



HAL
open science

Etudes de la régulation de la sulfhydryl oxydase QSOX1 et de son implication dans l'apoptose induite par les stress oxydants

Carole Morel

► **To cite this version:**

Carole Morel. Etudes de la régulation de la sulfhydryl oxydase QSOX1 et de son implication dans l'apoptose induite par les stress oxydants. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Franche-Comté, 2007. Français. NNT: . tel-00311794

HAL Id: tel-00311794

<https://theses.hal.science/tel-00311794>

Submitted on 21 Aug 2008

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

**UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE
BESANÇON**

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
DE FRANCHE-COMTÉ**
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Ecole Doctorale Homme, Environnement, Santé

Etudes de la régulation de la sulfhydryl oxydase QSOX1 et de son implication dans l'apoptose induite par les stress oxydants

par

Carole MOREL

Soutenue le 18 décembre 2007 devant la commission d'examen :

Président du jury : **D. Fellmann**, Professeur - Université de Franche-Comté.

Rapporteurs : **J. Roche**, Professeur - Université de Poitiers.
A. Beley, Professeur - Université de Bourgogne.

Membres du jury : **F. Esnard**, Professeur - Université de Tours.
M. Jouvenot, Professeur - Université de Franche-Comté.
P. Adami, Maître de conférences - Université de Franche-Comté.

A mes parents et grands parents,

A ma sœur et mon frère,

A mes amis et amies,

A Michaël.

LE COMTE : Qui t'a donné une philosophie aussi gaie ?

FIGARO : L'habitude du malheur. Je me presse de rire de tout, de peur d'être obligé d'en pleurer. (...)

*Le Barbier de Séville, acte 1, scène 2.
Beaumarchais*

REMERCIEMENTS

Je remercie la Ville de Besançon qui m'a accordé une bourse de thèse. Je suis consciente que c'est une chance sans laquelle je n'aurais sans doute pas réalisé ce rêve. Je salue également l'Université de Franche-Comté l'UFR Sciences et Techniques et l'école doctorale HES.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury.

Je suis particulièrement sensible à l'honneur que me font le Professeur Joëlle Roche et le Professeur Alain Beley en acceptant d'être rapporteurs et de juger ce travail. Je les remercie pour toutes leurs critiques enrichissantes.

Lors de la mise en place du projet de DEA en 2002, le Professeur Alain Beley et son équipe du laboratoire de Pharmacodynamie et Physiologie, Pharmaceutique de Dijon nous confié la technique utilisant le complexe Fe(III)-HQ d'induction d'un stress oxydant, je les en remercie.

Je remercie également le Professeur Frédéric Esnard d'avoir accepté de participer au jury, et d'avoir apporté aux discussions sa connaissance du sujet QSOX1. Ses dons réguliers d'anticorps anti-QSOX1 sont précieux pour l'équipe E2SNC et je souhaite que cette collaboration se poursuive et s'intensifie.

La réalisation de cette thèse n'aurait jamais été possible sans l'aide de nombreuses personnes envers lesquelles je suis infiniment redevable. Aussi, je tiens tout particulièrement à les remercier.

Merci au Professeur Michèle Jouvenot qui a été ma directrice de thèse pendant ces quatre années. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a témoignée en m'accueillant au Laboratoire de Biochimie, Biologie moléculaire. Je rends hommage à son honnêteté scientifique et morale. Ses enseignements ont toujours été d'une grande qualité, m'ont énormément apporté et resteront un exemple pour moi.

Je remercie infiniment Pascale Adami d'avoir encadré mes travaux de DEA et de thèse. Nos discussions scientifiques (peut-être pas assez nombreuses ?...) ont toujours été motivantes et dynamisantes, posant de nouvelles questions, donnant naissance à de nouveaux projets. Elle m'a formé aux techniques de laboratoire en DEA et reste une référence incollable dans de nombreux domaines. Je lui dois d'être arrivé jusque là. Ses cours de Biochimie, dès mes premières années universitaires, ont contribué à m'encourager (malgré la chimie organique !...) dans cette voie au détriment de l'Ecologie ou de la Biologie animale. Je vais maintenant retrouver ces autres passions avec plaisir.

Merci à Pascale et Michèle pour l'attention portée à l'écriture ou la relecture des articles, du manuscrit de DEA et de thèse. Ce sont des moments difficiles et studieux mais j'en retire beaucoup de plaisir, de travail et d'efficacité.

Je tiens également à remercier le Professeur Dominique Fellmann d'avoir accepté d'être président du jury. Même si je le connais peu, il me laisse l'impression d'être la force tranquille de l'équipe E2SNC. A chacune de nos rencontres, même en se croisant au détour d'un couloir, il a toujours eu un mot gentil ou une attention.

Merci aux enseignants-chercheurs de l'équipe E2SNC, pour leurs enseignements, leur amitié et leur soutien.

Régis, Annick, Maï et Jean (et Pascale et Michèle aussi, encore) ont été mes enseignants pendant mon cursus puis mes collègues au laboratoire. Je suis fière d'avoir partagé cette période de ma vie avec eux. A chaque étape j'ai grandi à leur contact, par la qualité de leurs enseignements. Le mot

« collègue » n'est pas anodin car ils considèrent les étudiants avec estime et respect et je trouve cela extrêmement important. Chacun est là pour les autres, même lorsque le temps vient à manquer, et je crois que c'est ce qui tient cette équipe debout. Qu'ils continuent de faire que cette équipe soit comme une « famille », elle l'est par sa taille mais surtout par les personnes qui la constituent. La raison vient peut-être simplement du fait que chacun d'entre eux sait ce qu'est une famille et sait équilibrer son temps et ses préoccupations entre sa propre famille et son travail. C'est une qualité rare. Ils font vivre le laboratoire de Biochimie auquel je souhaite « bon vent ! ».

Michaël et Hélène sont arrivés plus tardivement au cours de ma thèse mais nous avons eu l'occasion de travailler ensemble en encadrant des TP. Ces moments ainsi que nos discussions sur le plan personnel me permettent de penser que se sont des êtres brillants et généreux.

Pierre-Yves et Bernadette ont également toujours été présents, du côté de la fac de médecine. Merci pour tout.

Depuis quelques années, le laboratoire de Biochimie possède une nouvelle arme secrète nommée Valérie. Grâce à son souci du travail bien fait et son sens de l'organisation (au long terme et au quotidien !), elle a rendu ma vie au laboratoire plus agréable. Chacun a sa façon de travailler et sa « limite du supportable » en ce qui concerne l'ordre et l'environnement de travail, nous avons les mêmes... Je me suis donc sentie un peu moins seule de ce point de vue. Je lui souhaite de pouvoir s'épanouir dans sa vie professionnelle. Merci infiniment. Sur le plan personnel, ces dernières années ont été pour elle mi-figue mi-raisin, des grands bonheurs et des grandes peines. Je lui souhaite que les uns soient plus nombreux et les autres disparaissent, du fond du cœur. Merci pour son amitié, nos discussions et son soutien.

Merci aussi à Martine, qui s'en va mais revient dans cette équipe, tous les matins la première au labo (ou presque), fidèle à son poste.

Je n'oublie pas Gabrièle, Claude et Claude, Annie, Fabrice, Christophe et Martine qui sont toujours là pour donner un coup de main.

Merci aux étudiants.

Mes « aînés », Sandrine, Christophe, Georges et Anna, m'ont transmis leurs connaissances techniques et l'histoire du laboratoire. Je leur souhaite de poursuivre leurs vies dans les voies qu'ils se sont choisis et pour lesquelles ils se sont battus.

Mes « compagnons de route », Fabrice, Alexandre, Virginie, Karine et Kévin, ont partagé la grande partie de ma thèse et pour qui j'ai beaucoup de respect. A ceux qui ne l'ont pas encore soutenue, à l'heure où j'écris ces mots, je leur souhaite de terminer leurs thèses dans de bonnes conditions. J'espère être présente pour ces grands jours. Je souhaite à tous de la chance, il en faut, pour la suite du programme. Qu'ils parviennent à se tracer un chemin, qui leur convient.

Mes « puînés », Stéphanie, Sophie, Fatima et Nicolas, ont encore un long chemin devant eux. S'ils me permettent de leur donner un seul conseil, c'est de s'éclater au labo, dans leurs manips, de profiter de chaque bonheur grand ou petit. Qu'ils ne soient pas déçus de ne pouvoir tout faire, ça passe très très vite !...

Merci particulièrement à Stéphanie, cette dernière année est passée bien vite mais nous avons eu l'occasion de partager beaucoup. J'espère lui avoir un peu transmis ce que je savais. Je suis reconnaissante de son soutien.

Et tous les autres étudiants croisés lors d'un stage, BTS, maîtrise, DEA, etc... (Camila, Idir, Liliane, Cécile...).

A tous, je souhaite beaucoup de bonheur dans leurs vies personnelles. Merci pour leur amitié.

La Biologie à Besançon, c'est comme une grande équipe, il était juste que l'IFR IBCT soit créé.

Merci à tous ceux, au sein des différentes équipes, qui m'ont aidé ponctuellement, mais ces points permettent souvent d'ôter des épines. Je souhaite que cette entraide se poursuive et s'amplifie au

sein de l'IFR pour qu'aucun étudiant ne se sente vraiment seul dans un laboratoire qui n'est pas le sien ou face à un sujet nouveau.

Je pense tout particulièrement à Virginie Mougey, Zohair Selmani, Jean-Sébastien Guérini et Frédéric Déchaseaux qui m'ont accueillie, formée, conseillée... Merci pour leur amitié.

J'en profite pour saluer les gens de RD-Biotech, qui participent, peut-être plus de manière lucrative, mais souvent pour services rendus, à cette entraide bisontine.

Ces quatre années de thèse ont été également pour moi l'occasion de découvrir l'enseignement à l'université. J'ai eu l'opportunité d'effectuer des séances de travaux pratiques. Cette période d'enseignement a été pour moi la possibilité de découvrir un environnement différent et complémentaire de celui de la recherche. Aussi, je remercie Bernard Bonnet, Claudine Prouteau, Jean-Yves Cretin et tous les autres enseignants avec qui j'ai partagé des enseignements. Merci pour leur amitié.

Je pense tout particulièrement à Floriane, je souhaite vivement que notre amitié se poursuive en dehors des murs de l'université.

