

[Chem. Pharm. Bull.]  
24(2) 186-192 (1976)

UDC 547.68.04 : 547.963.32.04 : 542.98

## Interaction d'un Corps Cancérogène le Méthyl-7 benzo[*a*]anthracène avec de l'ADN en Présence de Microsomes Extraits du Foie de Hamsters

HIROKO KAWAMURA

*Section de Physique et Chimie de la Fondation Curie, Institut du Radium<sup>1)</sup>*

(Reçu le 5, Février, 1975)

The metabolites of 7-methylbenzo[*a*]anthracene (MBA) by NADPH requiring microsomal system from livers of phenobarbital-treated hamsters were analyzed by using <sup>3</sup>H-MBA. Then, these systems were applied to the reactions of MBA with the calf thymus DNA.

The binding ratio of <sup>3</sup>H-MBA to DNA was estimated at 8 μg of MBA/mg DNA, that is, 1 mole of MBA/100000 nucleotides. The fluorescence spectra indicated an analogy of delocalized electronic system to the parent hydrocarbon, but an evident difference from the DNA-MBA epoxide in the K-region. The formation, observed on the spectra, of MBA-DNA complex by microsomal system was similar to that of MBA-DNA complex by cell cultures.

Il semble maintenant bien établi que les hydrocarbures polycycliques cancérogènes se fixent de manière stable à l'ADN dans la peau de souris,<sup>2)</sup> dans les cellules en cultures<sup>3)</sup> ou en présence du système microsomal<sup>4)</sup>; mais, les hydrocarbures eux-mêmes ne semblent pas pouvoir se fixer directement chimiquement à l'ADN. La fixation des hydrocarbures polycycliques aux macromolécules, exige une activation enzymatique préalable. Les activations enzymatiques ont été effectuées par le système microsomal extrait du foie de rats, hamsters, etc.<sup>4)</sup> ou par des cellules en cultures.<sup>3)</sup> Le système enzymatique microsomal fonctionne strictement en présence de NADPH comme cofacteur et de l'air à pH 7,4, et il est fortement induit par le méthyl-3 cholanthrène ou par le phénobarbital.

La formation de complexes entre l'ADN et les métabolites<sup>5)</sup> des hydrocarbures polycycliques produits en présence de système microsomal a été mise en évidence.<sup>6)</sup> Mais la nature des métabolites "ultimes" des hydrocarbures, la nature des complexes qui se forment entre les hydrocarbures et l'ADN, est encore fort discutée. Diverses hypothèses ont été proposées au cours des dernières années concernant la nature des métabolites "ultimes" capable d'interagir avec les macromolécules et notamment l'ADN. La hypothèse la plus couramment admise est suggérée par les nombreux travaux de Grover, *et al.*<sup>7)</sup> à la suite d'une idée de Boyland,<sup>8)</sup> elle implique la formation d'un époxyde de l'hydrocarbure aromatique. Dans le cas de dérivés méthylés, Brookes<sup>9)</sup> a aussi préconisé un temps, la formation de carbocation du type ArCH<sub>2</sub><sup>+</sup>. Différentes formes de radicaux libres ont été également proposées.<sup>10)</sup>

- 1) Situation: 11, rue Pierre-et-Marie-Curie, 75231 Paris Cedex 05, France; a) Adresse actuelle: Institut de la Thérapeutique Balnéatoire, Université de Kyushu, 4546, Tsurumihara, Beppu.
- 2) P. Brookes, *Cancer Res.*, **26**, 1994 (1966).
- 3) T. Kuroki, E. Huberman, H. Marquardt et J.K. Selkirk, *Chem. Biol. Interactions*, **4**, 389 (1971).
- 4) P.L. Grover, *Biochem. J.*, **110**, 159 (1968).
- 5) P. Sims, *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 795 (1970).
- 6) a) H.V. Gelboin, *Cancer Res.*, **29**, 1272 (1969); b) A. Borgen, H. Darvey, N. Castagnoli, T.T. Crocker, R.E. Rasmussen et I.Y. Wang, *J. Med. Chem.*, **16**, 502 (1973).
- 7) a) G.R. Keysell, J. Booth, P.L. Grover et A. Hewer, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 2853 (1973); b) P.L. Grover et P. Sims, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 661 (1973).
- 8) E. Boyland, *Symposium Biochem. Soc.*, **5**, 40 (1950).
- 9) P. Brookes et A. Dipple, "The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry," Vol. 1, Jerusalem, 1969, p. 139.
- 10) P.O.P. Ts'o et C. Nagata, "World Symposium on Model Studies in Chemical Carcinogenesis," 1972.

