d'hydrogène (Aebi, 1984).

Nous mesurons la disparition du H₂O₂ par spectrophotométrie à 240 nm. Les extraits (200 µl) sont incubés 30 minutes à 0°C avec 2 µl d'éthanol 95 %. Deux µl de Triton à 1 % sont ensuite ajoutés et les homogénats sont centrifugés à 5000 g pendant 5 minutes. Le surnageant ainsi récupéré sera utilisé pour le dosage qui est réalisé dans un tampon (KH₂PO₄ [40 mM], HNa₂PO₄ [60 mM], pH 7,4). Une mesure est effectuée en présence surnageant seul et correspond au blanc. Puis 50 µl de H₂O₂ [180 mM] sont ajoutés pour déclencher la réaction.

La cinétique de la catalase n'obéissant pas au modèle Michaelien, nous n'utilisons pas la loi de Beer-Lambert. En effet, la constante de vitesse est définie telle que : $K=2,3/\Delta t * \log_{10}(DO_{zéro}/DO_t)$. Les résultats sont exprimés en unité (U ou K) / 100 mg de protéines totales.

XI.5. Détermination du contenu en HSP₇₂:

Pour quantifier les HSP₇₂ nous réalisons une électrophorèse sur gel polyacrylamide suivie d'une détection par immunorévélation. Cette méthode de détermination du contenu en HSP₇₂ c'est avérée sensible et spécifique lors d'autres expérimentations réalisée au laboratoire (Ecochard, 2000; Servais, 2003).

Les échantillons sont homogénéisés et mélangés avec 200 µl de tampon (Tris [40 mM], SDS 1 %, glycérol 6 %, β-mercaptoéthanol 1 %, pH 6,8). Les homogénats sont ensuite chauffés à 100°C pendant 10 minutes, puis dilués et déposés (200 µg de protéine) sur un gel de polyacrylamide avec un gel de concentration (SDS-PAGE) 5 % et un gel de séparation à 12,5 %. La migration s'effectue en deux temps: 1) 300 V, 40 mA pendant 1 heure; 2) 300 V, 70 mA pendant 12 heures. Le dépôt d'un marqueur de taille permet de localiser les protéines HSP₇₂.

Après séparation par électrophorèse, les protéines sont transférées à voltage constant en milieu humide sur une membrane de nitrocellulose. Une fois le transfert réalisé, les sites de

fixation non-spécifique des anticorps sont saturés pendant 2 heures d'incubation en présence de lait en poudre (10 g / 200 ml de tampon TBS [Tris 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,6]-tween 0,1 %). Les membranes sont ensuite incubées avec un anticorps monoclonal spécifique de la protéine HSP₇₂ (SPA 810, StressGen, Tebu; dilution 1:1000). Après 3 rinçages successifs de 10 minutes avec du tampon TBS-Tween 0,1 %, les membranes sont alors incubées avec un anticorps secondaire anti-immunoglobuline G de souris couplé à la HRP (Biorad; dilution 1:10000). Les membranes sont alors à nouveau rincées 2 fois 10 minutes avec du tampon TBS-Tween 0,1 %, puis une dernière fois avec du tampon TBS.

L'immunodétection est réalisée avec un kit ECL (Enhanced chemiluminescence, RPN 2106, Amersham). Les membranes sont ensuite mises en contact avec du papier photographique sensible. Les photographies de membrane sont analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Kodak 1D). Les bandes sont quantifiées en unité arbitraire de densité optique. Pour limiter la variabilité, les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur moyenne obtenue chez les rats des groupes contrôle (études I : adultes contrôle ; étude II : contrôle respectif pour chaque âge).

XI.6. Dosages par HPLC-EC et HPLC-MS/MS des dommages de l'ADN.

Ces dosages ont été effectués en collaboration avec le Laboratoire des Lésions de l'Acide Nucléique (DRFMC/SCIB, CEA; Grenoble, France; Directeur: Alain Favier)

XI.6.1. Principe de la spectrométrie de masse en tandem couplée à l'HPLC

La spectrométrie de masse permet de transformer des molécules dans leur état fondamental en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire en analysant leur rapport de masse/charge, noté m/z , où m est la masse du composé et z sa charge [Fig. 13].

Un spectromètre de masse se compose d'une source d'ion, d'un analyseur qui filtre les ions et d'un détecteur.

Pour les travaux présentés dans ce manuscrit, les molécules issues de l'HPLC sont introduites dans le spectrophotomètre de masse après avoir été ionisées. L'ionisation est faite par électronebulisation, l'éluat étant pulvérisé en fines gouttelettes depuis un capillaire en

présence d'un champ électrique élevé. Cette technique permet l'évaporation du solvant et l'ionisation des solutés. Les ions ainsi chargés vont entrer dans le spectromètre de masse, et passer à travers une série de quadripôle (filtre): 1) le premier (Q1) va filtrer la majorité des ions en appliquant un champ électrique avec une tension continue et une tension oscillante, spécifique à l'ion que l'on veut laisser passer; 2) le second quadripôle sert de chambre de collision pour fractionner les ions en présence d'un gaz inerte à basse pression (N₂, Ar); enfin, le dernier quadripôle permet de discriminer les différents ions issus de la fragmentation, pour ne laisser passer finalement que les ions fils souhaités qui seront quantifiés avec un détecteur d'électron.

La combinaison de l'efficacité de séparation par HPLC avec la spécificité du spectromètre de masse permet la mesure de plusieurs lésions de l'ADN en une seule analyse avec une très bonne sensibilité pour les adduits de l'ADN (10-20 fmol).

XI.6.2. Extraction de l'ADN

La principale difficulté de l'extraction de l'ADN cellulaire est de ne pas créer d'oxydations artéfactuelles de l'ADN (Cadet, 2002). Pour cette raison les noyaux sont d'abord isolés, puis traités, et le tampon d'extraction contient de la desferroxamine mesylate qui est un chélateur d'ions ferreux, et permet ainsi de limiter les oxydations pendant l'extraction.

□ Isolement des noyaux :

Les échantillons sont pesés (de 50 à 100 mg) et homogénéisés avec un piston en Téflon dans un potter en verre dans le tampon d'extraction (sucrose [320 mM], Tris [10 mM], MgCl₂ [5 mM], desferroxamine mesylate [0,1 mM], 1 % triton-100, pH 7,5). Les broyats sont ensuite centrifugés à 1500 g, 5 minutes à 4 °C. Le culot obtenu est resuspendu dans du tampon et re-centrifugé dans les mêmes conditions.

□ Isolement de l'ADN

Le culot de noyaux ainsi obtenu est resuspendu dans un tampon d'isolement (TRIS [10 mM], EDTA [5 mM], desferroxamine mesylate [0,15 mM], SDS 0.5 %, pH 8). La RNase A (qui coupe l'ARN) et la RNase T1 (qui digère les morceaux d'ARN) sont ensuite ajoutés et les échantillons sont incubés 15 minutes à 50 °C. Après addition de protéinase Qiagen la

suspension est alors incubée 60 minutes à 37 °C. L'ajout d'une solution de NaI, permet la précipitation de l'ADN après addition d'isopropanol (100 %). Les échantillons sont ensuite centrifugés 15 minutes à 5000 g, à température ambiante. Le culot d'acides nucléiques ainsi obtenu est rincé tout d'abord avec de l'isopropanol (40 %) (centrifugation 5 min à 5000 g) puis avec de l'éthanol (70 %). Finalement, le culot est partiellement séché et solubilisé dans de l'eau désionisée contenant de la desferroxamine mesylate [0,1 mM].

□ *Digestion de l'ADN*

La solution d'ADN est ensuite incubée avec la nucléase P1 pendant 2 heures à 37 °C. Puis les extraits sont incubés 1 heure à 37 °C avec la Phosphatase alcaline. A l'issue de cette étape, les protéines sont précipitées par ajout de 50 µL de chloroforme. Les échantillons sont alors centrifugés (5000 g, 5 minutes à température ambiante) afin de récupérer la phase aqueuse contenant le mélange de nucléotide provenant des acides nucléiques.

XI.6.3. Quantification de la 8-oxodGuo par HPLC avec détection électrochimique (HPLC-EC)

La technique de chromatographie liquide haute performance a été utilisée pour doser la 8-oxodGuo. Le système d'HPLC-EC est constitué d'une pompe (modèle 305, Gilson) connectée à un injecteur automatique (231-XL, Gilson) équipé d'une colonne composée de gel de silice octadecylsilyl (250 x 4,6 mm I.D., Uptisphere ODB, taille des particules: 5 µm; Interchim, Montluçon, France). L'éluant est une solution aqueuse de phosphate de potassium ([25 mM], pH 5,5) qui contient du méthanol (8 %). La colonne est maintenue à 28°C. La détection est faite par un détecteur Coulochem II équipé d'une cellule 5010 (Esa, Chelmsford, MA). Le potentiel des deux électrodes est respectivement de 200 et 400 mV. Le temps de rétention du 8-oxodGuo est de 20 minutes. Simultanément, les nucléosides non modifiés sont analysés avec un spectrophotomètre UV (Waters 484) à 280 nm. Les données des analyses électrochimiques et spectrophotométriques (UV) sont collectées sur un intégrateur D7500 Hitachi (Tokyo, Japon). La quantité d'ADN analysée est déterminée par l'aire représentée par le pic de dG (temps de rétention: 12 minutes) après avoir été calibré.

XI.6.4. Quantification des éthenobases, M1dGuo et 4-HNE-Guo par HPLC couplée avec un spectromètre de masse en tandem (HPLC-MS/MS):

Le contenu en adduits issus de la peroxydation lipidique dans les échantillons d'ADN est déterminé par HPLC MS/MS. Pour cela les flacons utilisés pour les analyses de 8-oxodGuo sont séchés. Le résidu est alors solubilisé dans 30 µl d'eau contenant 200 fmol de dérivés du 1,N²-εdA, 1,N²-εdG et HNE-dGuo marqués par 5 atomes de ¹⁵N qui seront utilisés comme standards internes pour la calibration de la dilution isotopique. Le M1dGuo est quantifié par calibration externe. Les échantillons sont ensuite analysés par HPLC avec phase inversée couplée à un spectromètre de masse (Perkin-Elmer/SCIEX, Thornhill, Canada). Les adduits 1,N²-εdA, 1,N²-εdG, M1dGuo et HNE-dGuo sont quantifiés en mode positif. Le contenu en ADN est mesuré comme l'aire du pic correspondant à la 2'-desoxyguanosine mesuré par un spectrophotomètre UV (280 nm) placé avant l'entrée du spectromètre de masse.

XII. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM (somme des écarts à la moyenne). L'analyse statistique entre les différents groupes a été réalisée de la manière suivante: si le nombre d'animaux est inférieur à 5, un test non paramétrique (Kruskal Wallis) est réalisé pour déterminer les différences entre chaque groupe. Pour le reste des données, l'analyse statistique a été réalisée par une analyse de variance (ANOVA2) suivie d'un test *post hoc* de Fisher pour déterminer les effets de l'exposition à l'O₃ et de l'âge, ou de la supplémentation en ω3. Le seuil de significativité statistique est de $p < 0,05$.

RESULTATS
&
DISCUSSION

ETUDE I

Cette étude a pour but d'évaluer les conséquences pulmonaires d'une exposition intermittente à l'O₃ sur le fonctionnement mitochondrial et la balance entre production de ROS et leur élimination. L'âge étant un facteur qui peut influencer les réponses au stress oxydant, nous avons étudié les effets de l'O₃ sur trois populations caractéristiques: immature, adulte et âgée.

Les résultats présentés ici font partis d'un article actuellement soumis pour publication dans la revue *Free Radical Research* (article joint en annexe).

Résultats

I.9. Evolution de la masse corporelle [Fig. 14]

Alors que la courbe de croissance des rats immatures n'est pas affectée par l'exposition à l'O₃, les rats adultes et âgés présentent une réduction significative de leur masse corporelle dès le premier jour d'exposition. Si les rats adultes récupèrent complètement leur masse corporelle au 4^{ème} jour d'exposition, les rats âgés inhalant l'O₃ conservent une masse corporelle inférieure à celle des rats âgés du groupe contrôle.

I.10. Paramètres ventilatoires [Tab.3; Fig. 15].

I.10.1. Ventilation en condition basale (normoxie)

Le débit ventilatoire (\dot{V}_e , en ml.min⁻¹) des rats immatures est 3 fois plus faible en comparaison à celui des rats adultes et âgés [Tab.3]. Quand ce débit est ramené à la masse corporelle (\dot{V}_e spécifique, en ml.min⁻¹.100 g⁻¹), il est alors significativement plus élevé chez les rats immatures ($\times 3$) par rapport aux animaux plus âgés [Fig. 15]. Cette différence est liée au volume courant (VT) significativement plus faible chez les rats immatures que les groupes adultes et âgés [Tab.3].

Après 6 jours d'exposition à l'O₃, aucun paramètre ventilatoire mesuré en condition basale (normoxie) n'est modifié chez les 3 groupes d'âge.

Tableau 3. Effets ventilatoires de l'exposition à l'O₃ chez les rats immatures, adultes et âgés.

	Immatures		Adultes		Agés		
	contrôle	ozone	Contrôle	ozone	contrôle	ozone	
V_e	Nx	88 ± 4 †§	103 ± 6	297 ± 12	286 ± 18	299 ± 16	293 ± 26
	Hx 1'	164 ± 13	243 ± 15 *	465 ± 37	458 ± 26	539 ± 36	512 ± 36
	Hx 4'	168 ± 10	223 ± 17 *	486 ± 39	534 ± 35	476 ± 24	551 ± 32
	Hx 10'	149 ± 5	220 ± 24 *	454 ± 32	504 ± 28	491 ± 30	569 ± 43
V_T	Nx	0,84 ± 0,05 †§	0,94 ± 0,05	2,83 ± 0,17	2,63 ± 0,32	3,61 ± 0,35 †	2,91 ± 0,21
	Hx 1'	1,10 ± 0,12	1,47 ± 0,11 *	3,25 ± 0,21	3,28 ± 0,25	4,48 ± 0,32	3,79 ± 0,29
	Hx 4'	1,05 ± 0,9	1,23 ± 0,09	3,91 ± 0,18	3,48 ± 0,22	4,45 ± 0,16	3,81 ± 0,23 *
	Hx 10'	0,98 ± 0,07	1,27 ± 0,13 *	3,44 ± 0,14	3,07 ± 0,25	4,33 ± 0,31	3,41 ± 0,19 *
F	Nx	106 ± 3	107 ± 3	116 ± 7	116 ± 8	89 ± 10	101 ± 7
	Hx 1'	152 ± 8	174 ± 6	143 ± 6	133 ± 3	121 ± 5	145 ± 4 *
	Hx 4'	162 ± 6	177 ± 4	134 ± 4	147 ± 7	107 ± 4	154 ± 8 *
	Hx 10'	154 ± 9	171 ± 4	134 ± 3	179 ± 9	114 ± 6	158 ± 8 *

V_e: débit ventilatoire en ml.min⁻¹; V_T: volume courant en ml; F: fréquence respiratoire en nombre de respiration par minute. *: différence significative contrôle vs ozone dans un même groupe d'âge. † : différence significative par rapport aux adultes contrôle. §: différence significative immatures vs âgés contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 9 dans chaque groupe.

I.10.2. Réponse ventilatoire à l'hypoxie (10 % O₂)

La réponse ventilatoire à l'hypoxie n'est pas modifiée par l'exposition à l'O₃ chez les rats adultes. Ainsi l'augmentation de la fréquence respiratoire (F) et du volume courant (V_T) qui conduit à l'augmentation de V_e spécifique à 1, 4 et 10 minutes est semblable entre les

adultes exposés ou non à l'O₃ [Tab. 3 et Fig. 15]. Par contre, l'augmentation de \dot{V}_e à 1, 4 et 10 minutes est statistiquement plus élevée (+ 30 %) chez les rats immatures exposés à l'O₃ en comparaison avec le groupe contrôle du même âge. Cette augmentation est essentiellement liée à un accroissement du V_T plus important (+ 30 %) chez les rats immatures exposés à l'O₃ en comparaison du groupe contrôle. De même, les rats âgés exposés à l'O₃ présentent une augmentation supérieure du débit ventilatoire spécifique après 4 et 10 minutes d'hypoxie (+ 30 %) par rapport au groupe contrôle. Cette augmentation de la ventilation est dû à une augmentation de la fréquence ventilatoire plus importante chez les rats âgés exposés à l'O₃ (+ 50 % à 4 et 10 minutes d'hypoxie).

I.11. Consommation mitochondriale d'O₂ [Tab. 4]

En condition contrôle, la consommation d'O₂ des mitochondries pulmonaires isolées chez les rats immatures est significativement plus élevée que chez les rats adultes et âgés (respectivement, pour l'état IV: + 50 % et + 40 % et état III: + 40 % et + 25 %). Aucune différence n'a été mesurée dans la consommation d'O₂ entre les rats adultes et âgés. Le RCR et le rapport ADP/O sont similaires entre les 3 groupes d'âge. Par contre, la vitesse de phosphorylation oxydative est significativement plus importante chez les immatures par comparaison aux rats adultes et âgés (+ 50 % et + 30 %, respectivement).

La consommation d'O₂ et les paramètres respiratoires ne sont pas affectés par l'exposition à l'O₃ chez les rats immatures et adultes. Chez les rats âgés exposés à l'O₃, la consommation d'O₂ à l'état IV est statistiquement plus élevée par rapport au groupe contrôle (+ 30%) avec pour conséquence une baisse significative de 15 % du RCR.

I.12. Production mitochondriale d'H₂O₂ [Tab. 4]

Avant tout il est important de noter que nous n'avons pas pu mesurer la production de H₂O₂ avec des substrats liés au complexe I sur mitochondrie pulmonaire isolée. En effet, nous avons observé une augmentation de fluorescence non spécifique lié au substrat lui-même (pyruvate/malate) et non pas au fonctionnement de la mitochondrie. Ces observations sont en accord avec des travaux récents (St-Pierre, 2002). Nos mesures ont donc été effectuées en présence de succinate seul, afin de mesurer la production du complexe III et du complexe I par le retour des électrons depuis le complexe II. Une telle mesure nous permet d'avoir une production de H₂O₂ spécifiquement mitochondriale, et un signal détectable par fluorimétrie.

Les mitochondries pulmonaires des rats immatures et adultes ont une production brute de H_2O_2 ($pmole.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$) similaire, en présence de succinate seul. Cependant, quand cette production d' H_2O_2 est rapportée par unité d' O_2 consommée ($pmole.nAtomO^{-1}$), elle est alors significativement plus faible (- 54 %) chez les rats immatures par rapport aux adultes. De plus, la production mitochondriale brute d' H_2O_2 mesurée chez les rats immatures est supérieure à celle mesurée chez les rats âgés (+ 50 %). Enfin, la production d' H_2O_2 des mitochondries pulmonaires, brute ou exprimée par unité d' O_2 consommée, est 2 fois supérieure chez les rats adultes par rapport aux rats âgés.

Chez les rats immatures et adultes, la production d' H_2O_2 par les mitochondries pulmonaires n'est pas affectée par l'exposition à l' O_3 . Cependant, chez les rats âgés la production brute d' H_2O_2 liée au succinate est significativement augmentée (+ 24 %) après l'exposition à l' O_3 , alors que si la production d' H_2O_2 rapporté par unité d' O_2 consommée, elle reste alors similaire entre les rats âgés des groupes contrôle et O_3 .

I.13. Activités des enzymes antioxydantes pulmonaires [Fig. 16 et 17]

I.13.1. Effet de l'âge:

Les rats immatures présentent une activité SOD totale pulmonaire 2 fois plus élevée que chez les rats adultes et âgés [Fig. 16]. Cette différence est essentiellement due à une activité plus élevée de l'isoforme cytosolique de la SOD. Nous n'avons pas détecté de différence significative d'activité de la SOD cyto entre les groupes adultes et âgés. Enfin, l'activité de la SOD mito est similaire pour les 3 groupes d'âge.

L'activité de la GPx est significativement plus faible (-70 %) chez les immatures par rapport aux groupes adultes et âgés. Mais l'activité de la GPx pulmonaire est significativement réduite chez les rats âgés en comparaison des rats adultes (- 20 %) [Fig. 16 et 17].

L'activité de la CAT pulmonaire est comparable chez les 3 groupes d'âge [Fig. 17].

I.13.2. Effet de l'exposition à l' O_3 :

L'exposition à l' O_3 n'a pas modifié les activités de la SOD, CAT et GPx pulmonaires des rats adultes [Fig. 16 et 17]. Il en est de même pour les rats immatures où aucune activité enzymatique n'est modifiée après l'exposition à l' O_3 . Ce n'est pas le cas pour les rats âgés, exposés à l' O_3 , qui présentent une augmentation significative de l'activité de la SOD

cytosolique (+ 90 %) en comparaison avec les rats du groupe contrôle [Fig. 16 et 17]. L'activité de la SOD mito n'est cependant pas modifiée par l'exposition à l'O₃ chez les rats âgés.

L'activité de la GPx est significativement augmentée (+ 20 %) chez les rats âgés exposés à l'O₃. Par contre, l'activité CAT est sensiblement réduite (- 20 %) chez les rats âgés après exposition à l'O₃ en comparaison du groupe contrôle [Fig. 17].

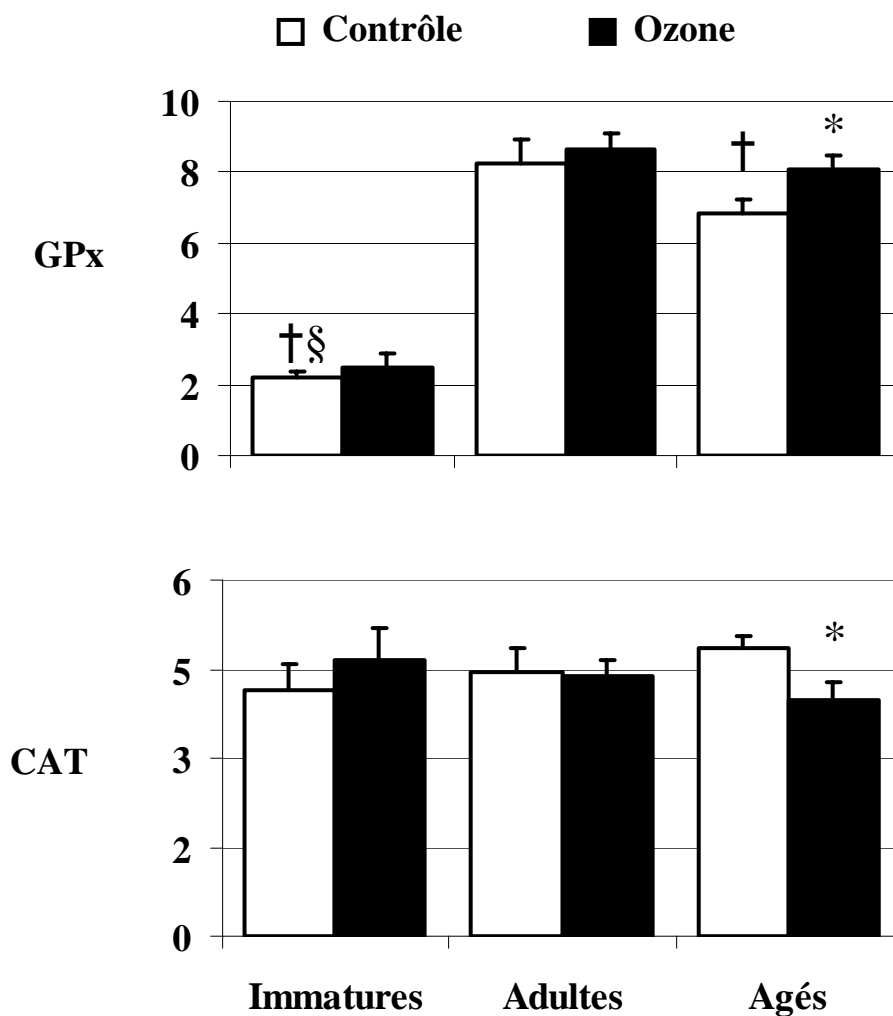


Figure 17. Activités de la glutathion peroxydase (GPx) et de la catalase (CAT) pulmonaires chez des rats immatures, adultes et âgés exposés ou non à l'O₃. *: différence significative contrôle vs ozone dans un même groupe d'âge. † : différence significative par

rapport aux adultes contrôle. ‡: différence significative immatures vs âgés contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, n = 9 dans chaque groupe.

I.14. Contenu pulmonaire en HSP₇₂ [Fig.18]

Le contenu pulmonaire en HSP₇₂ des rats adultes est significativement plus faible par rapport aux animaux immatures et âgés (- 50 % et - 70 % respectivement). De plus, les poumons des rats immatures ont un contenu en HSP₇₂ deux fois plus faible que celui mesuré chez les rats âgés.

En réponse à l'O₃, la quantité de HSP₇₂ est significativement augmentée chez les rats immatures (+ 80 %) alors qu'il n'y a aucune modification chez les rats adultes et âgés.

I.15. Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn pulmonaire [Fig.19]

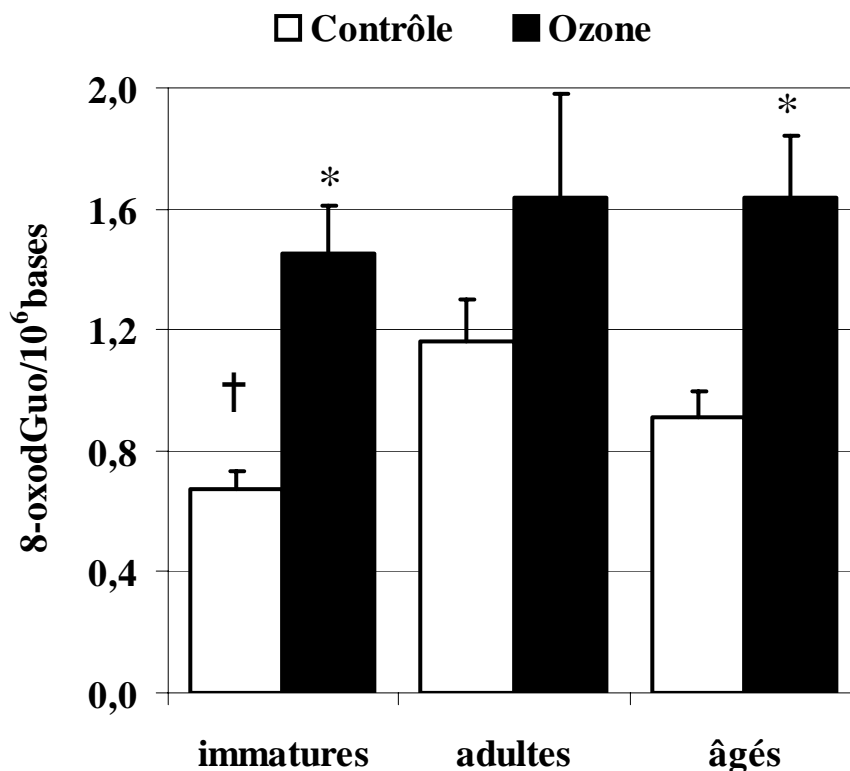


Figure 19. Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn pulmonaire chez des rats immatures, adultes et âgés exposés ou non à l'O₃. *: différence significative contrôle vs ozone dans un même groupe d'âge. † : différence significative par rapport aux adultes contrôle. Les résultats sont exprimés en lésions par 10⁶ bases et en moyenne \pm SEM, n = 9 dans chaque groupe.

Les contenus mesurés dans cette étude sont comparables à ceux présentés dans la littérature (Cadet, 2002). En effet, l'élément primordial dans le dosage des dégâts de l'ADN est la limitation des oxydations artéfactuelles qui peuvent avoir lieu lors de l'extraction de l'ADN (Ravanat, 2002). Ainsi des contenus trop élevés en 8-oxodGuo peuvent masquer des variations d'oxydation de l'ADN. Dans notre étude, le contenu en 8-oxodGuo pulmonaire mesuré chez les rats adultes du groupe contrôle est de 1,1 lésions par 10^6 bases, ce qui représente un taux d'oxydation basale acceptable si nous nous référons aux données obtenues par Cadet et al. (2002) avec la même méthode (0,9 lésions par 10^6 bases).

Le taux de 8-oxodGuo mesuré dans l'ADN pulmonaire chez les rats immatures est significativement plus faible (- 40 %) que chez les rats adultes. Le contenu en 8-oxodGuo dans l'ADN pulmonaire des rats adultes et âgés est similaire.

Contrairement au groupe de rats adultes qui ne présente pas de modification du contenu en 8-oxodGuo en réponse à l'exposition à l'O₃, les rats immatures et âgés exposés à l'O₃ ont une augmentation significative du taux en 8-oxodGuo (+ 110 % et + 80 % respectivement) en comparaison des rats des groupes contrôle respectifs.

I.16. Contenu en adduits issues de la peroxydation lipidique dans l'ADN pulmonaire [Tab.5]

Les taux les plus bas de M1dGuo et HNE-dGuo mesuré dans l'ADN pulmonaire lors de cette étude sont très faibles, proches de la limite de détection du système.

Le contenu pulmonaire en ϵ dA est significativement supérieur (+ 70 %) chez les rats immatures par rapport aux rats adultes et âgés. Les rats âgés ont un taux de HNE-dGuo plus élevé (+ 75 %) que celui mesuré chez les adultes. Les contenus en M1dGuo et ϵ dGuo est similaire pour les 3 groupes d'âge. Aucune modification liée à l'exposition à l'O₃ n'a été observée pour les 4 adduits mesurés dans cette étude quel que soit l'âge de la population exposée.

Discussion

Lors de cette étude nous nous sommes intéressés aux effets d'une exposition à des doses relativement faibles (0,5 ppm) d'O₃, chez trois populations de rats d'âge: immatures, adultes et âgés. Ces travaux se sont focalisés sur les effets d'une telle exposition sur les altérations mitochondriales et l'équilibre prooxydant/antioxydant pulmonaire.

Effets de l'O₃ chez les adultes

Tout d'abord, le groupe des rats adultes ne présente pas d'atteintes majeures après l'exposition à l'O₃. En effet, mis à part une faible réduction de la masse corporelle pendant les 3 premiers jours d'exposition, aucun des paramètres mesurés dans cette étude n'a été modifié chez les rats adultes. Ainsi, les composantes respiratoires (VT et F), en condition basale (normoxie) et en situation de stimulation du système respiratoire (hypoxie), ne sont pas différentes entre les groupes adultes exposés ou non à l'O₃. En plus de cette absence d'impact fonctionnel de l'O₃ sur le système respiratoire chez les rats adultes, nous n'avons pas observé d'altération de la balance prooxydant/antioxydant pulmonaire. La consommation mitochondriale d'O₂ pulmonaire, la production d'H₂O₂, les activités des principales enzymes antioxydantes ainsi que le contenu en HSP₇₂ sont restés inchangés dans le poumon après l'exposition à l'O₃. En conséquence, l'ADNn n'a pas subi d'oxydation directe (pas d'augmentation du contenu en 8-oxodGuo) ni de fixation de produits réactifs secondaires issues de la peroxydation lipidique (M1dGuo, HNE-dGuo et éthenobases).

Notre protocole d'exposition à l'O₃ (0,5 ppm, 12h par jour) ne semble pas provoquer pas un stress oxydant majeur chez les individus adultes. Cette exposition peut être qualifiée de modérée pour plusieurs raisons. Les effets de l'O₃ sur les organismes sont connus pour être liés à la dose inhalée et à la durée d'exposition (Plopper, 1994). Ainsi alors que de jeunes adultes exposés à 2-3 ppm d'O₃ pour 8 heures présentent des mitochondries pulmonaires qui ont une consommation d'O₂ réduite de 25%, des animaux du même âge exposés à une dose plus faible (0,8 ppm) mais pendant 10 à 20 jours ont une augmentation de la consommation d'O₂ cellulaire pulmonaire (Mustafa, 1974b; Mustafa, 1974c; Zychlinski, 1989). Aux facteurs dose et durée, il faut ajouter que la présence de périodes de récupération dans notre protocole d'exposition intermittente à l'O₃ pourrait avoir permis le maintien de la consommation d'O₂ grâce à une prolifération mitochondriale (Mustafa, 1974a). L'hypothèse, selon laquelle la

présence de périodes de récupération dans notre protocole pourrait expliquer les faibles conséquences chez le rat adulte, est, en partie, étayée par les travaux de Van Bree (Van Bree, 1992; Van Bree, 2002). Ces derniers ont montré qu'une exposition continue et unique à 0,4 ppm d'O₃ provoquait une augmentation de la perméabilité de l'épithélium pulmonaire et de la réponse inflammatoire alors que 5 jours d'exposition pendant 12 h /jour conduisaient à une disparition complète de ces réponses. Le type d'exposition choisie pour notre étude présente donc des périodes de récupération qui pourraient expliquer l'absence d'atteintes ventilatoires et de perturbation de l'équilibre pro/antioxydant pulmonaire observée chez le rat adulte.