Cette thèse est l'histoire d'une jeune fille de 5^{ème} qui s'est dit un jour « je serai un jour chercheur en Biologie ! ». Je salue M^{me} Catherine Magne, qui enseignait les SVT au collège Emile Laroue de Frasne et a suggéré cette idée. Merci, pour toujours.

J'ai progressé dans mes études en m'attachant à cette idée. Je rends hommage aux enseignants de Biologie ou d'autres matières qui ont su transmettre leurs passions et satisfaire ma curiosité.

Je voudrais enfin rendre hommage à mes proches.

Merci, à mes parents, à ma sœur, mon frère et à mes grands parents, qui m'ont toujours soutenue, encouragée et conseillée dans mes choix, même dans les moments difficiles. Je dois à mes parents et grands parents d'avoir contribué à ma passion des sciences. Depuis toujours, ils ont encouragé ma curiosité et ont largement contribué à mon goût pour la Biologie. *Papa, avec ses histoires d'« infiniment grand et infiniment petit », Maman, le travail de la terre, Pépé et Papy, toujours la tête dans les calculs et les mains au jardin. Claire et Paul, de ces deux mondes, c'est le jardin que vous avez choisi, je suis fière d'être votre sœur et de notre complicité. Je pense également à tous mes cousins et cousines, nous avons grandi ensemble, notre amitié est sincère. Merci à toute ma famille pour sa présence. Je vous dédie cette thèse.*

Merci à tous mes amis et amies pour leur soutien, leur présence, leur écoute, et pour tous les bons moments passés ensemble et nos discussions interminables dont je ne me lasserai jamais.

Je pense bien évidemment à chacun de mes « binômes » qui ont participé (plus ou moins !...) activement à ma réussite de chaque année passée en leur compagnie. *Je vous dédie cette thèse, « Binômes d'un jour, binômes d'amour, binômes toujours !... ».*

La liste serait longue si je devais citer tous ceux que j'ai aimé, que j'aime, et en plus, j'en oublierais, c'est sûr !... *Je voudrais juste nommer ceux qui ont particulièrement compté à certains moments de ma vie, Sandrine, Antoine, Fanny, Virginie, Antoine, Maxime, Adeline, Céline, David, Mélanie. Longues ou courtes, vous le savez, les amitiés sont précieuses pour moi et je garde une partie de chacun de vous dans ce que je suis. Je vous dédie cette thèse.*

Maxime, cette thèse est la tienne !!...

Merci à mon Ami, mon Amour, mon Pivert, Michaël, pour tout...

Nous nous sommes rencontrés à mon entrée à l'université et tu as été le témoin privilégié de mes études, une nouvelle vie s'offre à nous désormais. Pendant ma thèse, tu as été à mes côtés aussi bien pour les moments de déception que d'espoir. Tu as même poussé le concept en étant à la

maison (involontairement) pendant toute la durée de la rédaction... si ce n'était pas facile par certains aspects, ta présence a peut-être rendu l'ensemble plus acceptable... J'ai fait de la recherche pendant ces quatre années et tenu cette promesse. J'en ai retiré beaucoup de bonheur, mais un peu de stress aussi. Merci d'avoir été là. Nous ne garderons en mémoire de ces années que les bons moments. Les mots seraient bien petits pour exprimer mon admiration pour toi et la curiosité que nous partageons. Je te dédie cette thèse, je t'aime.

どうもありがとうございます

Merci à vous tous !

TABLE
DES MATIERES

Abréviations	.9
CADRE ET BUT DU TRAVAIL	.15
INTRODUCTION	.21
Première partie : Les sulfhydryl oxydases de la famille QSOX	.23
<u>I. Les gènes <i>QSOX</i></u>	.26
1. Caractéristiques des gènes <i>QSOX</i>	.26
2. Phylogénie des gènes <i>QSOX1</i> et <i>QSOX2</i>	.28
<u>II. Les transcrits <i>QSOX</i></u>	.29
1. Caractéristiques des transcrits <i>QSOX</i>	.29
2. Expression tissulaire des transcrits <i>QSOX</i>	.30
3. Régulation de l'expression des transcrits <i>QSOX1</i>	.31
<u>III. Les protéines sulfhydryl oxydases de la famille QSOX</u>	.33
1. Caractéristiques structurales des protéines QSOX	.33
2. Les propriétés enzymatiques des protéines QSOX1	.34
3. Localisation tissulaire et cellulaire et régulation de l'expression des protéines QSOX	.37
4. Les rôles cellulaires possibles de QSOX	.40
Deuxième partie : Régulation de l'état rédox dans des conditions physiologiques normales et pathologiques	.45
<u>I. Les mécanismes de régulation de l'état d'oxydoréduction cellulaire</u>	.47
1. Les sources d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)	.47
2. Les modulateurs de l'état rédox	.51
3. Le déclenchement d'un stress oxydant	.55
4. La régulation de l'expression génique induite par les stress oxydants	.56
<u>II. La mort cellulaire induite par les stress oxydants</u>	.59
1. Le contrôle des lésions l'ADN pendant les phases G ₁ et G ₂ et l'arrêt du cycle cellulaire	.59
2. Le déclenchement de l'apoptose	.60
<u>III. Pathologies liées à la perte de contrôle de l'état rédox, du cycle cellulaire et de l'apoptose</u>	.67
1. Les stress ischémiques et hypoxiques	.67
2. Les maladies neurodégénératives : exemple de la maladie d'Alzheimer	.71
Troisième partie : La régulation de l'expression génique et neuroprotection induite par les estrogènes	.73
<u>I. Les récepteurs des estrogènes</u>	.76

1. Les récepteurs nucléaires des estrogènes ERα et ERβ	.76
2. Actions génomiques indirectes et actions non génomiques	.83
II. <u>La protection du cerveau par les estrogènes</u>	.84
1. Les effets protecteurs des estrogènes sur le système nerveux central	.85
2. Rôle des estrogènes dans la modulation de l'état rédox	.88
3. Les effets des estrogènes sur le contrôle de l'apoptose	.89
MATERIELS ET METHODES	.91
Première partie : les modèles d'étude	.93
I. <u>Les Cellules établies en lignées</u>	.93
1. Culture cellulaire	.93
a. Les cellules PC12	.93
b. Les cellules MCF-7/QSOX et MCF-7/pcDNA	.93
c. Entretien des cellules établies en lignées	.94
2. Traitements des cellules	.95
a. Traitement par le complexe Fe(III)-HQ	.95
b. Traitement par H ₂ O ₂	.96
c. Traitement par la staurosporine aglycone	.97
d. Autres traitements	.97
3. Etude de la viabilité cellulaire	.97
a. Estimation de la viabilité cellulaire par exclusion du bleu trypan	.97
b. Estimation du nombre de cellules vivantes par la technique « MTT »	.98
4. Cycle cellulaire et cytométrie en flux	.99
a. Etude de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire par cytométrie en flux	.99
b. Etude de l'expression de la protéine QSOX1 par cytométrie en flux	.99
c. Analyse	.100
5. Etude des caractéristiques de l'apoptose	.104
a. La morphologie des noyaux	.104
b. La fragmentation de l'ADN génomique	.105
c. Détection de l'apoptose par la technique TUNEL	.106
d. La dépolarisation des membranes mitochondriales	.107
II. <u>Le modèle de Rates ovariectomisées</u>	.108
1. Elevage des rates	.108
2. Ovariectomie des rates et traitement par E₂	.108
3. Sacrifice et dissection du cerveau	.108
Deuxième partie : Etude de l'expression des ARN messagers	.109
1. Extraction des ARN totaux	.109
a. A partir de cellules en culture	.109
b. A partir de cerveau de Rat	.109
2. Préparation des échantillons	.110
3. RT-PCR quantitative en temps réel	.110
a. Transcription inverse (RT)	.110
b. PCR quantitative en temps réel	.110
c. Analyse	.111

Analyses statistiques	.114
RESULTATS	.117
<u>I. Mise au point d'un modèle de protection par E₂ des cellules PC12 soumises à un stress oxydant</u>	.117
1. Recherche des conditions de la protection par E ₂ sur les cellules PC12 non différenciées	.117
2. Recherche des conditions de la protection par E ₂ sur les cellules PC12 différenciées	.119
<u>II. Etude de la régulation de l'expression de QSOX1 <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i></u>	.123
1. Etude de l'effet du NGF et/ou E ₂ dans les cellules PC12 et les cellules MCF-7	.123
a. Etude sur les cellules PC12	.123
b. Etude sur les cellules MCF-7	.127
2. Etude de l'effet de E ₂ dans le cerveau de Rates	.129
Publication n°1 : Carole Morel, Fabrice Tolle, Pascale Adami, Annick Fraichard, Pierre-Yves Risold et Michèle Jouvenot. Estradiol-17β down-regulates sulfhydryl oxidase QSOX1 mRNAs in female rat brain. Soumis pour publication à Neuroscience Letters	
<u>III. Etude de l'expression de QSOX1 sous l'effet d'un stress oxydant et effet d'une surexpression de QSOX1 sur la survie des cellules soumises à un stress oxydant</u>	.145
Publication n°2 : Carole Morel, Pascale Adami, Jean-François Musard, Dominique Duval, Jean Radom et Michèle Jouvenot. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. Experimental cell research 313, 2007; 3971-3982.	
DISCUSSION	.177
LISTE DES COMMUNICATIONS	.189
BIBLIOGRAPHIE	.193