L'une des techniques le plus souvent employée pour donner des bases expérimentales à ces hypothèses est l'utilisation de molécules marquées. Cette méthode est certes très utile et très sensible pour mettre en évidence des associations entre les hydrocarbures et les macromolécules, mais ce procédé d'investigation devient très lourd et bien souvent insuffisant ou inopérant pour obtenir des informations sur la nature chimique des complexes. L'approche du problème par la technique de fluorescence est possible, les hydrocarbures aromatiques possédant un rendement quantique de fluorescence élevé. Cette méthode peut apporter des renseignements si l'on est capable d'interpréter les différences des spectres de fluorescence de la molécule libre et de la molécule liée. Une étude de ce type, en cours au Laboratoire, concerne la nature chimique du complexe qui se forme avec l'ADN dans des cellules d'embryons de hamsters maintenues en culture lorsque ces dernières sont traitées par du méthyl-7 benzo[*a*]-anthracène. Nous avons pensé qu'il serait tout à fait intéressant de mener une étude similaire concernant la structure du complexe qui prend naissance lorsque l'on traite de l'ADN par le méthyl-7 benzo[*a*]anthracène en présence d'un système microsomal et de comparer les résultats obtenus par les deux voies: les cellules en culture et le système microsomal.

Notre travail a donc comporté essentiellement trois parties: -La préparation du système microsomal et l'étude de son fonctionnement par la mise en évidence de la formation de métabolites du méthyl-7 benzo[*a*]anthracène tritié quand ce dernier est introduit dans le système; -L'évaluation du taux de fixation, à de l'ADN, de métabolites du méthyl-7 benzo[*a*]anthracène tritié produits par action du système sur l'hydrocarbure marqué; -L'obtention d'informations sur la structure du complexe formé par l'emploi de la méthode de fluorescence.

#### Matériel et Méthodes

**Matériel**—Les hamsters qui sont utilisés pour l'extraction du foie et la préparation des microsomes sont des hamsters "dorés", donnés par Markovits.<sup>11a)</sup>

Le méthyl-7 benzo[*a*]anthracène non-radioactif (MBA) était soit un produit commercial en provenance de la société Schuchardt, soit un produit purifié dans le laboratoire de Jacquignon.<sup>11b)</sup> Le méthyl-7 benzo[*a*]anthracène tritié (<sup>3</sup>H-MBA) a été préparé dans le service de Pichat<sup>11c)</sup> au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay. On a vérifié la pureté du MBA ainsi que celle du <sup>3</sup>H-MBA par chromatographie en couche mince, spectre UV et un compteur Tricarb Packard.

L'ADN employé fut soit de l'ADN de sperme saumon, soit de l'ADN de thymus de veau, tous deux en provenance de la société Worthington. Les réactifs nécessaires à l'élaboration du milieu d'incubation ont été achetés soit à la société Sigma (NADP), soit à la société Boehringer (glucose-6-phosphate et glucose-6-phosphate déhydrogénase).

**Préparation des Microsomes**—Nous avons préparé des microsomes à partir du foie de hamsters selon les méthodes décrites par Garner<sup>12)</sup> et Ames.<sup>13)</sup> Les hamsters ont reçu préalablement une solution de phéno-barbital de sodium à 0,1% pendant 5 jours au moins, puis jeûné pendant les dernières 24 hr. Les hamsters sont tués par décapitation. Le foie est excisé, mis sur glace, lavé avec du KCl 0,15 M, cisailé dans trois volumes de KCl 0,15 M, et homogénéisé avec un appareil de Potter-Elvehjem muni d'un piston en téflon. L'homogénat est centrifugé à 10 000 tpm durant 10 min afin d'éliminer les noyaux, les débris cellulaires, les mitochondries et les lysosomes en culot. La fraction postmitochondriale est centrifugée à 100 000 *g* pendant 60 min. Le culot microsomal est lavé par KCl 0,15M, puis remis en suspension dans KCl 0,15M, 1 ml contient les microsomes d'environ 500 mg de foie. Tous les procédés ci-dessus sont effectués à 0—4°. Les microsomes préparés sont distribués dans les petits tubes plastiques bouchés, gelés brusquement dans l'azote liquide, et conservés dans le carboglace. Au moment de l'emploi, les microsomes sont dégelés dans la glace.