L'exposition à l'O₃ crée un stress oxydant pulmonaire chez les rats immatures

Parce que la dose inhalée d'O₃ est le produit de la concentration, du temps d'exposition et de la ventilation, les rats immatures pourraient être plus atteints que les adultes par l'O₃. En effet, les rats immatures présentent un \dot{V}_e spécifique largement supérieur (+ 170 %) à celui des rats adultes. Ajoutons à ce critère que les travaux de Shore *et al.* (2002) ont observé que la réponse ventilatoire à l'O₃ chez les rats adultes est une hypoventilation marquée. Cette bradypnée peut être considérée comme une protection pour limiter la quantité d'O₃ inhalée et donc les altérations du système respiratoire. Les mêmes travaux se sont intéressés à l'effet de l'âge sur la réponse ventilatoire à l'O₃. Les rats immatures inhalant de l'O₃ ne présentent pas de modification ventilatoire comme chez les rats adultes. Cette absence d'hypoventilation lors de l'inhalation d'O₃ pourrait avoir comme conséquence d'accentuer les atteintes oxydatives pulmonaires (Shore, 2002).

Les données obtenues dans notre étude montrent une altération de la réponse ventilatoire à l'hypoxie chez les rats immatures exposés à l'O₃. En effet, ces derniers présentent une plus importante augmentation du \dot{V}_e pendant l'hypoxie en comparaison des rats du groupe contrôle. Cette modification de la réponse ventilatoire à l'hypoxie démontre un effet fonctionnel de l'exposition à l'O₃, qui n'est pas détectable en condition basale (normoxie). Les mécanismes pouvant expliquer cette "hyperréactivité" à l'hypoxie peuvent être nombreux, et font l'objet de travaux supplémentaires au sein du laboratoire. Cependant, nous pouvons supposer que la stimulation des fibres C par les médiateurs de l'inflammation, tels que le PGE₂, perturbe la régulation de la ventilation dans une situation où l'O₂ est en quantité limitante (Lee, 2001). Les modifications ventilatoires consécutives à l'exposition à l'O₃ chez les rats immatures peuvent être considérées comme relativement discrètes du fait

qu'elles n'apparaissent que lors d'une hypoxie à 10 % d'O₂ et non pas en condition normoxique.

Les modifications ventilatoires observées chez les rats immatures exposés à l'O₃ sont accompagnées d'une augmentation importante du contenu en 8-oxodGuo en en HSP₇₂ pulmonaire. Cela démontre clairement que l'équilibre pro/antioxydant pulmonaire a été perturbé par l'exposition à l'O₃.

L'augmentation du contenu en 8-oxdGuo peut être liée à une augmentation de l'oxydation de l'ADN, mais nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une diminution des capacités de réparation de l'ADN par excision de base pendant le début de l'exposition à l'O₃. En effet, il a été rapporté qu'après une semaine d'inhalation de chromate de sodium, le taux de 8-oxodGuo dans le poumon est significativement augmenté, alors qu'il retourne au niveau basale lors d'une exposition prolongée (Maeng, 2003). Ce retour à la normale coïncide avec la récupération totale de l'activités de réparation de l'ADN.

Enfin, l'altération de l'ADNn par addition de produits secondaires issus de la peroxydation lipidique tels que le MDA et le 4-HNE ne semble pas augmentée dans ces conditions de stress oxydant.

Les paramètres ventilatoires qui pourraient conduire à une plus grande quantité d'O₃ inhalée chez les immatures par rapport aux adultes peuvent expliquer en partie l'apparition du stress oxydant pulmonaire. Cependant une autre possibilité réside dans le statut pro/antioxydant initial des rats immatures qui pourrait influencer la susceptibilité à l'O₃ chez cette population par rapport aux adultes.

Notre étude montre que l'O₃ n'altère pas la production mitochondriale pulmonaire d'H₂O₂ chez les rats immatures. Mais il est important de noter que malgré une consommation d'O₂ significativement plus élevée chez les jeunes rats, la production brute d'H₂O₂ est plus faible que celle mesurée chez le groupe adulte. Si la production d'H₂O₂ est finalement exprimée par unité d'O₂ consommée, celle-ci est alors deux fois plus faible chez les immatures comparés aux adultes. L'augmentation de l'état respiratoire 4 observée chez les jeunes rats peut être assimilée à une augmentation de la fuite de proton (à travers la membrane mitochondriale ou patinage enzymatique (*slipping*) de la cytochrome c oxydase). L'augmentation de la perméabilité au proton est liée à la baisse du potentiel de membrane est reconnu pour protéger contre les dégâts liés à la production de ROS (Korshunov, 1997). Nous pouvons supposer que ce mécanisme explique en partie la plus faible production d'H₂O₂ observée chez les animaux immatures par rapport aux adultes. Ce phénomène pourrait

permettre de limiter la production de ROS liée à la consommation d'O₂ lors d'une demande importante en énergie, comme la croissance tissulaire.

Nos résultats permettent de conclure que l'oxydation accrue de l'ADNn après l'exposition à l'O₃ ne semble pas mettre en jeu la production mitochondriale d'H₂O₂.

A tout âge et chez toutes les espèces la tolérance au stress oxydant semble être dépendante des capacités à éliminer les molécules oxydantes via les enzymes antioxydantes. Toutefois, cette affirmation doit être modérée. En effet, lors d'une hyperoxie sévère (100 %) les enzymes antioxydantes telles que la SOD et la CAT ne pourraient jouer qu'un rôle local au niveau pulmonaire alors que la tolérance de l'organisme entier à l'hyperoxie pourrait être liée à d'autres systèmes de défenses enzymatiques ou non enzymatiques (Lanir, 1981). Selon d'autres travaux, ce n'est pas forcément l'activité de la SOD, CAT et GPx qui préjuge de la tolérance au stress oxydant pulmonaire mais plutôt un équilibre favorable entre production et élimination des ROS. Ainsi les rats immatures seraient plus résistants à l'hyperoxie car ils ont une balance entre production et élimination des ROS plus favorable que chez des rats adultes (Ischiropoulos, 1989). Dans notre étude, nous avons observé que l'activité totale de la SOD pulmonaire est deux fois plus élevée chez les rats immatures par rapport aux adultes. Cette activité SOD plus importante est essentiellement due à l'augmentation de l'activité de l'isoforme cytosolique. Par contre l'activité de la GPx est significativement plus faible (-75%) chez les plus jeunes alors que l'activité de la CAT est similaire entre les immatures et les adultes. L'exposition intermittente à l'O₃, et par conséquent le stress oxydant, n'a pas provoqué d'augmentation des activités des enzymes antioxydantes. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus par Rahman *et al.* (1992) qui démontrent une augmentation de contenu en ARNm et des activités de la SOD, GPx et CAT chez des rats immatures exposés de façon continue pendant 5 jours à 0,7 ppm. Nous pouvons, là encore, supposer que le taux d'O₃ (plus élevé dans l'étude de Rahman *et al.*) et surtout l'absence de période de récupération ont eu un effet plus important que lors de notre expérimentation.

En plus des enzymes antioxydantes, les protéines de stress (HSP) exercent une protection cellulaire en réponse à des conditions de stress oxydant dans la plupart des types de cellules étudiées (Parsell, 1994). Des travaux ont montré une augmentation du contenu en HSP₇₂ dans le tissu pulmonaire après des expositions chroniques ou aiguës à des doses d'O₃ allant de 0,15 à 0,66 ppm (Su, 1997; Wong, 1996). Les mécanismes impliqués dans l'induction des HSP₇₂ par une exposition *in vivo* à l'O₃ ne sont pas clairement connus, mais certains auteurs font l'hypothèse que le stress oxydant pourrait y jouer un rôle clef (Su, 1997). L'induction des HSP₇₂ de façon indirecte par l'inflammation associée à l'O₃ peut être exclue

car l'exposition directe de macrophages alvéolaires et de cellules épithéliales à l'O₃ ne stimule pas l'expression des HSP (Cohen, 1991). Dans les cellules pulmonaires humaines exposées à l'O₃, certains auteurs (Hamilton, 1998) font l'hypothèse que l'augmentation du contenu en 4-HNE, produit secondaire issu de la peroxydation lipidique, pourrait avoir un rôle potentiel dans l'augmentation des HSP₇₂. Nous pouvons donc penser que le contenu en HSP₇₂ augmenté chez les immatures exposés à l'O₃ en comparaison des adultes refléterait une meilleure capacité à détecter certaines formes spécifiques de dommages oxydatifs. L'absence d'augmentation du contenu en HNE-dGuo dans l'ADNn pulmonaire chez les rats immatures ne permet pas de confirmer cette hypothèse.

En condition contrôle, nous avons observé que le contenu pulmonaire en HSP₇₂ est significativement plus élevé chez les immatures par rapport aux adultes. L'influence de la maturation tissulaire sur le contenu en HSP₇₂ n'a pas été étudiée dans le poumon, mais il a été observé, dans le cœur que les contenus en HSP₇₂ et HSP₂₅ diminuaient significativement depuis la naissance à l'âge adulte (Lutsch, 1997). Ces travaux suggèrent une fonction des HSP₇₂ spécifique et dépendante du développement, dans le tissu pulmonaire.

Il est intéressant de noter que nos résultats rapportent un contenu plus faible en 8-oxodGuo pulmonaire chez les rats immatures par rapport aux adultes en condition contrôle, ce qui est en accord avec la littérature (Schmerold, 2001).

Toute exposition à l'O₃ supérieure ou égale à 0,4 ppm, chez le rat adulte provoque dès les premières heures une réaction inflammatoire (Bhalla, 1999). Si l'exposition est répétée, il y a atténuation des effets et certains des paramètres inflammatoires reviennent à un niveau basal au bout de 5 jours de récupération. Mais certains marqueurs de l'inflammation comme le nombre de macrophages, ne sont pas atténués lors d'une exposition répétée (Van Bree, 2002). Nous pouvons donc supposer que s'il y a eu un déséquilibre de la balance pro/antioxydant, il peut être imputé, en partie, à l'O₃ et à la surproduction de ROS par les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire pulmonaire.

Les éléments qui ont pu concourir à l'apparition du stress oxydant pulmonaire chez les rats immatures exposés à l'O₃ par rapport aux adultes pourraient donc être principalement: i) les caractéristiques ventilatoires propres aux individus immatures qui conduisent à l'inhalation d'une plus grande quantité d'O₃ que chez des adultes ii) une activité GPx pulmonaire plus faible chez les rats immatures. iii) l'absence de réponse des principales enzymes antioxydantes lors de l'exposition à l'O₃. Ce dernier point semble être commun à l'hyperoxie, autre modèle de stress oxydant. En effet, il faut 5 jours d'hyperoxie à 100 % pour stimuler les activités de la SOD, GPx et CAT chez des animaux immatures (Laudert, 1994).

L'O₃ provoque un stress oxydant pulmonaire chez les rats âgés

Les individus âgés représentent eux aussi une population potentiellement plus sensible à l'O₃. En effet, le taux de mortalité à 4 ppm d'O₃ pendant 8 heures est plus élevé chez les rats âgés que des rats plus jeunes (Mustafa, 1985). De même, les rats âgés exposés à 0,8 ppm pendant 6 heures présentent des altérations de l'épithélium des conduits alvéolaires et des bronchioles terminales plus importantes que chez les rats adultes (Vincent, 1995).

Dans notre étude la sensibilité des vieux rats est illustrée par le fait que la masse corporelle des rats du groupe âgé est durablement affectée par l'exposition à l'O₃. De plus, notre étude démontre clairement que notre protocole d'exposition à l'O₃ provoque un stress oxydant pulmonaire sévère chez les rats âgés alors que nous n'avons pas observé d'augmentation de marqueurs du stress oxydant chez les rats adultes. En effet, le taux de 8-oxodGuo dans l'ADN pulmonaire est statistiquement plus élevé (+ 80%) chez les rats âgés exposés à l'O₃ comparés aux rats du groupe contrôle du même âge. Nous pouvons encore supposer que l'augmentation du taux de 8-oxodGuo est liée, soit à une augmentation de l'oxydation de l'ADN, soit à une baisse des capacités de réparations de l'ADN (Maeng, 2003).

Il semble cependant que le stress oxydant pulmonaire provoqué par l'O₃ soit sévère car il est accompagné de modifications de l'activité mitochondriale. Ainsi la consommation d'O₂ à l'état IV est plus élevée chez les rats exposés à l'O₃ qui conduit à une baisse significative du couplage mitochondrial. L'augmentation de la consommation d'O₂ à l'état IV est strictement reliée à une augmentation de la génération d'H₂O₂ qui conduit à un même rapport H₂O₂/O₂. Il semble que nos travaux soient les premiers à étudier la production d'H₂O₂ mitochondriale pulmonaire après exposition à l'O₃. L'augmentation de l'état IV, associée au découplage mitochondrial, pourrait être considérée comme une adaptation mitochondriale au stress oxydant afin de limiter l'augmentation de production d'H₂O₂. En effet, comme nous l'avons rappelé précédemment, le découplage des mitochondries est un mécanisme qui permettrait de limiter la production d'H₂O₂ par la chaîne respiratoire mitochondriale par l'intermédiaire d'une baisse du potentiel de membrane lors d'un stress oxydant (Azzone, 1985; Brand, 2000; Korshunov, 1997; Papa, 1997a).

Le stress oxydant pulmonaire consécutif à l'exposition à l'O₃ chez les rats âgés, ne peut s'expliquer par une dose d'O₃ inhalée plus importante, en effet, le débit ventilatoire spécifique est identique entre adultes et vieux rats. Nous pouvons donc nous demander si le statut pro/antioxydant initial des rats âgés pourrait être impliqué dans la susceptibilité accrue à l'O₃ par rapport aux adultes

De façon surprenante nous avons observé que la production d' H_2O_2 mitochondriale chez les animaux âgés est deux fois plus faible que chez les adultes. Actuellement, l'évolution de la production mitochondriale de H_2O_2 avec l'âge est l'objet de plusieurs controverses (Lopez-Torres, 2002). Si certains auteurs rapportent une augmentation de cette production, d'autres ne discernent aucun effet du vieillissement. Il faut prendre en compte que la production d' H_2O_2 est étroitement dépendante du tissu considéré (Barja, 1999; St-Pierre, 2002). De plus, le poumon est un tissu particulier du fait de son exposition continue à des pressions partielles en O_2 élevées et il n'y a pas de travaux, à notre connaissance, qui se soient intéressés à la production d' H_2O_2 mitochondriale au cours du vieillissement. Nous pouvons faire l'hypothèse que cette faible production d' H_2O_2 est liée à une adaptation spécifique du tissu pulmonaire à des pressions partielles en O_2 élevées. Le fonctionnement mitochondrial n'est donc pas un élément qui nous permet de justifier l'occurrence du stress oxydant consécutif à l' O_3 chez les rats âgés. Mais comme nous l'avons rappelé précédemment, la principale source de ROS pulmonaire à l' O_3 est plus certainement la réponse inflammatoire. La production d'interleukines pro-inflammatoires et la susceptibilité à l'inflammation seraient accrues au cours du vieillissement (Chung, 2001). Cette source de ROS pourrait être plus importante chez les animaux âgés.

Comme nous l'avons rappelé précédemment, il semble que la capacité pulmonaire à répondre au stress oxydant dépendrait de façon importante de la capacité à stimuler les protections antioxydantes enzymatiques, comme il l'a été montré dans des modèles d'hyperoxie (Comhair, 2002). Dans notre étude nous avons observé une réponse spécifique des enzymes antioxydantes. Ainsi, si l'activité de la SOD augmente fortement, avec une augmentation modérée de la GPx après exposition à l' O_3 , l'activité de la CAT est réduite. La stimulation des activités des deux premières enzymes confirme que la SOD et la GPx sont les enzymes principales de la lutte contre les ROS au niveau pulmonaire (Comhair, 2002). Nous avons pu constater que le niveau d'activité de la GPx chez les rats âgés est plus faible (- 20 %) par rapport aux adultes. Cette baisse d'activité de la GPx au cours du vieillissement couplée à une réponse à l' O_3 qui est composée d'une augmentation de la SOD avec une réponse plutôt mitigée des enzymes éliminant le H_2O_2 pourrait expliquer en partie l'apparition du stress oxydant pulmonaire. En effet, lors d'un stress oxydant une augmentation de l'activité de la SOD sera associée à une augmentation de la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Si l'augmentation de la SOD n'est pas relayée par les enzymes éliminant le H_2O_2 (GPx et CAT), il pourrait y avoir propagation du stress oxydant.

En ce qui concerne les systèmes complémentaires qui permettent de limiter le stress oxydant, le contenu en HSP₇₂ est resté inchangé après l'exposition à l'O₃ chez les animaux âgés. Ces résultats sont en accord avec des travaux qui ont montré une altération des capacités à exprimer les HSP₇₂ en réponse à un stress lié à l'exercice physique chez le sujet âgé (Demirel, 2003). Cependant le contenu en HSP₇₂ pulmonaire est statistiquement plus élevé chez les vieux rats comparés aux adultes. Ces données semblent un peu contradictoires avec la décroissance de l'expression des HSP₇₂ en réponse au stress avec le vieillissement (Demirel, 2003; Fagnoli, 1990). Comme nous l'avons précisé des travaux ont montré que le 4-HNE pourrait être impliqué dans l'expression des HSP₇₂ lors d'un stress oxydant (Hamilton, 1998). Or nous avons observé que le niveau de HNE-dGuo dans l'ADNn pulmonaire est significativement plus élevé chez les rats âgés en comparaison des adultes en parallèle avec le contenu en HSP₇₂.

Enfin, l'apparition du stress oxydant chez les rats âgés exposés à l'O₃ ne peut pas non plus être la résultante d'un stress oxydant chronique consécutif au vieillissement. En effet, le contenu en 8-oxodGuo n'est pas augmenté au cours du vieillissement pulmonaire dans des conditions contrôles contrairement à d'autres tissus (Schmerold, 2001). Nos résultats sont en accord avec ceux de Hirano *et al.* (1996). L'absence d'augmentation de l'oxydation de l'ADNn avec le vieillissement chez les rats du groupe contrôle pourrait être liée aux fortes capacités de réparation de l'ADN du poumon (Hirano, 1996).

Il semble donc que le stress oxydant pulmonaire consécutif à l'exposition à l'O₃ chez les animaux âgés semble donc être lié à une réponse enzymatique antioxydante et en terme de HSP₇₂, soit inexistante soit mitigée. L'absence d'augmentation du contenu en εdA, εdGuo ainsi qu'en M1dGuo et HNE-dGuo dans l'ADNn pulmonaire permet de penser, comme chez les rats immatures, que l'oxydation directe de l'ADNn (8-oxodGuo) est plus importante que la fixation de produits secondaires issus de la peroxydation lipidique lors de l'exposition à l'O₃.

Conclusions de l'étude I

Nous avons démontré que l'exposition intermittente à 0,5 ppm d'O₃ 12 heures/jour pendant 7 jours constitue une exposition qui ne provoque pas de stress oxydant pulmonaire majeur chez des animaux adultes. Cependant chez des populations supposées plus fragiles, comme les rats immatures et âgés, il est clair que cette exposition relativement faible a provoqué une augmentation du 8-oxodGuo, marqueur de l'oxydation de l'ADNn pulmonaire. Chez les rats immatures, ces dommages de l'ADN ne semblent pas liés à une augmentation de la production d'H₂O₂ mitochondriale, mais plutôt à une activité GPx plus faible pour une dose d'O₃ inhalée plus élevée. Parce que le 8-oxodGuo dans l'ADNn induit une modification de la molécule d'ADN (GC > AT) pendant la réplication, les effets d'une telle lésion pourrait être exacerbés lors de la prolifération cellulaire associée à la croissance pulmonaire (Cheng, 1992). Chez les individus âgés, la réponse des enzymes antioxydantes pulmonaire pendant l'exposition à l'O₃, n'est pas suffisante pour prévenir l'oxydation de l'ADNn et l'altération du fonctionnement mitochondrial.

Etude II

Cette étude se propose d'étudier les effets d'une supplémentation en huile poisson enrichie en acide gras polyinsaturés eicosapentanoïque (EPA, $\omega 3$) et docosanexanoïque (DHA, $\omega 3$) chez des rats immatures exposés à l' O_3 . Dans ce modèle d'exposition à l' O_3 qui provoque un stress oxydant pulmonaire chez les rats immatures, nous souhaitons mettre à jour une atténuation du stress oxydant pulmonaire par les propriétés anti-inflammatoires des $\omega 3$. La possibilité d'une peroxydation accrue des acides gras polyinsaturés sous O_3 est étudiée en parallèle dans le poumon et le foie.

Pour cette étude deux groupes ont été utilisés : un groupe contrôle et un groupe exposé à l' O_3 et supplémenté en huile de poisson enrichie en $\omega 3$ ($O_3\omega 3$). Les rats du groupe $O_3\omega 3$ sont gavés avec de l'huile poisson à raison de 1,5 g/jour/Kg, soit 675 mg/jour/ Kg d'EPA.

Les résultats obtenus dans cette seconde étude sont comparés à ceux rapportés dans l'étude I.

Résultats

II.5. Evolution de la masse corporelle [Fig.20]

La courbe de croissance des rats immatures $O_3\omega 3$ est comparable à celle des rats du groupe contrôle.

II.6. Paramètres ventilatoires [Tab. 6; Fig. 21]

II.6.1. En condition basale (normoxie)

Les valeurs de fréquence respiratoire et de volume courant sont similaires entre les rats des groupes contrôle et $O_3\omega 3$. Si l'on compare ces données aux valeurs de fréquence respiratoire et de volume courant mesurées lors de l'étude I, sur les rats immatures exposés à l' O_3 , il n'y a pas de différence significative entre les 3 groupes en condition normoxique [Tab. 6]. Par conséquent, nous n'avons observé aucune différence de débit ventilatoire (en ml/min et ml/min/100 g) entre les 3 groupes de rats immatures étudiés en normoxie.

II.6.2. réponse ventilatoire à l'hypoxie (10 % O₂)

L'augmentation du \dot{V}_E et \dot{V}_E spécifique à 1, 4 et 10 minutes d'hypoxie est similaire chez les rats des groupes contrôle et O₃ω3. Mais l'augmentation du \dot{V}_E et \dot{V}_E spécifique mesurées chez les rats immatures exposés à l'O₃ lors de l'étude I est deux fois plus importante que celle des groupes contrôle et O₃ω3 à 1, 4 et 10 minutes d'hypoxie.

La fréquence respiratoire est significativement plus élevée chez les rats O₃ω3 durant toute la durée de l'hypoxie (+ 20 % à 1 et 4 minutes d'hypoxie et + 30% à 10 minutes d'hypoxie) par rapport au groupe contrôle. Par contre, le VT est statistiquement plus faible chez les rats O₃ω3 en comparaison du groupe contrôle à 1, 4 et 10 minutes d'hypoxie (- 20 %). Par rapport aux rats exposés à l'O₃ dans l'étude I, nous observons qu'ils présentent une augmentation plus importante du VT à l'hypoxie que le groupe contrôle mais aussi plus importante que le groupe O₃ω3 tout au long de l'hypoxie (+ 63 % à 1 minute, + 50 % à 4 minutes et + 70 % à 10 minutes). Cependant, la fréquence ventilatoire des rats du groupe ozone (Etude I) n'est pas différente de celle mesurée chez le groupe contrôle, mais est significativement plus faible à 10 minutes d'hypoxie par rapport au groupe O₃ω3 (- 21 %).

II.7. Production et élimination des ROS au niveau pulmonaire

II.7.1. Consommation d'O₂ et production d'H₂O₂ mitochondriale [Tab. 7]

La consommation mitochondriale d'O₂ aux états 4 et 3 n'est pas différente entre les groupes contrôle et O₃ω3. Par comparaison avec les rats exposés à l'O₃ lors de l'étude I, la consommation d'O₂ à l'état 4 est significativement plus importante chez les rats du groupe O₃ω3 (+ 30 %).

Le RCR, le rapport ADP/O et l'OPR sont similaires chez les trois groupes de rats comparés dans cette étude.

La production d'H₂O₂ à l'état 4 n'est pas statistiquement différente entre les rats des groupes contrôle et O₃ω3, qu'elle soit rapportée par unité d'O₂ consommé ou non. Par comparaison avec les rats exposés à l'O₃ (première étude), la production mitochondriale d'H₂O₂ à l'état 4 rapportée par unité d'O₂ consommé est significativement plus faible chez le groupe O₃ω3.

II.7.2. Activités des enzymes antioxydantes

Au niveau pulmonaire, les activités de la SOD cytosolique et mitochondriale sont similaires chez les rats des groupes contrôle, O₃ω3 et ozone [Fig. 22].

Il en est de même pour les activités de la GPx et de la CAT qui ne sont pas différentes chez ces trois groupes [Fig. 23].

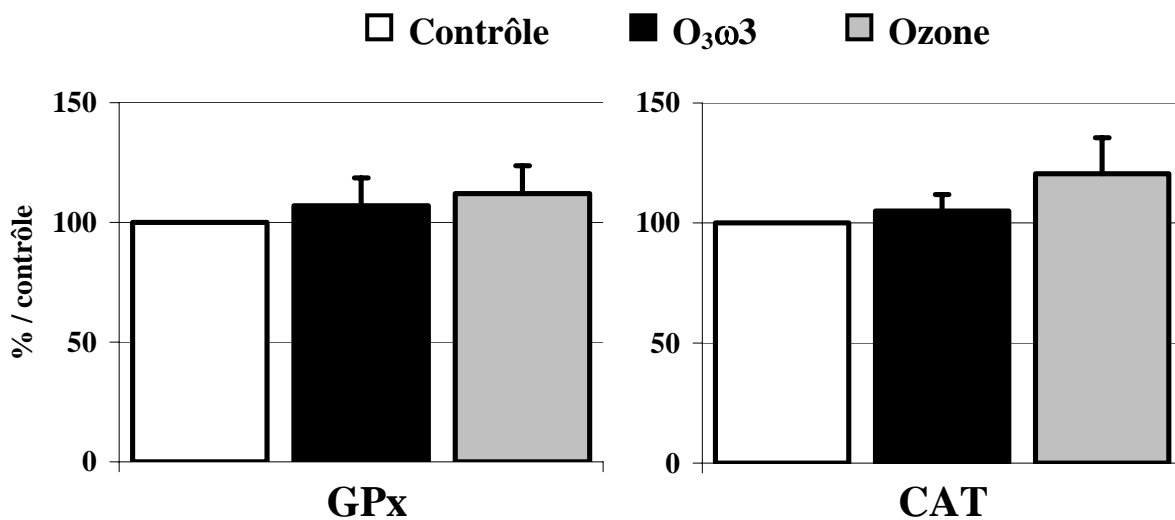


Figure 23: **Activités de la glutathion peroxydase (GPx) et de la catalase (CAT) pulmonaires chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3).** Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, par la moyenne ± SEM, n = 9 dans chaque groupe.

II.7.3. Contenu en HSP₇₂ pulmonaire

Le contenu en HSP₇₂ (exprimé en % du groupe contrôle) au niveau pulmonaire n'est pas différent entre les groupes contrôle et O₃ω3 (respectivement, 100 % vs 147 % ± 35).

II.7.4. Dommages oxydatifs de l'ADNn

II.7.4.a. Contenu en 8-oxodGuo [Fig. 24]

Le taux de 8-oxodGuo pulmonaire est similaire entre les groupes contrôle et O₃ω3. Toutefois, en comparant aux données obtenues lors de la première étude, nous constatons que

le contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn des rats exposé à l'O₃ est significativement plus élevé comparé aux groupes contrôle et O₃ω3 (respectivement, + 120 % et + 150 %).

II.7.4.b. Contenu en adduits de l'ADN issus de la peroxydation lipidique

Les contenus en M1dGuo et HNE-dGuo [Fig. 25], ainsi qu'en éthenobases, εdAde et εdGuo [Fig. 26], sont comparables dans les 3 groupes de rats étudiés.

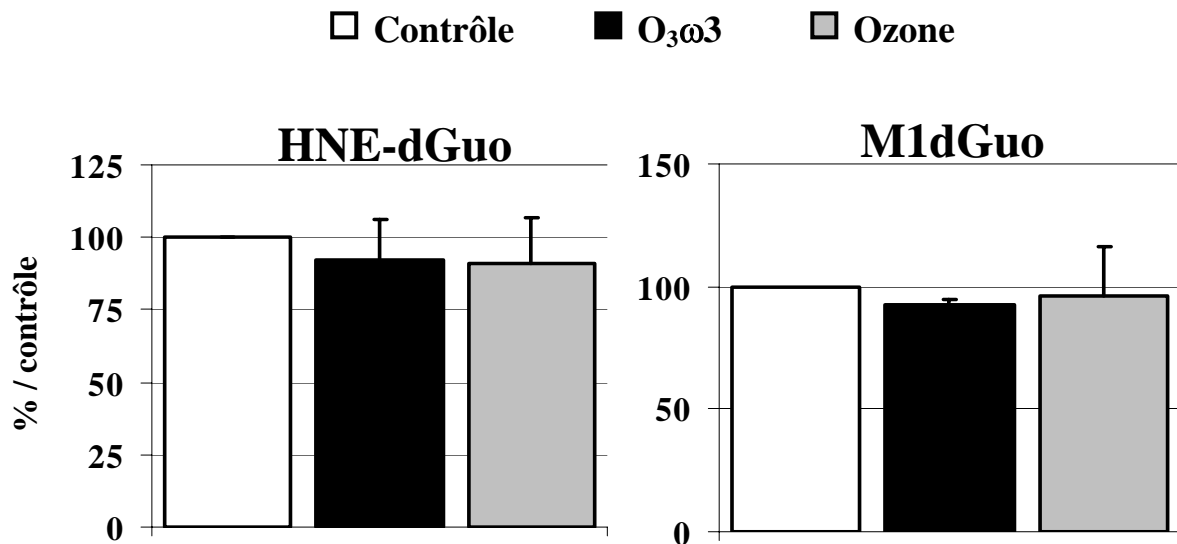


Figure 25: Contenu en HNE-dGuo et M1dGuo dans l'ADNn pulmonaire chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3). M1dGuo, pyrimido-[1,2α]purin-10(3H)-un ; HNE-dGuo, 6-(1-hydroxyhexanyl)-8-hydroxy-1,N²-propano-2'-deoxyguanosine. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, par la moyenne ± SEM, n = 9 dans chaque groupe.

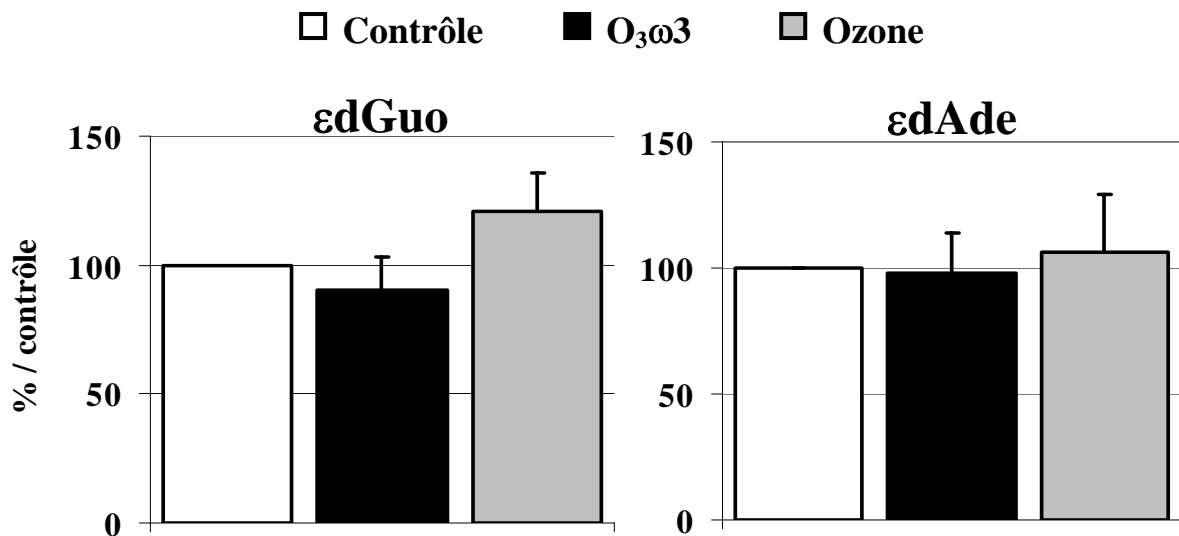


Figure 26: Contenu en éthenobases ϵ dGuo et ϵ dAde dans l'ADNn pulmonaire chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω 3 (O₃ω₃). ϵ dAde, 1,N⁶-ethenodeoxyadenine; ϵ dGuo, 1,N²-ethenodeoxyguanosine. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, par la moyenne \pm SEM, n = 9 dans chaque groupe.

II.8. Susceptibilité au stress oxydant au niveau hépatique

II.8.1. Dégâts oxydatifs dans l'ADNn hépatique [Fig. 27 et 28]

Les contenus en 8-oxodGuo, HNE-dGuo, ϵ dAde et ϵ dGuo dans l'ADNn hépatique sont similaires chez les groupes contrôle et O₃ω₃. Par contre, le taux de M1dGuo est fortement augmenté chez les rats du groupe O₃ω₃ ($\times 3$) comparé au groupe contrôle.

II.8.2. Activités des enzymes antioxydantes [Tab. 8]

Les activités des isoformes cytosolique et mitochondriale de la SOD ne sont pas différentes entre les rats O₃ω₃ et contrôle. Par conséquent, l'activité totale de la SOD est comparable chez les deux groupes. Les activités de la GPx et CAT hépatiques sont similaires entre les rats des groupes contrôle et O₃ω₃.