ABREVIATIONS

ET

ACRONYMES

aa : amino-acyl
 ABC : ATP binding cassette
 ACO : aconitase
 ADN : acide désoxyribonucléique
 ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
 AF : activation function
 AIF : apoptosis-inducing factor
 ANT : adenine nucleotide translocator
 AP-1 : activator protein-1
 ARN : acide ribonucléique
 ARNm : ARN messenger
 ATF : activating transcription factor
 ATM/ATR : ataxia-telangiectasia-mutated/ATM-related
 AVC : accidents vasculaires cérébraux
 BBB : blood-brain barrier (barrière hémato-encéphalique)
 Bcl-2 : B cell lymphomas
 BDNF : brain derived neurotrophic factor
 BET : bromure d'éthidium
 BR : récepteur des benzodiazépines
 C/EBP β : CCAAT/enhancer binding protein β
 CAD : caspase-activated DNase
 caspases : Cystein **AS**partate prote**ASES**
 CAT : catalase
 CBP : CREB binding protein
 CCCP : carbonyl cyanide m-cholorophenylhydrazone
 CCE: cornified cell envelope
 CDK : cyclin-dependent kinase
 CEC : cellules endothéliales cérébrales
 CEGE : cellules épithéliales glandulaires d'endomètre
 CHX: cycloheximide
 CIF : caspase inhibitory factor
 Cip/Kip : CDK interacting protein/kinase inhibitory protein
 CK : créatine kinase
 Cp : *Cavia porcellus*
 CRE : cyclic AMP response element
 CREB : CRE binding protein
 CREM : CRE modulator
 CsA : cyclosporine A
 Ct : cycle threshold
 Cyt.*b5* réductase : cytochrome *b5* réductase
 DACM :
 DD : death domain
 DED : death effector domain
 DHOH : dihydroorotate déshydrogénase
 DIABLO : direct IAP binding protein with low pI
 DiOC₆(3) : dihexyloxacarbocyanine iodide
 DMSO : diméthyl sulfoxyde
 dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate
 domaine BH : domaine d'homologie à Bcl-2
 DTT : dithiotréitol
 Duox : dual oxidase
 E₂ : estradiol-17 β

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EGF : epidermal growth factor
eNOS : NO synthase endothéliale
EPO : érythropoïétine
ER: estrogen receptor
ERE : élément de réponse des estrogènes
ERK : extracellular signal-regulated kinases
Ero1p : endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 protein
ERV1/ALR : essential for respiration and viability/augmenter of liver regeneration
EST : expressed sequence tag
FAD : flavine adénine dinucléotide
FADD : Fas-associated death domain
Fe(III)-HQ : complexe formé par Fe³⁺ et la 8-hydroxyquinoline (HQ)
FITC : isothiocyanate de fluoresceine
FSH : follicle-stimulating hormone
GABA : acide γ -aminobutyrique
GABARAP : GABA_A receptor-associated protein
GADD : growth arrest and DNA damage
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GEC : pour glandular epithelial cells
Gg : *Gallus gallus*
GLAST : glutamate/aspartate transporter
GLT-1 : glutamate transporter-1
Gp : *Guinea pig*
GPR30 : G protein-coupled receptor 30
GPX : glutathion peroxydase
GR : glutathion réductase
GSH : glutathion réduit
GSK-3 β : glycogen synthase kinase-3 β
GSSG : glutathion oxydé
HAT : activité histone acétyl transférase
HDAC : activité histone désacétylase
HIF-1 α : hypoxia inducible factor-1 α
HK : hexokinase
HO-1 : hème oxygénase-1
HQ : 8-hydroxyquinoline
HRE : hormone response element
HS : horse serum
Hs : *Homo sapiens*
hsp : heat shock protein
HtrA2 : high-temperature requirement protein A2
IAP : protéines inhibitrices de l'apoptose
ICAD : inhibiteur de CAD
IFN- γ : interféron γ
IGF-I: insulin-like growth factor
iNOS : NO synthase inductible
IP : iodure de propidium
IRI : ischemia/reperfusion injury
ISP : iron-sulfure protein
I- κ B: inhibitor of NF- κ B
JNK : c-Jun N-terminal kinase
kb : kilo-bases

KGDHC : complexe α -cétoglutarate déshydrogénase
kpb : kilo-paires de base
LH: luteinizing hormone
MAO : monoamine oxydase
MAP : protéines associées aux microtubules
MAPK: mitogen activated protein kinase
MCF-7 : Michigan Cancer Foundation
Mdm2 : mouse double minute 2
MFI : intensité de fluorescence moyenne
MLK3-MKK4/7-JNK1/2 : mixed lineage kinase-3/MAP kinase kinase 4/7/c-jun-N-terminal kinase
Mm : *Mus musculus*
MPF : maturation promoting factor
mPTP : mitochondrial permeability transition pore
NAC : N-acétyl cystéine
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFT : neurofibrillary tangles
NF- κ B : facteur nucléaire κ B
NGF : nerve growth factor
NLS : nuclear localisation signal
Nox : NADPH oxydase
NT-3 : neurotrophin-3
OVX : rate ovariectomisée
PARP : poly-(ADP ribose) polymérase
pb : paire de base
PBS : phosphate buffer saline
PC12 : phéochromocytome 12
PCR : polymerase chain reaction
PDHC : complexe pyruvate déshydrogénase
PDI : protéine disulfures isomérase
PFA : paraformaldéhyde
PI3K : phosphatidyl-inositol 3- kinase
PKC : protein kinase C
PLC γ : phospholipase C γ
PPAR : récepteurs des activateurs de prolifération des peroxysomes
pRb : protéine du rétinoblastome
Q6 : quiescine 6
QSOX : quiescine/sulfhydryl oxydase
QSOX1-L : long QSOX1
QSOX1-S : short QSOX1
RAR, RXR : récepteurs des acides rétinoïques
RE : réticulum endoplasmique
Ref-1 : redox factor-1
Renox : Nox4 rénale
RNase : ribonucléase
RNS : reactive nitrogen species
ROS : reactive oxygen species
RT : récepteurs des hormones thyroïdiennes
RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction
RVD : récepteurs de la vitamine D
SDH : succinate déshydrogénase
SDS : sodium dodécylsulfate

SLA : sclérose latérales amyotrophiques
SMP : particules submitochondriales
SNC : système nerveux central
SOD : superoxyde dinucléotide
SoS : son of sevenless
SOXN : neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase
SP : plaques séniles
Sp1 : promoter-specific transcription factor-1
Src : steroid receptor coactivator
SRC-1 : steroid/nuclear receptor coactivator-1
SSO : skin sulfhydryl oxydase
SVF : sérum de veau foetal
TAE : Tris acétate EDTA
TAF : facteurs associés à la TATA-binding protein
TBP : TATA-binding protein
Tf : température de fusion
TGF : transforming growth factor
Thox ou Tox : thyroid oxidase
TPA : 12-O-tétradecanoyl-phorbol-13-acetate
Tris : tri-(hydroxyméthyl) amino méthane
trk : tyrosine kinase receptor
trx : thiorédoxine
TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling
UV : ultra-violet
VDAC : voltage-dependent anion channel
VEGF : vascular endothelial growth factor
 α GDH : α -glycérophosphate déshydrogénase

CADRE ET BUT

DU TRAVAIL

Le gène *QSOX1* de Cobaye a été identifié au début des années 1990 au sein de notre équipe. L'ADNc *QSOX1* de Cobaye a été le premier de la famille *QSOX* à être séquencé et déposé dans les bases de données. Comme nous le présenterons dans l'introduction, sa découverte est liée à la recherche de nouveaux gènes estrogéno-dépendants. Depuis, différentes approches ont montré une variation de l'expression de *QSOX1* sous l'effet des estrogènes dans différents types de cellules et apporté plus d'arguments en faveur de l'estrogéno-dépendance de *QSOX1*.

Au début de ces travaux de recherche, le rôle de la protéine QSOX1 au sein de la cellule et de l'organisme était inconnu. Son expression avait été étudiée dans les cellules quiescentes (Coppock *et al*, 2000 ; Musard *et al*, 2001), dans la maturation des spermatozoïdes (Kumari *et al*, 1990), la formation de la couche cornée de l'épiderme (Hashimoto *et al*, 2001), ainsi que dans l'endomètre utérin au cours du cycle estrien (Musard *et al*, 2001). Cependant, les éléments de réponse manquaient concernant le rôle de QSOX1 dans ces processus. Les études menées sur les propriétés enzymatiques de QSOX1 avaient permis de montrer qu'il s'agissait d'une sulfhydryl oxydase (Hoover *et al*, 1996).

En 2004 a eu lieu le regroupement entre les équipes du Pr D. Fellmann, travaillant sur l'hypothalamus latéral et en particulier les neurones à hormone de mélan-concentration (MCH) et les neurones à hypocrétine/orexine (Hcr/Ox), et du Pr. M. Jouvenot, travaillant sur les gènes estrogéno-dépendants. La nouvelle équipe EA3922 « Estrogènes, expression génique et pathologies du système nerveux central », s'est notamment intéressée aux effets neuroprotecteurs des estrogènes. La protection du cerveau par E₂ implique notamment la modulation de l'expression de gènes cibles qui font l'objet de nombreuses études. Nous avons donc voulu savoir si le gène *QSOX1* pourrait faire partie des gènes dont l'expression est régulée par les estrogènes et intervenant dans la neuroprotection.

Les stress oxydants ont un rôle prépondérant dans la mort des cellules du cerveau lors d'un épisode d'ischémie/reperfusion et au cours du développement des maladies neurodégénératives. L'hormone stéroïde E₂ possède des effets neuroprotecteurs qui s'exercent à différents niveaux et protègent le cerveau contre les processus induisant la mort neuronale (Dubal *et al*, 2001 ; Behl, 2002).

Dans ce contexte, nous nous sommes posé les questions suivantes : quels sont les autres gènes régulés par E₂ impliqués dans la neuroprotection ? Le gène QSOX1, estrogéno-dépendant, est-il impliqué dans la neuroprotection par les estrogènes ?

Afin d'apporter des éléments de réponse à ces questions, les objectifs de nos travaux ont été les suivants :

- **mettre au point un modèle de protection par E₂ des cellules PC12 soumises à un stress oxydant.**

Pour cela, nous avons choisi de réaliser les expériences sur des cellules PC12, apparentées à des cellules nerveuses, transfectées de façon stable par un vecteur d'expression des récepteurs des estrogènes ER α (cellules PC12/ER α). Les cellules PC12 naïves sont les cellules contrôles transfectées par le vecteur vide. La protection des cellules par E₂ a été testée sur les cellules non différenciées puis différenciées par le NGF.

La mise au point d'un modèle de stress oxydant induisant la mort des cellules PC12 a débuté par le choix des molécules induisant ce stress. Les stress oxydants ont été créés dans les cellules PC12 par une augmentation du fer libre intracellulaire en traitant les cellules par le complexe Fe(III)-HQ. Les cellules ont également été traitées par H₂O₂.

- **étudier la régulation de l'expression de QSOX1 *in vitro* et *in vivo*.**

In vitro, l'étude de l'expression de QSOX1, sous l'effet de E₂ et/ou du NGF, a été réalisée dans les cellules PC12/ER α et PC12 naïves différenciées et dans les cellules MCF-7. L'expression des messagers *QSOX1* a été analysée par RT-PCR quantitative en temps réel tandis que l'expression de la protéine QSOX1 a été étudiée par immunomarquage et cytométrie en flux.