Les valeurs déterminées étaient 11,5 mg protéine/ml microsome.

Le système microsomal NADPH-responsable utilisé pour incubation contient: 80  $\mu$ mole de KCl, 15  $\mu$ mole de glucose-6-phosphate, 20  $\mu$ mole de MgCl<sub>2</sub>, 1 unité de glucose-6-phosphate déhydrogénase, 1  $\mu$ mole de NADP, 250  $\mu$ mole de Tris-HCl (pH 7,4), 1,5 ml de suspension microsomale diluée avec KCl 0,15M à 6 mg protéine/ml, pour 3 ml de mélange d'incubation.

11) a) P. Markovits, *Fondation Curie, Institut du Radium, rue Pierre-et-Marie-Curie, 75 Paris, France*; b) P. Jacquignon, *Institut de Chimie des Substances Naturelles, Centre National de la Recherche Scientifique, 91 Gif-sur-Yvette, France*; c) L. Pichat, *Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, 91 Gif-sur-Yvette, France*.

12) R.C. Garner, E.C. Miller et J.A. Miller, *Cancer Res.*, **32**, 2058 (1972); R.C. Garner, *Chem. Biol. Interactions*, **6**, 125 (1973).

13) B.N. Ames, W.E. Durston, E. Yamasaki et F.D. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2281 (1973).

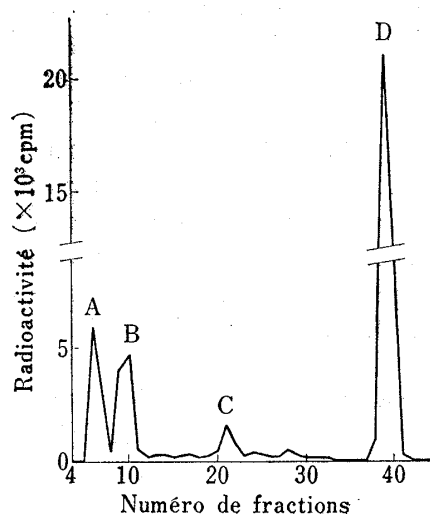


Fig. 1. Radiochromatogramme des Métabolites du  $^3\text{H}$ -MBA Produits par le Système Microsomal

A: dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 MBA, B: hydroxy-5 MBA C: époxy-5,6 dihydro-5,6 MBA, D: MBA

dans chacune est déterminée. Toute la manipulation est effectuée aussi rapidement que possible en lumière rouge de faible intensité et sous hotte.

Nous étions capables de démontrer l'époxyde de MBA très réactif (Fig. 1), comme l'indiquent les valeurs  $R_f$ : MBA 0,87 (métabolite)  $\longleftrightarrow$  0,87 (étalon); époxy-5,6 dihydro-5,6 MBA 0,39 (métabolite)  $\longleftrightarrow$  0,36 (étalon).

**Action du MBA sur l'ADN en Présence des Microsomes**—La fixation du MBA sur l'ADN, l'extraction et la purification du complexe ADN-MBA, s'effectuent selon les procédés décrits par Garner et Millers.<sup>12)</sup>

Les études du taux de fixation du MBA sur l'ADN, mesure de radioactivité liée à l'ADN, ont été faites avec l'ADN de sperme saumon et les microsomes extraits du foie de hamsters mâles. Les études de la forme chimique du complexe du MBA avec l'ADN, par spectrofluorimétrie, ont été faites avec l'ADN de thymus de veau et les microsomes de hamsters femelles. Les expériences ont été réalisées dans le cas des trois échantillons suivants, témoin, MBA,  $^3\text{H}$ -MBA, également traités en même temps toujours dans les mêmes conditions. Par ailleurs, toute la manipulation sauf l'extraction est effectuée à 0–4°, en utilisant un éclairage de lumière rouge de faible intensité.