II.8.3. Fonctionnement mitochondrial hépatique [Tab. 9]

La consommation d'O₂ des mitochondries hépatiques isolées des animaux du groupe contrôle est comparable à celle mesurée chez le groupe O₃ω3, aux états respiratoires 4 et 3. Le RCR, le rapport ADP/O et la vitesse de phosphorylation oxydative sont similaires dans les deux groupes de rats.

Mais la production brute d'H₂O₂ ou rapportée par unité d'O₂ consommée n'est pas altérée par la superposition de la supplémentation en ω3 et l'exposition à l'O₃ au niveau des mitochondries hépatiques.

Discussion

Si la supplémentation en ω3, essentiellement en EPA et DHA, est reconnue pour avoir des effets anti-inflammatoires dans les pathologies inflammatoires pulmonaires (Simopoulos, 2002), l'augmentation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique chez des rats supplémentés en acides gras polyinsaturés (AGPI) est encore discutée. En effet, l'augmentation des doubles liaisons C-C peut accentuer les possibilités d'attaques radicalaires sur les AGPI constituant les membranes cellulaires (Yuan, 2003). Ces effets contradictoires de la supplémentation en ω3 pourraient avoir une implication spécifique dans notre modèle d'exposition à l'O₃. Lors de la première étude, nous avons montré qu'une exposition à l'O₃ à 0,5 ppm, pendant 7 jours, 12 heures/jour provoque chez des rats âgés de 21 jours un stress oxydant pulmonaire important comme le montre l'augmentation du contenu pulmonaire en 8-oxodGuo et HSP₇₂. Or toute exposition à l'O₃ supérieure ou égale à 0,4 ppm est accompagnée d'une augmentation de cytokines pro-inflammatoires qui conduisent au développement d'une réponse inflammatoire chez le rat (Bhalla, 1999; Van Bree, 1992; Van Bree, 2002). Ainsi, une supplémentation en ω3 pourrait avoir un effet bénéfique en limitant la réponse inflammatoire à l'O₃ qui se met en place dès les premiers jours d'exposition mais l'exposition directe à l'O₃ des cellules pulmonaires et inflammatoires pourrait en contre-partie augmenter la susceptibilité à la peroxydation lipidique par modification de la composition des membranes cellulaires.

Dans cette étude, nous avons pu constater que les rats exposés à l'O₃ et supplémentés en huile de poisson, ne présentent pas d'augmentation du contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn

pulmonaire. De même, nous n'avons pas détecté de modification du contenu en HSP₇₂ entre les groupes contrôle et O₃ω₃. Il semble donc, en comparaison des résultats obtenus dans l'étude I, que les rats O₃ω₃ n'ont pas développé de stress oxydant pulmonaire. La supplémentation en ω₃ chez le rat adulte pendant 3 semaines limite les phénomènes inflammatoires pulmonaires liés au traitement à la monocrotaline (Baybutt, 2002). Certes la durée de la supplémentation en huile de poisson dans l'étude de Baybutt *et al.* (2002) était beaucoup plus longue que celle réalisée dans notre expérimentation, avec une dose plus faible en EPA. Or, chez les rats adultes, la supplémentation en huile de poisson à raison de 360 mg/kg d'EPA pendant seulement une semaine modifie la composition lipidique pulmonaire en augmentant la part des ω₃ et diminuant celle des ω₆ (Calviello, 1997). Avec une dose plus importante d'EPA (1000 mg/kg/jour), il faut 3 jours pour modifier la composition lipidique des macrophages (Sane, 2000) en augmentant le ratio ω₃/ω₆. Enfin, il est important de prendre en compte le fait que les rats de 21 jours sont très réactifs à la supplémentation en ω₃ par rapport aux adultes (Suarez, 1996). En effet, en période postnatale la composition lipidique des cellules pulmonaires répond fortement à une alimentation enrichie en ω₃ (Suarez, 1996). Si nous nous référons aux marqueurs de stress oxydant utilisés lors de l'étude I, la supplémentation en huile de poisson chez les rats immatures limite le stress oxydant pulmonaire consécutif à l'exposition à l'O₃ et par conséquent l'oxydation de l'ADN. Cette action protectrice sur l'oxydation de l'ADN peut être due à une limitation de l'inflammation, du fait des propriétés anti-inflammatoires des ω₃, l'EPA entrant en compétition avec l'acide arachidonique (ARA) pour la synthèse des eicosanoïdes qui initient la réponse inflammatoire.

Cependant une supplémentation en huile de poisson chez le rat à raison de 50 g/kg/jour augmente la peroxydation lipidique au niveau hépatique, ce qui semble, par ailleurs, protéger la cellule de l'oxydation directe de l'ADN (Kikugawa, 2003). Donc nous pouvons émettre l'hypothèse que l'absence d'augmentation du contenu en 8-oxodGuo est associée à une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau pulmonaire. Le dosage du contenu pulmonaire en adduits issus de la fixation de produits secondaires de la peroxydation des acides gras polyinsaturés ne semble pas s'orienter vers une augmentation de la production de MDA ou de 4-HNE. En effet, les contenus en M1dGuo, HNE-dGuo, et εbases ne sont pas modifiés au niveau de l'ADN pulmonaire chez les rats supplémentés en ω₃. Le 4-HNE serait formé essentiellement à partir des acides gras ω₆ (Chung, 2003a), du fait de la faible quantité en ω₆ dans l'huile de poisson utilisée lors de notre étude, nous pouvions nous attendre plutôt à une augmentation du contenu en M1dGuo. Nous pouvons conclure qu'il ne semble pas y avoir

eu une forte augmentation de la peroxydation, et nous pouvons donc privilégier l'hypothèse d'une inhibition de la réponse inflammatoire à l'O₃ au niveau pulmonaire.

Si la supplémentation en ω 3 a permis de limiter le stress oxydant induit par l'exposition à l'O₃, il semble de plus que le fonctionnement mitochondrial soit modifié. En effet, le principal effet de la supplémentation chez les rats O₃ ω 3, comparés aux rats exposés à l'O₃, est une augmentation de 35 % de la consommation mitochondriale d'O₂ à l'état 4. Cet effet est spécifique de l'état 4, la consommation mitochondriale d'O₂ en présence d'ADP étant identique chez les deux groupes. Ainsi nous avons observé une tendance à une baisse du couplage des phosphorylations oxydatives mitochondriales chez le groupe O₃ ω 3 comparé aux rats uniquement exposés à l'O₃. Ce découplage des oxydations phosphorylantes est associé à une plus faible production de H₂O₂ rapportée par unité d'O₂ consommée chez les rats O₃ ω 3. Comme nous l'avons expliqué précédemment, le découplage mitochondrial permet une réduction de la production de ROS au niveau des complexes de la chaîne respiratoire (Korshunov, 1997). L'augmentation de la consommation d'O₂ à l'état 4 démontre soit une augmentation de la fuite de protons à travers la membrane interne soit l'augmentation du "patinage" enzymatique des pompes à protons de la chaîne respiratoire. A notre connaissance il n'y a aucune donnée traitant de l'effet d'une supplémentation en ω 3 sur la consommation d'O₂ et la production de ROS au niveau des mitochondries pulmonaires. Toutefois, dans d'autres tissus, tels que le foie et le cœur, il existe une controverse sur l'impact d'une supplémentation en AGPI sur le fonctionnement mitochondrial. Ainsi, si certains auteurs rapportent une augmentation des fuites de protons associées à une augmentation de l'état 4 et une baisse de RCR avec l'augmentation du ratio ω 3/ ω 6 dans les membranes mitochondriales (McMillin, 1992; Porter, 1996; Stillwell, 1997), d'autres observent les effets opposés (Pehowich, 1999). Ces effets seraient liés soit à la perméabilisation de la membrane interne mitochondriale, soit à des interactions lipides-protéines au sein de la chaîne respiratoire. L'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la proportion de AGPI ω 3 provoque l'augmentation de la fuite de protons est en partie étayée par le fait qu'une alimentation enrichie en ω 3 augmente le contenu en ARNm pour UCP2 dans le foie (Tsuboyama-Kasaoka, 1999), et UCP3 dans le muscle squelettique (Cha, 2001). De plus, les AGPI à longue chaîne sont des activateurs des UCP2 et 3 (Zackova, 2003).

Comme lors de la première expérimentation, les activités des principales enzymes antioxydantes, la SOD, GPx et CAT sont restées similaires entre les 3 groupes de rat comparés.

La supplémentation en huile de poisson n'accentue donc pas le stress oxydant pulmonaire induit par l'O₃ via une augmentation de la peroxydation lipidique, et a un impact spécifique sur le fonctionnement mitochondrial.

D'un point de vue fonctionnel, les paramètres ventilatoires mesurés par pléthysmographie barosensible apportent des informations très complexes. Alors que dans l'étude I, l'exposition à l'O₃ des rats immatures provoquait une hyper-réactivité à l'hypoxie, les conséquences ventilatoires de la supplémentation en ω₃ lors de l'exposition à l'O₃ sont différentes. Si le V_e spécifique n'est pas différent entre le groupe O₃ω₃ et le groupe contrôle, il est la résultante d'une augmentation significative de la fréquence respiratoire couplée à une baisse du volume courant à 1, 4 et 10 minutes d'hypoxie. L'étude spécifique des effets de cette supplémentation en ω₃ sur la régulation de la fréquence respiratoire et du volume courant, fera l'objet de travaux supplémentaires au sein du laboratoire. En effet, l'intégrité du surfactant pulmonaire pourrait en partie expliquer ces modifications complexes des paramètres ventilatoires. Ainsi, une supplémentation en huile de poisson chez le cochon diminue la compliance pulmonaire et augmente la rétention en CO₂, par altération de la fonction du surfactant pulmonaire (Wolfe, 2002). Des modifications du fonctionnement des centres régulateurs du volume et de la fréquence respiratoire en réponse à une supplémentation en ω₃ ne peuvent être exclues.

Plusieurs études ont observé une augmentation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique dans le foie chez des rats supplémentés en ω₃, (Garrido, 1989; Kikugawa, 2003; Yuan, 2003), alors que d'autres études démontrent le contraire (Ando, 2000; Calviello, 1997). Afin de savoir si les rats immatures supplémentés en ω₃ peuvent être plus sensibles à la peroxydation lipidique, nous nous sommes intéressés aux modifications de l'équilibre pro/antioxydant dans le tissu hépatique.

Parmi les raisons responsables des résultats discordants dans la littérature sur l'augmentation de la susceptibilité au stress oxydant avec les ω₃, nous pouvons citer les variations de la dose d'ω₃ utilisée, la présence d'ω₆ et de vitamine E. En effet, alors qu'une dose élevée d'huile de poisson (ω₃, 4000 mg/kg/jour) provoque une augmentation des marqueurs de la peroxydation lipidique dans les membranes microsomales hépatiques (Garrido, 1989), une supplémentation en EPA à raison de 360 mg/kg/jour ne provoque pas d'augmentation de la susceptibilité au stress oxydant (Calviello, 1997). A ce paramètre quantitatif, il faut ajouter que la supplémentation en ω₆ semble accentuer la peroxydation

lipidique et l'oxydation de l'ADN dans le foie alors que cela n'est pas le cas avec les $\omega 3$ (Kikugawa, 2003). Enfin, la présence de vitamine E en concentration adaptée permettrait de limiter les effets potentiels de la supplémentation en $\omega 3$ (Ando, 2000; Calviello, 1997; Suarez, 1999). Cet effet de la vitamine E est en partie due au fait que lors d'une telle supplémentation, il y a une baisse de la concentration en vitamine E au niveau plasmatique et hépatique (Farwer, 1994).

Dans notre étude, l'huile de poisson utilisée contient principalement des $\omega 3$ avec 45 % d'EPA et 10 % de DHA, mais il faut noter la présence d'une faible quantité d' $\omega 6$, représentés uniquement par l'ARA (2,6 %). La présence d' $\omega 6$ en faible quantité s'avère nécessaire pour ne pas déstabiliser complètement le système immunitaire et les capacités bactéricides pulmonaires (Palombo, 1995). Dans le but d'avoir le moins d'effets néfastes potentiels lors de la supplémentation dans cette étude, l'huile de poisson utilisée contient de la vitamine E à raison de 3,5 mg/g.

Dans nos conditions, avec nos marqueurs de stress oxydant nous n'avons pas observé d'augmentation de la peroxydation lipidique pulmonaire.

Au niveau hépatique la supplémentation en huile de poisson chez les rats exposés à l' O_3 n'est pas accompagnée d'un stress oxydant puissant, comme nous l'avons apprécié avec nos marqueurs. Le contenu en 8-oxodGuo hépatique n'est pas plus élevé chez les rats du groupe contrôle et $O_3\omega 3$. Il en est de même pour les adduits de l'ADN faisant intervenir le 4-HNE. Par contre l'augmentation très importante du contenu en M1dGuo ($\times 3$) dans l'ADNn hépatique chez les rats $O_3\omega 3$ par rapport au groupe contrôle, démontre clairement une accentuation du contenu en MDA issu de la peroxydation lipidique fixé à l'ADNn. La peroxydation des acides gras polyinsaturés a donc été augmentée chez les rats immatures exposés à l' O_3 et supplémentés en huile de poisson. Cette peroxydation lipidique accrue ne semble pas avoir eu de conséquence sur la consommation d' O_2 et la production d' H_2O_2 mitochondriale. L'activité de la GPx est augmentée après une semaine d'exposition à l' O_3 couplée à la supplémentation en $\omega 3$ qui conduit au niveau du foie à une accentuation de la peroxydation des AGPI. Nous pouvons nous interroger sur les causes de l'augmentation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique qui a lieu dans le foie et mais non dans le poumon. Afin de déterminer si l'augmentation en M1dGuo est due à un stress oxydant consécutif à l'exposition à l' O_3 au niveau hépatique ou si la supplémentation en $\omega 3$ a simplement augmenté les possibilités de peroxydation des AGPI, il sera nécessaire d'étudier des marqueurs de dégâts oxydatifs dans le foie de rats de 21 jours exposés à l' O_3 . La différence de susceptibilité à la

peroxydation lipidique entre le foie et le poumon peut avoir de nombreuses origines. Cette spécificité est en partie confirmée par le fait que le contenu en vitamine E en réponse à une supplémentation en huile de poisson (50 g/Kg/jour) chez le rat est diminué dans le foie et pas dans le poumon, ceci malgré un apport externe en vitamine E (Ando, 2000). De plus, les travaux de Ando *et al.* (2000) rapportent que la concentration en vitamine E pulmonaire est deux fois plus importante que dans le foie. De plus, les activités des enzymes antioxydantes au niveau hépatique sont plus importantes que celles mesurées dans le poumon. En effet, dans le foie de rat immature l'activité GPx est 7 fois plus élevée, alors que la CAT et la SOD ont une activité deux fois plus importante. Cette forte activité enzymatique antioxydante hépatique reflète la présence d'importantes sources de ROS. En effet, la xanthine oxydase et le peroxyosome sont deux sources de ROS en quantité importante dans les cellules hépatiques.

Conclusions de l'étude II

Les résultats de cette étude montrent qu'une supplémentation en acides gras polyinsaturés $\omega 3$ à raison de 675 mg/kg/jour permet de limiter le stress oxydant pulmonaire résultant d'une exposition à l' O_3 chez les rats âgés de 21 jours, comme nous l'avons démontré dans la première étude. Une des voies d'actions protectrice contre le stress oxydant concerne les capacités anti-inflammatoires de l'EPA, du fait qu'il a été démontré largement qu'à partir de 0,4 ppm d' O_3 , une réponse inflammatoire pulmonaire se met en place rapidement. Alternativement, l'augmentation de la peroxydation lipidique pourrait protéger de l'oxydation directe de l'ADN. Nous n'avons pas mesuré directement les produits issus de la peroxydation lipidique mais la fixation de ces produits sur l'ADN n'est pas augmentée au niveau pulmonaire. La supplémentation en huile de poisson enrichie en EPA ne semble pas augmenter la susceptibilité à la peroxydation lipidique des rats immatures en situation de stress oxydant au niveau pulmonaire. Par contre, il semble que la supplémentation en $\omega 3$ provoque une accumulation de M1dGuo au niveau hépatique lors de l'exposition à l' O_3 . Comme observé par certains auteurs, une telle supplémentation en environnement oxydant augmenterait la peroxydation lipidique au niveau hépatique, comme l'illustre l'augmentation de la quantité de MDA issue de la peroxydation lipidique fixé à l'ADN.

Etude III

Comme lors de la deuxième étude, nous avons analysé les effets d'une supplémentation en huile poisson enrichie en acide eicosapentanoïque (EPA) et docosanexanoïque (DHA) pendant l'exposition à l'O₃ chez des rats âgés. En effet, dans cette population, nous avons observé, lors de la première expérimentation, que l'O₃ provoque un stress oxydant pulmonaire qui conduit à une oxydation de l'ADN pulmonaire. Si chez les rats immatures la supplémentation en ω 3 semble limiter le stress oxydant, une même supplémentation chez des individus âgés pourrait avoir des effets très différents. En effet, les rats âgés sont moins réactifs aux ω 3 que des rats adultes (Kotkat, 1999), alors que les rats très jeunes sont très sensibles à la supplémentation en ω 3 (Suarez, 1996). De même la susceptibilité à la peroxydation lipidique pourrait être différente.

Pour cette étude deux groupes de rats, âgés de 20 mois, ont été utilisés : un groupe contrôle et un groupe exposé à l'O₃ et supplémenté en huile de poisson enrichie en ω 3 (O₃ ω 3). Les rats du groupe O₃ ω 3 sont gavés avec de l'huile poisson à raison de 1,5 g/jour/Kg, soit 675 mg/jour/ Kg d'EPA.

Les résultats obtenus dans cette troisième étude sont comparés à ceux obtenus chez les rats âgés dans l'étude I.

Résultats

III.5. Evolution de la masse corporelle [Fig.29]

La courbe de croissance des rats âgés O₃ ω 3 est comparable à celle des rats du groupe contrôle. Cependant la masse corporelle des deux groupes est significativement différente dès le début de l'exposition.

III.6. Paramètres ventilatoires [Tab. 10; Fig. 30]

III.6.1. En condition basale (normoxie)

Les valeurs de fréquence respiratoire et de volume courant sont similaires entre les rats des groupes contrôle et O₃ ω 3 en condition normoxique. Si l'on compare ces données aux valeurs de fréquence respiratoire et de VT mesurées, sur les rats âgés exposés à l'O₃ lors de

l'étude I, il n'y a pas de différence significative entre les 3 groupes en normoxie [Tab. 10]. Ainsi, il n'existe pas de différence de débit ventilatoire (en ml/min et ml/min/100 g) entre les 3 groupes de rats âgés comparés en normoxie.

III.6.2. Ventilation en condition hypoxique (10 % O₂)

L'augmentation du \dot{V}_E et \dot{V}_E spécifique à 1, 4 et 10 minutes est similaire chez les rats des groupes contrôle et O₃ω3. Mais cette augmentation du \dot{V}_E et \dot{V}_E spécifique, à 4 et 10 minutes d'hypoxie, est statistiquement plus importante chez le groupe de rats âgés exposé à l'O₃ (étude I) comparé au groupe contrôle (+ 70 % et + 50 % à 4 et 10 minutes, respectivement). Après 10 minutes d'hypoxie, le débit ventilatoire spécifique est significativement plus faible chez les rats O₃ω3 par comparaison aux rats exposés à l'O₃.

La fréquence respiratoire et le volume courant ne sont pas différents entre les groupes contrôle et O₃ω3 durant toute la durée de l'hypoxie [Tab. 10]. En comparant ces données à celles obtenues lors de la première étude, les rats âgés exposés à l'O₃ ont une fréquence ventilatoire plus élevée par rapport au contrôle (+ 27 %, + 49 % et + 61 % à 1, 4 et 10 minutes d'hypoxie, respectivement). Les valeurs de VT recueillies dans la première étude sur les rats âgés exposés à l'O₃ sont comparables à celles des groupes contrôle et O₃ω3.

III.7. Production et élimination des ROS au niveau pulmonaire

III.7.1. Consommation d'O₂ et production d'H₂O₂ mitochondriale [Tab. 11]

La consommation d'O₂ aux états 4 et 3 n'est pas différente entre les groupes contrôle et O₃ω3. Toutefois, la consommation d'O₂ mitochondriale à l'état IV est significativement plus élevée chez les rats âgés exposés à l'O₃ par rapport au groupe contrôle (+ 50 %).

Le RCR est similaire entre les groupes contrôle et O₃ω3, alors qu'il est significativement plus faible chez les rats âgés exposés à l'O₃ en comparaison des groupes contrôle et O₃ω3.

Le rapport ADP/O et l'OPR sont similaires chez les trois groupes de rats comparés dans cette troisième étude.

Un problème de sensibilité du fluorimètre ne nous a pas permis de détecter un signal convenable en présence de succinate seul, lors de cette troisième étude. Afin d'avoir une

production largement supérieure au bruit de fond, nous avons mesuré la production maximale d'H₂O₂ en présence de succinate et de l'antimycine A, qui inhibe le complexe III. Dans cette condition la production de H₂O₂ est très importante et correspond à la production d'H₂O₂ maximale liée au transport reverse des électrons du complexe II au complexe I.

Dans ces conditions, la production maximale d'H₂O₂ à l'état IV n'est pas statistiquement différente entre les rats du groupe contrôle et O₃ω3.

III.7.2. Activités des enzymes antioxydantes

Dans le poumon, les activités de la SOD cytosolique et mitochondriale sont similaires chez les rats âgés des groupes contrôle et O₃ω3 [Fig. 31]. Mais l'activité de l'isoforme cytosolique de la SOD est deux fois plus élevée chez les rats âgés exposés à l'O₃ par rapport aux groupes contrôle et O₃ω3.

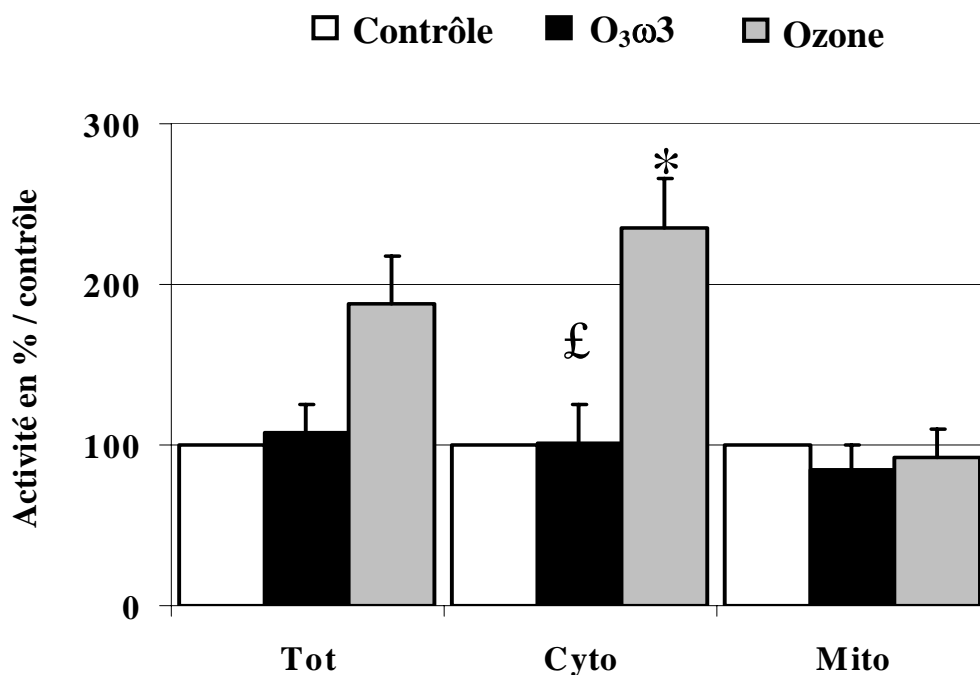


Figure 31: **Activité de la superoxyde dismutase (SOD) pulmonaire chez les rats âgés des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3).** SOD Tot: activité SOD totale; SOD cyto: activité de l'isoforme cytosolique, SOD mito: activité de l'isoforme mitochondriale. *: différence significative par rapport au contrôle. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, par la moyenne ± SEM. Contrôle et O₃ω3 (n = 5), Ozone (n = 9).

Les activités de la GPx et de la CAT ne sont pas différentes entre les groupes contrôle et O₃ω3 [Fig. 32]. L'activité de la GPx est significativement plus élevée (+ 30 %) chez les rats

âgés par rapport au groupe contrôle. Par contre, l'activité de la CAT est plus faible (- 20 %) dans le groupe exposé à l'O₃ par rapport au contrôle.

III.7.3. Dommages oxydatifs de l'ADNn

III.7.3.a. Contenu en 8-oxodGuo [Fig. 33]

Le taux de 8-oxodGuo pulmonaire n'est pas différent entre les groupes contrôle et O₃ω3. Toutefois, le contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn est significativement plus élevé chez les rats exposés à l'O₃ (étude I) comparés aux groupes contrôle et O₃ω3 (respectivement, + 70 % et + 100 %).

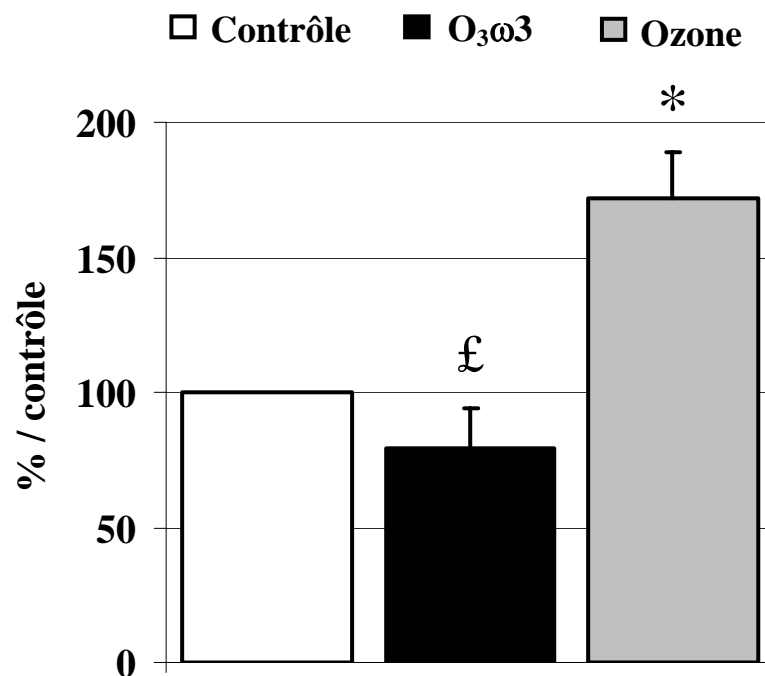


Figure 33: **Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn pulmonaire, chez des rats âgés contrôle et supplémentés en ω3 exposés à l'O₃.***: différence significative par rapport au contrôle. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, par la moyenne ± SEM, Contrôle et O₃ω3 (n = 5), Ozone (n = 9).

III.7.3.b. Contenu en adduits de l'ADN issues de la peroxydation lipidique

Le contenu en HNE-dGuo mesuré dans cette troisième étude est inférieur à la limite de détection du système HLPC-MS/MS.

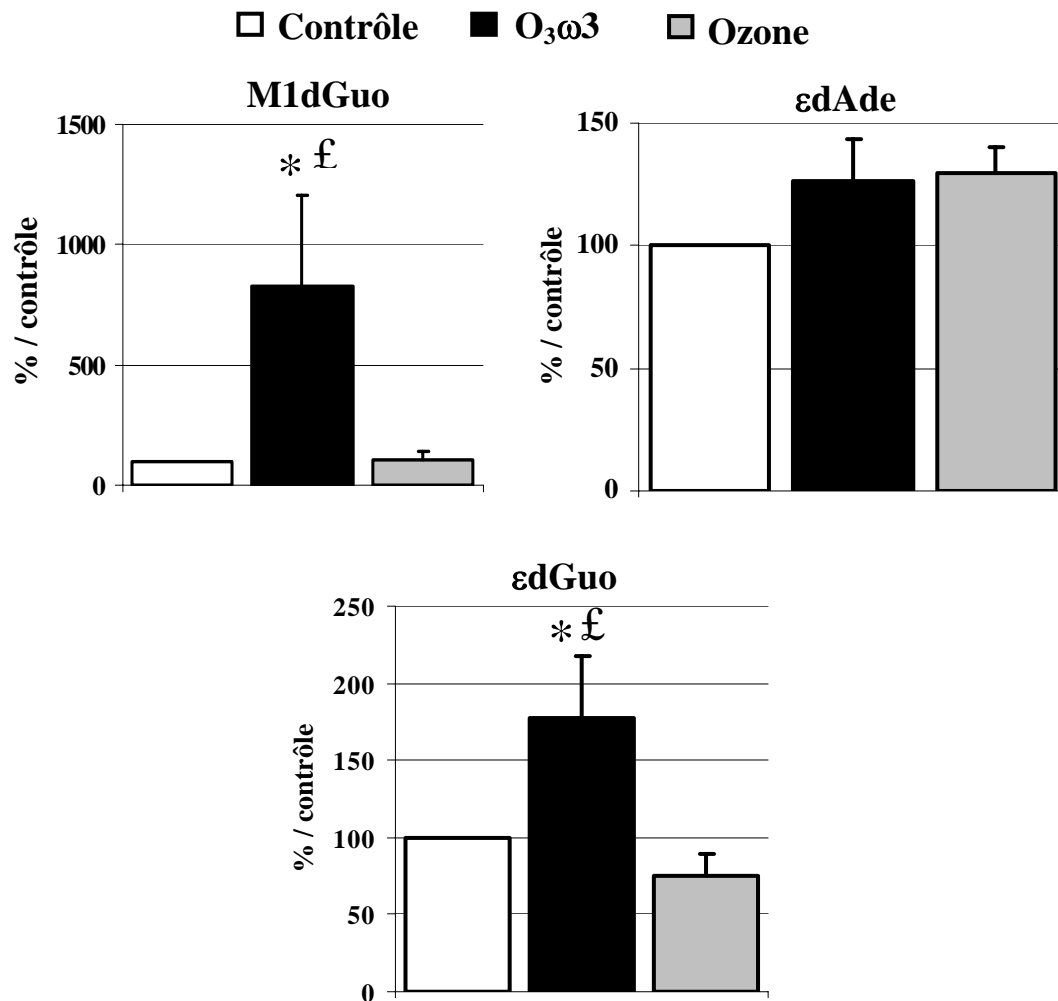


Figure 34: Contenu en M1dGuo, εdGuo et εdAde dans l'ADNn pulmonaire chez les rats âgés des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω₃ (O₃ω₃). M1dGuo, pyrimido-[1,2α]purin-10(3H)-un. εdAde, 1,N⁶-ethenodeoxyadenine; εdGuo, 1,N²-ethenodeoxyguanosine. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, par la moyenne ± SEM, Contrôle et O₃ω₃ (n = 5), Ozone (n = 9).

Le contenu pulmonaire en M1dGuo est multiplié par 8 chez les rats du groupe O₃ω₃ en comparaison des rats contrôle et exposés à l'O₃ [Fig. 34]. Le contenu en εdAde dans l'ADNn pulmonaire n'est pas différent entre les trois groupes comparés. Enfin, le contenu en εdGuo est augmenté dans le poumon des rats O₃ω₃ comparés aux rats contrôle et exposés à l'O₃. (+ 70 % et + 120 % par rapport aux groupes contrôle et exposé à l'O₃, respectivement).

III.8. Susceptibilité au stress oxydant au niveau hépatique

III.8.1. Dégâts oxydatifs dans l'ADNn hépatique [Fig. 35 et 36]

Les contenus en 8-oxodGuo, ϵ dAde et ϵ dGuo dans l'ADNn hépatique sont similaires chez les groupes contrôle et O₃ ω 3. Par contre, les taux de M1dGuo et HNE-dGuo sont fortement augmentés chez les rats du groupe O₃ ω 3 ($\times 2$, et $\times 6$ respectivement) en comparaison du groupe contrôle.

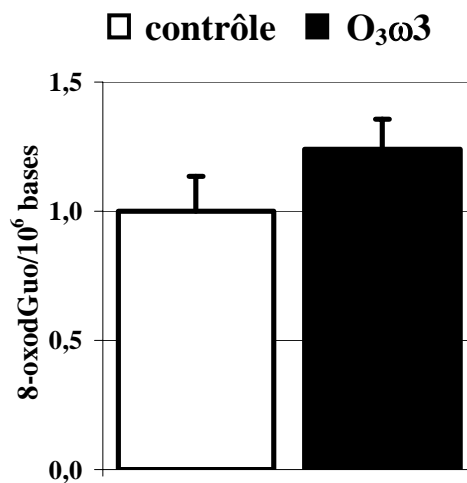


Figure 35: Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn hépatique chez les rats âgés des groupes contrôle et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω 3 (O₃ ω 3). Les résultats sont exprimés en lésions par 10⁶ bases et en moyenne \pm SEM, n = 5 dans chaque groupe.