In vivo, les variations du taux de messagers *QSOX1* ont été analysées par RT-PCR quantitative en temps réel dans différentes aires du cerveau de Rates ovariectomisées et traitées ou non par E₂.

- **étudier l'implication de QSOX1 dans la réponse des cellules aux stress oxydants.**

Les cellules ont été soumises à des stress oxydants induits par le complexe Fe(III)-HQ et par H₂O₂. Un témoin positif de l'induction de l'apoptose a été obtenu en traitant les cellules par la staurosporine aglycone.

Dans un premier temps, nous avons étudié les variations de l'expression des messagers *QSOX1* et de la protéine QSOX1 en réponse à un stress oxydant dans les cellules PC12.

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet d'une surexpression de QSOX1 sur la survie des cellules MCF-7 soumises à un stress oxydant.

Le manuscrit se présentera de la manière suivante :

Dans un premier chapitre d'introduction nous présenterons successivement

- **les sulfhydryl oxydases de la famille QSOX,**
- **la régulation de l'état rédox dans des conditions physiologiques normales et pathologiques,**
- **la régulation de l'expression génique et neuroprotection induite par les estrogènes.**

Nous exposerons les données bibliographiques afin de définir le contexte concernant ces trois domaines.

Dans un second chapitre, nous décrirons les techniques utilisées lors de nos expériences.

Un chapitre sera ensuite consacré aux résultats que nous avons obtenus lors de nos différents travaux. Certains résultats seront exposés sous forme d'articles publiés ou en cours de soumission.

Enfin, nous terminerons par une discussion de nos résultats avant de conclure.

INTRODUCTION

Première partie :

Les sulfhydryl oxydases de la famille QSOX

Les sulfhydryl oxydases sont des enzymes qui catalysent la réaction d'oxydation de résidus thiols par l'oxygène moléculaire pour former des ponts disulfures. Cette réaction s'accompagne d'une libération de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La stoechiométrie de cette réaction est illustrée dans la figure 1. Selon l'enzyme, les substrats peuvent être deux protéines ou deux peptides, et dans ce cas le pont disulfure permet leur dimérisation. Au contraire, le pont disulfure peut être formé à partir de deux résidus cystéyls d'une seule protéine et permet son repliement.

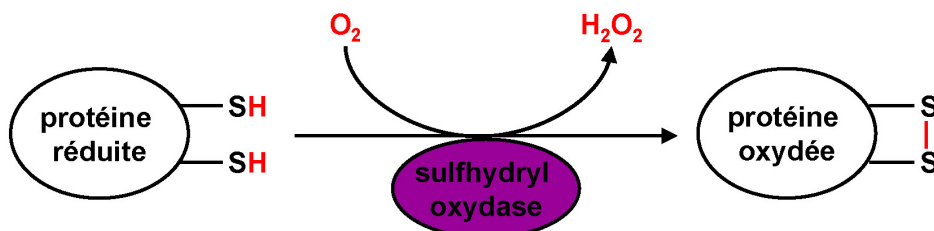


Figure 1 : La réaction catalysée par les sulfhydryl oxydases. Les groupements thiols (-SH) de peptides et de protéines réduits sont des substrats potentiellement oxydables par ces enzymes. Au cours de la réaction, l'oxygène moléculaire est réduit en peroxyde d'hydrogène.

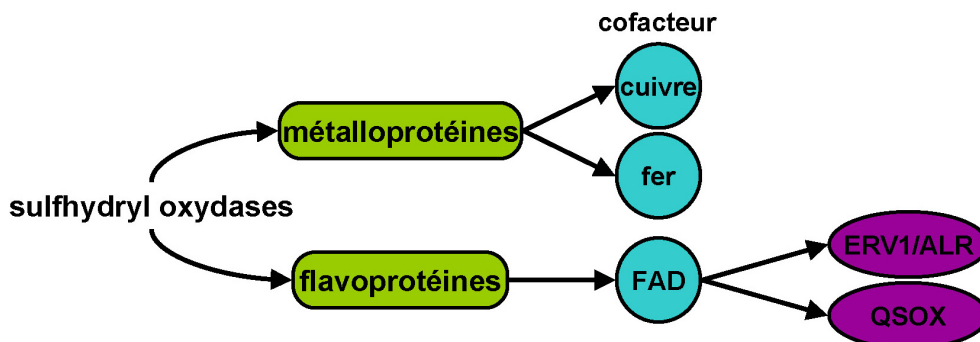


Figure 2 : Deux grandes classes d'enzymes à activité sulfhydryl oxydasique ont été étudiées depuis le début des années 70 : les métalloprotéines, dépendantes du cuivre ou du fer, et les flavoprotéines dépendantes du FAD (pour flavine adénine dinucléotide). Les flavoprotéines sont réparties en deux groupes, la famille des protéines ERV1/ALR (pour essential for respiration and viability/augmenter of liver regeneration) et la famille QSOX (pour quiescine/sulfhydryl oxydase).

Les **sulfhydryl oxydases dépendantes de métaux** sont des métalloprotéines à activité sulfhydryl oxydasique. Elles se regroupent en deux familles en fonction de leur cofacteur (figure 2). Les **sulfhydryl oxydases dépendantes du fer** ont été étudiées dès les années 1970, par l'équipe de Swaisgood. La sulfhydryl oxydase bovine a été isolée à partir du lait (Janolino et Swaisgood, 1975). En présence de cette enzyme, la RNase A et le chymotrypsinogène A acquièrent leur conformation fonctionnelle plus rapidement qu'en son absence. Ce résultat suggère que les sulfhydryl oxydases pourraient être impliquées dans la maturation des protéines en intervenant dans leur repliement grâce à la formation de ponts disulfures (Janolino *et al*, 1978 ; Swaisgood et Horton, 1979). Les **sulfhydryl oxydases dépendantes du cuivre**, comme la sulfhydryl oxydase identifiée dans l'intestin de Rat et dans le rein de Porc, utilisent le cuivre comme cofacteur enzymatique (Lash et Jones, 1983 ; Lash et Jones, 1986). La sulfhydryl oxydase de rein de Porc oxyde le DTT

(dithiotréitol), la NAC (N-acétyl cystéine) et la cystéamine (Lash et Jones, 1986).

Les **sulfhydryl oxydases dépendantes du FAD** (pour flavine adénine dinucléotide) appartiennent à deux familles (figure 2).

La **famille des protéines ERV1/ALR** (pour essential for respiration and viability/augmenter of liver regeneration) comprend les protéines ERV1 et ERV2 qui ont été identifiées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Lisowsky, 1992). ERV1 pourrait jouer un rôle dans le cycle cellulaire, le maintien du génome mitochondrial et l'assemblage des protéines fer-soufre cytosoliques (Lisowsky, 1994 ; Lange *et al*, 2001). ERV2 est localisée dans le réticulum endoplasmique et oxyde la protéine disulfures isomérase (PDI) en parallèle de l'action de la protéine Ero1p (Sevier *et al*, 2001). Le gène *ALR* est l'orthologue chez les mammifères du gène *ERV1* (Polimeno *et al*, 1999).

Les **sulfhydryl oxydases de la famille QSOX** (pour quiescine/sulfhydryl oxydase) seront l'objet de cette première partie.

I. Les gènes QSOX

1. Caractéristiques des gènes QSOX

La découverte des différents gènes (ou protéines) de la famille *QSOX* a été relativement étalée dans le temps. Afin d'uniformiser la nomenclature, Thorpe et collaborateurs ont proposé, en 2002, de renommer « *QSOX* » (pour quiescine Q6/sulfhydryl oxydase) les gènes apparentés à celui de la quiescine Q6, auparavant nommé « *QSCN6* ». L'appartenance à chaque espèce est désignée par la première lettre du genre et de l'espèce, comme par exemple, *QSOX1* aviaire appelé « *GgQSOX1* » (pour *Gallus gallus QSOX1*) (tableau I). Pour simplifier, il est également possible de trouver la première lettre de l'animal d'origine. Ainsi, le gène *QSOX1* de Rat conservera la dénomination « *rQSOX1* » (tableau I). Il existe actuellement deux gènes connus, les gènes paralogues appelés *QSOX1* et *QSOX2*.

organisme	ancienne dénomination	nomenclature utilisée
Homme	quiescine Q6 ou hQSOX	HsQSOX1 ou hQSOX1
Rat	SOx-2	rQSOX1
Cobaye	GEC-3 ou SOx-3	CpQSOX1 ou gpQSOX1
Poule	QSOX aviaire	GgQSOX1
Souris	mQSOX	MmQSOX1 ou mQSOX1
Homme	SOXN	HsQSOX2 ou hQSOX2

Tableau I : Les gènes de la famille QSOX. Les différentes appellations données à l'origine aux gènes (ou aux protéines) tendent à être remplacées par la nomenclature proposée par Thorpe *et al* (2002). h : Homme ; Hs : *Homo sapiens* ; r : Rat ; gp : Guinea pig ; Cp : *Cavia porcellus* ; m : Mouse ; Mm *Mus musculus*.

Les informations générales concernant les gènes *QSOX* connus des mammifères et de Poule sont présentées dans le tableau II. Le gène *QSOX1* humain est localisé sur le chromosome 1 dans une région potentiellement impliquée dans une forme héréditaire de cancer de la prostate (Coppock *et al*, 1998). Chez le Cobaye, le gène *QSOX1* a été identifié, dans notre équipe, au cours d'une étude visant à rechercher des gènes potentiellement régulés par les estrogènes dans un modèle de cellules épithéliales glandulaires d'endomètre (GEC) de Cobaye en culture primaire (Pellerin *et al*, 1993 ; Musard *et al*, 2001). L'ADNc *QSOX1* de Cobaye fut initialement nommé *gec-3*, puis renommé *SOX-3*.

Le gène *QSOX2*, a été identifié dans le génome de nombreuses espèces végétales (*AtQSOX2*, *Arabidopsis thaliana QSOX2*) et animales, notamment chez l'Homme, le Rat et la Souris (Thorpe *et al*, 2002 ; Wittke *et al*, 2003) (tableau II). Chez toutes les espèces animales étudiées, les gènes *QSOX2* et *QSOX1* sont localisés sur des chromosomes différents (tableau II).