A 1,15 ml d'une solution d'ADN en concentration voisine de 4,5 mg ADN/ml acétate de sodium  $10^{-2}\text{M}$ , pH 5,5, on ajoute 1,85 ml du système microsomal, l'ensemble est porté à 37°, puis chaque échantillon est additionné des réactifs suivants

pour évaluer la fixation du méthyl-7 benzo[*a*]anthracène tritié

témoin: 20  $\mu\text{l}$  d'acétone

MBA: 50  $\mu\text{g}$  de MBA dans 20  $\mu\text{l}$  d'acétone

$^3\text{H}$ -MBA: 30  $\mu\text{g}$  (17  $\mu\text{Ci}$ ) de  $^3\text{H}$ -MBA dans 20  $\mu\text{l}$  d'acétone

pour l'étude des spectres de fluorescence

témoin: 30  $\mu\text{l}$  d'acétone

MBA: 200  $\mu\text{g}$  de MBA dans 30  $\mu\text{l}$  d'acétone

Les mélanges sont maintenus 1 hr à 37°, additionnés de 1,7 ml de tampon Tris 0,08M (pH 7,4), et centrifugés 30 min à 100 000 g afin d'éliminer les microsomes. Les surnageants sont additionnés de 0,6 ml de lauryl sulfate de sodium à 0,1%, et extraits par un volume égal de mélange Kirby phénol (phénol: m-crésol: hydroxy-8 quinoléine: eau = 500: 70: 0,5: 55, w/w). Pour chaque échantillon, la phase aqueuse (I) est réextraite avec 1,5 volume de mélange Kirby phénol, et les extraits phénoliques combinés (I et II) traités par 3,6 ml de tampon Tris  $10^{-2}\text{M}$ , pH 7,4. Cet extrait aqueux (III) est combiné à la phase aqueuse (II), puis extrait trois fois par un volume égal d'éther saturé d'eau. La phase aqueuse déprotéinisée est ajustée à 3% avec l'acétate de sodium, et additionnée d'un volume identique de 2-éthoxyéthanol. L'ADN précipité est lavé avec l'éthanol à 80%, puis l'éthanol absolu et par l'éther, ensuite dissous dans le tampon Tris  $10^{-3}\text{M}$ , pH 7,4, ramené ultérieurement à une concentration de  $10^{-2}\text{M}$  par addition d'une solution  $10^{-1}\text{M}$ . L'ADN dans le tampon Tris  $10^{-2}\text{M}$  est soumis à une chromatographie sur colonne de Sephadex G-10 ( $1,8 \times 11$  cm). La solu-

**Etude des Métabolites du MBA par la Fraction Microsomal**—Afin d'inhiber l'enzyme microsomal "époxyde hydrase" qui autrement convertit les époxydes en dihydrodiols, nous avons utilisé le cyclohexène oxyde<sup>7a)</sup> ou des microsomes préincubés<sup>14)</sup> 10 min à 30°.

Au système microsomal on ajoute 1,1  $\mu\text{mole}$  de cyclohexène oxyde et 1 ml d'eau tridistillée (amenée à pH 7,4 avec de la soude 0,1N), préincube le mélange 10 min à 30°, puis on y ajoute une quantité de  $^3\text{H}$ -MBA dissoute dans l'acétone (30  $\mu\text{g}$  d'un hydrocarbure d'activité spécifique de 134 mCi/m mole). Le mélange est à nouveau maintenu 10 min à 30°, refroidi, extrait par un volume égal d'acétate éthylique renfermant de l'époxyde de MBA, et centrifugé 10 min à 8000 tpm. La phase organique supérieure est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  déshydraté, concentrée à tout petit volume par évaporation sous vide, déposée sur la plaque silica-gel (Merck, 0,25 mm d'épaisseur) préalablement séchée à 120°, et développée dans le benzène. Un mélange authentique de MBA, époxy-5,6 dihydro-5,6 MBA, dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 MBA et hydroxy-5 MBA dissous dans l'acétate éthylique, est développé comme les étalons dans chaque plaque. Les taches sont localisées en éclairant la plaque, avec une lampe émettant dans l'ultraviolet. Les couches silica-gel sont fractionnées en 4 mm de largeur. A chaque fraction sont ajoutés 5 ml de scintillateur,<sup>15)</sup> et la radioactivité présente

14) J.K. Selkirk, E. Huberman et C. Heidelberger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1010 (1971).