III.8.2. Activités des enzymes antioxydantes [Tab. 12]

Les activités des isoformes de la SOD ne sont pas différentes entre les rats âgés O₃ ω 3 et contrôle. Il en est de même pour l'activité totale de la SOD. Les activités de la GPx et CAT hépatiques sont similaires entre les rats des groupes contrôle et O₃ ω 3

III.8.3. fonctionnement mitochondrial hépatique [Tab. 13]

La consommation d'O₂ des mitochondries hépatiques des animaux du groupe contrôle n'est pas différente de celle mesurée chez le groupe O₃ω3, aux états respiratoires 4 et 3. Par conséquent, le RCR n'est pas modifié non plus. Le rapport ADP/O et la vitesse de phosphorylation oxydative sont similaires dans les deux groupes d'animaux étudiés.

La production maximale d'H₂O₂ n'est pas altérée par la superposition de la supplémentation en ω3 et de l'exposition à l'O₃ au niveau des mitochondries hépatiques.

Discussion

Lors de la première étude nous avons montré qu'une exposition à l'O₃ à raison de 0,5 ppm, provoque chez le rat âgé un stress oxydant pulmonaire poussé, qui se traduit par une augmentation du contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn, et l'augmentation des activités de la SOD cytosolique et de la GPx. Ce stress oxydant pulmonaire est associé à un découplage des oxydations phosphorylantes mitochondriales, qui est une adaptation permettant de limiter la production de ROS par la chaîne respiratoire. Cependant, le stress oxydant consécutif à l'exposition à l'O₃ n'est pas associé à une augmentation du contenu dans l'ADNn en adduits issus de la peroxydation lipidique. Comme nous l'avons fait dans la deuxième étude sur les rats immatures, nous avons supplémente les rats âgés exposés à l'O₃ avec des Oméga-3.

Comme chez les rats immatures, les rats âgés exposés à l'O₃ et supplémentés en ω3 ne présentent pas d'augmentation du contenu en 8-oxodGuo. Ainsi alors que les rats âgés uniquement exposés à l'O₃ ont une augmentation de 70 % du contenu en 8-oxodGuo par rapport au groupe contrôle, nous n'avons pas observé de modification chez les rats supplémentés en ω3. De même, les activités des principales enzymes antioxydantes restent similaires chez les rats des groupes O₃ω3 et contrôle. Il semble donc que chez les rats supplémentés en ω3 l'exposition à l'O₃ n'a pas provoqué un stress oxydant pulmonaire poussé. Comme nous l'avons rappelé précédemment, l'une des principales causes du stress oxydant pulmonaire lors de l'exposition à l'O₃ est l'inflammation (Bhalla, 1999). Or les phénomènes inflammatoires pulmonaires peuvent être limités lors de supplémentation en EPA. Bien que

les rats âgés soient moins réactifs à une telle supplémentation (Kotkat, 1999), nous observons, comme chez les rats immatures, une limitation du stress oxydant pulmonaire induit par l'O₃.

L'étude des paramètres ventilatoires par pléthysmographie nous montre que l'hyperréactivité à l'hypoxie observée chez les rats âgés exposés à l'O₃ n'est pas présente quand ces derniers sont supplémentés en ω3. En effet, dans la première étude nous avons montré que l'exposition à l'O₃ conduit à une augmentation supérieure de la fréquence respiratoire qui n'est pas observée chez les rats O₃ω3. La supplémentation en ω3 a donc limité l'hyperréactivité ventilatoire à l'hypoxie. Si, comme nous l'avons proposé dans l'interprétation des résultats de la première étude, cette hyperréactivité peut être attribuée à une stimulation des fibres C par les médiateurs de l'inflammation (Lee, 2001), la supplémentation en ω3 pourrait avoir limité l'inflammation pulmonaire et par conséquent la stimulation des fibres C. Mais l'étude des effets différentiels de la supplémentation en ω3 sur les systèmes de régulation des paramètres ventilatoires demandera des travaux complémentaires au sein du laboratoire.

Si une supplémentation en EPA peut limiter la réponse inflammatoire pulmonaire en concurrençant le métabolisme des eicosanoïdes pro-inflammatoires, elle peut être aussi la cause d'une augmentation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique pulmonaire. Du fait que dans notre modèle expérimental, l'O₃ provoque un stress oxydant marqué, une telle possibilité doit être considérée. Si chez les rats immatures la supplémentation en ω3 ne semble pas avoir augmenté la susceptibilité à la peroxydation lipidique, il est clair qu'elle est fortement augmentée chez les rats âgés. En effet, le contenu en M1dGuo dans l'ADN pulmonaire est huit fois plus élevé chez les rats O₃ω3 que chez les rats contrôle ou simplement exposés à l'O₃. De plus, nous observons une augmentation plus modérée en εdGuo. L'accentuation des contenus en adduits de l'ADN issus de la peroxydation lipidique peut être due à une augmentation de la peroxydation lipidique et donc à l'augmentation de production de MDA et de 4-HNE, mais aussi à l'inhibition temporaire des activités des enzymes de réparations des dégâts de l'ADN. L'absence d'augmentation du contenu en M1dGuo et εdGuo chez les rats âgés exposés à l'O₃ laisse penser que l'O₃ ne provoque pas de diminution des capacités de réparations, ni d'augmentation de la peroxydation lipidique. Si l'exposition à l'O₃ seule ne semble pas réduire les capacités d'élimination des adduits issus de la peroxydation lipidique, nous pouvons donc supposer que la forte augmentation en M1dGuo et εdGuo est liée à une accentuation de la peroxydation des acides gras polyinsaturés. La supplémentation en ω3 chez les rats âgés accentue donc clairement la susceptibilité à la

peroxydation lipidique au niveau pulmonaire. Le 4-HNE est produit essentiellement à partir de la peroxydation des $\omega 6$ (Chung, 2003b), alors que le MDA est un aldéhyde majeur produit par la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés (Marnett, 1999). Ainsi, nous pouvons expliquer la plus forte augmentation du contenu en M1dGuo par rapport aux adduits formés par fixation du 4-HNE ou du 2, 3-epoxy-4-HNE, du fait de la faible teneur en $\omega 6$ présente dans l'huile de poisson. Si la supplémentation en $\omega 3$ a limité l'oxydation directe de l'ADN, elle a aussi provoqué, en parallèle, une augmentation de la susceptibilité à la peroxydation au niveau pulmonaire.

Chez les rats immatures la supplémentation en $\omega 3$ a potentiellement augmenté la susceptibilité à la peroxydation au niveau hépatique. Toutefois, les rats âgés exposés à l'O₃ et supplémentés en $\omega 3$ présentent une forte augmentation des adduits M1dGuo et HNE-dGuo au niveau hépatique. Les adduits majoritairement accumulés sont donc des produits issus de la formation de MDA et de 4-HNE. Nous constatons, dès lors, un profil différent de celui observé dans le poumon, où l'augmentation concernait principalement le M1dGuo. Dans le foie, le taux de HNE-dGuo est multiplié par six, alors que le 4-HNE est produit essentiellement à partir d' $\omega 6$ et que la supplémentation en huile de poisson a une teneur faible en $\omega 6$. Mais les travaux de Calviello *et al* (1997) nous indiquent que le contenu en AGPI $\omega 6$ dans les membranes hépatiques est plus important (+ 40 %) que celui mesuré au niveau pulmonaire chez des rats non supplémentés. De plus, comme nous l'avons rappelé précédemment, le contenu hépatique en vitamine E diminue lors d'une supplémentation en huile de poisson alors qu'il reste inchangé dans le poumon, ceci malgré un apport externe en vitamine E (Ando, 2000). Une telle différence entre ces deux tissus en terme de composition lipidique peut être à l'origine de l'augmentation en HNE-dGuo dans l'ADNn hépatique.

Comme pour les rats immatures, pour déterminer si l'augmentation en adduits de l'ADN observée chez les rats âgés au niveau hépatique est liée à un stress oxydant consécutif à l'exposition à l'O₃ ou une simple augmentation de probabilité de peroxydation lipidique, il sera nécessaire d'étudier l'impact d'une exposition à l'O₃ sur l'équilibre pro/antioxydant hépatique. En effet, l'augmentation du contenu en M1dGuo et HNE-dGuo hépatique peut être due à une augmentation de la peroxydation lipidique ou à une baisse des capacités d'élimination des produits secondaires tels que le MDA et le 4-HNE ou encore à une diminution des activités de réparation de l'ADN.

Cette forte augmentation du contenu en adduits de l'ADN issus de la peroxydation lipidique n'est pas accompagnée d'une modification de l'oxydation directe de l'ADN comme

nous le montrent les contenus similaires en 8-oxodGuo hépatiques entre les rats des groupes contrôle et O₃ω3. De même, nous n'observons pas de mobilisation des enzymes antioxydantes hépatiques, dont la GPx. Enfin, l'activité mitochondriale n'est en aucun point modifiée par la superposition de la supplémentation en ω3 et l'exposition à l'O₃.

Conclusions de l'étude III

Les résultats de cette étude montrent qu'une supplémentation en acides gras polyinsaturés $\omega 3$ à raison de 675 mg d'EPA/kg/jour permet de limiter le stress oxydant pulmonaire résultant d'une exposition à l' O_3 chez les rats âgés. Toutefois, cet effet bénéfique apparent de la supplémentation en $\omega 3$, qui réduit le contenu en marqueur de l'oxydation directe de l'ADN, et normalise le fonctionnement pulmonaire en réponse à l'hypoxie, s'accompagne d'une forte augmentation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation en M1dGuo et ϵ dGuo dans l'ADNn pulmonaire est due à une augmentation de la production de MDA et 4-HNE plutôt qu'à une baisse des capacités de réparation de l'ADN.

En parallèle au poumon, le foie est lui aussi le siège d'une augmentation du contenu en adduits de l'ADNn issus de la peroxydation lipidique.

En comparaison de la deuxième étude, nous confirmons que l'âge influe sur les effets de la supplémentation en $\omega 3$, et qu'une telle supplémentation semble bénéfique au niveau pulmonaire chez les rats immatures alors qu'elle a des effets délétères pour l'ADNn chez les rats âgés.

DISCUSSION GENERALE

Ces travaux de thèse avaient plusieurs objectifs. Le premier était de définir les atteintes mitochondriales et les modifications de la balance pro/anti-oxydant pulmonaire chez le rat adulte (6 mois) lors d'une exposition à l'O₃ se rapprochant de l'exposition humaine. Le deuxième objectif était de déterminer l'influence de l'âge sur les conséquences d'une telle exposition à l'O₃, en étudiant trois groupes de rats d'âges distincts: immatures (21 jours), adultes et âgés (20 mois). Enfin, le dernier objectif était d'évaluer si une supplémentation en huile de poisson enrichie en acides gras polyinsaturés de la famille des ω3 pouvait limiter les effets de l'O₃ chez les populations les plus fragiles à l'O₃, mais aussi si une telle supplémentation en AGPI pouvait être à l'origine d'une augmentation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique. En parallèle nous avons évalué l'impact fonctionnel de l'O₃ au niveau du système respiratoire.

La première étude nous a permis de définir qu'une exposition à 0,5 ppm, 12 heures par jour pendant 7 jours n'altère la fonction respiratoire que chez les rats immatures et âgés. En effet, la réponse ventilatoire à l'hypoxie est accentuée chez les rats immatures et âgés après exposition à l'O₃, alors que nous n'avons détecté aucune modification ventilatoire chez les adultes.

En nous basant sur les paramètres mesurés lors de ces travaux, notre protocole d'exposition à l'O₃ ne semble pas provoquer de stress oxydant pulmonaire chez le rat adulte. Cette dose d'O₃ peut paraître très élevée si elle est comparée aux expositions urbaines. Mais il faut prendre en compte que l'induction de manifestations inflammatoires pulmonaires similaires chez l'Homme et le rat requiert une dose d'O₃ au moins 5 fois supérieure chez le rat (Hatch, 1994). De ce fait, nous pouvons considérer que 0,5 ppm (980 µg/m³) est équivalente à une exposition humaine d'environ 200 µg/m³. L'absence de modification de la fonction pulmonaire, des contenus en bases modifiées de l'ADNn, du fonctionnement mitochondrial, du contenu en HSP₇₂ ainsi que des activités des principales enzymes antioxydantes chez les rats adultes, semble être en partie liée à la présence de périodes de récupération dans notre protocole d'exposition à l'O₃. En effet, une exposition intermittente conduit à l'atténuation progressive des conséquences inflammatoires de l'exposition à l'O₃ (Van Bree, 1992; Van Bree, 2002).

L'hyper-réactivité ventilatoire observée sous hypoxie illustre la plus grande sensibilité des rats immatures à l'O₃. La dose d'O₃ inhalée peut expliquer, en partie, cette sensibilité accrue par rapport aux adultes. Comme la dose d'O₃ inhalée est directement liée au débit ventilatoire, les rats immatures qui présentent un débit ventilatoire spécifique très supérieur (3

fois) à celui des adultes, pourraient donc inhaler une dose plus importante d'O₃ comme l'ont supposé Shore *et al.* (2002). D'autre part, cette hyper-réactivité ventilatoire à l'hypoxie est certainement liée à l'incapacité des rats immatures à mettre en place des mécanismes ventilatoires de protection lors de l'inhalation d'O₃. Ainsi, alors que les adultes hypoventilent en réponse à l'O₃, les rats immatures maintiennent une ventilation élevée qui conduirait à des altérations pulmonaires plus importantes par rapport à des adultes (Shore, 2002). En revanche, chez les rats âgés, le débit ventilatoire est similaire à celui des adultes. Arito *et al.* (1997) rapportent une hypoventilation moins marquée en réponse à l'inhalation aiguë d'O₃ chez les rats âgés par rapport aux adultes.

En relation avec ces altérations du fonctionnement respiratoire, nous avons détecté une perturbation de l'équilibre pro/antioxydant pulmonaire uniquement chez les populations immatures et âgées.

Chez les rats immatures, l'exposition à l'O₃ augmente de façon importante les contenus en 8-oxodGuo dans l'ADNn et en HSP₇₂ pulmonaire. Ces deux paramètres nous indiquent clairement qu'un déséquilibre entre production et élimination des ROS s'est installé dans les cellules pulmonaires pendant l'exposition à l'O₃. Mais les principales enzymes antioxydantes n'ont pas pour autant été mobilisées, comme le montrent les activités de la GPx, CAT et des isoformes cytosolique et mitochondriale de la SOD qui restent inchangées après l'exposition à l'O₃. La consommation d'O₂ et la production d'H₂O₂ des mitochondries pulmonaires ne sont pas modifiées.

Comme nous l'avons rappelé précédemment les paramètres ventilatoires pourraient expliquer en partie la plus grande fragilité des rats immatures au stress oxydant consécutif à l'O₃. Mais la plus faible activité de la GPx chez les animaux immatures par rapport aux adultes, ainsi que l'absence de mobilisation des enzymes antioxydantes pourraient avoir favorisé l'apparition d'un stress oxydant pulmonaire. Comme cette absence de stimulation des enzymes antioxydantes pulmonaires en réponse à un stress oxydant est commune au modèle d'hyperoxie (Laudert, 1994), nous pouvons nous demander si elle n'est pas liée à un défaut de transduction du signal stress oxydant. Enfin, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'augmentation du contenu en 8-oxodGuo après exposition à l'O₃ soit due à une baisse des activités de réparation de l'ADN. En effet, une semaine d'inhalation de chromate de sodium chez le rat induit une augmentation du taux de 8-oxodGuo dans le poumon, alors qu'il retourne au niveau basal si l'exposition est prolongée (Maeng, 2003). Ce retour à la normale coïncide avec la récupération totale de l'activité de réparation de l'ADN. A notre connaissance

il n'y a pas de travaux qui se soient intéressés aux capacités de réparation de l'ADN pendant la maturation pulmonaire ou en réponse à l'inhalation d'O₃.

Chez les rats âgés nous avons observé que l'exposition à l'O₃ a pour conséquence une forte augmentation de l'oxydation de l'ADN pulmonaire. En plus de cet indice reconnu de stress oxydant cellulaire, l'activité même des mitochondries est altérée dans le sens d'une réduction de la production de ROS par induction d'un découplage des oxydations phosphorylantes. L'augmentation des activités de la SOD cytosolique et de la GPx semble être soit insuffisante, soit trop tardive ou alors, mal coordonnée. En effet, l'augmentation forte de l'activité de dismutation de l'O₂^{•-} associée à une faible augmentation de l'activité de la GPx pourrait être interprétée comme un élément influençant l'apparition du stress oxydant chez les rats âgés exposés à l'O₃.

Il apparaît que les facteurs qui ont pu concourir à l'augmentation de la fragilité des rats âgés au stress oxydant induit par l'O₃ pourraient être: i) la baisse des capacités pulmonaires de défense contre les ROS, comme nous le montre la plus faible activité de la GPx chez les rats âgés par rapport aux adultes. De même, le vieillissement est accompagné d'une absence de stimulation des HSP₇₂ que nous pouvons relier à une altération des capacités d'induction de HSP₇₂ observée dans d'autres tissus (Demirel, 2003). ii) l'augmentation en 8-oxodGuo qui peut être en relation avec une baisse des capacités de réparation pendant les premières phases d'exposition à l'O₃, comme nous en avons fait l'hypothèse pour les rats immatures.

La mitochondrie ne semble pas être une source majeure de ROS pulmonaire en réponse à l'O₃. Toutefois, comme toute exposition à l'O₃ supérieure ou égale à 0,4 ppm provoque une réaction inflammatoire pulmonaire chez le rat (Bhalla, 1999), nous pouvons proposer que la réponse inflammatoire à l'O₃ est en partie impliquée dans le stress oxydant observé chez les rats immatures et âgés. En effet, une exposition aiguë à l'O₃ provoque une réponse inflammatoire qui tend à disparaître si l'exposition est répétée ou prolongée (van Bree, 1992 et 2002). Cette inflammation pulmonaire pourrait être directement responsable des modifications du contrôle de la ventilation sous hypoxie, du fait que les fibres C sont stimulées par des médiateurs de l'inflammation (Lee, 2001). De même, la fragilité accrue des rats âgés vis à vis de l'O₃ peut s'expliquer par le fait que le vieillissement est associé à une augmentation de la susceptibilité à l'inflammation (Chung, 2001).

Dans ce contexte, les propriétés anti-inflammatoires pulmonaires reconnues des acides gras polyinsaturés (AGPI) de la famille des ω3 (Simopoulos, 2002) pourraient limiter les

effets de l'O₃ chez les rats immatures et âgés. Paradoxalement, l'augmentation du nombre de doubles liaisons C-C est potentiellement à l'origine d'une susceptibilité accrue à la peroxydation lipidique.

Une supplémentation en ω 3 chez les rats immatures pendant l'exposition à l'O₃, à raison de 1,5 g d'huile de poisson/Kg/jour, a eu un impact fonctionnel important. L'hyper-réactivité à l'hypoxie observée chez les rats immatures exposés à l'O₃ n'est plus présente quand ils sont supplémentés en ω 3. L'action des ω 3 semble aller au-delà d'une simple réduction du stress oxydant pulmonaire qui limiterait la stimulation des fibres C, potentiellement responsables de l'hyperréactivité à l'hypoxie (Lee, 2001). Ainsi, une réponse complexe en terme de régulation spécifique du volume courant et de la fréquence respiratoire est observée chez les rats immatures supplémentés en ω 3 et fera l'objet de travaux spécifiques complémentaires.

Nous avons observé que la supplémentation en ω 3 chez les rats immatures exposés à l'O₃ limite le stress oxydant pulmonaire. En effet, les contenus pulmonaires en 8-oxodGuo et HSP₇₂ ne sont pas augmentés chez les rats supplémentés en ω 3 lors de l'exposition à l'O₃. Cette protection contre le stress oxydant consécutif à l'O₃ n'est pas accompagnée, au niveau pulmonaire, d'une augmentation du contenu en adduits issus de la peroxydation lipidique dans l'ADNn. La supplémentation a eu pour conséquence d'accentuer la consommation d'O₂ mitochondrial à l'état respiratoire 4 qui conduit à une baisse du couplage des oxydations phosphorylantes. Ces résultats s'inscrivent dans l'hypothèse selon laquelle une plus grande proportion en ω 3 dans les membranes mitochondriales serait associée à une perméabilisation aux protons de la membrane interne (Mcmillin, 1992; Porter, 1996; Stillwell, 1997). Il a été proposé que le découplage mitochondrial, par augmentation du passage de proton à travers la membrane interne mitochondriale, régule la production d'H₂O₂ mitochondriale (Brand, 2000; Korshunov, 1997). La réduction de la production d'H₂O₂ mitochondriale pulmonaire chez les rats immatures supplémentés en ω 3 lors de l'exposition à l'O₃ semble confirmer cette théorie.

En réalisant la même supplémentation en ω 3 chez les rats âgés, nous avons pu confirmer un effet important de l'âge (Kotkat, 1999). Ainsi, si l'oxydation de l'ADN pulmonaire est limitée par la supplémentation, nous avons détecté une forte augmentation du contenu en M1dGuo et ϵ dGuo, adduits de l'ADN issus de la peroxydation lipidique. Cette accentuation de la fixation du MDA ou du produit de l'époxydation du 4-HNE sur les bases de l'ADN ne semble pas liée à une baisse de l'activité de réparation de ce type de dommage de

l'ADN. En effet, les contenus en M1dGuo et ϵ dGuo ne sont pas modifiés chez les rats exposés uniquement à l'O₃, signe que le stress oxydant induit par l'O₃ n'inhibe pas les activités de réparation de ce type de dégâts de l'ADN. La supplémentation en ω 3 chez les rats âgés exposés à l'O₃ induirait donc une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau pulmonaire. L'absence de modification de l'activité mitochondriale et des activités des enzymes antioxydantes pulmonaires chez les rats âgés exposés à l'O₃ et supplémenté en ω 3, démontre que les modifications observées chez les rats non supplémentés sont essentiellement liées aux espèces radicalaires primaires plutôt qu'aux produits secondaires issus des réactions d'oxydation.

Le foie est un tissu qui a été très étudié pour déterminer si une supplémentation en ω 3 accentue la susceptibilité à la peroxydation lipidique. Si cette augmentation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique est encore sujet à débat, nous pouvons avec nos travaux apporter quelques éléments. Il est clair que nous devons confirmer ces interprétations en nous intéressant plus spécifiquement au foie. En effet, que ce soit chez les rats immatures ou âgés exposés à l'O₃ et supplémentés en ω 3, il y a une forte augmentation du contenu en adduits issus de la peroxydation lipidique dans l'ADN hépatique. Nous devons vérifier que cette augmentation est directement liée à la supplémentation en ω 3, même si l'ampleur de l'augmentation des contenus des différents adduits laisse penser qu'il y a une réelle accentuation de la peroxydation lipidique. L'âge semble influencer le type de lésion formée dans de telles conditions. Ainsi, chez les rats immatures, l'exposition à l'O₃ couplée à la supplémentation en ω 3 est associée à une accumulation de MDA fixé à l'ADN, alors que chez les rats âgés une exacerbation de fixation du MDA et du 4-HNE est observée. Le 4-HNE étant produit essentiellement à partir des ω 6 et la supplémentation ayant une teneur faible (2,6 %) en ω 6, il semble que la susceptibilité à la peroxydation lipidique soit accrue chez les rats âgés par rapport aux immatures.

CONCLUSION GENERALE

Ces travaux nous ont permis de définir qu'une exposition à raison de 0,5 ppm d'O₃, 12 heures par jour, pendant 7 jours ne provoque pas de stress oxydant pulmonaire chez les rats adultes, et représente donc une exposition que nous pouvons qualifier de modérée.

Nous avons confirmé que les populations immatures et âgées étaient plus susceptibles à l'exposition à l'O₃ que les rats adultes. L'O₃ engendre un stress oxydant qui conduit à une modification de la régulation la fonction ventilatoire et à l'oxydation de l'ADNn pulmonaire. Les éléments qui participent à la plus grande susceptibilité à l'O₃ sont différents selon l'âge. Les rats immatures inhalent une dose d'O₃ supérieure, et les principales enzymes antioxydantes mesurées dans cette étude ne sont pas mobilisées. Les rats âgés sont caractérisés par une faible capacité de réponse pour lutter contre les stress oxydant via les enzymes antioxydantes et les HSP₇₂.

Enfin, une supplémentation en ω 3 permet de limiter l'oxydation directe de l'ADNn pulmonaire chez les rats immatures et âgés. La supplémentation semble avoir des effets bénéfiques, par une limitation des phénomènes inflammatoires, qui conduit à une disparition de l'hyper-réactivité ventilatoire à l'hypoxie.

Paradoxalement, une telle supplémentation en ω 3 chez les rats âgés provoque une accentuation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique qui conduit à une augmentation du contenu en adduits de l'ADN au niveau pulmonaire.

Le foie semble aussi le siège d'une peroxydation lipidique accrue chez les populations immatures et âgées supplémentées en ω 3. Cependant ces résultats demandent à être confirmés.

PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont ouvert un large terrain d'investigation sur la régulation de l'équilibre prooxydant/ antioxydant. Les paramètres que nous avons appréciés dans cette étude ne couvrent malheureusement pas toute la sphère complexe du stress oxydant, et il semble que d'autres systèmes de production et de défense contre le stress oxydant pourraient expliquer, aussi, les différences de réponse observées entre les 3 populations d'âge exposées à l'O₃.

Ainsi nous avons conclu que la mitochondrie n'est pas la principale source de ROS pulmonaire lors d'une exposition à l'O₃ mais peut être plutôt considérée comme un indice de réponse cellulaire au stress oxydant. L'étude de la réponse inflammatoire chez les 3 populations est donc une orientation justifiée de ces travaux. Afin de savoir si l'âge influence la réponse inflammatoire à l'O₃ (avec notre protocole) de manière à expliquer les différences observées en terme de dégâts oxydatifs, deux approches peuvent être envisagées:

i) La quantification de la réponse inflammatoire à l'O₃, par dosage de marqueurs de l'inflammation pulmonaires tels que l'IL-6, et le TNF- α . En effectuant une cinétique d'apparition de la réponse inflammatoire à l'O₃ au cours de l'exposition, nous pourrions déterminer si l'âge interfère avec l'adaptation à l'O₃ qui conduit à la disparition de l'inflammation.

ii) La mesure de la production de ROS au niveau de macrophages issus de lavage bronchoalvéolaire permettrait de déterminer si le stress oxydant consécutif à l'exposition à l'O₃ est spécifiquement dû aux capacités intrinsèques des macrophages à produire des ROS. Il sera nécessaire de mettre au point la technique de mesure de la production de ROS au niveau cellulaire par fluorimètre en utilisant le DCFH.

Dans la régulation des systèmes antioxydants, nous pouvons proposer de compléter la gamme de paramètres évalués lors de cette thèse. En effet, chez les rats immatures exposés à l'O₃ nous avons observé, comme il a été montré dans un modèle d'hyperoxie, l'absence de stimulation rapide de la SOD, CAT et GPx en réponse au stress oxydant. Ce résultat peut être dû à un défaut des voies de transduction du signal ou alors à une mobilisation d'autres systèmes antioxydants. Ainsi le glutathion pourrait jouer un rôle très important dans la régulation du stress oxydant pulmonaire (O'donovan, 2000). De même, d'autres enzymes antioxydantes telles que les peroxyredoxines peuvent être stimulées au niveau pulmonaire.

Pour les dégâts oxydatifs consécutifs à l'exposition à l'O₃, une cinétique d'apparition et de récupération permettrait de mieux cerner les conséquences à moyen terme d'une telle exposition, surtout chez les rats immatures et âgés. L'étude des altérations de l'équilibre pro/antioxydant après une période de récupération nous permettra de déterminer la réversibilité des dégâts oxydatifs de l'ADN en fonction de l'âge.

La supplémentation en acides gras polyinsaturés de la famille des ω 3 nous a permis de montrer une accumulation de MDA et 4 - HNE au niveau des bases de l'ADN. Comme peu d'études ont démontré, *in vivo*, qu'une supplémentation en AGPI pouvait augmenter le contenu en adduits de l'ADN issus de la peroxydation lipidique (Nair, 1997), il est intéressant de faire le lien entre la production de 4 - HNE et MDA par la peroxydation lipidique et la formation des adduits de l'ADN. Ainsi doser le 4-HNE et le MDA pourrait apporter des informations pertinentes sur la cinétique de formation des adduits de l'ADN, *in vivo*.

Bien sûr, afin de favoriser les effets positifs d'une supplémentation en ω 3 lors d'une exposition à l'O₃, faire varier la composition de l'huile serait aussi un outil intéressant pour comprendre le lien entre peroxydation lipidique et adduits de l'ADN. Une supplémentation exclusive en ω 3, avec une dose plus faible pourrait limiter les effets néfastes de la supplémentation.

Dans le foie, il est nécessaire de confirmer l'augmentation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique après supplémentation en ω 3 en étudiant l'impact de l'exposition à l'O₃ sur l'équilibre pro/antioxydant hépatique. Nous pourrions ainsi vérifier, chez les rats immatures et âgés, si notre protocole d'exposition à l'O₃ s'accompagne d'une augmentation des dégâts oxydatifs de l'ADN au niveau hépatique. Ainsi, nous pourrions conclure si l'augmentation du contenu en adduits de l'ADN issus de la peroxydation lipidique observée chez les animaux supplémentés en ω 3 et exposés à l'O₃ est la conséquence de la supplémentation en ω 3 ou de l'exposition à l'O₃, ou la combinaison des deux facteurs.

Enfin, un moyen de lutte efficace contre les effets néfastes de l'O₃ semble être la restriction alimentaire. Déjà connue pour retarder le vieillissement, elle limiterait la mortalité due à une exposition aiguë à l'O₃, et réduirait les dégâts pulmonaires (Elsayed, 2001). Les effets de la restriction alimentaire (- 30 %) pourraient mettre en jeu deux voies: une action

directe, par la modulation favorable de l'équilibre pro/antioxydant des capacités antioxydantes (Elsayed, 2001), une action indirecte en diminuant l'adiposité du rat. En effet, la réponse inflammatoire à l'O₃ est accentuée chez les souris obèses (Shore, 2003). Ainsi, la réduction du volume pulmonaire et la leptinémie consécutives à l'obésité pourraient expliquer l'augmentation de fragilité à l'O₃ de souris obèse. Au sein du laboratoire nous nous sommes intéressés à une souche de rat spécifique dérivée de la souche Wistar, la souche Lou/C. Le rat Lou/C a la particularité d'ingérer 60 à 70 % de la ration alimentaire d'un Wistar (Couturier, 2002), d'être hyperactif (Servais, 2003) et de ne pas développer d'obésité avec l'âge (Perrin, 2003). Les rats de la souche Sprague Dawley que nous avons utilisés lors de ces travaux de thèse, ont une accumulation des dépôts adipeux au cours du vieillissement. L'étude des effets de l'O₃ sur des rats Lou/C immatures et âgés, pourrait révéler des effets différents liés à leur faible adiposité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**: 121-126; 1984.

Anantharaju, A.; Feller, A.; Chedid, A. Aging Liver. A review. *Gerontology* **48**: 343-353; 2002.

Ando, K.; Nagata, K.; Yoshida, R.; Kikugawa, K.; Suzuki, M. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs. *Lipids* **35**: 401-407; 2000.

Arito, H.; Takahashi, M.; Iwasaki, T.; Uchiyama, I. Age-related changes in ventilatory and heart rate responses to acute ozone exposure in the conscious rat. *Ind. Health* **35**: 78-86; 1997.

Arsenijevic, D.; Onuma, H.; Pecqueur, C.; Raimbault, S.; Manning, B. S.; Miroux, B.; Couplan, E.; Alves-Guerra, M. C.; Gubern, M.; Surwit, R.; Bouillaud, F.; Richard, D.; Collins, S.; Ricquier, D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* **26**: 435-439; 2000.

Azzone, G. F.; Zoratti, M.; Petronilli, V.; Pietrobon, D. The stoichiometry of H⁺ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling. *J. Inorg. Biochem.* **23**: 349-356; 1985.

Barja, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**: 347-366; 1999.

Baybutt, R. C.; Rosales, C.; Brady, H.; Molteni, A. Dietary fish oil protects against lung and liver inflammation and fibrosis in monocrotaline treated rats. *Toxicology* **175**: 1-13; 2002.

- Beckman, K. B.; Ames, B. N. Mitochondrial aging: open questions. *Ann. N Y Acad. Sci.* **854**: 118-127; 1998.
- Bhalla, D. K. Ozone-induced lung inflammation and mucosal barrier disruption: toxicology, mechanisms, and implications. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **2**: 31-86; 1999.
- Bohr, V. A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* **32**: 804-812; 2002a.
- Bohr, V. A.; Stevnsner, T.; de Souza-Pinto, N. C. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene* **286**: 127-134; 2002b.
- Bornholdt, J.; Dybdahl, M.; Vogel, U.; Hansen, M.; Loft, S.; Wallin, H. Inhalation of ozone induces DNA strand breaks and inflammation in mice. *Mutat. Res.* **520**: 63-71; 2002.
- Boveris, A.; Oshino, N.; Chance, B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **128**: 617-630; 1972.
- Brand, M. D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* **35**: 811-820; 2000.
- Brunekreef, B.; Holgate, S. T. Air pollution and health. *Lancet* **360**: 1233-1242; 2002.
- Burri, P. H. The postnatal growth of the rat lung. 3. Morphology. *Anat. Rec.* **180**: 77-98; 1974.
- C**adet, J.; Delatour, T.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Pouget, J. P.; Ravanat, J. L.; Sauvaigo, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* **424**: 9-21; 1999.