Sulfhydryl Oxydase	Organisme	gène ID (GenBank™) exons/ introns taille du gène	Localisation du gène (GenBank™)	ADNc (GenBank™)	Protéine (GenBank™)
QSOX1 humaine <i>hQSOX1</i>	<i>Homo sapiens</i>	(5768) 11/12 41 000 pb	Chromosome locus 1q24	2602 pb (AF361868)	hQSOX1-S 604 aa (AAM00263)
				3314 pb (U97276)	hQSOX1-L (Q6) 747 aa (AAC09010)
QSOX1 de Rat <i>rQSOX1</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	(84491) 13/12 37 750 pb	Chromosome 13 locus 13q21	2472 pb (NM_053431)	hQSOX1-S 570 aa (NP_445883)
				3356 pb (AY623665)	rQSOX1-L 750 aa (Q6IUU3)
QSOX1 de Souris <i>MmQSOX1</i>	<i>Mus musculus</i>	(104009) 12/11 34 744 pb	Chromosome 1 locus 1G3	1734 pb (AB044284)	568 aa (BAB21936)
QSOX1 de Cobaye <i>CpQSOX1</i>	<i>Cavia porcellus</i>			2492 pb (U82982)	613 aa (AAB58401)
QSOX1 aviaire <i>GgQSOX1</i>	<i>Gallus gallus</i>	(373914) 10/9	Chromosome 8	2232 pb (AY112666)	743 aa (AAM44079)
QSOX2 humaine <i>hQSOX2</i>	<i>Homo sapiens</i>	(169714) 11/10 32 000 pb	Chromosome 9 locus 9q34	4555 pb (AJ318051)	698 aa (CAC85331)
QSOX2 de Souris <i>MmQSOX2</i>	<i>Mus musculus</i>	gène prédit (227638)	Chromosome 2 locus 2A3	2466 pb (BC030934)	639 aa (AAH30934)

Tableau II : Informations générales concernant les gènes de la famille *QSOX* identifiés. pb : paires de bases ; aa : amino-acyls.

2. Phylogénie des gènes *QSOX1* et *QSOX2*

L'analyse des séquences *QSOX* connues et des génomes séquencés des organismes modèles montre que tous les métazoaires possèdent au moins un gène *QSOX* (Thorpe *et al*, 2002 ; Coppock et Thorpe, 2006). Les plantes supérieures (*Arabidopsis thaliana*) possèdent également des séquences *QSOX* (Thorpe *et al*, 2002). Différents protozoaires, parasites importants dans les maladies humaines, possèdent un seul gène apparenté à *QSOX1* (*Trypanosoma brucei*). Les levures et champignons ne possèdent pas de gène *QSOX* mais une ou plusieurs copies du gène *erv1/alr* (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Encephalitozoon cuniculi*) (Lisowsky, 1992 ; Stein et Lisowsky, 1998 ; Thorpe *et al*, 2002).

L'évolution de l'organisation structurale des gènes *QSOX1* et *QSOX2* a été étudiée à travers l'analyse des homologies des séquences nucléotidiques et d'amino-acyls entre les espèces. La figure 3 présente un modèle possible de l'évolution ayant permis l'apparition des gènes de la famille *QSOX*. Ces analyses phylogénétiques ont conduit à la conclusion que les gènes *QSOX1* et *QSOX2* proviennent de la fusion de deux gènes ancestraux, les gènes *thiorédoxine* (*trx*) et *erv1* (Coppock *et al*, 1998). La comparaison des séquences des deux domaines Trx présents dans les PDI et les membres de la famille *QSOX* démontre qu'ils ont évolué séparément à partir d'un ancêtre commun il y a plus d'1 milliard d'années (Coppock *et al*, 1998) (figure 3).

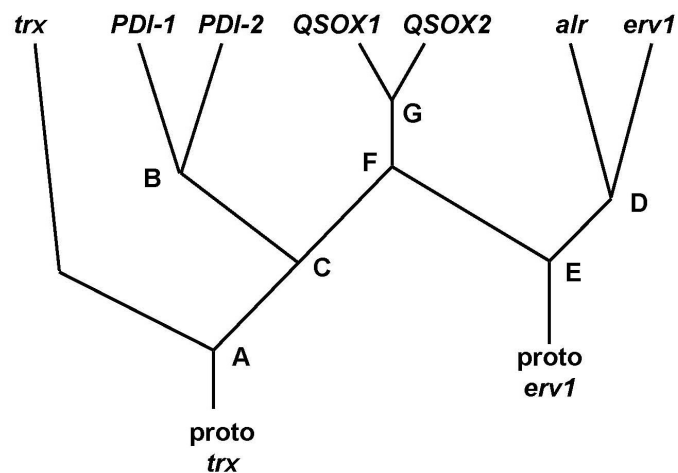


Figure 3 : Modèle de la phylogénie des gènes *QSOX*. Les thiorédoxines bactérienne et eucaryote ont un site actif contenant le motif WCGPC. Les protéines *QSOX* et les *PDI* possèdent un site contenant le motif WCGHC, suggérant que les gènes *QSOX* et *PDI* dérivent d'un ancêtre commun (A), avant de diverger l'un de l'autre (C). Les protéines *ALR* et *ERV1* présentent de fortes identités de séquences suggérant que les gènes *alr* et *erv1* dérivent d'un ancêtre commun (D). D et la partie codant le domaine *ERV1* de *QSOX* ont probablement un ancêtre commun (E). La présence des domaines *TRX* et *ERV1* au sein des protéines *QSOX* a permis de supposer la fusion des deux gènes *trx* et *erv1* (F). Les gènes *QSOX1* et *QSOX2* proviendraient d'une duplication du gène *QSOX* ancestral (G). D'après Coppock *et al*, 1998.

Le locus *QSOX* semble s'être dupliqué indépendamment chez les plantes, les invertébrés et les vertébrés pour former des gènes paralogues. En effet, les séquences du gène paralogue de *QSOX1* chez *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* sont plus proches entre elles que des séquences de *QSOX2* des espèces vertébrées (Thorpe *et al*, 2002 ; Coppock et Thorpe, 2006). La duplication du locus *QSOX* chez les vertébrés, qui a conduit à la formation de *QSOX1* et *QSOX2*, aurait eu lieu à une période estimée à 450 millions d'années, avant la divergence entre les poissons osseux et l'ancêtre des mammifères et des oiseaux (Coppock et Thorpe, 2006). Les protéines codées par les gènes *QSOX2* présentent entre elles plus de 75% d'identité, indiquant que le gène *QSOX2* provient vraisemblablement d'une duplication du gène *QSOX* ancestral et qu'il a évolué de façon distincte (Wittke *et al*, 2003).

II. Les transcrits *QSOX*

1. Caractéristiques des transcrits *QSOX*

Des transcrits du gène *QSOX1* ont été détectés chez de nombreuses espèces animales et dans de nombreux tissus, en particulier chez l'Homme, le Rat, la Souris et le Cobaye.

L'hybridation des northern blots, réalisés à partir des ARN extraits de différents tissus humains et de Rat, montre la présence d'au moins deux transcrits de taille différente (Coppock *et al*, 1993 ; Musard *et al*, 2001 ; Radom *et al*, 2006). Chez l'Homme, un site d'épissage alternatif au sein de l'exon 12 entraîne la formation des deux transcrits (Thorpe *et al*, 2002) (tableau II). Chez le Rat, l'existence d'un épissage alternatif a été démontrée dans le cerveau (Radom *et al*, 2006) (figure 4). Les protéines codées par les deux ARN messagers ont été désignés, par Thorpe *et al* en 2002, *QSOX1a* et *QSOX1b*. Nous les avons appelés respectivement *QSOX1-L* (pour large *QSOX1*) et *QSOX1-S* (pour short *QSOX1*). Cette appellation, qui nous paraît plus explicite et simple d'utilisation, a été utilisée par Radom *et al* (2006), à la fois pour les protéines et les transcrits (*QSOX1-L* et *QSOX1-S*) (figure 4). Le tableau II présente les caractéristiques des différents ADNc *QSOX1* (*hQSOX1-L* = *hQ6*).

Les séquences d'ADNc des différentes espèces de mammifères (*hQSOX1-S*, *QSOX1* de Souris et *QSOX1* de Cobaye) montrent de fortes identités (plus de 79%) sur une grande partie de leur longueur avec l'ADNc *rQSOX1-S*. Sur l'ensemble de sa longueur, l'ADNc *QSOX1* aviaire présente peu d'identité avec les ADNc des mammifères mais présente 73% d'identité au niveau des régions correspondant aux domaines intervenant dans la réaction enzymatique.

Trois transcrits *QSOX2*, de 3,3 kb, 4,6 kb et 7,5 kb ont été mis en évidence par northern

blotting/hybridation dans la lignée cellulaire Tet21N de neuroblastome humain (Wittke *et al*, 2003). Un ADNc de 4555 pb correspondant au transcrit de 4,6 kb a été séquencé (tableau II) (Wittke *et al*, 2003). Les ADNc *QSOX2* de l'Homme, du Rat et de la Souris montrent de fortes identités entre eux (plus de 82%), mais une faible identité avec les ADNc *QSOX1*.