15) La composition du mélange scintillant est: POPOP 100 mg, PPO 4 g pour 1 litre de toluène.

tion élue renfermant l'ADN est concentrée par lyophilisation, et enfin dialysée contre 2 litres de Tris-NaCl  $10^{-2}M$ , pH 7,4. Dans le cas où l'on étudie les spectres de fluorescence, avant la dialyse nous avons encore purifié l'ADN par réprécipitation.

La concentration de l'ADN est déterminée par absorption ultraviolette à 260 nm et ajustée à une valeur commune pour spectrométrie.

**Détermination de la Radioactivité Fixée sur l'ADN**—100  $\mu$ l de chaque solution dialysée (échantillon MBA et  $^3H$ -MBA) sont placés directement dans les récipients servant à la mesure par scintillation en milieu liquide. Après évaporation, traitement pendant 2 hr vers  $30^\circ$  par 0,2 ml de Soluène, 10 ml de mélange scintillant (POPOP 100 mg, PPO 4 g/litre toluène) est finalement ajouté et la radioactivité évaluée à l'aide d'un compteur Tricarb Packard, l'échantillon "MBA" servant de "blanc".

**Spectrophotofluorimétrie du Complexe**—Les solutions dialysées sont amenées à une densité optique à 260 nm sensiblement analogue et leur spectre de fluorescence détecté à l'aide du spectrophotofluorimètre construit spécialement pour la détection de très faible fluorescence de molécules biologiques par Duquesne et Vigny.<sup>16)</sup> Le spectre est exploré dans l'intervalle 300 à 500 nm aux conditions expérimentales: en concentration voisine d'ADN 0,4 mg/ml Tris-NaCl  $10^{-2}M$ , pH 7,4; à la température ambiante; longueur d'onde d'excitation  $\lambda_0 = 248$  nm, largeur de bande  $\Delta\lambda_0 = 4,2$  nm, largeur de bande du monochromateur d'analyse  $\Delta\lambda_i = 6,4$  nm.

## Résultats

### Taux de Fixation du MBA sur l'ADN

La densité optique à 260 nm de 0,382 pour une dilution de 40  $\mu$ l de la solution ADN- $^3H$ -MBA avec 2 ml de tampon donne comme concentration de la solution initiale environ 1 mg/ml. D'autre part, la radioactivité mesurée du même échantillon ADN- $^3H$ -MBA était de 527 cpm/100  $\mu$ l, c'est-à-dire, 5270 cpm/ml.

Il en résulte que le niveau de fixation trouvé du  $^3H$ -MBA sur l'ADN est de 8  $\mu$ g/mg ADN, en tenant compte de l'activité spécifique de  $^3H$ -MBA à 650 cpm/ $\mu$ g dans les mêmes conditions de comptage. Mais en considération de détritiation de composés marqués qui peuvent survenir au cours des expériences,<sup>17)</sup> il semble possible de conclure que la quantité du MBA liée à l'ADN soit finalement plus grande que ces résultats trouvés par radioactivité. De ce point de vue, il serait évidemment plus souhaitable d'utiliser du MBA marqué par du