- Cadet, J.; Douki, T.; Frelon, S.; Sauvaigo, S.; Pouget, J. P.; Ravanat, J. L. Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. *Free Radic. Biol. Med.* **33**: 441-449; 2002.
- Calviello, G.; Palozza, P.; Franceschelli, P.; Bartoli, G. M. Low-dose eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid administration modifies fatty acid composition and does not affect susceptibility to oxidative stress in rat erythrocytes and tissues. *Lipids* **32**: 1075-1083; 1997.
- Cha, S. H.; Fukushima, A.; Sakuma, K.; Kagawa, Y. Chronic docosahexaenoic acid intake enhances expression of the gene for uncoupling protein 3 and affects pleiotropic mRNA levels in skeletal muscle of aged C57BL/6NJcl mice. *J. Nutr.* **131**: 2636-2642; 2001.
- Chen, L. C.; Qu, Q. Formation of intracellular free radicals in guinea pig airway epithelium during in vitro exposure to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**: 96-101; 1997.
- Chen, Q.; Vazquez, E. J.; Moghaddas, S.; Hoppel, C. L.; Lesnefsky, E. J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* **278**: 36027-36031; 2003.
- Cheng, K. C.; Cahill, D. S.; Kasai, H.; Nishimura, S.; Loeb, L. A. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J. Biol. Chem.* **267**: 166-172; 1992.
- Chung, F. L.; Pan, J.; Choudhury, S.; Roy, R.; Hu, W.; Tang, M. Formation of trans-4-hydroxy-2-nonenal- and other enal-derived cyclic DNA adducts from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and their roles in DNA repair and human p53 gene mutation. *Mutat Res* **531**: 25-36; 2003a.
- Chung, F. L.; Pan, J.; Choudhury, S.; Roy, R.; Hu, W.; Tang, M. S. Formation of trans-4-hydroxy-2-nonenal- and other enal-derived cyclic DNA adducts from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and their roles in DNA repair and human p53 gene mutation. *Mutat. Res.* **531**: 25-36; 2003b.

- Chung, H. Y.; Kim, H. J.; Kim, J. W.; Yu, B. P. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by caloric restriction. *Ann. N Y Acad. Sci.* **928**: 327-335; 2001.
- Cillard, J. and Cillard, P. Prooxidant effect of alpha-tocopherol on essential fatty acids in aqueous media, *Ann. Nutr. Aliment.* **34**: 579-591; 1980.
- Clerch, L. B.; Massaro, D. Rat lung antioxidant enzymes: differences in perinatal gene expression and regulation. *Am. J. Physiol.* **263**: L466-L470; 1992.
- Cohen, D. S.; Palmer, E.; Welch, W. J.; Sheppard, D. The response of guinea pig airway epithelial cells and alveolar macrophages to environmental stress. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **5**: 133-143; 1991.
- Comhair, S. A.; Erzurum, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol.* **283**: L246-L255; 2002.
- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (1996) *L'ozone, indicateur majeur de la pollution photochimique en France: évaluation et gestion du risque de santé.* Technique & Documentation, Paris.
- Cooke, M. S.; Evans, M. D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J.* **17**: 1195-1214; 2003.
- Costa, D. L.; Tepper, J. S.; Stevens, M. A.; Watkinson, W. P.; Doerfler, D. L.; Gelzleichter, T. R.; Last, J. A. Restrictive lung disease in rats exposed chronically to an urban profile of ozone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**: 1512-1518; 1995.
- Cottet-Emard, J. M.; Dalmaz, Y.; Pequignot, J.; Peyrin, L.; Pequignot, J. M. Long-term exposure to ozone alters peripheral and central catecholamine activity in rats. *Pflügers Arch.* **433**: 744-749; 1997.
- Couturier, K.; Servais, S.; Koubi, H.; Sempore, B.; Sornay-Mayet, M. H.; Cottet-Emard, J. M.; Lavoie, J. M.; Favier, R. Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C). *Obes. Res.* **10**: 188-195; 2002.

Croteau, D. L.; ap Rhys, C. M.; Hudson, E. K.; Dianov, G. L.; Hansford, R. G.; Bohr, V. A. An oxidative damage-specific endonuclease from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **272**: 27338-27344; 1997.

Demirel, H. A.; Hamilton, K. L.; Shanely, R. A.; Tumer, N.; Koroly, M. J.; Powers, S. K. Age and attenuation of exercise-induced myocardial HSP72 accumulation. *Am. J. Physiol.* **285**: H1609-H1615; 2003.

Desqueyroux, H.; Pujet, J. C.; Prosper, M.; Le Moullec, Y.; Momas, I. Effects of air pollution on adults with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch. Environ. Health* **57**: 554-560; 2002.

Drew, B.; Phaneuf, S.; Dirks, A.; Selman, C.; Gredilla, R.; Lezza, A.; Barja, G.; Leeuwenburgh, C. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am. J. Physiol.* **284**: R474-R480; 2003.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**: 47-95; 2002.

Echtay, K. S.; Murphy, M. P.; Smith, R. A.; Talbot, D. A.; Brand, M. D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J. Biol. Chem.* **277**: 47129-47135; 2002.

Echtay, K. S.; Esteves, T. C.; Pakay, J. L.; Jekabsons, M. B.; Lambert, A. J.; Portero-Otin, M.; Pamplona, R.; Vidal-Puig, A. J.; Wang, S.; Roebuck, S. J.; Brand, M. D. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J.* **22**: 4103-4110; 2003.

Ecochard, L.; Lhenry, F.; Sempore, B.; Favier, R. Skeletal muscle HSP72 level during endurance training: influence of peripheral arterial insufficiency. *Pflugers Arch.* **440**: 918-924; 2000.

Elichegaray, C.; Colosio, J.; Fangeant, E. La pollution photochimique en France: Le climat de l'ozone en 2001 et sur la période 1991/2001, bilan des dépassements du seuil d'information réglementaire. *ADEME* 2002.

Elsayed, N. M. Diet restriction modulates lung response and survivability of rats exposed to ozone. *Toxicology* **159**: 171-182; 2001.

Fargnoli, J.; Kunisada, T.; Fornace, A. J., Jr.; Schneider, E. L.; Holbrook, N. J. Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 846-850; 1990.

Farwer, S. R.; der Boer, B. C.; Haddeman, E.; Kivits, G. A.; Wiersma, A.; Danse, B. H. The vitamin E nutritional status of rats fed on diets high in fish oil, linseed oil or sunflower seed oil. *Br. J. Nutr.* **72**: 127-145; 1994.

Feng, Z.; Hu, W.; Amin, S.; Tang, M. S. Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. *Biochemistry* **42**: 7848-7854; 2003.

Flohe, L.; Otting, F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* **105**: 93-104; 1984.

Floyd, R. A.; Hensley, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* **23**: 795-807; 2002.

Folinsbee, L. J.; Horstman, D. H.; Kehrl, H. R.; Harder, S.; Abdul-Salaam, S.; Ives, P. J. Respiratory responses to repeated prolonged exposure to 0.12 ppm ozone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**: 98-105; 1994.

Fontaine, E. M.; Moussa, M.; Devin, A.; Garcia, J.; Ghisolfi, J.; Rigoulet, M.; Leverve, X. M. Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1276**: 181-187; 1996.

Fontaine, E. M.; Devin, A.; Rigoulet, M.; Leverve, X. M. The yield of oxidative phosphorylation is controlled both by force and flux. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**: 532-535; 1997.

Frank, R.; Liu, M. C.; Spannhake, E. W.; Mlynarek, S.; Macri, K.; Weinmann, G. G. Repetitive ozone exposure of young adults: evidence of persistent small airway dysfunction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**: 1253-1260; 2001.

Garrido, A.; Garrido, F.; Guerra, R.; Valenzuela, A. Ingestion of high doses of fish oil increases the susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress. *Lipids* **24**: 833-835; 1989.

Gil, A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed. Pharmacother.* **56**: 388-396; 2002.

Gomi, F.; Matsuo, M. Effects of 60% oxygen inhalation on the survival and antioxidant enzyme activities of young and old rats. *Mech. Ageing Dev.* **123**: 1295-1304; 2002.

Gonzalez-Pina, R.; Paz, C. Brain monoamine changes in rats after short periods of ozone exposure. *Neurochem. Res.* **22**: 63-66; 1997.

Gunnison, A. F.; Weideman, P. A.; Sobo, M.; Koenig, K. L.; Chen, L. C. Age-dependence of responses to acute ozone exposure in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **18**: 360-369; 1992.

Hamilton, R. F., Jr.; Li, L.; Eschenbacher, W. L.; Szweda, L.; Holian, A. Potential involvement of 4-hydroxynonenal in the response of human lung cells to ozone. *Am. J. Physiol.* **274**: L8-16; 1998.

- Hansford, R. G.; Hogue, B. A.; Mildaziene, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**: 89-95; 1997.
- Harman, D. Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298-300; 1956.
- Harrison, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic. Biol. Med.* **33**: 774-797; 2002.
- Hatch, G. E.; Slade, R.; Harris, L. P.; McDonnell, W. F.; Devlin, R. B.; Koren, H. S.; Costa, D. L.; McKee, J. Ozone dose and effect in humans and rats. A comparison using oxygen-18 labeling and bronchoalveolar lavage. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**: 676-683; 1994.
- Helbock, H. J.; Beckman, K. B.; Ames, B. N. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol.* **300**: 156-166; 1999.
- Herrero, A.; Barja, G. ADP-regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I- or complex II-linked substrates: implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**: 241-249; 1997.
- Hirano, T.; Yamaguchi, R.; Asami, S.; Iwamoto, N.; Kasai, H. 8-hydroxyguanine levels in nuclear DNA and its repair activity in rat organs associated with age. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **51**: B303-307; 1996.
- Hoppe, P.; Peters, A.; Rabe, G.; Praml, G.; Lindner, J.; Jakobi, G.; Fruhmann, G.; Nowak, D. Environmental ozone effects in different population subgroups. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **206**: 505-516; 2003.

Lanaro, A.; Ialenti, A.; Maffia, P.; Pisano, B.; Di Rosa, M. HSF1/hsp72 pathway as an endogenous anti-inflammatory system. *FEBS Lett.* **499**: 239-244; 2001.

Ischiropoulos, H.; Nadziejko, C. E.; Kumae, T.; Kikkawa, Y. Oxygen tolerance in neonatal rats: role of subcellular superoxide generation. *Am. J. Physiol.* **257**: L411-420; 1989.

Kadenbach, B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1604**: 77-94; 2003.

Kelly, F. J.; Dunster, C.; Mudway, I. Air pollution and the elderly: oxidant/antioxidant issues worth consideration. *Eur. Respir. J. Suppl* **40**: 70s-75s; 2003.

Kikugawa, K.; Yasuhara, Y.; Ando, K.; Koyama, K.; Hiramoto, K.; Suzuki, M. Protective effect of supplementation of fish oil with high n-3 polyunsaturated fatty acids against oxidative stress-induced DNA damage of rat liver in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 6073-6079; 2003.

Kim, H. S.; Kang, S. W.; Rhee, S. G.; Clerch, L. B. Rat lung peroxiredoxins I and II are differentially regulated during development and by hyperoxia. *Am. J. Physiol.* **280**: L1212-L1217; 2001.

Kirichenko, A.; Li, L.; Morandi, M. T.; Holian, A. 4-hydroxy-2-nonenal-protein adducts and apoptosis in murine lung cells after acute ozone exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**: 416-424; 1996.

Koken, P. J.; Piver, W. T.; Ye, F.; Elixhauser, A.; Olsen, L. M.; Portier, C. J. Temperature, air pollution, and hospitalization for cardiovascular diseases among elderly people in Denver. *Environ. Health Perspect.* **111**: 1312-1317; 2003.

Korshunov, S. S.; Skulachev, V. P.; Starkov, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**: 15-18; 1997.

Kotkat, H. M.; Rady, A. A.; Nemcsok, J. Effect of dietary fish oil (active EPA-30) on liver phospholipids in young and aged rats. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **122**: 283-289; 1999.

Kwong, L. K.; Sohal, R. S. Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **350**: 118-126; 1998.

Lanir, A.; Kerem, D.; Gershon, D. Pulmonary oxygen toxicity: lack of tolerance of mice of various ages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 1193-1199; 1981.

Laskin, D. L.; Pendino, K. J.; Punjabi, C. J.; Rodriguez del Valle, M.; Laskin, J. D. Pulmonary and hepatic effects of inhaled ozone in rats. *Environ. Health Perspect.* **102 Suppl 10**: 61-64; 1994.

Laudert, S.; Thibeault, D. W.; Rezaiekhalthigh, M. M.; Mabry, S. M.; Huntrakoon, M. Comparative age-related acute and chronic pulmonary oxygen tolerance in rats. *J. Appl. Physiol.* **77**: 2709-2719; 1994.

Lee, L. Y.; Widdicombe, J. G. Modulation of airway sensitivity to inhaled irritants: role of inflammatory mediators. *Environ. Health Perspect.* **109 Suppl 4**: 585-589; 2001.

Levine, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **32**: 790-796; 2002.

Li, Y.; Huang, T. T.; Carlson, E. J.; Melov, S.; Ursell, P. C.; Olson, J. L.; Noble, L. J.; Yoshimura, M. P.; Berger, C.; Chan, P. H.; et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **11**: 376-381; 1995.

- Liu, Y.; Fiskum, G.; Schubert, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* **80**: 780-787; 2002.
- Long, N. C.; Suh, J.; Morrow, J. D.; Schiestl, R. H.; Murthy, G. G.; Brain, J. D.; Frei, B. Ozone causes lipid peroxidation but little antioxidant depletion in exercising and nonexercising hamsters. *J. Appl. Physiol.* **91**: 1694-1700; 2001.
- Lopez-Torres, M.; Gredilla, R.; Sanz, A.; Barja, G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **32**: 882-889; 2002.
- Lutsch, G.; Vetter, R.; Offhauss, U.; Wieske, M.; Grone, H. J.; Klemenz, R.; Schimke, I.; Stahl, J.; Benndorf, R. Abundance and location of the small heat shock proteins HSP25 and alphaB-crystallin in rat and human heart. *Circulation* **96**: 3466-3476; 1997.
- M**aeng, S. H.; Chung, H. W.; Yu, I. J.; Kim, H. Y.; Lim, C. H.; Kim, K. J.; Kim, S. J.; Ootsuyama, Y.; Kasai, H. Changes of 8-OH-dG levels in DNA and its base excision repair activity in rat lungs after inhalation exposure to hexavalent chromium. *Mutat. Res.* **539**: 109-116; 2003.
- Marnett, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* **424**: 83-95; 1999.
- Mates, J. M.; Perez-Gomez, C.; Nunez de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **32**: 595-603; 1999.
- Mauderly, J. L. Respiratory function responses of animals and man to oxidant gases and to pulmonary emphysema. *J. Toxicol. Environ. Health* **13**: 345-361; 1984.
- Mautz, W. J.; Bufalino, C. Breathing pattern and metabolic rate responses of rats exposed to ozone. *Respir. Physiol.* **76**: 69-77; 1989.

- McDonnell, W. F.; Stewart, P. W.; Andreoni, S.; Seal, E., Jr.; Kehrl, H. R.; Horstman, D. H.; Folinsbee, L. J.; Smith, M. V. Prediction of ozone-induced FEV1 changes. Effects of concentration, duration, and ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**: 715-722; 1997.
- McMillin, J. B.; Bick, R. J.; Benedict, C. R. Influence of dietary fish oil on mitochondrial function and response to ischemia. *Am. J. Physiol.* **263**: H1479-1485; 1992.
- Menzel, D. B. The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress. *Toxicol. Lett.* **72**: 269-277; 1994.
- Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 399-430; 1961.
- Mudway, I. S.; Kelly, F. J. Ozone and the lung: a sensitive issue. *Mol. Aspects Med.* **21**: 1-48; 2000.
- Mustafa, M. G.; DeLucia, A. J.; York, G. K.; Arth, C.; Cross, C. E. Ozone interaction with rodent lung. II. Effects on oxygen consumption of mitochondria. *J. Lab. Clin. Med.* **82**: 357-365; 1973.
- Mustafa, M. G. Augmentation of mitochondrial oxidative metabolism in lung tissue during recovery of animals from acute ozone exposure. *Arch. Biochem. Biophys.* **165**: 531-538; 1974a.
- Mustafa, M. G.; Cross, C. E. Effects of short-term ozone exposure on lung mitochondrial oxidative and energy metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **162**: 585-594; 1974b.
- Mustafa, M. G.; DeLucia, A. J.; Cross, C. E.; York, G. K.; Dungworth, D. L. Effect of ozone exposure on lung mitochondrial oxidative metabolism. *Chest* **66**: suppl:16S-18S; 1974c.

Mustafa, M. G.; Elsayed, N. M.; Ospital, J. J.; Hacker, A. D. Influence of age on the biochemical response of rat lung to ozone exposure. *Toxicol. Ind. Health.* **1**: 29-41; 1985.

Mustafa, M. G. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **9**: 245-265; 1990.

Nair, J.; Vaca, C. E.; Velic, I.; Mutanen, M.; Valsta, L. M.; Bartsch, H. High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **6**: 597-601; 1997.

Nair, J.; Barbin, A.; Velic, I.; Bartsch, H. Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat. Res.* **424**: 59-69; 1999.

Negre-Salvayre, A.; Hirtz, C.; Carrera, G.; Cazenave, R.; Troly, M.; Salvayre, R.; Penicaud, L.; Casteilla, L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J.* **11**: 809-815; 1997.

Nicholls, D. G. A history of UCP1. *Biochem. Soc. Trans.* **29**: 751-755; 2001.

Nogueira, V.; Rigoulet, M.; Piquet, M. A.; Devin, A.; Fontaine, E.; Leverve, X. M. Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *J. Biol. Chem.* **276**: 46104-46110; 2001.

O'Donovan, D. J.; Fernandes, C. J. Mitochondrial glutathione and oxidative stress: implications for pulmonary oxygen toxicity in premature infants. *Mol. Genet. Metab.* **71**: 352-358; 2000.

- P**alombo, J. D.; Lydon, E.; Imrich, A.; Kobzik, L.; Bistran, B.; Forse, R. A. The respiratory burst in rat alveolar macrophages is attenuated after displacement of phospholipid arachidonic acid by n-3 fatty acids in vivo. *Surgical forum* **46**: 316-318; 1995.
- Papa, S.; Guerrieri, F.; Capitanio, N. A possible role of slips in cytochrome C oxidase in the antioxygen defense system of the cell. *Biosci. Rep.* **17**: 23-31; 1997a.
- Papa, S.; Skulachev, V. P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell. Biochem.* **174**: 305-319; 1997b.
- Parnia, S.; Brown, J. L.; Frew, A. J. The role of pollutants in allergic sensitization and the development of asthma. *Allergy* **57**: 1111-1117; 2002.
- Parsell, D. A.; Lindquist, S. (1994) Heat Shock Proteins and Stress Tolerance. In *Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. (Morimoto, R. I. T., A.Georgopoulos, C., ed) pp. 457-494, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Paz, C.; Huitron-Resendiz, S. The effects of ozone exposure on the sleep-wake cycle and serotonin contents in the pons of the rat. *Neurosci. Lett.* **204**: 49-52; 1996.
- Paz, C. Some consequences of ozone exposure on health. *Arch. Med. Res.* **28**: 163-170; 1997.
- Pehowich, D. J. Thyroid hormone status and membrane n-3 fatty acid content influence mitochondrial proton leak. *Biochim. Biophys. Acta.* **1411**: 192-200; 1999.
- Perrin, D.; Soulage, C.; Pequignot, J. M.; Geloën, A. Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia* **46**: 1489-1496; 2003.
- Piotrowski, W. J.; Marczak, J. Cellular sources of oxidants in the lung. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **13**: 369-385; 2000.

Plopper, C. G.; Duan, X.; Buckpitt, A. R.; Pinkerton, K. E. Dose-dependent tolerance to ozone. IV. Site-specific elevation in antioxidant enzymes in the lungs of rats exposed for 90 days or 20 months. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127**: 124-131; 1994.

Plopper, C. G.; Hatch, G. E.; Wong, V.; Duan, X.; Weir, A. J.; Tarkington, B. K.; Devlin, R. B.; Becker, S.; Buckpitt, A. R. Relationship of inhaled ozone concentration to acute tracheobronchial epithelial injury, site-specific ozone dose, and glutathione depletion in rhesus monkeys. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **19**: 387-399; 1998.

Polla, B. S.; Kantengwa, S.; Francois, D.; Salvioli, S.; Franceschi, C.; Marsac, C.; Cossarizza, A. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 6458-6463; 1996.

Porter, R. K.; Hulbert, A. J.; Brand, M. D. Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am. J. Physiol.* **271**: R1550-1560; 1996.

Putman, E.; van Golde, L. M.; Haagsman, H. P. Toxic oxidant species and their impact on the pulmonary surfactant system. *Lung* **175**: 75-103; 1997.

Rahman, I.; Clerch, L. B.; Massaro, D. Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone. *Am. J. Physiol.* **260**: L412-L418; 1991.

Rahman, I.; Massaro, G. D.; Massaro, D. Exposure of rats to ozone: evidence of damage to heart and brain. *Free Radic. Biol. Med.* **12**: 323-326; 1992.

Ravanat, J. L.; Douki, T.; Duez, P.; Gremaud, E.; Herbert, K.; Hofer, T.; Lasserre, L.; Saint-Pierre, C.; Favier, A.; Cadet, J. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* **23**: 1911-1918; 2002.

Romieu, I.; Meneses, F.; Ramirez, M.; Ruiz, S.; Perez Padilla, R.; Sienna, J. J.; Gerber, M.; Grievink, L.; Dekker, R.; Walda, I.; Brunekreef, B. Antioxidant supplementation and respiratory functions among workers exposed to high levels of ozone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**: 226-232; 1998.

Roux, J. C.; Peyronnet, J.; Pascual, O.; Dalmaz, Y.; Pequignot, J. M. Ventilatory and central neurochemical reorganisation of O₂ chemoreflex after carotid sinus nerve transection in rat. *J. Physiol.* **522 Pt 3**: 493-501; 2000.

Samet, J. M.; Hatch, G. E.; Horstman, D.; Steck-Scott, S.; Arab, L.; Bromberg, P. A.; Levine, M.; McDonnell, W. F.; Devlin, R. B. Effect of antioxidant supplementation on ozone-induced lung injury in human subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**: 819-825; 2001.

Sane, S.; Baba, M.; Kusano, C.; Shirao, K.; Andoh, T.; Kamada, T.; Aikou, T. Eicosapentaenoic acid reduces pulmonary edema in endotoxemic rats. *J. Surg. Res.* **93**: 21-27; 2000.

Santa Maria, C.; Ayala, A.; Revilla, E. Changes in superoxide dismutase activity in liver and lung of old rats. *Free Radic. Res.* **25**: 401-405; 1996.

Schmerold, I.; Niedermuller, H. Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cellular DNA from 12 tissues of young and old Sprague-Dawley rats. *Exp. Gerontol.* **36**: 1375-1386; 2001.

Schwartz, J. Role of polyunsaturated fatty acids in lung disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 393S-396S; 2000.

Servais, S.; Couturier, K.; Koubi, H.; Rouanet, J. L.; Desplanches, D.; Sornay-Mayet, M. H.; Sempore, B.; Lavoie, J. M.; Favier, R. Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **35**: 24-32; 2003.

- Shiva, S.; Crawford, J. H.; Ramachandran, A.; Ceaser, E. K.; Hillson, T.; Brookes, P. S.; Patel, R. P.; Darley-Usmar, V. M. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem J Pt*: 2004.
- Shore, S. A.; Johnston, R. A.; Schwartzman, I. N.; Chism, D.; Krishna Murthy, G. G. Ozone-induced airway hyperresponsiveness is reduced in immature mice. *J. Appl. Physiol.* **92**: 1019-1028; 2002.
- Shore, S. A.; Rivera-Sanchez, Y. M.; Schwartzman, I. N.; Johnston, R. A. Responses to ozone are increased in obese mice. *J. Appl. Physiol.* **95**: 938-945; 2003.
- Simopoulos, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* **21**: 495-505; 2002.
- Skulachev, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1363**: 100-124; 1998.
- Smolka, M. B.; Zoppi, C. C.; Alves, A. A.; Silveira, L. R.; Marangoni, S.; Pereira-Da-Silva, L.; Novello, J. C.; Macedo, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am. J. Physiol.* **279**: R1539-R1545; 2000.
- Sohal, R. S.; Ku, H. H.; Agarwal, S.; Forster, M. J.; Lal, H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* **74**: 121-133; 1994.
- Sorace, A.; de Acetis, L.; Alleva, E.; Santucci, D. Prolonged exposure to low doses of ozone: short- and long-term changes in behavioral performance in mice. *Environ. Res.* **85**: 122-134; 2001.
- Stevnsner, T.; Thorslund, T.; de Souza-Pinto, N. C.; Bohr, V. A. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp. Gerontol.* **37**: 1189-1196; 2002.

- Stillwell, W.; Jenski, L. J.; Crump, F. T.; Ehringer, W. Effect of docosahexaenoic acid on mouse mitochondrial membrane properties. *Lipids* **32**: 497-506; 1997.
- St-Pierre, J.; Buckingham, J. A.; Roebuck, S. J.; Brand, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **277**: 44784-44790; 2002.
- Su, W. Y.; Gordon, T. In vivo exposure to ozone produces an increase in a 72-kDa heat shock protein in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* **83**: 707-711; 1997.
- Suarez, A.; Faus, M. J.; Gil, A. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids modify heart, kidney, and lung fatty acid composition in weanling rats. *Lipids* **31**: 345-348; 1996.
- Suarez, A.; Ramirez-Tortosa, M.; Gil, A.; Faus, M. J. Addition of vitamin E to long-chain polyunsaturated fatty acid-enriched diets protects neonatal tissue lipids against peroxidation in rats. *Eur. J. Nutr.* **38**: 169-176; 1999.
- Subjeck, J. R.; Shyy, T. T. Stress protein systems of mammalian cells. *Am. J. Physiol.* **250**: C1-C17; 1986.
- Szczesny, B.; Hazra, T. K.; Papaconstantinou, J.; Mitra, S.; Boldogh, I. Age-dependent deficiency in import of mitochondrial DNA glycosylases required for repair of oxidatively damaged bases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003.
- T**akebayashi, T.; Abraham, J.; Murthy, G. G.; Lilly, C.; Rodger, I.; Shore, S. A. Role of tachykinins in airway responses to ozone in rats. *J. Appl. Physiol.* **85**: 442-450; 1998.
- Tappel, A. L. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol.* **52**: 506-513; 1978.

Tepper, J. S.; Costa, D. L.; Lehmann, J. R.; Weber, M. F.; Hatch, G. E. Unattenuated structural and biochemical alterations in the rat lung during functional adaptation to ozone. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**: 493-501; 1989.

Thannickal, V. J.; Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol.* **279**: L1005-L1028; 2000.

Tsuboyama-Kasaoka, N.; Takahashi, M.; Kim, H.; Ezaki, O. Up-regulation of liver uncoupling protein-2 mRNA by either fish oil feeding or fibrate administration in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**: 879-885; 1999.

Van Bree, L.; Marra, M.; Rombout, P. J. Differences in pulmonary biochemical and inflammatory responses of rats and guinea pigs resulting from daytime or nighttime, single and repeated exposure to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **116**: 209-216; 1992.

van Bree, L.; Dormans, J. A.; Koren, H. S.; Devlin, R. B.; Rombout, P. J. Attenuation and recovery of pulmonary injury in rats following short-term, repeated daily exposure to ozone. *Inhal. Toxicol.* **14**: 883-900; 2002.

Vedal, S.; Brauer, M.; White, R.; Petkau, J. Air pollution and daily mortality in a city with low levels of pollution. *Environ. Health Perspect.* **111**: 45-52; 2003.

Vidal-Puig, A. J.; Grujic, D.; Zhang, C. Y.; Hagen, T.; Boss, O.; Ido, Y.; Szczepanik, A.; Wade, J.; Mootha, V.; Cortright, R.; Muoio, D. M.; Lowell, B. B. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* **275**: 16258-16266; 2000.

Vincent, R.; Adamson, I. Y. Cellular kinetics in the lungs of aging Fischer 344 rats after acute exposure to ozone. *Am. J. Pathol.* **146**: 1008-1016; 1995.

Wolfe, R. R.; Martini, W. Z.; Irtun, O.; Hawkins, H. K.; Barrow, R. E. Dietary fat composition alters pulmonary function in pigs. *Nutrition* **18**: 647-653; 2002.

Wong, C. G.; Bonakdar, M.; Mautz, W. J.; Kleinman, M. T. Chronic inhalation exposure to ozone and nitric acid elevates stress-inducible heat shock protein 70 in the rat lung. *Toxicology* **107**: 111-119; 1996.

Wood, Z. A.; Schroder, E.; Robin Harris, J.; Poole, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 32-40; 2003.

Yuan, Y. V.; Kitts, D. D. Dietary (n-3) fat and cholesterol alter tissue antioxidant enzymes and susceptibility to oxidation in SHR and WKY rats. *J. Nutr.* **133**: 679-688; 2003.

Zackova, M.; Skobisova, E.; Urbankova, E.; Jezek, P. Activating omega-6 polyunsaturated fatty acids and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J. Biol. Chem.* **278**: 20761-20769; 2003.

Zychlinski, L.; Raska-Emery, P.; Balis, J. U.; Montgomery, M. R. Age-related difference in bioenergetics of lung and heart mitochondrial from rats exposed to ozone. *J. Biochem. Toxicol.* **4**: 251-254; 1989.

ANNEXES

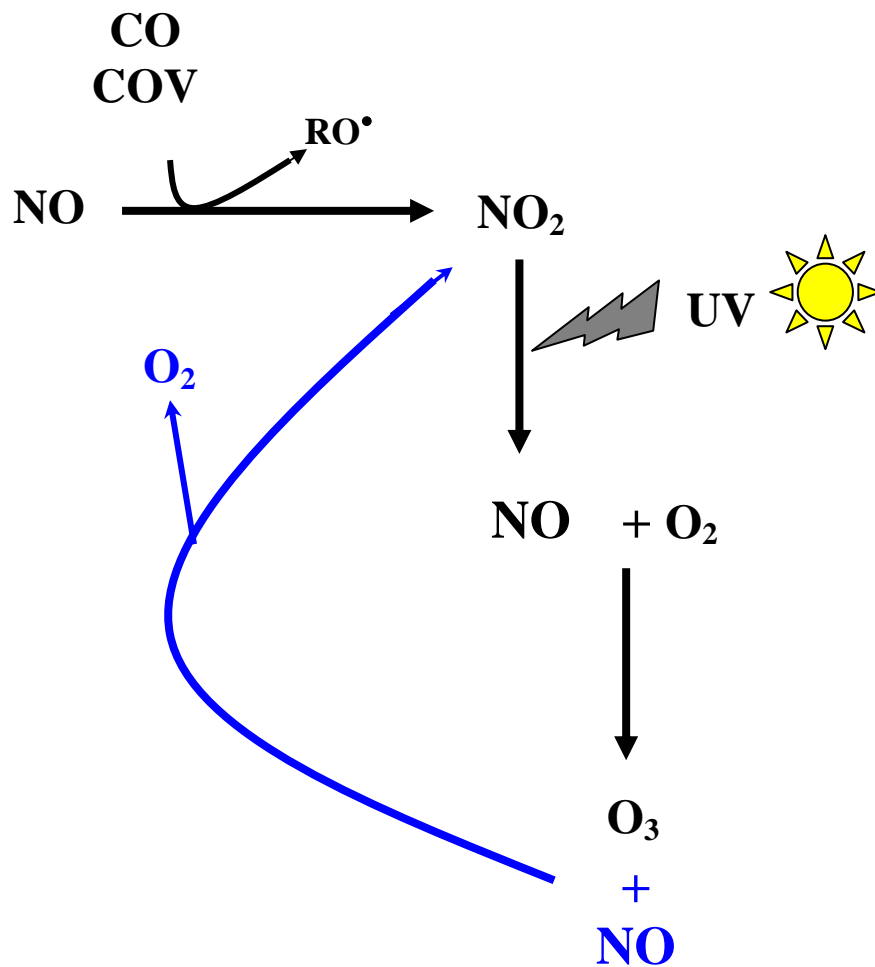


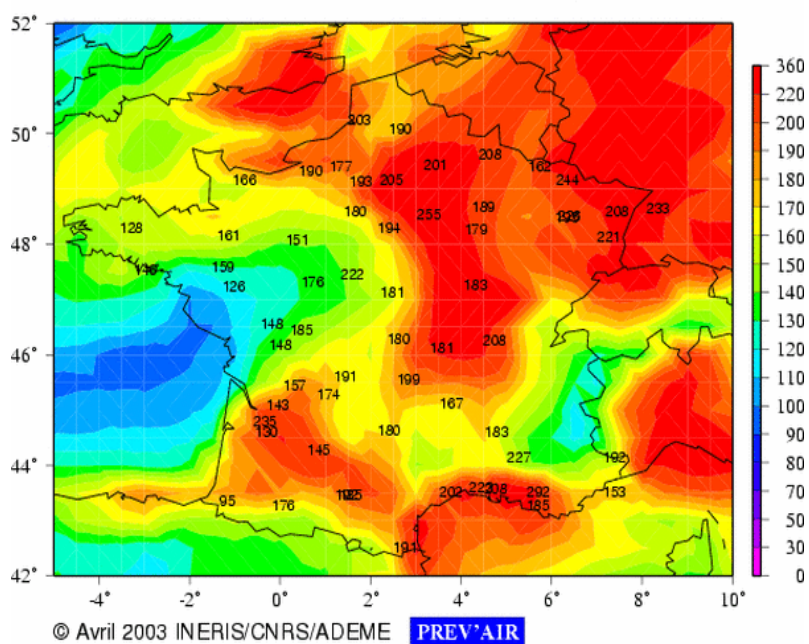
Figure 1: Réactions conduisant à la formation et l'élimination de l'ozone (O₃)

Le CO et les COV et le NO ont pour origine les gaz d'échappements automobiles et les rejets industriels. CO: monoxyde de carbone; COV: composés organiques volatils; UV: ultra-violet.