ADN génomique *rQSOX1*

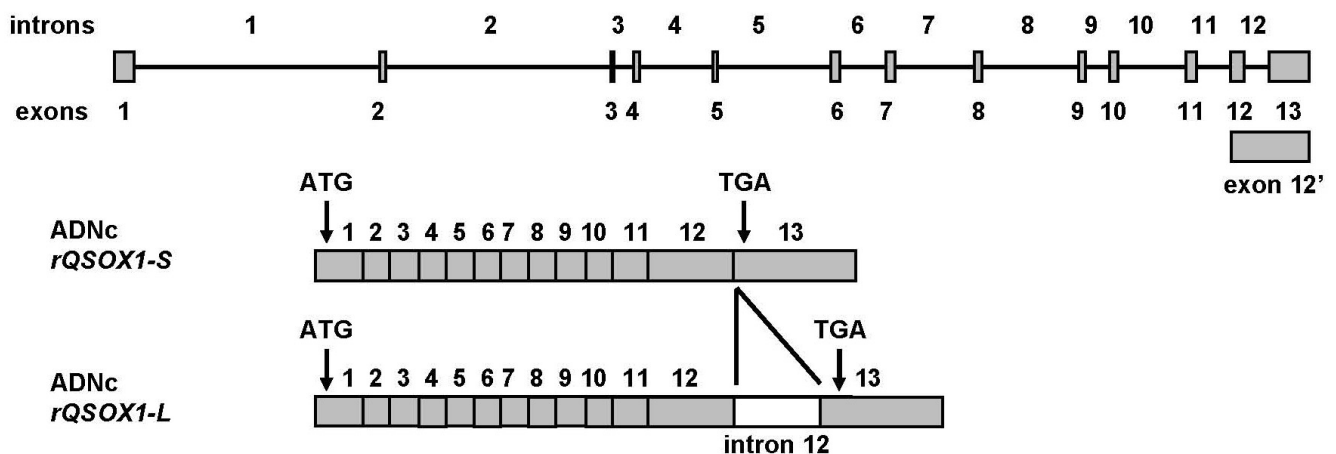


Figure 4 : Organisation structurale du gène *rQSOX1* et des ADNc. Ce gène est localisé sur le chromosome 13, au locus 13q21. Il est constitué de 13 exons (en gris) et 12 introns sur environ 37 750 paires de bases. L'épissage alternatif de l'intron 12 entraîne la formation de deux transcrits, dont les ADNc sont représentés, et codant les protéines *rQSOX1-S* de 570 amino-acyls et *rQSOX1-L* de 750 amino-acyls. L'exon 12' de *rQSOX1-L* est constitué de l'exon 12 de l'intron 12 et de l'exon 13. D'après Radom *et al*, 2006.

2. Expression tissulaire des transcrits *QSOX*

Les messagers *QSOX* sont observés dans une grande variété de tissus chez beaucoup d'espèces.

Les transcrits *hQSOX1-S* et *hQSOX1-L* sont exprimés dans le cœur, le placenta, les poumons, le foie, les muscles squelettiques et le pancréas et faiblement exprimés ou peu détectables dans le cerveau et les reins (Coppock *et al*, 2000). Ces deux transcrits sont également présents dans les testicules, les ovaires, l'intestin grêle, le colon, les leucocytes du sang périphérique et la prostate (Musard *et al*, 2001). Dans certains organes, la présence de transcrits supplémentaires apparemment de taille différente a été détectée. Par exemple, dans le placenta et le pancréas humains, un transcrit de 4,8 kb est observable, ainsi qu'un transcrit de 1,8 kb dans les testicules, les ovaires, l'intestin grêle, le colon, le placenta, les muscles squelettiques, et un transcrit de 2,9 kb dans le placenta (Musard *et al*, 2001). Ces résultats suggèrent la possibilité d'un épissage alternatif complexe dans ces organes. Par northern blotting/hybridation, un transcrit *rQSOX1-S* de 2 600 bases a été détecté en quantité abondante dans les vésicules séminales, l'épididyme (Benayoun *et al*, 2001) et les testicules

(Mairet-Coello *et al*, 2002). L'amplification par RT-PCR a permis de détecter sa présence dans d'autres organes, tels que les reins, la rate (Benayoun *et al*, 2001), et dans la glande surrénale (Mairet-Coello *et al*, 2002). Chez le Rat, en prélevant les ARN de différentes zones du cerveau, l'expression des transcrits *QSOX1* a pu être mise en évidence pour la première fois dans le cerveau, par northern blotting/hybridation et RT-PCR (Mairet-Coello *et al*, 2002). Le transcrit le plus abondant, *rQSOX1-S*, se trouve principalement dans le diencéphale, le télencéphale et plus faiblement dans le bulbe olfactif, le tronc et le cervelet (Mairet-Coello *et al*, 2002). Une sonde s'hybridant spécifiquement au transcrit long a été mise au point dans notre équipe (Radom *et al*, 2006). La présence du transcrit *rQSOX1-L* a pu ainsi être mise en évidence pour la première fois dans les vésicules séminales, le cerveau, le cœur, les testicules, l'hypophyse et les poumons (Radom *et al*, 2006). Dans l'endomètre de Cobaye, par northern blotting/hybridation le transcrit *QSOX1* de 2,7 kb est plus fortement détecté dans les cellules épithéliales glandulaires que dans les cellules stromales (Musard *et al*, 2001).

Ces résultats montrent que, si *QSOX1* est présent de manière ubiquitaire dans la plupart des tissus, il existe une variation de l'intensité d'expression entre les tissus mais surtout entre les différents types cellulaires. Cette observation sera confirmée par les variations d'expression de la protéine spécifique de certaines cellules au sein des organes (voir troisième chapitre).

Les transcrits *hQSOX2* de 4,6 kb et 7,5 kb ont été détectés dans un grand nombre de tissus. Ils sont abondamment présents dans le pancréas, les reins, le cœur, et plus faiblement dans les poumons, le foie et les muscles squelettiques (Wittke *et al*, 2003). Ces transcrits sont également présents dans différents tissus fœtaux (Wittke *et al*, 2003). Les données d'une banque d'EST (pour expressed sequence tag) montrent des profils d'expression différents pour les transcrits *QSOX1* et *QSOX2* dans les tissus humains. *hQSOX1* est globalement plus fortement exprimé que *hQSOX2* et les niveaux d'expression des deux messagers varient en fonction des tissus. Les organes présentant les niveaux de *hQSOX1* les plus importants sont les poumons, le placenta, l'estomac et les os. L'expression de *hQSOX2* est cependant plus importante que celle de *hQSOX1* dans la rate, les yeux, les nodules lymphatiques et le sang (Coppock et Thorpe, 2006).

3. Régulation de l'expression des transcrits *QSOX1*

Lors de la quiescence

Le taux des transcrits *hQSOX1-L* augmente lors de l'entrée en quiescence des fibroblastes humains en culture sous l'effet d'une déplétion sérique (Coppock *et al*, 1993), ou lorsque les cellules arrivent à confluence et subissent l'inhibition de contact (Coppock *et al*, 2000). Les cellules

quiescentes expriment nettement plus de messagers *hQSOX1-L* que les cellules en cycle (Coppock *et al*, 2000). L'expression des messagers *QSOX1* augmente dans les cellules épithéliales glandulaires d'endomètre de Cobaye rendues quiescentes après déplétion sérique, avec un maximum atteint 72 heures après le début de la déplétion (Musard *et al*, 2001). Lorsque les cellules sont placées en déplétion sérique pendant 60 heures puis stimulées à nouveau par le sérum, le taux de transcrit *QSOX1-S* diminue lors de l'entrée dans le cycle et pendant la durée de la phase G₁. Il augmente ensuite progressivement en phases S, G₂ et M pour diminuer à nouveau au cours de la phase G₁ du cycle suivant (Musard *et al*, 2001). Ainsi, la variation de l'expression des messagers *QSOX1*, positive lors de l'entrée en quiescence et négative lors du retour en cycle, suggère l'implication de la protéine QSOX1 dans le contrôle négatif du cycle cellulaire. Le taux de transcrits augmente également lorsque les cellules sont détachées du flacon de culture, mécaniquement ou par trypsination (Coppock *et al*, 1993 ; 2000).

Régulation de l'expression de *QSOX1* par les estrogènes

Le gène *QSOX1* de Cobaye a été découvert lors d'une étude ayant pour but l'identification de nouveaux gènes dont l'expression varie lorsque les cellules épithéliales glandulaires d'endomètre sont traitées par l'estradiol-17 β (E₂) en présence de cycloheximide (CHX), qui est un inhibiteur de la synthèse protéique. Le criblage d'une banque d'ADNc par hybridation différentielle a révélé un ADNc moins abondant dans les cellules traitées par CHX et E₂ que dans les cellules traitées par la CHX seule (figure 5). Ce résultat suggère que, dans les cellules utérines, E₂ inhibe l'expression de *QSOX1* sans synthèse protéique *de novo* (Pellerin *et al*, 1993). Dès lors, la possibilité que le gène *QSOX1* puisse être estrogéno-dépendant a été envisagée.

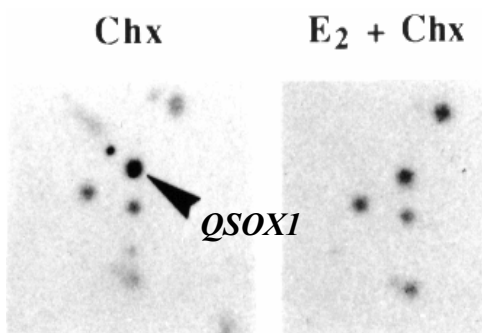


Figure 5 : Criblage d'une banque d'ADNc par hybridation différentielle à l'aide de deux sondes ADNc, une sonde fabriquée à partir des ARN extraits de cellules traitées par CHX et une sonde fabriquée à partir d'ARN extraits de cellules traitées par CHX et E₂. L'ADNc *QSOX1* a été identifié grâce à ce spot dont l'intensité de marquage est plus faible avec la sonde CHX plus E₂. Les cellules utilisées sont les CEGE de Cobaye (pour cellules épithéliales glandulaires d'endomètre).

Des études par northern blotting/hybridation ont montré l'absence d'expression des messagers *QSOX1* dans les tumeurs ER-positives et la forte expression de *QSOX1* dans certaines tumeurs ER-négatives (Coppock *et al*, 2000). Récemment, une étude menée à l'aide de puces à ADN, visant à mettre en évidence le profil d'expression de gènes estrogéno-dépendants dans les cellules MCF-7 de cancer du sein, a suggéré que le gène *QSOX1* humain puisse être régulé négativement par les estrogènes (Inoue *et al*, 2002). Ces auteurs ont confirmé qu'au cours des 72h

qui suivent le traitement par E₂, l'expression du messenger *hQSOX1* diminue d'un facteur 4.

Ces résultats suggèrent que, au niveau de certains tissus, l'expression de QSOX1 pourrait être inhibée dans un processus cellulaire ou physiologique contrôlé par les estrogènes, comme par exemple, la prolifération cellulaire. Toutefois, malgré ces observations intéressantes, les mécanismes de régulation de l'expression de *QSOX1* par E₂ restent inconnus.

III. Les protéines sulfhydryl oxydases de la famille QSOX

1. Caractéristiques structurales des protéines QSOX

Les séquences polypeptidiques des membres de la famille QSOX1 présentent plus de 70% d'identité entre elles (Hooper *et al*, 1999a) et moins de 50% d'identité avec les protéines QSOX2, entre espèces ou au sein d'une même espèce (Thorpe *et al*, 2002). Les protéines QSOX2 présentent plus de 75% d'identité entre elles. Des caractéristiques structurales propres aux membres de la famille QSOX émergent de ces homologies de séquences.