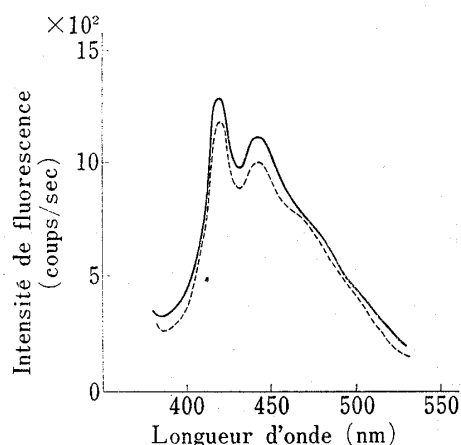


Fig. 2. Spectre de Fluorescence, en Phase Aqueuse, de l'ADN Témoin et de l'ADN Traité par le MBA, en Absence de Microsomes

a) —: ADN traité par MBA  
b) - - - : ADN témoin

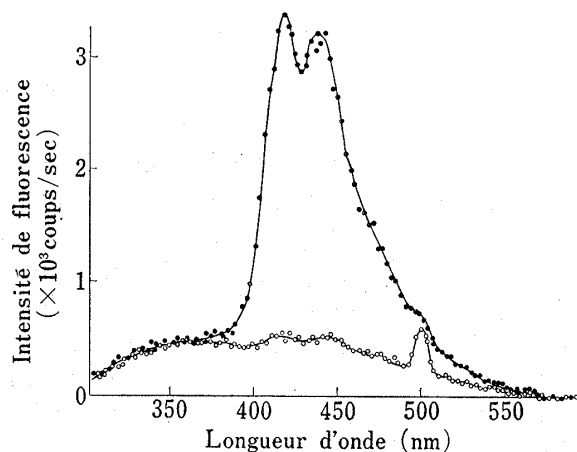


Fig. 3. Spectre de Fluorescence de l'ADN Témoin et de l'ADN Traité par le MBA en Présence de Microsomes

a) —●—: ADN traité par MBA dans le système microsomal  
b) - - - ○ - - : ADN témoin

16) P. Vigny et M. Duquesne, *Photochem. Photobiol.*, **20**, 15 (1974).

17) a) N. Kinoshita, B. Shears et H.V. Gelboin, *Cancer Res.*, **33**, 1937 (1973); b) W.M. Baird, A. Dipple, P.L. Grover, P. Sims et P. Brookes, *Cancer Res.*, **33**, 2386 (1973).

radio-C dans les noyaux, à la place du  $^3\text{H}$ -MBA; la perte de radioactivité en cours de réaction serait beaucoup moins probable. Mais on ne dispose pas actuellement de molécules d'hydrocarbures marquées par du  $^{14}\text{C}$  avec une activité spécifique suffisamment élevée pour permettre ces déterminations.

Lorsque nous avons effectué une expérience complète sauf que le système microsomal a manqué de cofacteur NADPH, nous n'avons pas observé de fixation; la radioactivité était de l'ordre du bruit de fond.

### Forme Chimique du Métabolite de MBA fixé à l'ADN

Avant de nous mettre à l'expérience, nous avons voulu vérifier l'efficacité des méthodes employées pour la purification des ADN. La solution aqueuse d'ADN additionnée de MBA

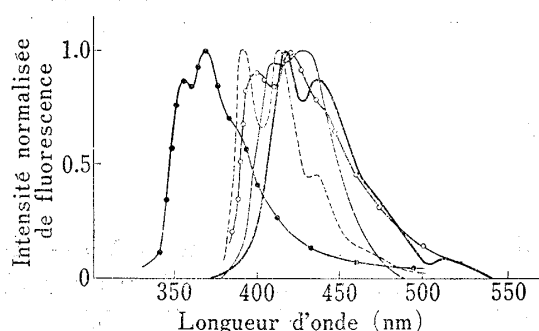


Fig. 4. Comparaison entre les Spectres de Fluorescence Obtenus avec l'ADN Traité par le MBA en Présence de Microsomes et Quelques Produits de Référence

—: ADN traité par MBA dans le système microsomal, —: ADN extrait de cellules traitées par MBA, —●—: ADN traité par époxy-5,6 dihydro-5,6 MBA, —○—: ADN traité par bromométhyl-7 benzo[a]anthracène, - - - - -: MBA libre

dans l'acétone subit directement le traitement de purification que nous avons décrit. La spectrofluorimétrie finale de l'ADN additionné de MBA (Fig. 2a) a donné le spectre de fluorescence analogue à celui de témoin (Fig. 2b). Le spectre ne dénote aucune substance par comparaison au spectre de témoin.

La Fig. 3 montre le spectre de fluorescence de l'ADN ayant réagi avec le MBA dans le système microsomal (Fig. 3a) et celui d'ADN témoin (Fig. 3b).