La formation d'O₃ est liée à l'ensoleillement (UV) et aux polluants primaires (COV, CO, NO_x) émis par les activités industrielles et le trafic routier. Cependant si la concentration en NO est trop élevée (en bleu), il réagit alors avec l'O₃ et réduit donc sa concentration.

Ozone , pic en $\mu\text{g}/\text{m}^3$, le 12/08/2003

Simulation (et observations)



Ozone , pic en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Prévision du 12/08/2003 pour le jour-même

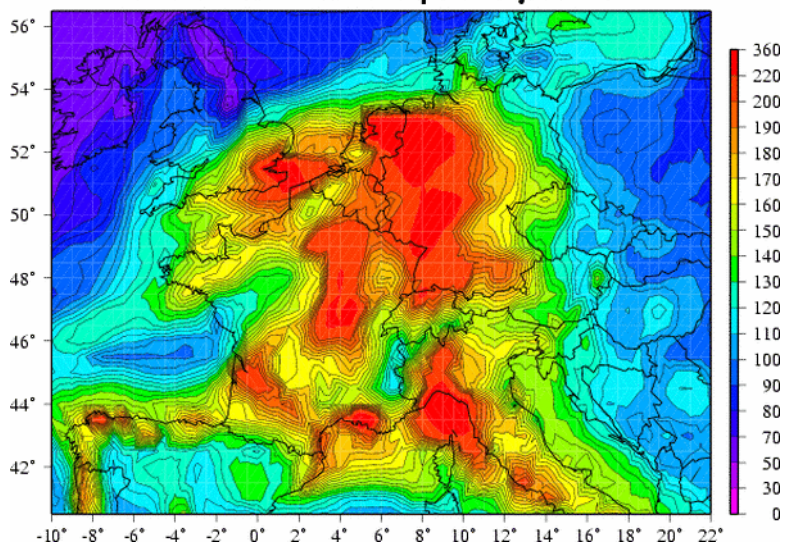


Figure 2. Concentrations d'O₃ maximum mesurées le 12 août 2003 en France et simulation sur l'Europe. Source: ineris

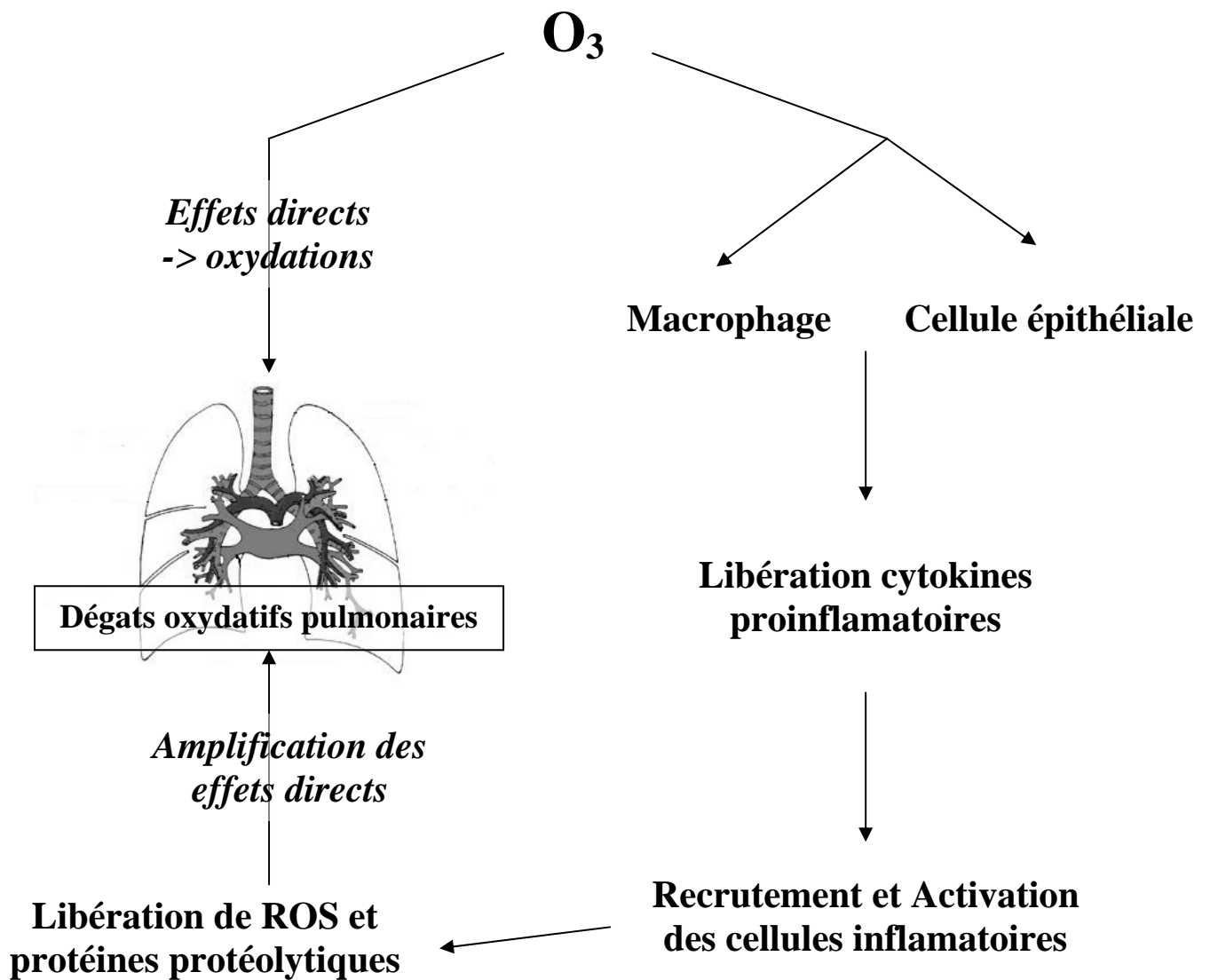


Figure 3. Schéma d'action de l'O₃ au niveau pulmonaire
Adapté de Bhalla DK, 1999

Tableau 1 : Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote :

nom	formule
Oxygène	$^3\text{O}_2$
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\bullet -}$
Radical hydroxyle	OH^\bullet
Radical hydroperoxyde	HOO^\bullet
Radical peroxyde	ROO^\bullet
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO^\bullet
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO^\bullet
Peroxynitrite	ONOO^-
Hypochlorite	ClO^-

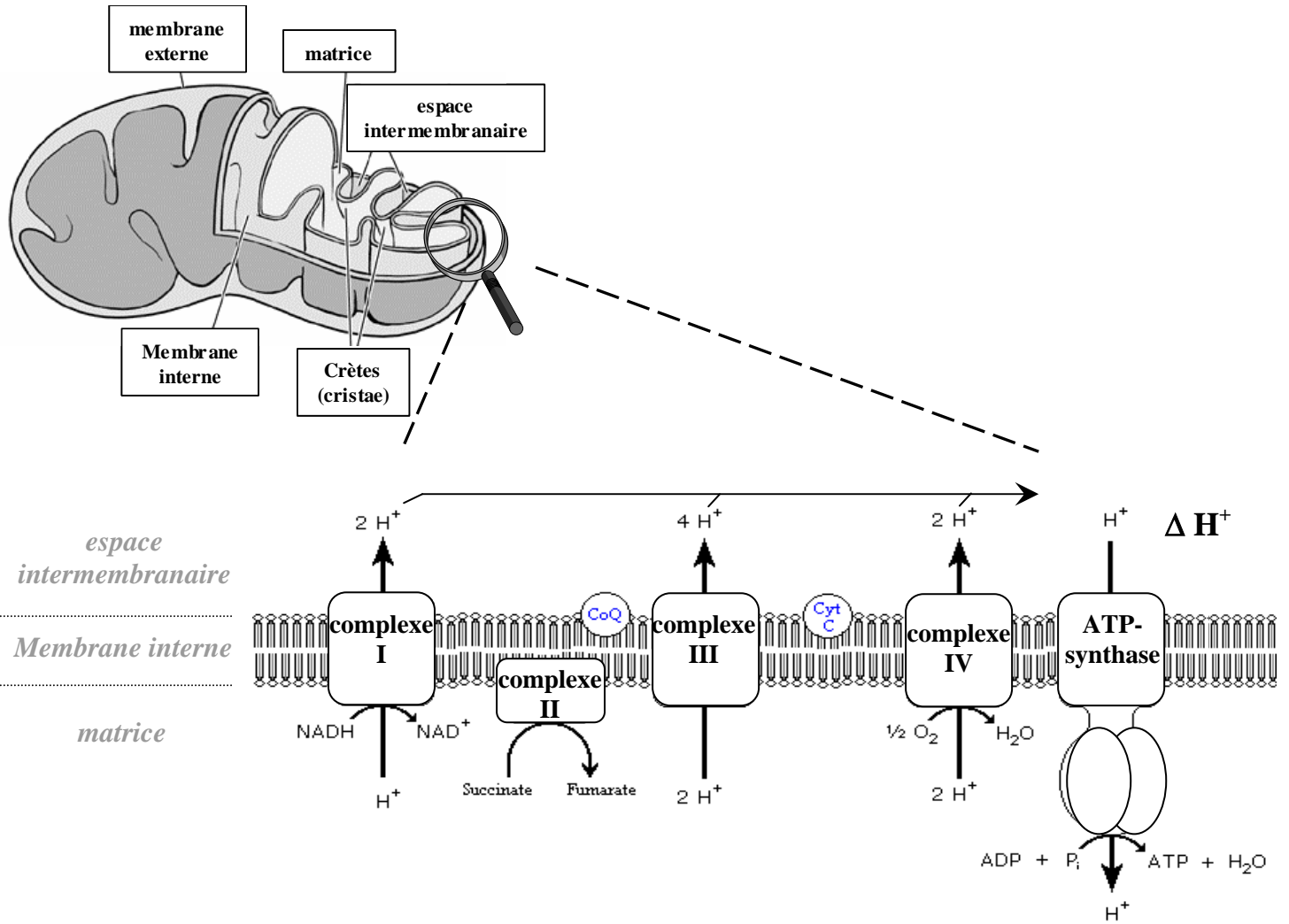


Figure 4. **Mitochondrie et structure de la chaîne respiratoire mitochondriale**

- a) ultra-structure de la mitochondrie
- b) chaîne respiratoire mitochondriale

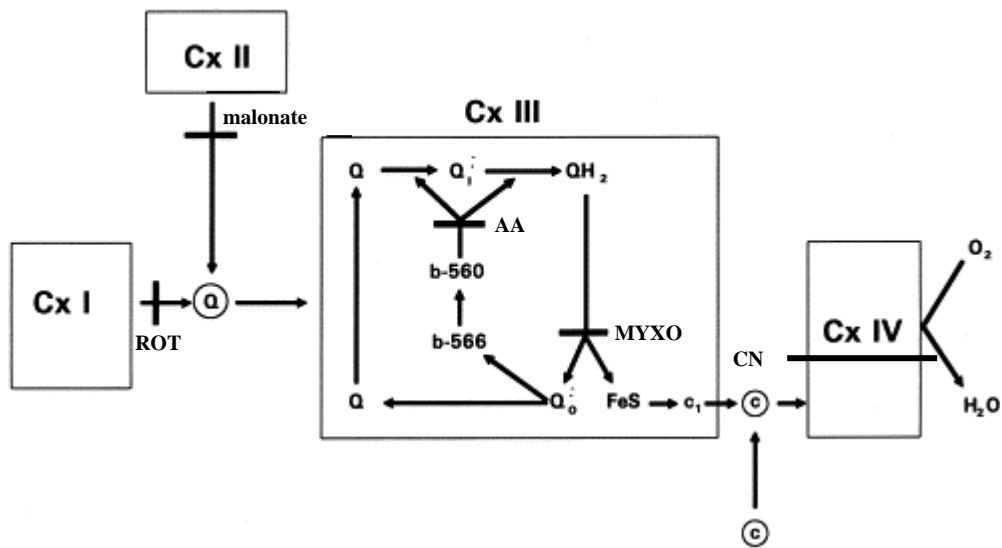


Figure 5. **Site d'action des inhibiteurs au niveau de la chaîne respiratoire.** (Adaptée de Barja, 1999)

La rotenone (ROT) inhibe le flux d'électrons entre le complexe I et le pool d'ubiquinone (Q). Le malonate inhibe le flux d'électrons entre le complexe II et l'ubiquinone. L'antimycine A (AA) bloque le transport des électrons depuis le cytochrome b-560 to Q ou Q_i⁻ au niveau du complexe III. Alors que le myxothiazol (MYXO) inhibe le flux d'électrons depuis l'ubiquinol (QH₂) au centre FeS du complexe III. Le cyaniure (CN) inibe le complexe IV. Q_i⁻, ubisemiquinone "in" (coté matriciel); Q_o⁻, ubisemiquinone "out" (coté intermembranaire); FeS, centre fer-souffre du complexe III; c₁, cytochrome c₁; and c, cytochrome c.

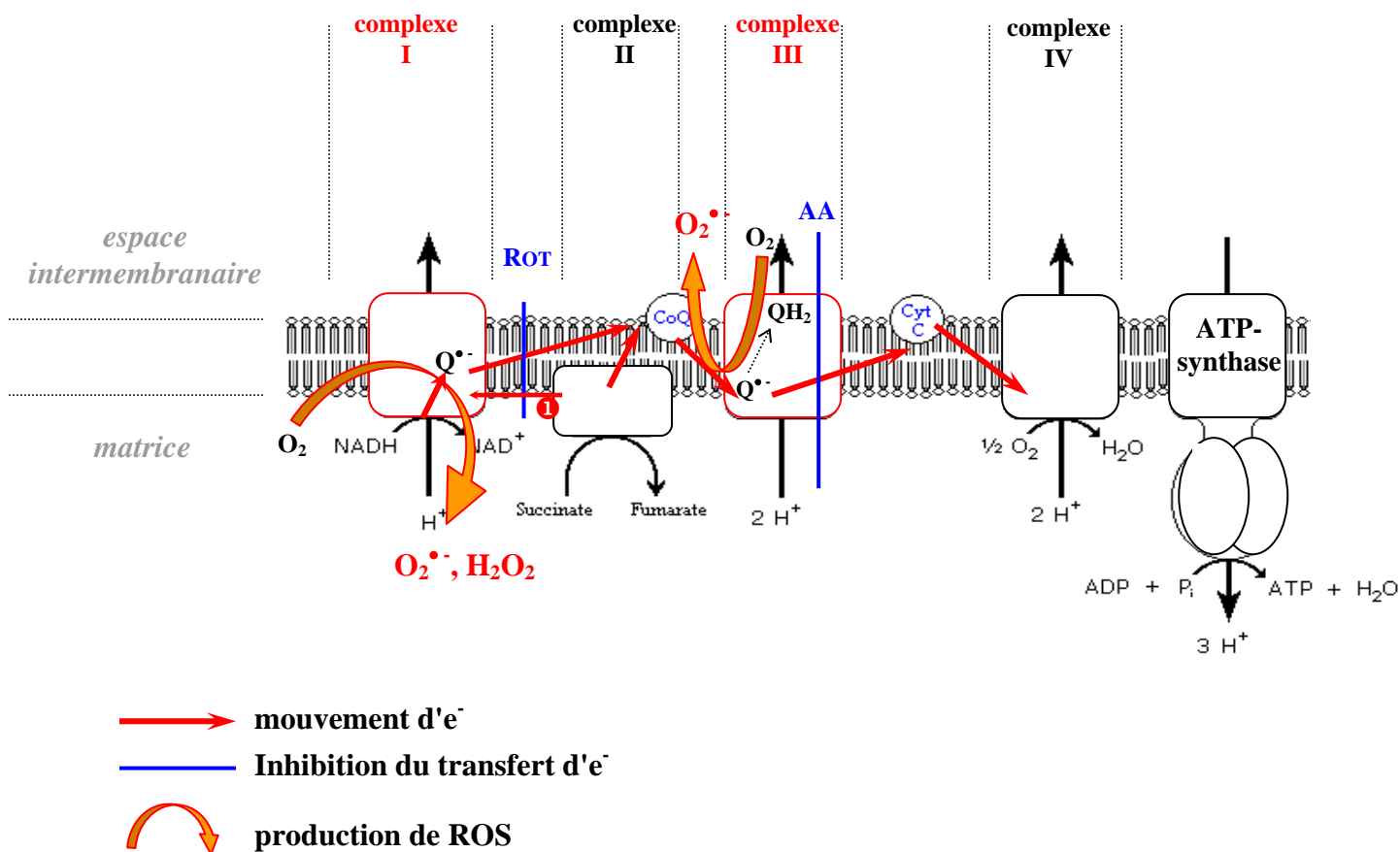


Figure 6. **Production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.**

Deux sites de production de O₂^{•-} sont reconnus: le site FMN (Flavine mononucléotidique) du complexe I et le cycle de quinone dans le complexe III. L'utilisation de la roténone (ROT) et de l'antimycine A (AA) a permis de localiser la production de ROS au niveau de ces complexes et de mettre en évidence que le mouvement inverse des électrons du complexe II au I (❶) en présence d'AA est responsable d'une forte production de ROS au niveau du complexe I.

SOD: superoxyde
dismutase
Prx: peroxyredoxines
GPx: glutathion
peroxydase
CAT: catalase
AoxnE: antioxydants
non enzymatiques
HSP: protéine de stress
ADNn et mt: nucléaire
et mitochondrial
ROOH: hydroperoxyde

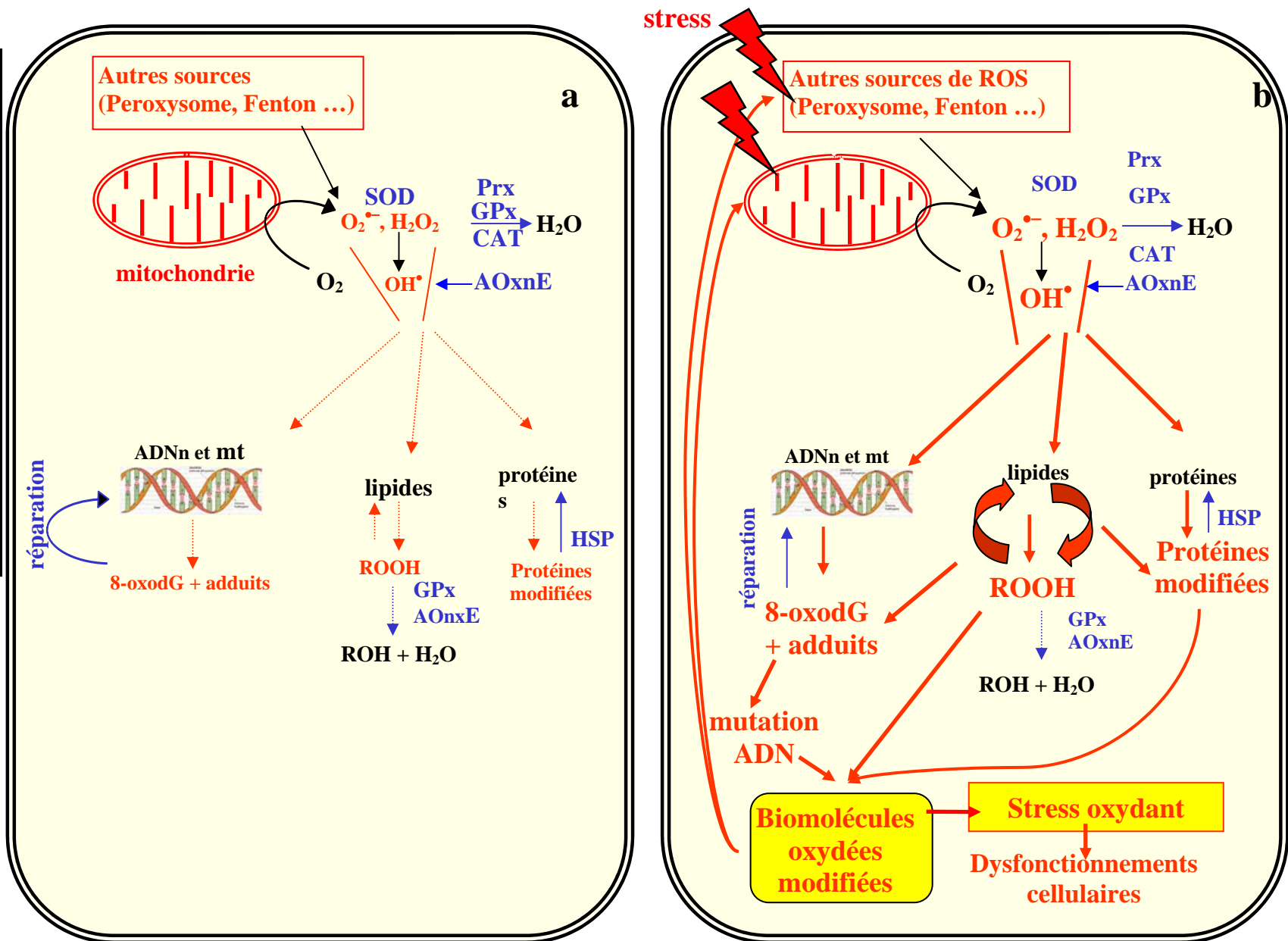


Figure 7. **Représentation schématique de la balance prooxydant/antioxydant cellulaire**, en situation basale (a) et (b) après action d'un stress (polluant, alimentation...). En bleu sont représentés les systèmes qui permettent de limiter les dégâts oxydatifs, et en rouge les molécules oxydées et/ou oxydantes. (b): l'initiation de dégâts oxydatifs peut conduire à un cercle vicieux qui augmente la production de molécules oxydantes.

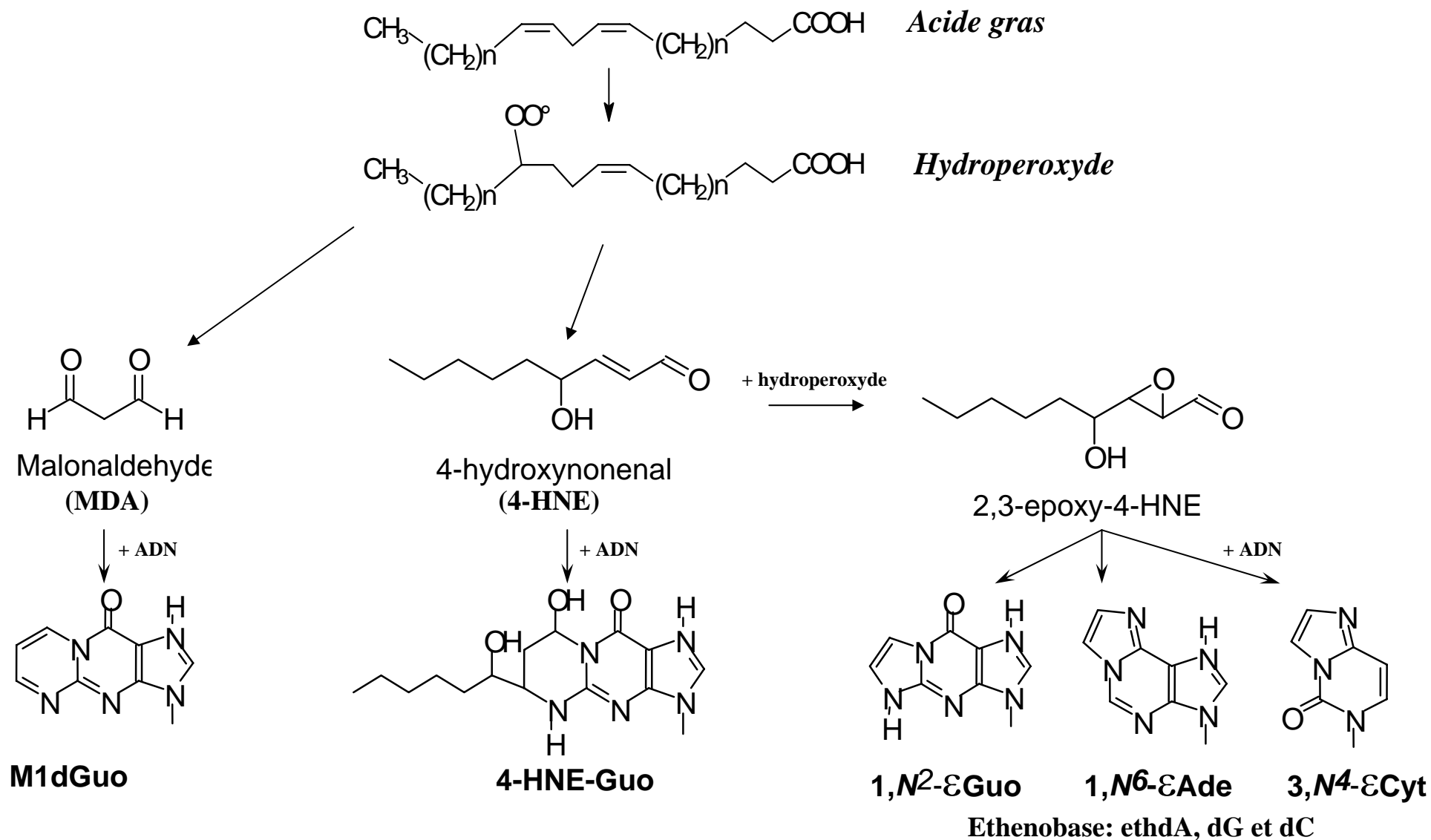


Figure 8. **Formation des principaux adduits de l'ADN à partir de produits secondaires issues de la peroxydation lipidique.** M1dGuo: pyrimido-[1,2 α]purin-10(3*H*)-un; 4-HNE-Guo: 6-(1-hydroxyhexanyl)-8-hydroxy-1,N²-propano-2'-deoxyguanosine; 1,N²-Ethenodeoxyguanosine, 1,N⁶ ϵ Ade: 1,N⁶-Ethenodeosyadenosine et 3,N⁴ ϵ Cyt: 3,N⁴-Ethenodeoxycytidine.

Tableau 2: Principaux acides gras polyinsaturés

Acide gras	Nom commun	famille
18:2	Linoléique	n-6
18:3	γ linolénique	n-6
18:3	α linolénique	n-3
20:4	Arachidonique (ARA)	n-6
20:5	Eicosapentaénoïque (EPA)	n-3
22:5	Docosapentaénoïque	n-3
22:6	Docosahexaénoïque (DHA)	n-3

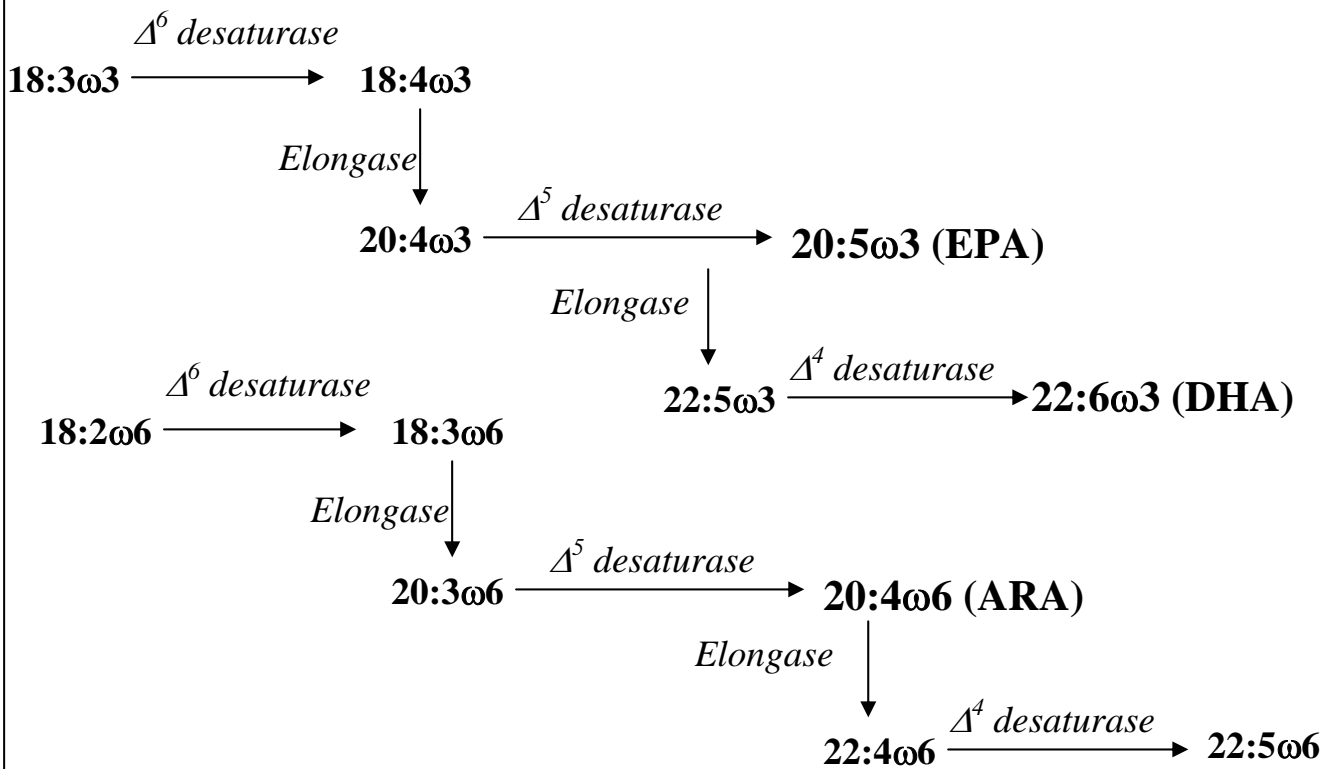


Figure 9: Conversion des acides linoléique et α linolénique en AGPI à longue chaîne.