Figure 6 : Représentation schématique de la structure de protéine QSOX1 aviaire. Les lignes noires verticales représentent les trois motifs CxxC. Trx : domaine thiorédoxine. D'après Coppock et Thorpe, 2006.

Les protéines QSOX1 possèdent une séquence signal d'adressage au réticulum endoplasmique à l'extrémité amino-terminale mais pas de séquence de rétention (K,H)DEL pour ce compartiment cellulaire. Chez les métazoaires, deux domaines thiorédoxine (Trx) suivent la séquence signal N-terminale (figure 6). Le premier domaine Trx1 contient le motif WCGHC typique des PDI. Le domaine Trx2, ne possédant pas de motif CxxC, paraît inactif du point de vue rédox (Coppock *et al*, 1998 ; Thorpe *et al*, 2002). Le deuxième domaine Trx2 est absent des protéines QSOX1 des plantes (*AtQSOX1*, *Arabidopsis thaliana*) et des protistes (*TbQSOX1*, *Trypanosoma brucei*). Les protéines QSOX1 possèdent un domaine espaceur qui pourrait intervenir dans la liaison du substrat (Coppock et Thorpe, 2006) (figure 6). Le deuxième domaine hautement conservé est une région apparentée à la protéine ERV1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il contient deux motifs CxxC, indispensables à la réaction enzymatique, qui interagissent avec le FAD (figure 6). Les études biochimiques menées sur la protéine QSOX1 aviaire ont montré que ces trois

motifs CxxC sont importants pour son activité enzymatique (Hooper *et al*, 1999b ; Raje et Thorpe, 2003). La région C-terminale est très variable entre les espèces. Dans la forme longue de la protéine (QSOX1-L), cette région contient un domaine transmembranaire pouvant servir d'ancrage dans une membrane. Cette région peut être éliminée lors de l'épissage alternatif du messager qui conduit à la forme courte (QSOX1-S) (figure 4). Les protéines QSOX1 possèdent des sites potentiels de N-glycosylation, de O-glycosylation et de sumoylation (Benayoun *et al*, 2001 ; Radom *et al*, 2006).

Ces particularités se retrouvent également dans la structure des protéines QSOX2. En effet, QSOX2 possède les 3 motifs CxxC (Wittke *et al*, 2003). La structure de QSOX2 suggère donc une activité sulfhydryl oxydasique potentielle qui n'a pas encore été démontrée.

2. Les propriétés enzymatiques des protéines QSOX1

Les protéines QSOX1 ont été largement étudiées du point de vue de leurs caractéristiques enzymatiques. Les protéines rQSOX1 et QSOX1 aviaire ont été les modèles importants dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'oxydation des thiols. Cependant, quelques zones d'ombre subsistent, en particulier à propos des substrats de QSOX1 *in vivo*.

La sulfhydryl oxydase de Rat a été identifiée par Chang et Morton en 1975 et purifiée à partir du fluide séminal de Rat (Ostrowski *et al*, 1979). Ostrowski et Kistler (1980) ont débuté sa caractérisation enzymatique et ont montré qu'il s'agit d'une protéine monomérique d'environ 66 kDa, libérant une mole de FAD par mole d'enzyme après dénaturation acide. La stoechiométrie de la réaction a été vérifiée (figure 1). Différents substrats ont été testés et oxydés par rQSOX1, comme le glutathion, la cystéine, le DTT et le β -mercaptoéthanol. Pour le glutathion, le K_m est égal à 4,4 mM avec une V_{max} estimée à 660 μ mol par minute par mg de protéine. rQSOX1 est également capable d'augmenter la vitesse de renaturation de la ribonucléase A entièrement réduite (Ostrowski et Kistler, 1980).

Des chercheurs japonais ont isolé et purifié la sulfhydryl oxydase de peau de Rat (nommée SSO, pour skin sulfhydryl oxidase) (Takamori *et al*, 1980). Ils ont étudié ses propriétés enzymatiques et l'ont longtemps considérée comme une métalloprotéine dépendante du cuivre. Cependant, la sulfhydryl oxydase de peau de Rat est reconnue par des anticorps préparés à partir de QSOX1 de vésicule séminale de Rat (Hashimoto *et al*, 2001). De plus, la séquence ADNc de la sulfhydryl oxydase de peau de Souris présente une forte identité de séquence avec celle des ADNc de la famille QSOX (Matsuba *et al*, 2002), montrant que SSO appartient à la famille des protéines QSOX. Elle catalyse l'oxydation des mêmes thiols, possède la même masse moléculaire et les agents alkylants ont des effets inhibiteurs (Takamori *et al*, 1980). La sulfhydryl oxydase de peau a fait l'objet de différentes études enzymatiques qui ont montré que le DTT est le petit substrat le plus

efficacement utilisé (Yamada *et al*, 1987a ; 1987b ; 1989 ; 1994). L'oxydation des thiols par la sulfhydryl oxydase de peau nécessite de l'oxygène comme oxydant et sa consommation augmente linéairement avec la concentration d'enzyme (Yamada *et al*, 1987a).

La protéine QSOX1 aviaire a ensuite servi de modèle afin de mieux comprendre les mécanismes enzymatiques des protéines QSOX1. La protéine QSOX1 aviaire est une glycoprotéine de 743 amino-acyls qui se présente sous la forme d'homodimères (Hooper *et al*, 1996), alors que rQSOX1 semble se présenter sous la forme de monomères (Ostrowski et Kistler, 1980), montrant que l'association des sous-unités dans l'enzyme QSOX1 aviaire n'est probablement pas prérequis pour l'activité enzymatique (Thorpe *et al*, 2002). L'activité enzymatique de QSOX1 dépend d'un cofacteur, le FAD. Les travaux de Brohawn et collaborateurs ont permis d'affirmer que QSOX1 n'est pas une métalloenzyme et que les ions cuivre et zinc inhibent l'activité de l'enzyme *in vitro* (Brohawn *et al*, 2003). Les études *in vitro* ont montré qu'elle est capable d'oxyder un large éventail de thiols de petite taille comme le glutathion, la cystéine et le DTT. La protéine QSOX1 aviaire est également capable d'oxyder des peptides et des protéines réduits tels que les chaînes A et B de l'insuline, le lysozyme, l'ovalbumine et la RNase. L'activité catalytique en présence de la RNase réduite est 1000 fois plus importante qu'avec le glutathion et 10 fois plus importante qu'en présence de DTT (Hooper et Thorpe, 1999). La figure 7 présente les propriétés d'absorbance de la protéine QSOX1 aviaire qui ont permis l'étude de ses propriétés enzymatiques.

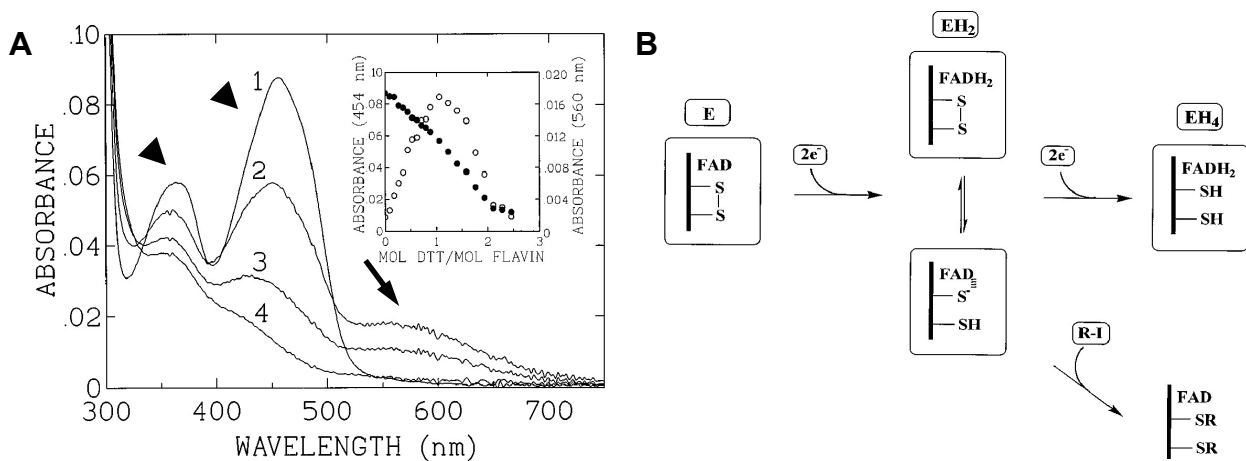


Figure 7 : Titrage de la sulfhydryl oxydase QSOX1 aviaire (A) et schéma simplifié de la réaction (B) avec le DTT. L'oxydation du DTT est optimale à pH 7,5. La protéine QSOX1 aviaire montre un spectre d'absorbance avec un maximum atteint à 454 nm et un second pic à 364 nm (courbe 1, enzyme seule, pointes de flèches). Au cours de la réaction, l'enzyme est réduite et se présente sous une forme intermédiaire, appelée EH₂, qui entraîne la formation d'un troisième pic d'absorbance à 560 nm (courbes 2 et 3, pour des concentrations croissantes de DTT, flèche). Le tracé en encart montre les variations d'absorbance à 560 nm (○) et 454 nm (●) en fonction de la concentration de DTT. L'enzyme sous la forme EH₂ est montrée sous la forme d'un équilibre entre les état dithiol et dihydroflavine. Elle est inhibée par des agents alkylants (R-I) qui bloquent deux résidus cystéyls, ce qui montre que la protéine contient un pont disulfure, actif dans la réaction d'oxydoréduction en interaction avec le FAD. D'après Hooper *et al*, 1996.

La protéolyse partielle de QSOX1 aviaire permet la séparation de deux fragments (Raje et Thorpe, 2003). Le premier est un monomère contenant le domaine Trx et ne présentant aucune activité sulfhydryl oxydasique. Le second fragment est un dimère contenant le domaine ERV1/ALR, glycosylé et lié au FAD. Ce fragment oxyde le DTT environ 1000 fois plus lentement que la protéine QSOX1 intacte. En revanche, il est incapable d'oxyder la RNase réduite. Ces résultats montrent l'importance du domaine Trx dans l'activité enzymatique de QSOX1. Il est intéressant de constater que le fragment contenant le domaine Trx est un substrat pour le fragment ERV1/ALR. Raje et Thorpe (2003) se sont basés sur cette observation et la structure cristallographique de la petite sulfhydryl oxydase de levure ERV2 (Gross *et al*, 2002) pour déduire la succession des événements lors de la réaction d'oxydation (figure 8). La fusion des domaines Trx et ERV1/ALR semble procurer un important avantage du point de vue catalytique par rapport à un domaine ERV1/ALR isolé dans l'oxydation des protéines (Raje et Thorpe, 2003).