Les courbes de la Fig. 4 correspondent à la normalisation des signaux d'ADN traité par MBA dans le système microsomal (Fig. 3a - Fig. 3b) et de différents produits de référence<sup>18)</sup> -ADN extrait de cellules traitées par MBA, ADN ayant réagi directement avec le MBA époxyde ou le bromométhyl-7 benzo[a]anthracène. On a rappelé également le spectre de MBA libre.

### Discussion

Notre travail présente plusieurs aspects qui concernent l'étude des interactions des hydrocarbures aromatiques et des acides nucléiques.

L'emploi de MBA radioactif a permis l'observation d'un bon fonctionnement de notre système expérimental, y compris le très faible métabolisme de l'hydrocarbure. Qualitativement nous avons mis en évidence la formation par voie enzymatique de dérivés variés du MBA dans le système microsomal. D'autre part, nous avons mesuré la fixation de MBA sur l'ADN, 8  $\mu\text{g}$  par mg d'ADN ce qui correspond à 1 mole de MBA pour 100000 nucléotides, ce qui est une valeur raisonnable par rapport aux valeurs données par Gelboin<sup>6a)</sup> dans des conditions expérimentales similaires pour le benzo[a]pyrène. Rappelons cependant que ces valeurs de fixation sont évidemment très élevées en comparaison de ce que l'on peut observer avec des cultures de cellules ou chez l'animal, à savoir 1 mole de benzo[a]anthracène/600000 nucléotides.<sup>3)</sup> Il n'est pas interdit de penser d'ailleurs que les phénomènes de détritiation introduisent des erreurs différentes d'évaluation de la fixation dans ces différents cas, et minimisent de toute façon les résultats obtenus.

18) a) P. Daudel, M. Croisy-Delcey, P. Jacquignon et P. Vigny, *Compt. Rend.*, **277**, Série D, 2437 (1973); b) P. Daudel, M. Croisy-Delcey, C. Alonso-Verduras, M. Duquesne, P. Jacquignon, P. Markovits et P. Vigny, *Compt. Rend.*, "sous presse."

Le système d'activation du MBA est strictement enzymatique. En effet, la fixation est dépendante de la présence de microsomes et de cofacteur NADPH dans le milieu réactionnel. Lorsque le MBA dans une solution aqueuse d'ADN n'a pas été additionné du système microsomal, nous n'avons trouvé d'après le spectre de fluorescence aucune réaction du MBA avec l'ADN. Alors même que le  $^3\text{H}$ -MBA a été mis au contact d'ADN en présence de microsomes, mais en absence de NADPH, la fixation du  $^3\text{H}$ -MBA à l'ADN n'a pas non plus été détectée. Ces résultats sont également l'assurance de l'efficacité de notre procédé de purification de l'ADN. En somme, ce que nous avons mesuré par radioactivité ou évalué par spectre de fluorescence est donc très fortement lié.

Il est remarquable que le spectre du complexe MBA-ADN formé en présence de microsomes soit assez analogue à celui du complexe MBA-ADN de cellules. Les deux spectres accusent un déplacement bathochrome d'environ 20 nm par rapport au spectre du MBA libre, et sont déplacés de 10 nm par rapport à celui de l'ADN ayant fixé chimiquement le bromométhyl-7 benzo[*a*]anthracène.<sup>18b)</sup> Ces résultats suggèrent une analogie du système électronique délocalisé entre les métabolites intervenant dans les complexes décrits ci-dessus et l'hydrocarbure parent. (On ne doit pas oublier que la largeur de bande du monochromateur d'analyse était de  $\Delta\lambda = 6,4$  nm).

Mais, contre notre prévision, le complexe MBA-ADN de microsomes observé sur le spectre, aussi bien que celui de cellules, est évidemment très différent du complexe obtenu en traitant directement l'ADN par MBA époxyde de la région K. Cependant, un tel complexe de l'ADN-MBA époxyde pourrait être présent sans donner de spectre décelable dans nos conditions expérimentales, dans les plusieurs suppositions suivantes: -La quantité de produit qui se forme est très faible. Le rapport de l'époxyde dans les métabolites de MBA produits en présence de système microsomal n'est que voisin de 5% d'après la radiochromatographie. Mais encore, dans ce système expérimental l'époxyde est très stabilisé, car l'enzyme microsomale "époxyde hydratase" a été inhibée par le cyclohexène oxyde ou par préincubation des microsomes; -La différence des rendements quantiques observés sur les formes libres, et la méconnaissance de leur évolution pour les formes liées exercées sur les spectres de fluorescence.