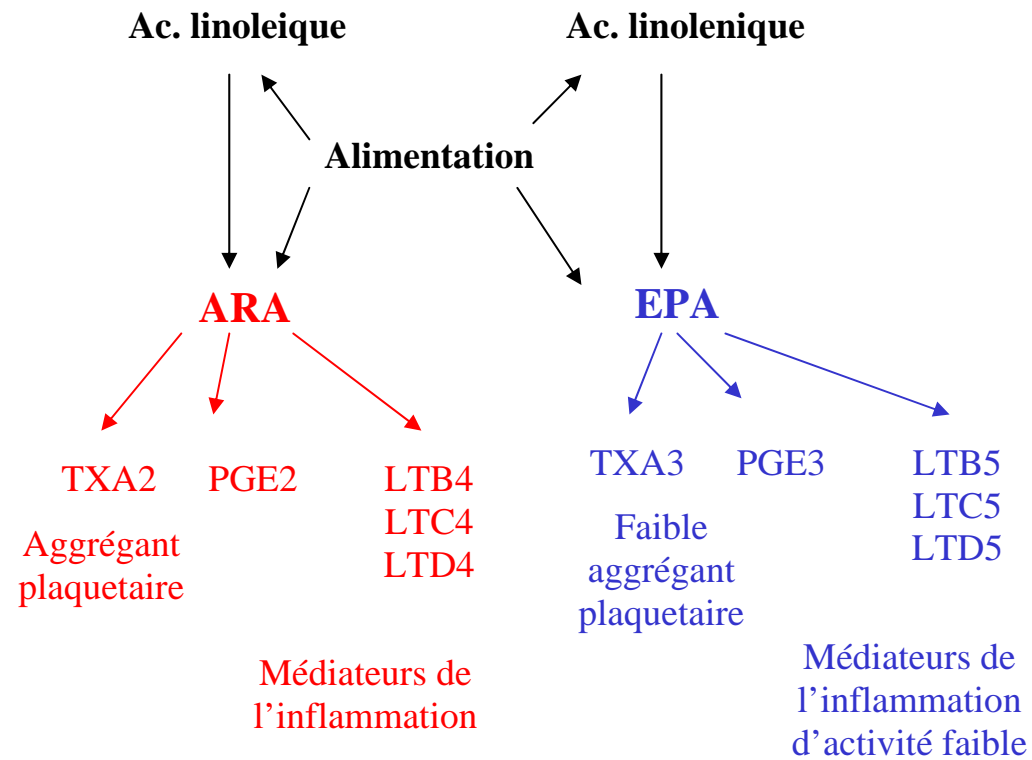


Figure 10: **Interaction de l'EPA avec l'ARA dans la synthèse des eicosanoïdes pro-inflammatoires**
 ARA: acide arachidonique; EPA : acide eicosapentaénoïque; TX: thromboxane; LT: leucotriènes; PGE: prostagladine. (Gìl, 2002)

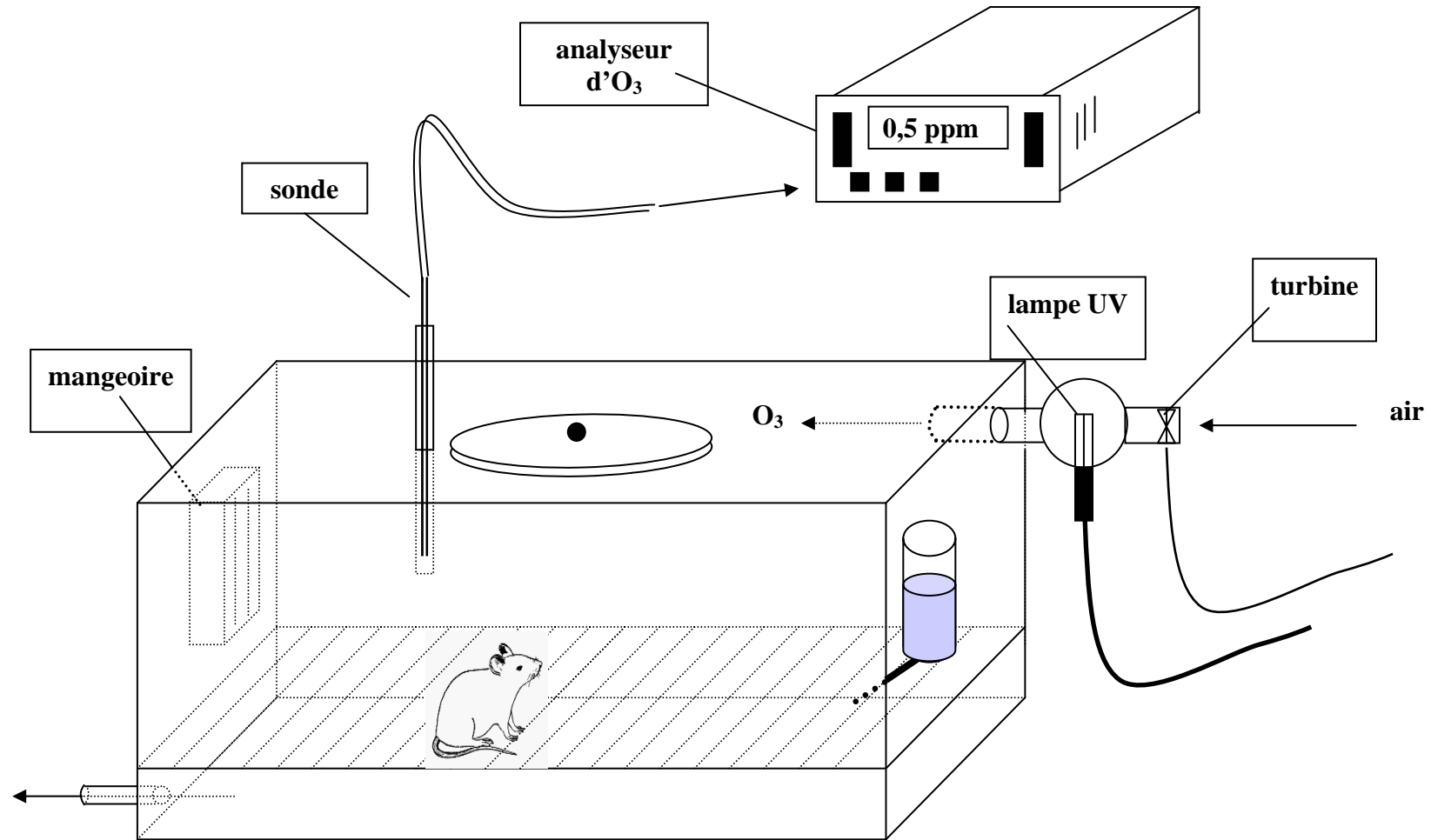


Figure 11. Schéma du caisson d'exposition à l'O₃.

La teneur en O₃ est continuellement mesurée par l'analyseur d'ozone (Environnement SA, Coparly) et est réglée à 0,5 ppm en variant le débit d'air à travers la lampe UV. Pour un nombre de rat constant la teneur en O₃ est stable une fois réglée.

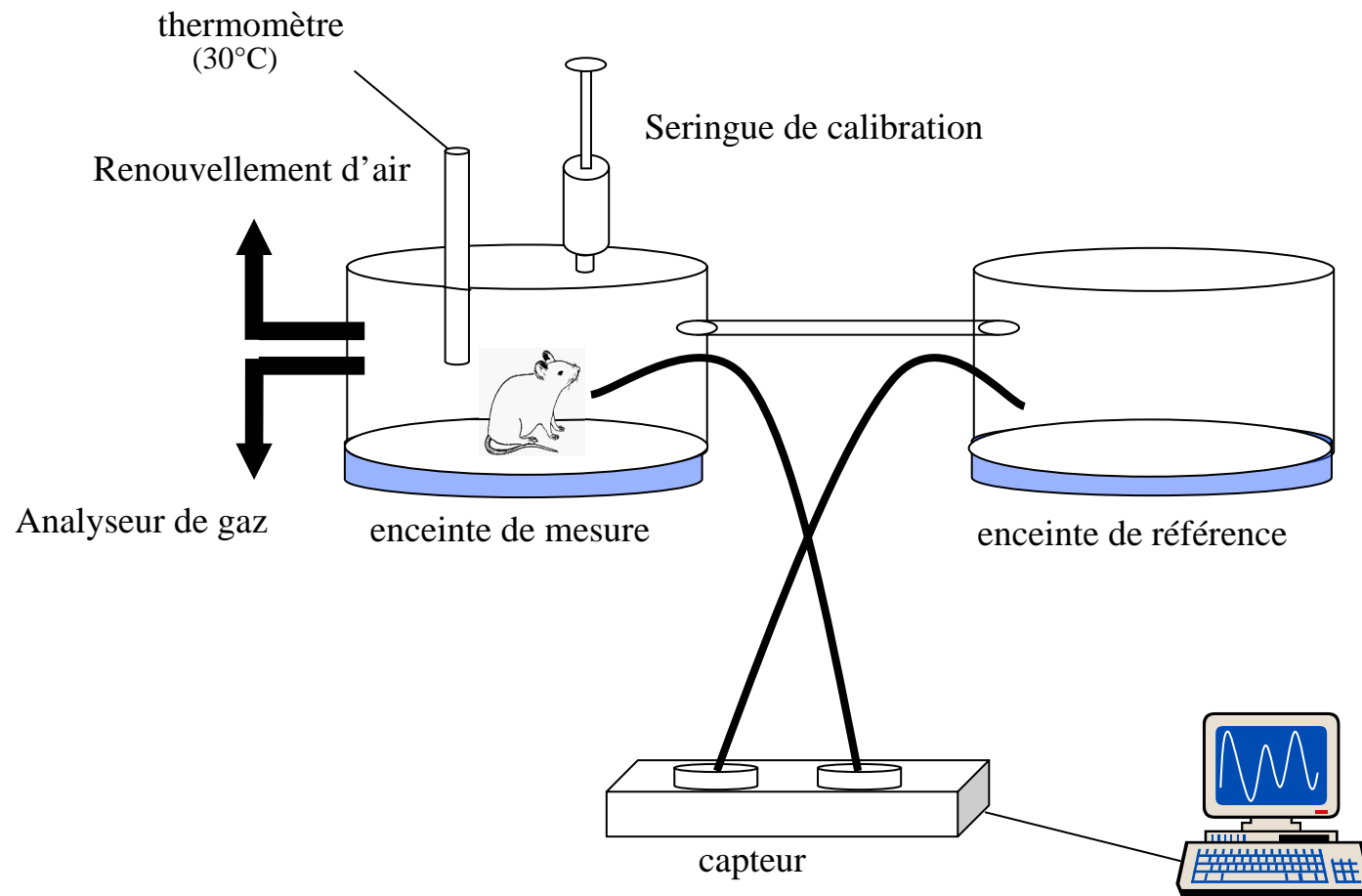


Figure 12. Schéma du plethysmographe barosensible

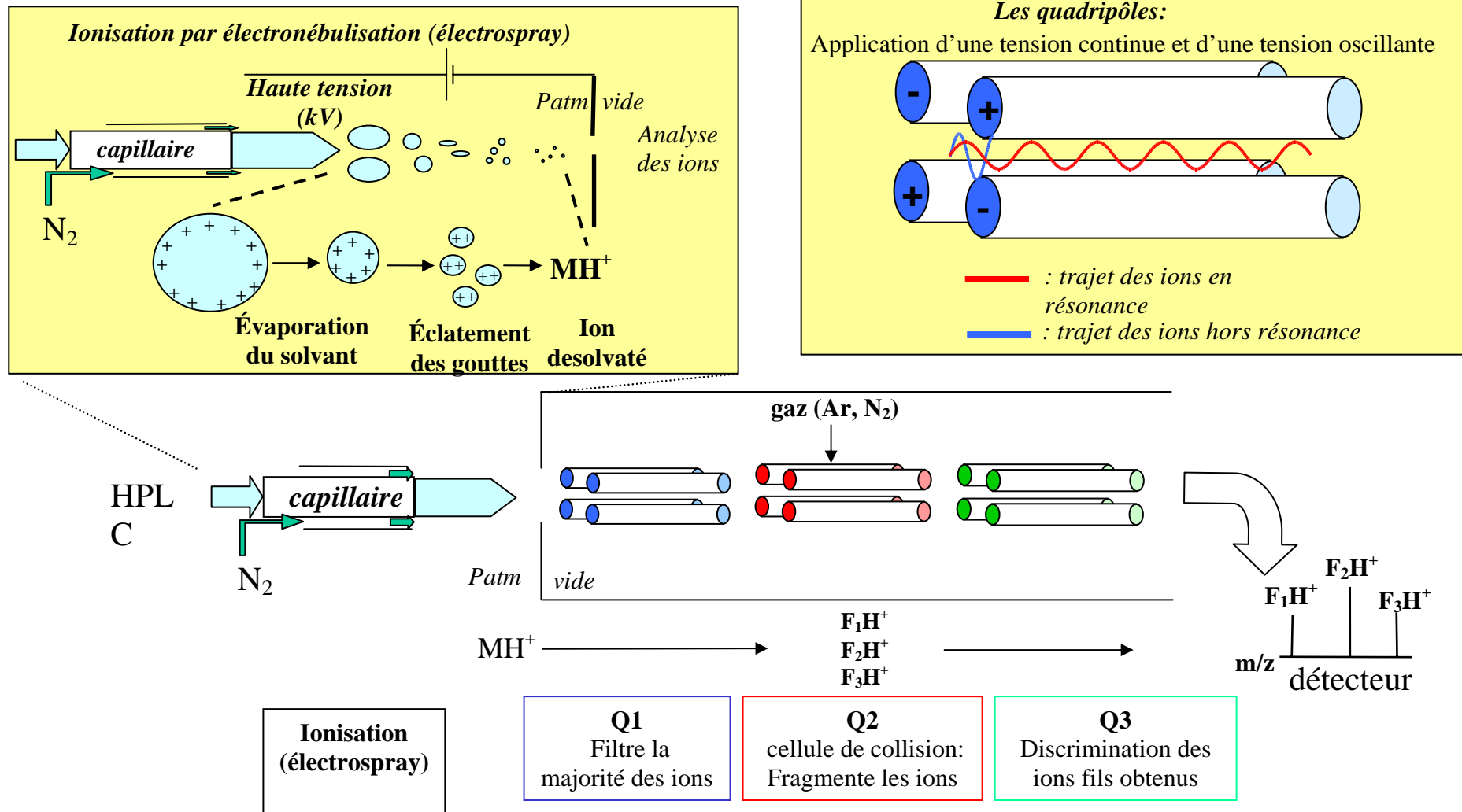


Figure 13. Représentation des différentes étapes de l'analyse des adduits de l'ADN issus de la peroxydation lipidique par HPLC couplée au spectromètre de masse en tandem.

Q1, 2 et 3 : quadripôles; m/z rapport masse /charge de l'ion.

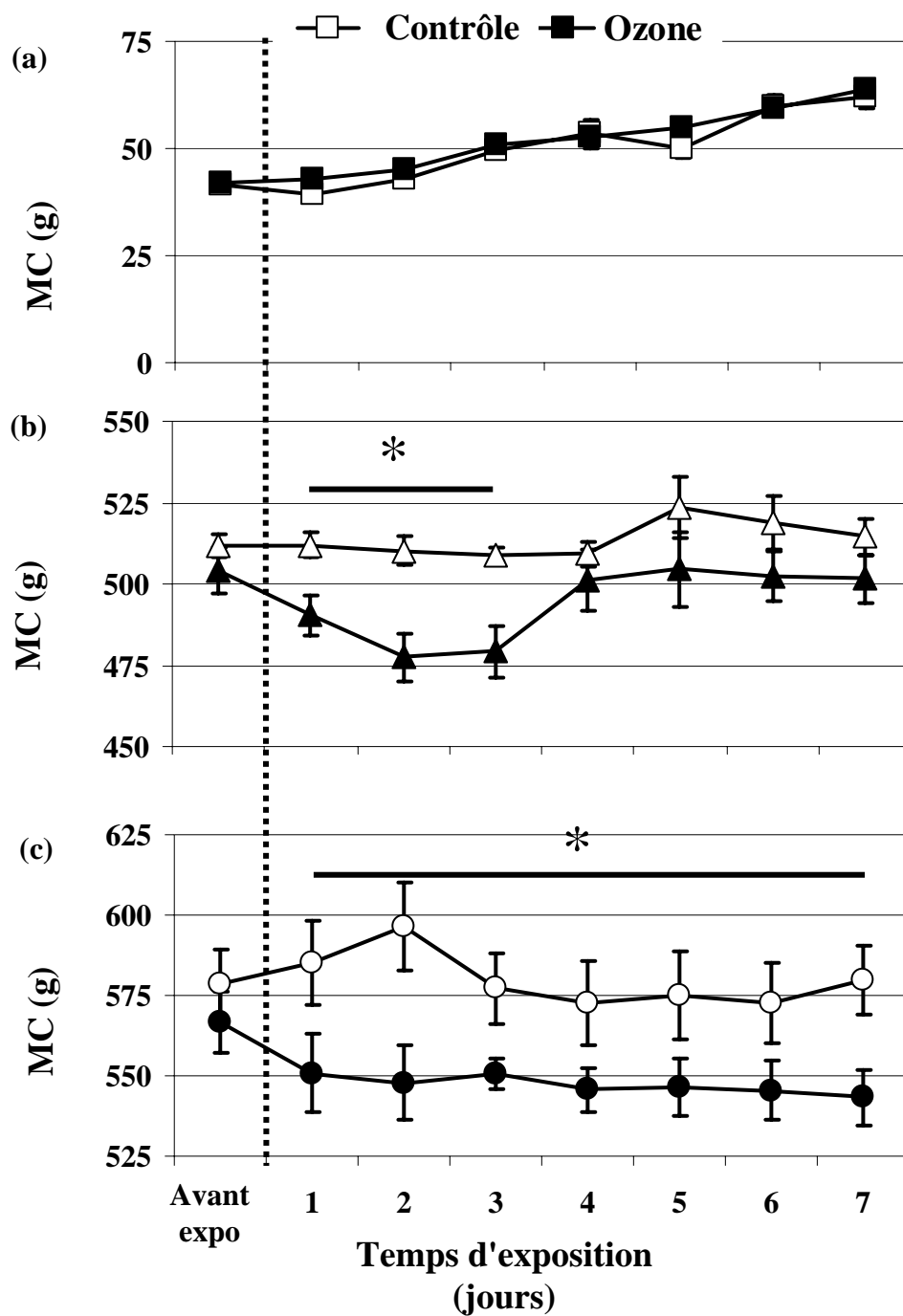


Figure 14. Evolution de la masse corporelle (MC) des rats immatures (a), adultes (b) et âgés (c) exposés ou non à 0,5 ppm d'O₃. *: différence significative contrôle vs ozone dans un même groupe d'âge. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, n = 9 dans chaque groupe.

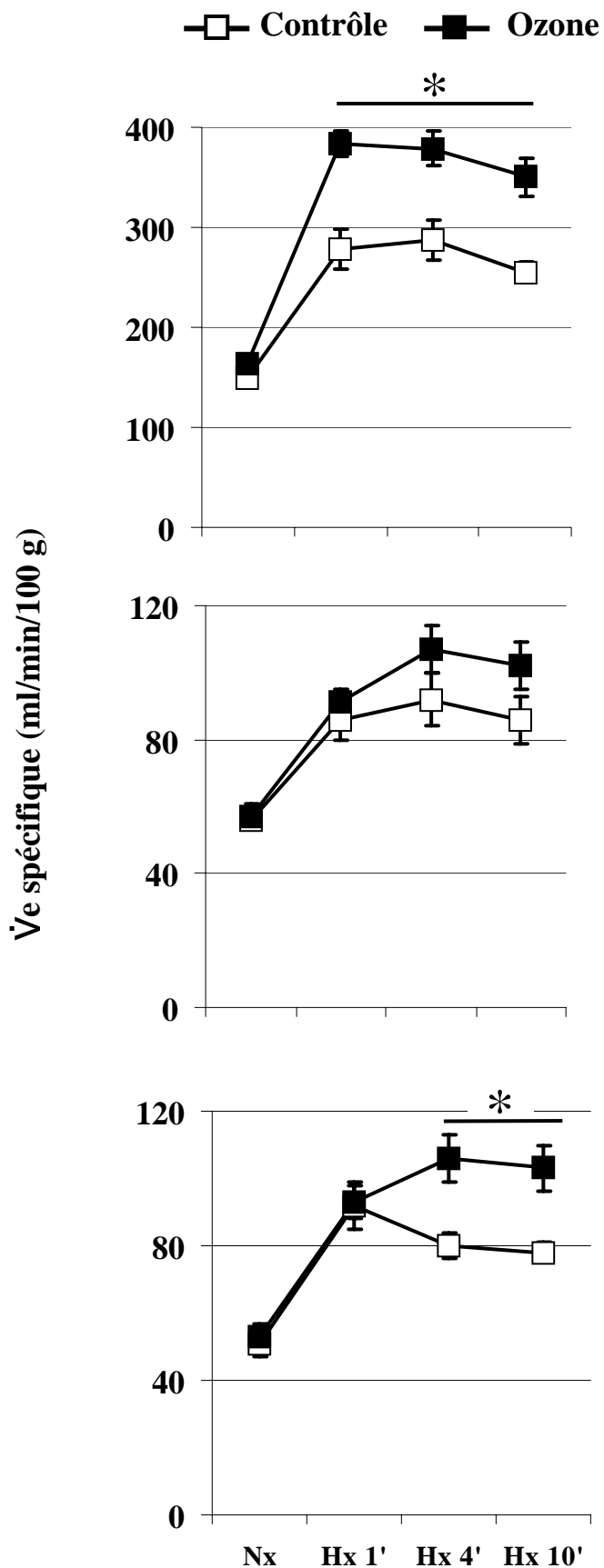


Figure 15. Débit ventilatoire (\dot{V}_e) spécifique en normoxie (Nx) et en hypoxie (Hx) chez les rats immatures (haut), adultes (milieu) et âgés (bas) exposés ou non à l' O_3 . Les mesures en hypoxie sont réalisées à 1, 4 et 10 minutes. *: différence significative contrôle vs ozone dans un même groupe d'âge. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, n = 9 dans chaque groupe

Tableau 4. Effet de l'âge et de l'O₃ sur la consommation d'O₂ et production d'H₂O₂ mitochondriale pulmonaire en présence de succinate.

	Immatures		Adultes		Agés		ANOVA		
	Contrôle	Ozone	Contrôle	Ozone	Contrôle	Ozone	Age	O ₃	interaction
<i>Consommation d'O₂ (nAtomO.min⁻¹.mg⁻¹)</i>									
Etat IV	15,7 ± 1,7 † §	13,9 ± 1,0	10,8 ± 1,0	13,23 ± 1,2	11,5 ± 0,6	15,0 ± 0,8 *	P< 0,05	ns	P< 0,05
Etat III	49,6 ± 6,0 † §	50,7 ± 1,6	36,0 ± 2,4	42,6 ± 2,6	36,0 ± 2,4	40,5 ± 1,5	ns	ns	ns
<i>Paramètres respiratoires</i>									
RCR	3,5 ± 0,3	3,7 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,2 ± 0,1	2,7 ± 0,2 *	ns	ns	ns
ADP/O	1,28 ± 0,12	1,33 ± 0,05	1,13 ± 0,03	1,16 ± 0,05	1,19 ± 0,02	1,21 ± 0,03	P< 0,05	ns	ns
OPR	64,4 ± 9,8 † §	67,7 ± 3,5	40,9 ± 3,0	49,3 ± 3,5	48,3 ± 1,9	53,0 ± 3,4	P< 0,001	ns	ns
<i>Production d'H₂O₂ (pmole.min⁻¹.mg⁻¹)</i>									
Etat IV	16,3 ± 3,2 §	15,0 ± 3,3	20,4 ± 2,4	17,7 ± 3,9	10,9 ± 0,3 †	13,5 ± 0,6 *	P< 0,05	ns	ns
<i>Production d'H₂O₂/O₂ consommé (pmole.nAtomO⁻¹)</i>									
Etat IV	0,97 ± 0,19 †	1,34 ± 0,24	2,12 ± 0,43	1,58 ± 0,38	0,91 ± 0,06 †	0,86 ± 0,08	P< 0,05	ns	ns

Etat IV: en présence de succinate; Etat III: avec succinate + ADP; les paramètres respiratoires ont été décrit dans "matériels et méthodes", RCR: rapport de contrôle respiratoire; OPR: vitesse de phosphorylation oxydative (nmole ATP. min⁻¹.mg⁻¹). *: différence significative contrôle vs ozone dans un même groupe d'âge. †: différence significative par rapport aux adultes contrôle. §: différence significative immatures vs âgés contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 9 dans chaque groupe

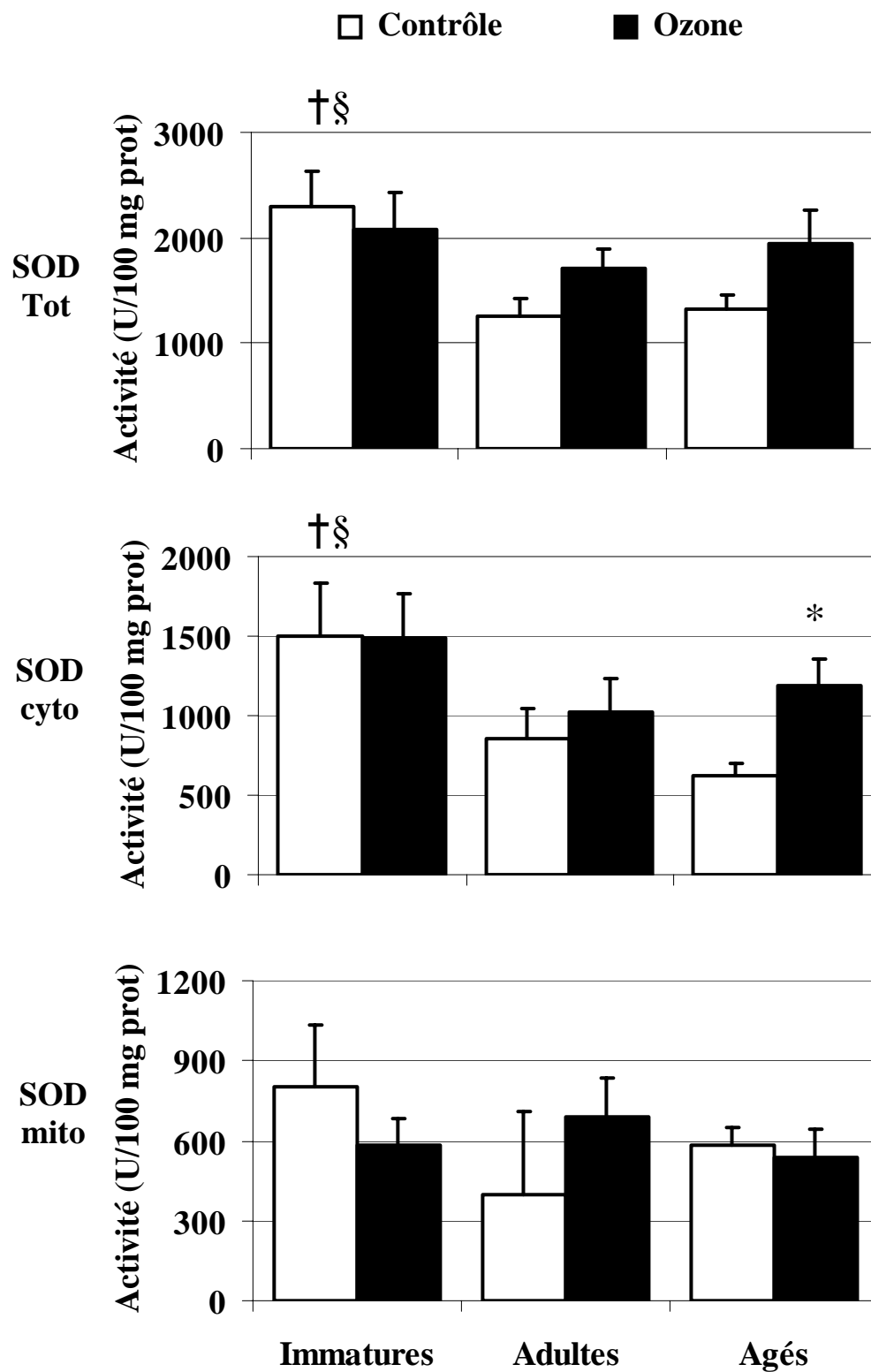


Figure 16. Activités de la superoxyde dismutase (SOD) pulmonaire chez des rats immatures, adultes et âgés exposés ou non à l'O₃. SOD Tot: activité SOD totale (haut); SOD cyto: activité de l'isoforme cytosolique de SOD (milieu), SOD mito: activité de l'isoforme mitochondriale de SOD (bas). *: différence significative contrôle vs ozone dans un même groupe d'âge. † : différence significative par rapport aux adultes contrôle. §:différence significative immatures vs âgés contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 9 dans chaque groupe

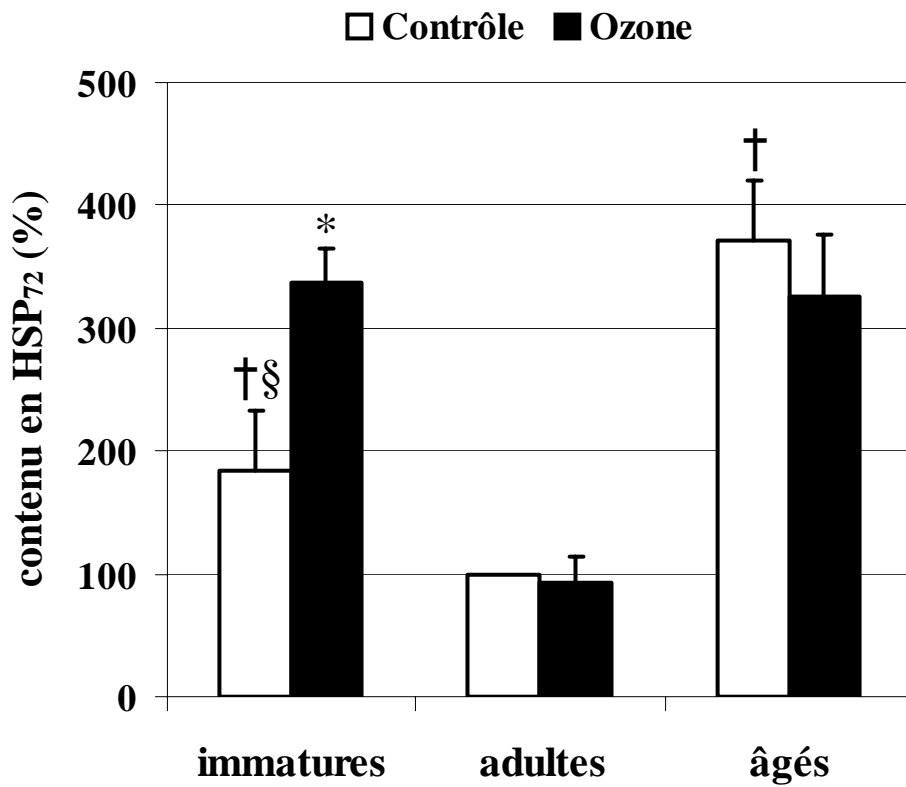


Figure 18. **Contenu pulmonaire en HSP₇₂ chez des rats immatures, adultes et âgés exposés ou non à l'O₃.** *: différence significative contrôle vs ozone dans un même groupe d'âge. † : différence significative par rapport aux adultes contrôle. §:différence significative immatures vs âgés contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, n = 9 dans chaque groupe.

Tableau 5: Effets de l'exposition à l'O₃ sur le contenu en adduits issus de la peroxydation lipidique dans l'ADN pulmonaire chez les rats immatures, adultes et âgés.

	Immatures		Adultes		Agés	
	Contrôle	Ozone	Contrôle	Ozone	Contrôle	Ozone
εdAde	0.67 ± 0.11 †§	0.72 ± 0.53	0.39 ± 0.05	0.53 ± 0.11	0.37 ± 0.07	0.50 ± 0.03
εdGuo	0.43 ± 0.02	0.53 ± 0.07	0.51 ± 0.09	0.34 ± 0.05	0.51 ± 0.09	0.34 ± 0.05
M1dGuo	0.0080 ± 0.0041	0.0077 ± 0.0025	0.0067 ± 0.0029	0.0103 ± 0.0038	0.0057 ± 0.0005	0.0060 ± 0.0019
HNE-dGuo	0.013 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.009 ± 0.001	0.012 ± 0.002	0.016 ± 0.001 †	0.014 ± 0.003

Les contenus en adduits de l'ADN sont exprimés en lésions par 10⁶ bases. εdAde, 1,N⁶-ethenodeoxyadenine; εdGuo, 1,N²-ethenodeoxyguanosine; M1dGuo, pyrimido-[1,2α]purin-10(3*H*)-un ; HNE-dGuo, 6-(1-hydroxyhexanyl)-8-hydroxy-1,N²-propano-2'-deoxyguanosine. †: P < 0.05, significativement différent du groupe adulte. n = 4 dans chaque groupe.

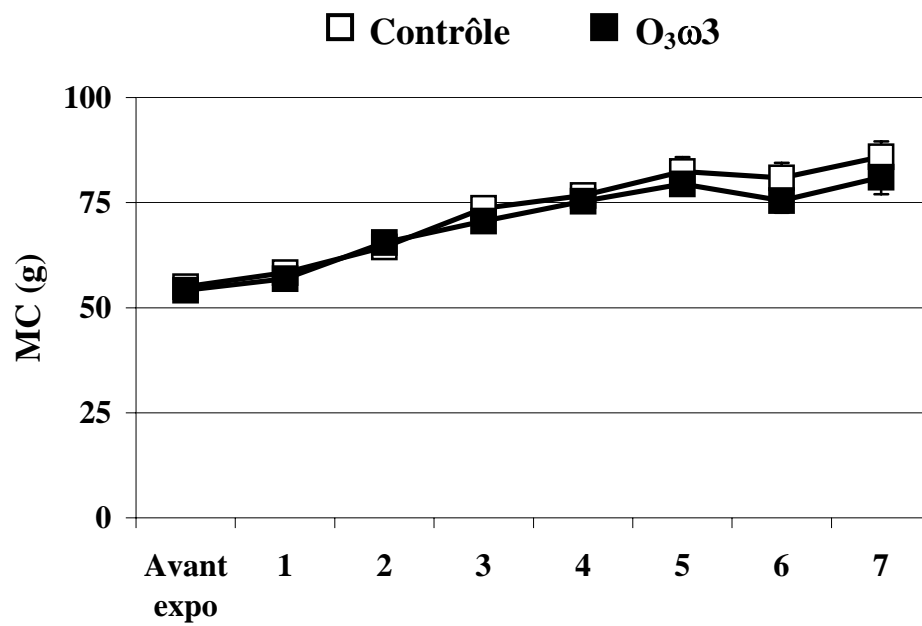


Figure 20. **Evolution de la masse corporelle** (MC) chez les rats immatures contrôle et le rats immatures supplémentés en ω 3 exposés à l'O₃ (O₃ω₃). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, n = 8 dans chaque groupe.

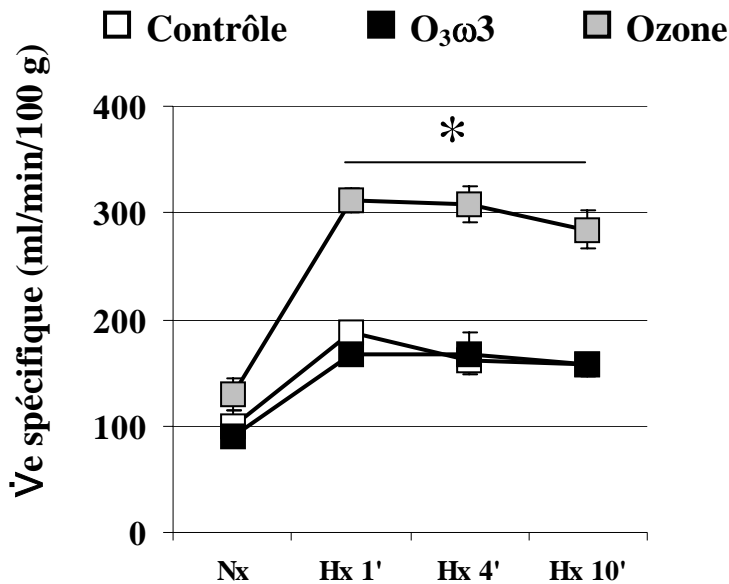


Figure 21: Débit ventilatoire (\dot{V}_e) spécifique chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω₃ (O₃ω₃). *: différence significative par rapport au contrôle. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle en normoxie, par la moyenne ± SEM, n = 9 dans chaque groupe.

Tableau 6. Effets conjugués de l'exposition à l'O₃ et la supplémentation en ω₃ sur les paramètres ventilatoires chez le rat immature.

		Contrôle	O ₃ ω ₃	O ₃
\dot{V}_e	Nx	101 ± 9	97 ± 10	103 ± 6
	Hx 1'	171 ± 13	172 ± 20 £	243 ± 15 *
	Hx 4'	162 ± 9	173 ± 16 £	223 ± 17 *
	Hx 10'	146 ± 11	174 ± 17 £	220 ± 24 *
F	Nx	107 ± 4	118 ± 5	107 ± 3
	Hx 1'	158 ± 7	195 ± 11 *	174 ± 6
	Hx 4'	160 ± 6	191 ± 12 *	177 ± 4
	Hx 10'	164 ± 6	218 ± 11 *£	171 ± 4
V _T	Nx	0,73 ± 0,10	0,65 ± 0,07	0,94 ± 0,05
	Hx 1'	1,09 ± 0,08	0,90 ± 0,04 *£	1,47 ± 0,11 *
	Hx 4'	1,03 ± 0,05	0,83 ± 0,05 *£	1,23 ± 0,09
	Hx 10'	0,96 ± 0,04	0,75 ± 0,04 *£	1,27 ± 0,13 *

\dot{V}_e : débit ventilatoire (ml.min⁻¹); V_T: volume courant en ml; F: fréquence respiratoire : nombre de respiration par minute. *: différence significative par rapport au contrôle. £: différence significative O₃ω₃ vs Ozone ; Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle en normoxie, par la moyenne ± SEM, n = 9 dans chaque groupe.

Tableau 7. Effets conjugués de l'exposition à l'O₃ et la supplémentation en ω3 sur la consommation d'O₂ et la production d'H₂O₂ mitochondriale en présence de succinate

	Contrôle	O ₃ ω3	O ₃
<i>Consommation d'O₂ (nAtomO.min⁻¹.mg⁻¹)</i>			
Etat IV	16,01 ± 0,59	18,87 ± 1,20 £	13,9 ± 1,0
Etat III	51,3 ± 5,2	59,2 ± 5,0	50,7 ± 1,6
<i>Paramètres respiratoires</i>			
RCR	3,4 ± 0,2	3,3 ± 0,3	3,7 ± 0,2
ADP/O	1,26 ± 0,05	1,29 ± 0,04	1,33 ± 0,05
OPR	63 ± 5	72 ± 5	67,7 ± 3,5
<i>Production d'H₂O₂ (pmole.min⁻¹.mg⁻¹)</i>			
Etat IV	14,8 ± 1,0	11,9 ± 1,7	15,0 ± 2,4
<i>Production d'H₂O₂/O₂ consommé (pmole.nAtomO⁻¹)</i>			
Etat IV	0,79 ± 0,07	0,54 ± 0,09 £	1,34 ± 0,24

dans le poumon chez le rat immature.

Etat IV: en présence de substrat seul; Etat III: substrat + ADP; les paramètres respiratoires ont été décrits dans "matériels et méthodes", RCR: rapport de contrôle respiratoire; OPR: vitesse de phosphorylation oxydative (nmole ATP. min⁻¹.mg⁻¹). £: différence significative O₃ω3 vs Ozone. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 9 dans chaque groupe.

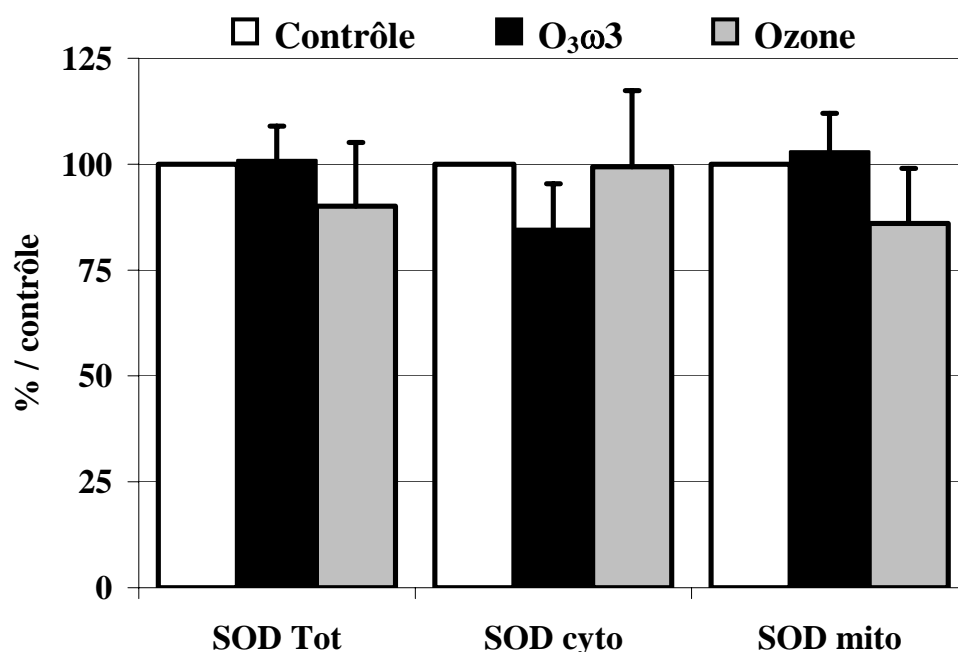


Figure 22: **Activité de la superoxyde dismutase (SOD) pulmonaire chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3).** SOD Tot: activité SOD totale; SOD cyto: activité de l'isoforme cytosolique, SOD mito: activité de l'isoforme mitochondriale. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, par la moyenne ± SEM, n = 9 dans chaque groupe.

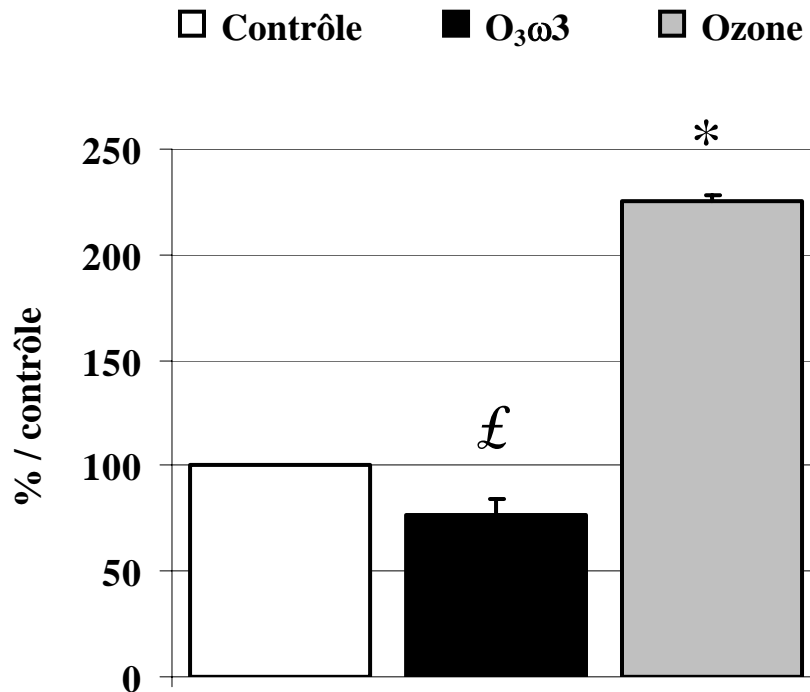


Figure 24: Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn pulmonaire chez les rats immatures des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3). *: différence significative par rapport au contrôle. £: différence significative Ozone vs O₃ω3. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, par la moyenne ± SEM, n = 9 dans chaque groupe.

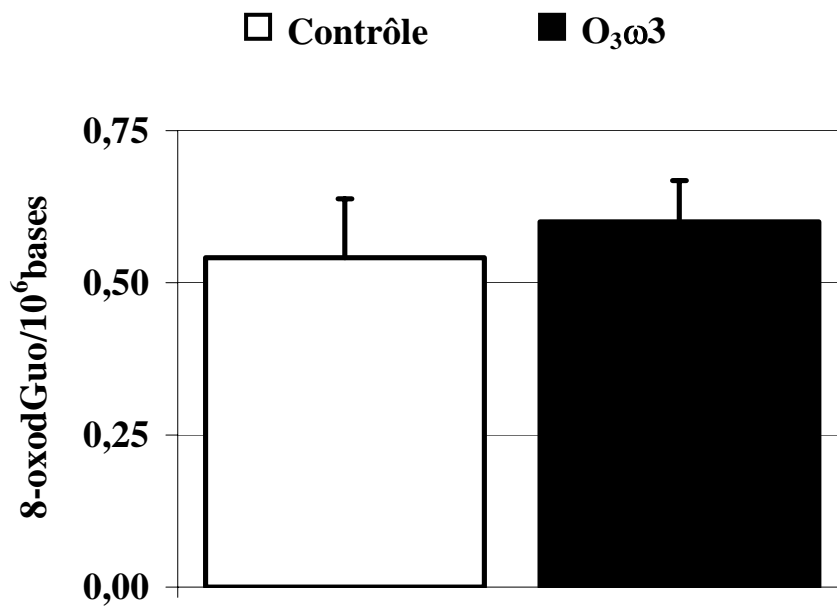


Figure 27: Contenu en 8-oxodGuo dans l'ADNn hépatique chez les rats immatures des groupes contrôle et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3). Les résultats sont exprimés en lésions par 10⁶ bases et en moyenne ± SEM, n = 8 dans chaque groupe.

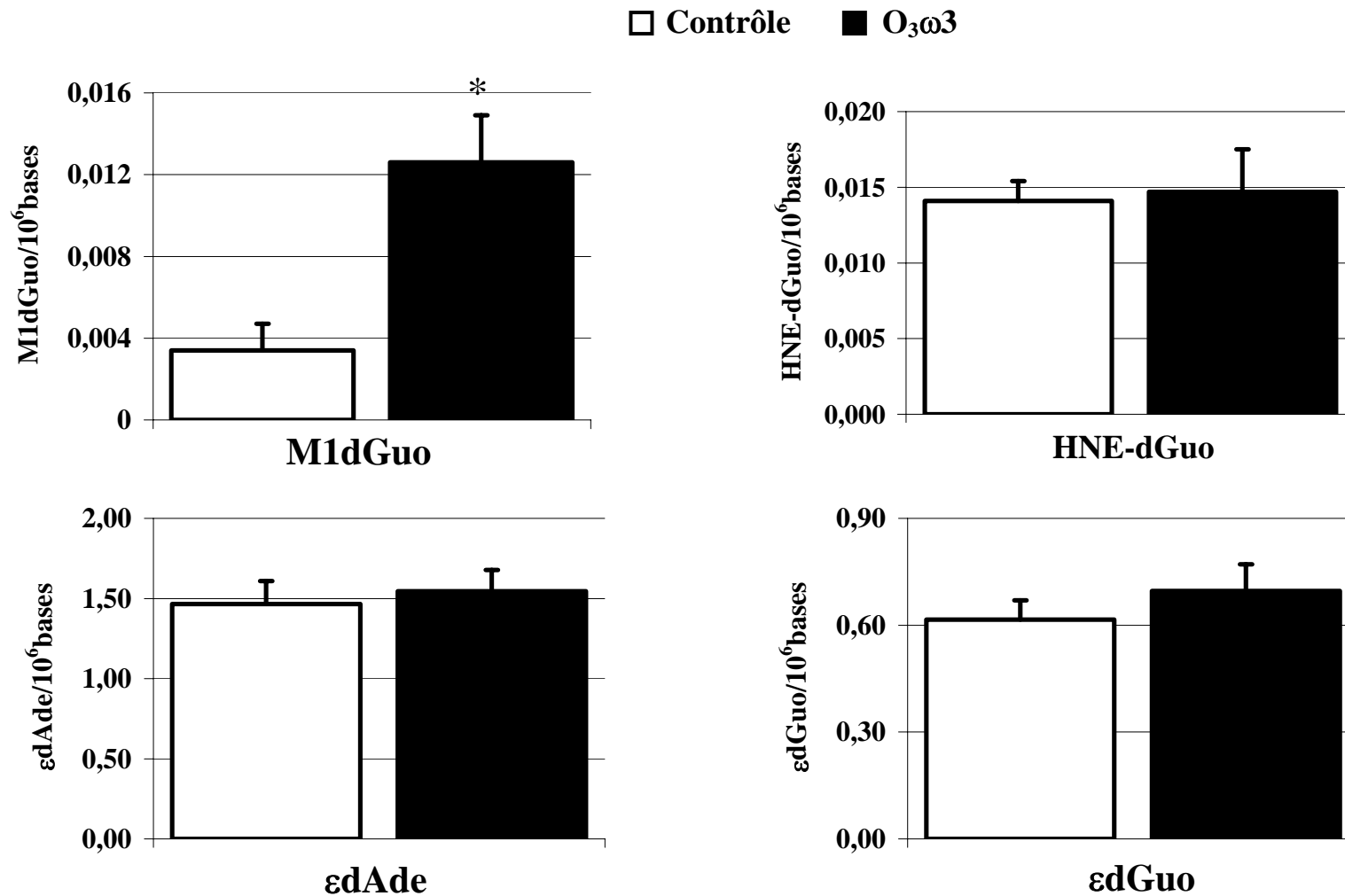


Figure 28: Contenu en adduits issues de la peroxydation lipidique dans l'ADNn hépatique, chez les rats immatures des groupes contrôle et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω₃ (O₃ω₃). εdAde, 1,N⁶-ethenodeoxyadenine; εdGuo, 1,N²-ethenodeoxyguanosine; M1dGuo, pyrimido-[1,2α]purin-10(3H)-un ; HNE-dGuo, 6-(1-hydroxyhexanyl)-8-hydroxy-1,N²-propano-2'-deoxyguanosine. *: différence significative contrôle vs O₃ω₃. Les résultats sont exprimés en lésions par 10⁶ bases et en moyenne ± SEM, n = 8 dans chaque groupe..

Tableau 8. Effets conjugués de l'exposition à l'O₃ et la supplémentation en ω3 sur les activités des principales enzymes antioxydantes dans le foie de rat immature.

	SOD				
	Tot	Cyto	Mito	GPx	CAT
Contrôle	4286 ± 263	3043 ± 277	1099 ± 30	13,37 ± 0,64	10,55 ± 0,90
O ₃ ω3	4964 ± 858	3921 ± 827	1086 ± 52	11,80 ± 0,73	9,49 ± 0,40

Activités exprimées en U/100 mg prot. SOD Cyto et Mito: SOD cytosolique et mitochondriale; GPx, glutathion peroxydase; CAT, catalase. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 8 dans chaque groupe.

Tableau 9. Effets conjugués de l'exposition à l'O₃ et la supplémentation en ω3 sur le fonctionnement des mitochondries hépatiques de rat immature.

	Foie	
	Contrôle	O ₃ ω3
	<i>Consommation d'O₂ (nAtomO.min⁻¹.mg⁻¹)</i>	
Etat IV	19,50 ± 2,75	17,19 ± 0,95
Etat III	79,3 ± 8,5	70,1 ± 5,3
	<i>Paramètres respiratoires</i>	
RCR	4,9 ± 0,3	5,7 ± 0,5
ADP/O	1,38 ± 0,05	1,43 ± 0,06
OPR	109 ± 13	100 ± 8
	<i>Production d'H₂O₂ (pmole.min⁻¹.mg⁻¹)</i>	
Etat IV	43,7 ± 11,6	33,4 ± 5,7
	<i>Production d'H₂O₂/O₂ consommé (pmole.nAtomO⁻¹)</i>	
Etat IV	2,37 ± 0,54	1,82 ± 0,30

Etat IV: en présence de substrat seul; Etat III: substrat + ADP; les paramètres respiratoires ont été décrit dans "matériels et méthodes", RCR: rapport de contrôle respiratoire; OPR: vitesse de phosphorylation oxydative (nmole ATP. min⁻¹.mg⁻¹). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 8 dans chaque groupe.

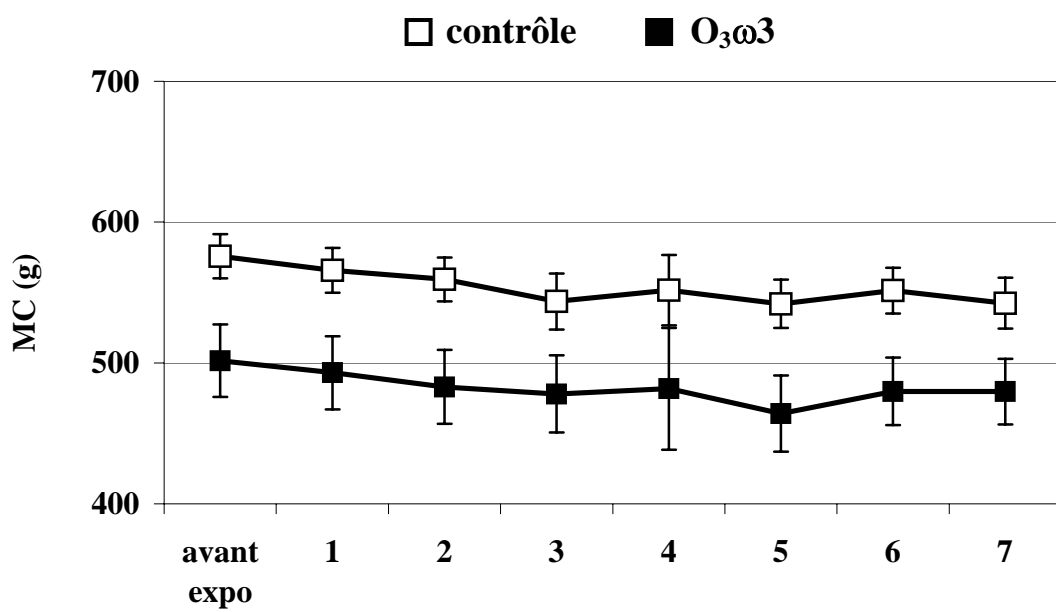


Fig.29. Evolution de la masse corporelle (MC) chez les rats âgés des groupes contrôle et supplémentés en $\omega 3$ exposés à l' O_3 ($O_3\omega 3$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, n = 5 dans chaque groupe.

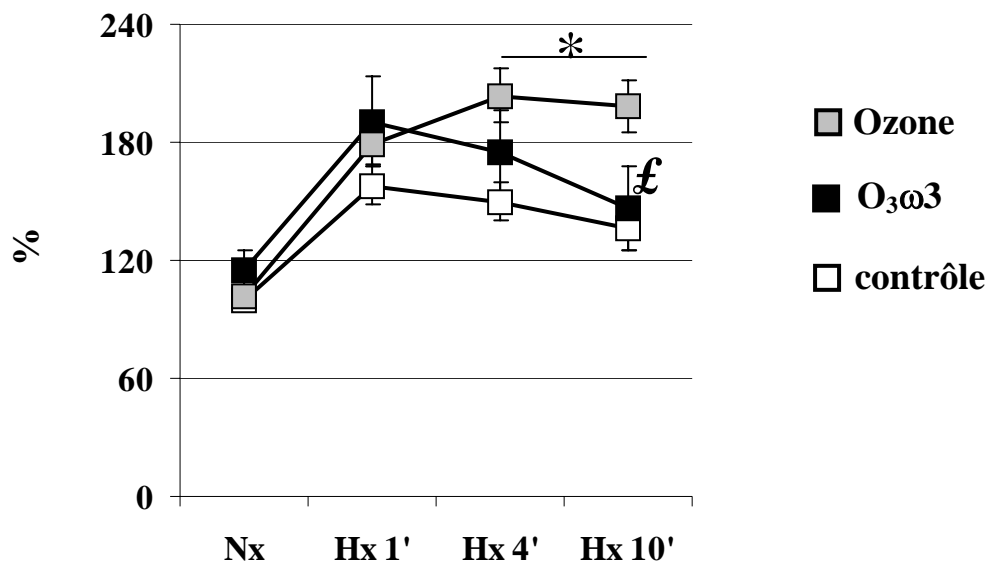


Figure 30: Débit ventilatoire (\dot{V}_e) spécifique chez les rats âgés des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω₃ (O₃ω₃). *: différence significative par rapport au contrôle. £: différence significative O₃ω₃ vs Ozone. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle en normoxie, par la moyenne ± SEM. Contrôle (n = 5) et O₃ω₃ (n = 5) et Ozone (n = 9).

Tableau 10. Effets conjugués de l'exposition à l'ozone et la supplémentation en ω₃ sur les paramètres ventilatoires chez le rat âgés.

		Contrôle (5)	O ₃ ω ₃ (5)	Ozone (9)
\dot{V}_e (ml.min ⁻¹)	Nx	287 ± 17	284 ± 17	293 ± 26
	Hx 1'	460 ± 26	470 ± 60	512 ± 36
	Hx 4'	435 ± 29	438 ± 44 £	551 ± 32 *
	Hx 10'	392 ± 35	365 ± 47 £	569 ± 43 *
F	Nx	83 ± 8	80 ± 9	101 ± 7
	Hx 1'	114 ± 5	130 ± 15	145 ± 4 *
	Hx 4'	103 ± 6	132 ± 15	154 ± 8 *
	Hx 10'	98 ± 7	129 ± 17	158 ± 8 *
V _t (ml)	Nx	3,67 ± 0,24	3,46 ± 0,26	2,91 ± 0,21
	Hx 1'	4,02 ± 0,32	3,90 ± 0,49	3,79 ± 0,29
	Hx 4'	4,22 ± 0,40	3,92 ± 0,33	3,81 ± 0,23
	Hx 10'	4,06 ± 0,47	3,61 ± 0,22	3,41 ± 0,19

\dot{V}_e : débit ventilatoire; V_T: volume courant en ml; F: nombre de respiration par minute. *: différence significative par rapport au contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, (n): nombre d'animaux dans chaque groupe.

Tableau 11. Effets conjugués de l'exposition à l'ozone et la supplémentation en $\omega 3$ sur la consommation d' O_2 et la production maximale d' H_2O_2 mitochondriale dans le poumon et le foie de rats âgés.

	Contrôle (5)	$O_3\omega 3$ (5)	Ozone (9)
<i>Consommation d'O_2 (nAtomO.min⁻¹.mg⁻¹)</i>			
Etat IV	10,0 ± 0,9	13,5 ± 2,2	15,0 ± 0,8 *
Etat III	39,5 ± 5,2	48,8 ± 5,8	40,5 ± 1,5
<i>Paramètres respiratoires</i>			
RCR	3,7 ± 0,4	4,2 ± 0,4 £	2,7 ± 0,2 *
ADP/O	1,20 ± 0,09	1,14 ± 0,28	1,21 ± 0,03
OPR	49 ± 7	56 ± 14	53 ± 3
<i>Production maximale d'H_2O_2 (pmole.min⁻¹.mg⁻¹)</i>			
Etat IV	51,9 ± 2,3	67,2 ± 12,1	#

Etat IV: en présence de substrat seul; Etat III: substrat + ADP; les paramètres respiratoires ont été décrit dans "matériels et méthodes", RCR: rapport de contrôle respiratoire; OPR: vitesse de phosphorylation oxydative (nmole ATP. min⁻¹.mg⁻¹). La production maximale d' H_2O_2 a été effectuée avec l'utilisation de succinate + antimycine A. *: différence significative par rapport au contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, (n): nombre d'animaux dans chaque groupe.

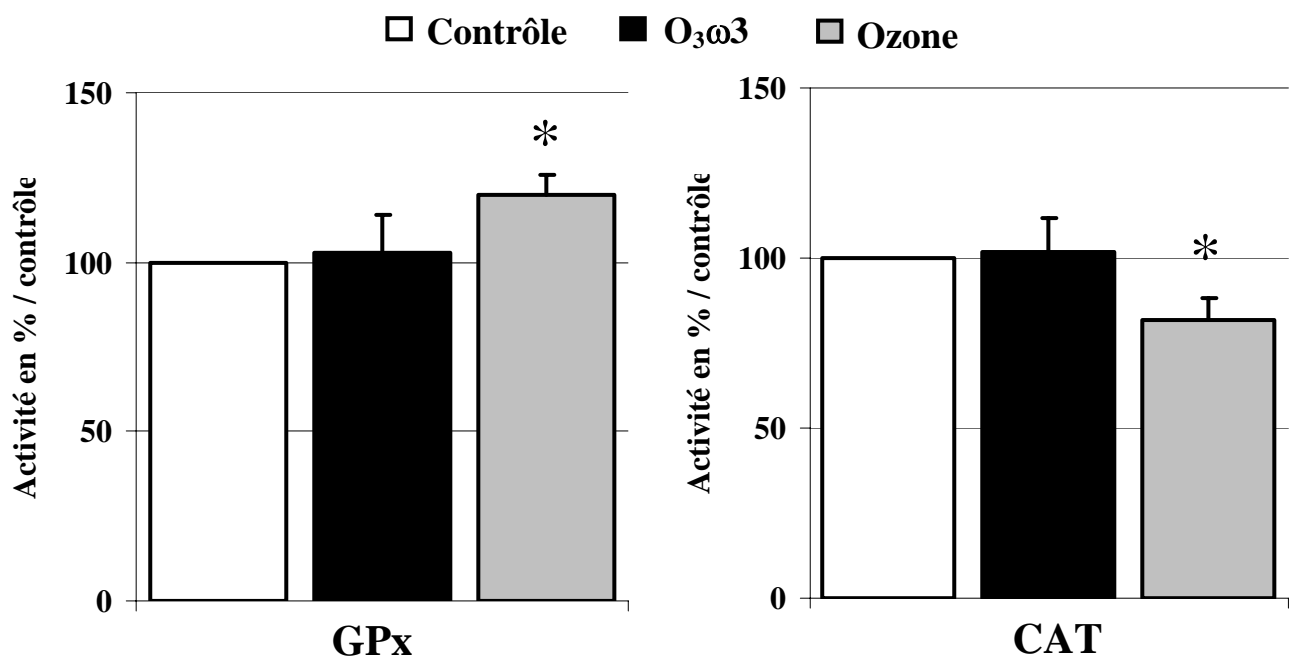


Figure 32: **Activité de la glutathion peroxydase (GPx) et catalase (CAT) pulmonaire chez les rats âgés des groupes contrôle, exposés à l'O₃ (Ozone) et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω3 (O₃ω3).** Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, par la moyenne ± SEM. Contrôle et O₃ω3 (n = 5), Ozone (n = 9).

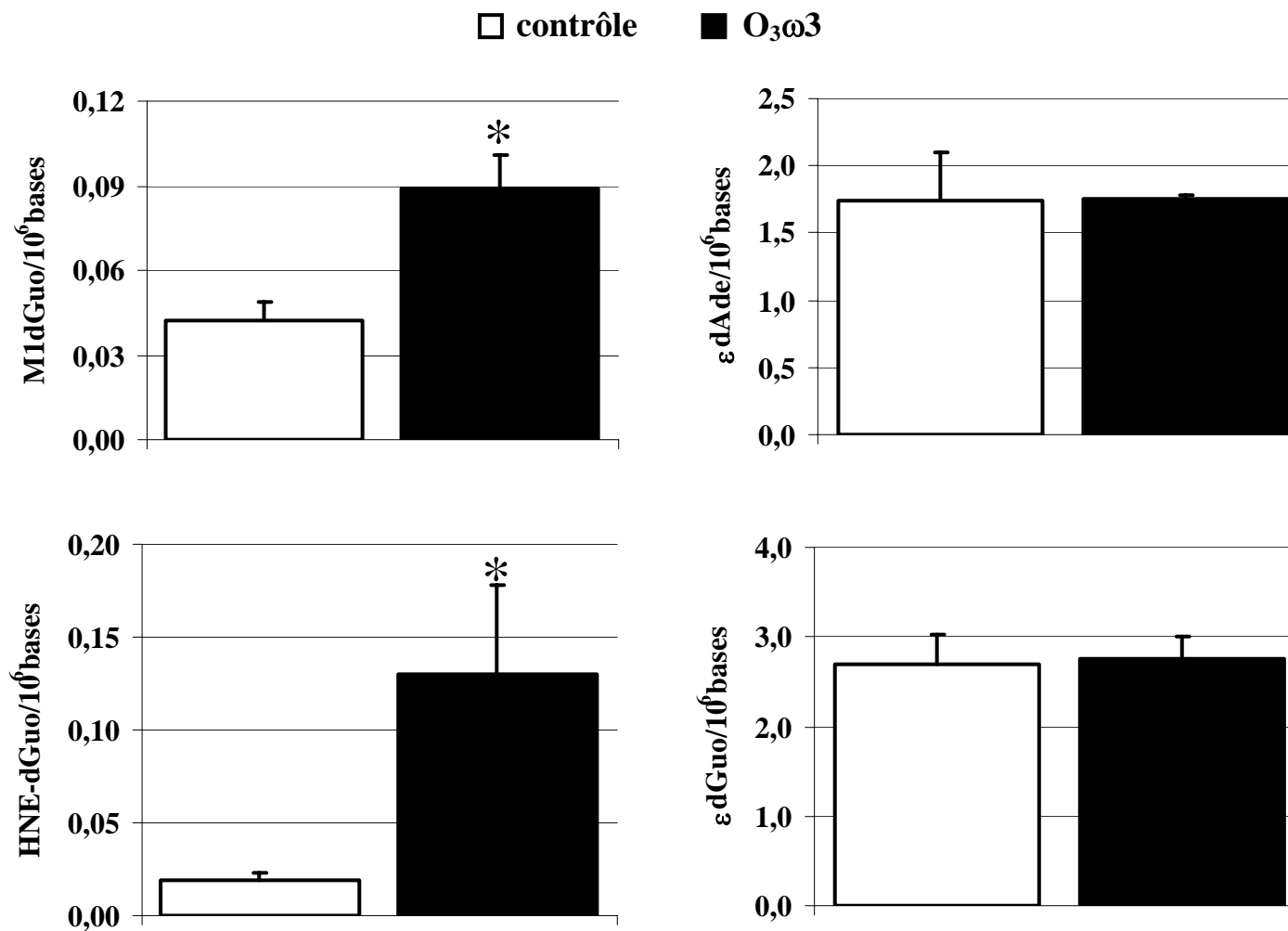


Figure 36: Contenu en adduits issues de la peroxydation lipidique dans l'ADNn hépatique, chez les rats âgés des groupes contrôle et exposés à l'O₃ avec supplémentation en ω₃ (O₃ω₃). εdAde, 1,N⁶-ethenodeoxyadénine; εdGuo, 1,N²-ethenodeoxyguanosine; M1dGuo, pyrimido-[1,2α]purin-10(3H)-un ; HNE-dGuo, 6-(1-hydroxyhexany1)-8-hydroxy-1,N²-propano-2'-deoxyguanosine.*: différence significative contrôle vs O₃ω₃. Les résultats sont exprimés en lésions par 10⁶ bases et en moyenne ± SEM, n = 5 dans chaque groupe.

Tableau 12. Effets conjugués de l'exposition à l'O₃ et la supplémentation en ω3 sur les activités des principales enzymes antioxydantes dans le foie de rat âgé.

	SOD				
	Tot	Cyto	Mito	GPx	CAT
Contrôle	2391 ± 136	1651 ± 120	740 ± 124	22,64 ± 2,10	10,57 ± 1,60
O ₃ ω3	3169 ± 570	2046 ± 539	1173 ± 64	27,48 ± 7,10	12,44 ± 0,42

Activités exprimées en U/100 mg prot. SOD Cyto et Mito: SOD cytosolique et mitochondriale; GPx, glutathion peroxydase; CAT, catalase. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 5 dans chaque groupe.

Tableau 13. Effets conjugués de l'exposition à l'O₃ et la supplémentation en ω3 sur le fonctionnement des mitochondries hépatiques de rat âgé.

	Foie	
	Contrôle	O ₃ ω3
	<i>Consommation d'O₂ (nAtomO.min⁻¹.mg⁻¹)</i>	
Etat IV	16,02 ± 1,72	18,09 ± 3,25
Etat III	73,6 ± 11,7	73,2 ± 15,1
	<i>Paramètres respiratoires</i>	
RCR	6,4 ± 0,6	6,9 ± 0,3
ADP/O	1,27 ± 0,05	1,26 ± 0,09
OPR	95 ± 17	96 ± 24
	<i>Production maximale d'H₂O₂ (pmole.min⁻¹.mg⁻¹)</i>	
Etat IV	60,2 ± 10,4	65,0 ± 10,4

Etat IV: en présence de substrat seul; Etat III: substrat + ADP; les paramètres respiratoires ont été décrit dans "matériels et méthodes", RCR: rapport de contrôle respiratoire; OPR: vitesse de phosphorylation oxydative (nmole ATP. min⁻¹.mg⁻¹). La production maximale d'H₂O₂ a été effectuée avec l'utilisation de succinate + antimycine A. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 5 dans chaque groupe.