Par ailleurs, nos résultats apparaissent en excellent accord avec des résultats récents de Baird, *et al.*<sup>17b)</sup> Ces auteurs ont en effet étudié le comportement radiochromatographique de fragments nucléotidiques obtenus par dégradation enzymatique d'ADN extraits de cellules traitées en culture par le MBA, et d'ADN traité directement par l'époxyde de la région K de cet hydrocarbure. Les profils d'éluion de la radioactivité obtenus dans ces deux expériences étaient entièrement différents, ce qui a conduit les auteurs à assurer que "leurs résultats ne supportent pas l'hypothèse d'un mécanisme de fixation du MBA à l'ADN (dans des cellules en culture), impliquant la formation d'un époxyde de la région K de cet hydrocarbure". Comme nous l'avons signalé, l'hypothèse de la formation d'un époxyde comme métabolite "ultime" d'un hydrocarbure polycyclique a été avancée à la suite d'une idée de Boyland,<sup>19)</sup> mais on peut se demander dans quelle mesure la pensée de Boyland a été bien interprétée car on pouvait lire de ce même auteur,<sup>19)</sup> les lignes suivantes: Il se peut que le métabolite actif d'un hydrocarbure cancérigène soit des

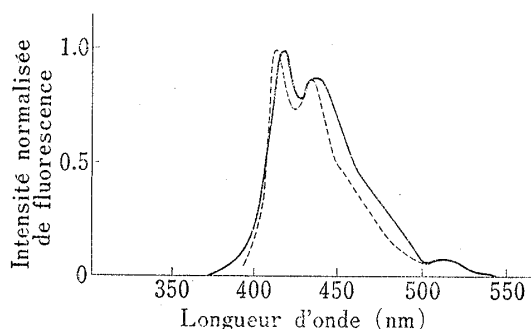


Fig. 5. Comparaison entre les Spectres de Fluorescence Obtenus avec l'ADN Traité par le MBA en Présence de Microsomes et Celui du Méthoxy-5 MBA

—: ADN traité par MBA dans le système microsomal,  
 - - - : méthoxy-5 MBA

19) E. Boyland, "The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry," Vol. 1, Jerusalem, 1969, p. 30.

formes réactives, ne soit pas des époxydes eux-mêmes, comme des radicaux ou des ions qui sont les précurseurs des époxydes. Il est curieux de remarquer dans cet esprit que le spectre de fluorescence du dérivé méthoxy-5 benzo[*a*]anthracène se trouve situé exactement à l'endroit du signal donné par le complexe que nous avons mis en évidence (Fig. 5).

Le résultat important de notre travail est donc d'avoir montré que lorsque l'on met en contact de l'ADN et du MBA, en présence d'un système microsomal, il se forme un complexe très voisin de celui qui se forme avec l'ADN dans le cas de cellules traitées en culture par l'hydrocarbure. Le métabolite du MBA intervenant dans ce complexe conserve la structure aromatique de l'hydrocarbure parent. Cette observation, l'analogie de la formation de complexe dans le système microsomal et dans les cellules en culture, rend plus aisée l'étude même de ces complexes, puisqu'en effet, le taux de formation en est plus important dans le système microsomal.

Nous avons donc maintenant en main un outil simple à manipuler, donnant des résultats rapides et reproductibles pour l'étude de l'interaction des acides nucléiques et des hydrocarbures cancérigènes.

**Remerciement** Ce travail a été réalisé au Laboratoire Curie de la Fondation Curie-Institut du Radium, sous la direction de Madame P. Daudel, Maître de Recherche au CNRS. Elle m'a habilement orientée et toujours encouragée. Je la prie de trouver ici l'expression de ma profonde admiration et toute ma reconnaissance.