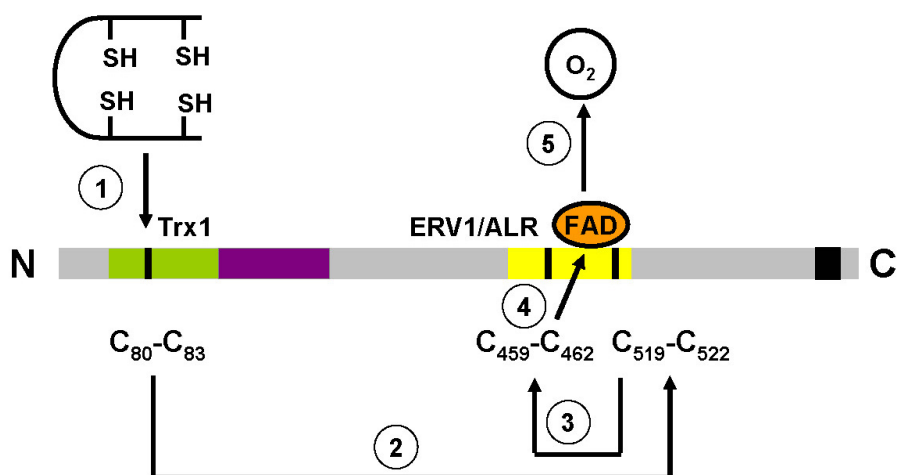


Figure 8 : Succession probable des événements de l'activité enzymatique de QSOX1 aviaire. La protéine QSOX1 oxydée accepte les électrons du substrat thiolé. Les échanges entre disulfures commencent par l'oxydation du substrat (flèche 1) par le pont disulfure C₈₀-C₈₃ du premier domaine thiorédoxine (Trx1). Le transfert s'effectue ensuite au sein de la protéine vers le domaine ERV1/ALR (flèche 2) pour terminer par la réduction du pont disulfure C₄₅₉-C₄₆₂ (flèche 3) qui se produit à l'interface entre les deux sous-unités de l'homodimère. Les charges sont transférées au FAD (flèche 4) qui les cède au dioxygène (flèche 5). D'après Coppock et Thorpe, 2006.

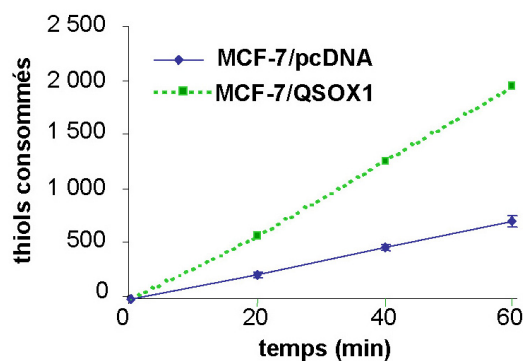
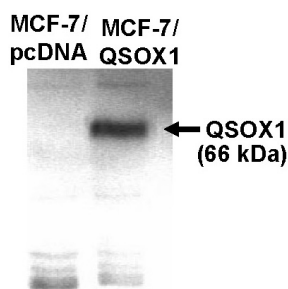


Figure 9 : Détection de la protéine QSOX1 recombinante dans le surnageant de culture des cellules MCF-7 (à gauche) et mesure de l'activité sulfhydryl oxydasique de la protéine sécrétée (à droite). MCF-7/QSOX1 : cellules MCF-7 transfectées de façon stable par un vecteur d'expression de la protéine QSOX1-S de Cobaye ; MCF-7/pcDNA : cellules contrôles. D'après Amiot *et al*, 2004.

Dans les cellules MCF-7, transfectées de façon stable par un vecteur d'expression de la protéine QSOX1-S de Cobaye, la protéine est sécrétée dans le surnageant de culture et possède une activité sulfhydryl oxydase (figure 9) (Amiot *et al*, 2004). L'activité enzymatique de hQSOX1-L, surexprimée dans des cellules de mammifères, a été démontrée récemment par Chakravarti *et al* (2007).

3. Localisation tissulaire et cellulaire et régulation de l'expression des protéines QSOX

La localisation tissulaire

Par immunomarquage, une cartographie détaillée de la distribution de la protéine QSOX a été réalisée dans notre équipe (Mairet-Coello *et al*, 2004). L'anticorps utilisé ne permet pas de différencier rQSOX1-S et rQSOX1-L. QSOX1 est spécifiquement exprimée par les neurones dans tout le cerveau ainsi que dans la moelle épinière. Si une majorité des neurones exprime QSOX1, différentes intensités de marquage sont observées en fonction des aires étudiées. La protéine QSOX1 est principalement exprimée dans les bulbes olfactifs, l'isocortex, l'hippocampe, le télencéphale basal, différents noyaux thalamiques et hypothalamiques et le cervelet (Mairet-Coello *et al*, 2004). Une cartographie de la distribution de QSOX1 de Cobaye dans le cerveau a été réalisée par immunohistochimie et montre que QSOX1 est synthétisée par les neurones dans tout le système nerveux central (Amiot *et al*, 2004).

Si QSOX1 est exprimée par les corps cellulaires des neurones du cerveau et de la moelle épinière, les faisceaux d'axones de la muqueuse olfactive de Souris ne présentent aucun marquage QSOX1 (Bon *et al*, 2005). Ce résultat suggère probablement une spécificité de la localisation de QSOX1 dans les corps cellulaires des neurones où s'effectue la synthèse protéique.

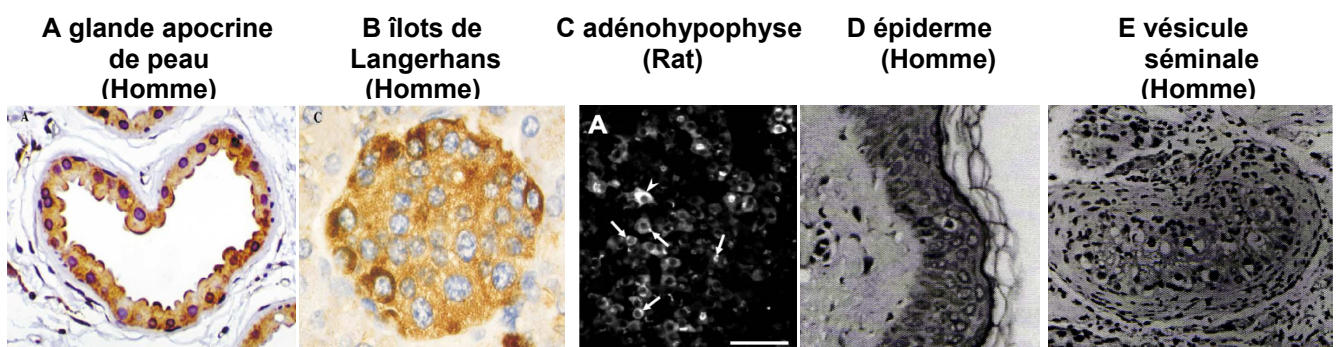


Figure 10 : Distribution de la protéine QSOX1 dans différents tissus sécréteurs. D'après Thorpe *et al*, 2002 (A et B), Tury *et al*, 2004 (C) et Thorpe et Coppock, 2007 (D et E).

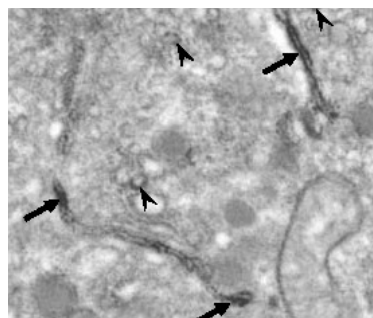
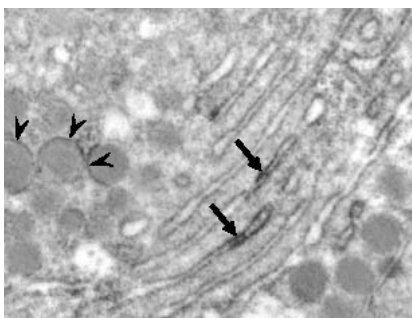
D'une manière générale, la protéine QSOX1 est fortement exprimée dans les tissus à vocation de sécrétion avec une grande spécificité d'expression au niveau des types cellulaires (figure 10). Dans ces tissus, l'enzyme QSOX1 est localisée essentiellement dans des cellules qui produisent des

protéines contenant un ou plusieurs ponts disulfures. C'est le cas des cellules épithéliales des glandes parotides qui sécrètent les mucines et les défensines, et des îlots de Langerhans (figure 10B) où l'insuline et la somatostatine sont produites. Dans l'intestin grêle, les cellules absorbantes sont uniformément marquées. Dans cette couche, les cellules neuroendocrines, qui sécrètent plusieurs peptides contenant des ponts disulfures, présentent un marquage QSOX1 intense (Thorpe *et al*, 2002). La protéine QSOX1 est présente dans les glandes sébacées, les follicules de cheveux et dans la couche de cellules syncytiotrophoblastiques du placenta (Thorpe et Coppock, 2007). Dans les cellules épithéliales de l'épiderme, QSOX1 est localisée dans la zone de transition entre les cellules vivantes et les couches cornées (Hashimoto *et al*, 2000) (figure 10D). L'activité enzymatique de la protéine QSOX1 de Rat, recherchée dans les différentes parties du tractus génital mâle, est faible dans les testicules, augmente le long de l'épididyme et est la plus forte dans les vésicules séminales (Chang et Zirkin, 1978).

La localisation subcellulaire

Des études en microscopie électronique ont montré la présence de la protéine QSOX1 au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, de la membrane de l'appareil de Golgi et de la membrane des vésicules de sécrétion (figure 11) (Mairet-Coello *et al*, 2004 ; Tury *et al*, 2004). Les protéines QSOX1 possèdent une séquence signal, en accord avec cette localisation cellulaire.

Figure 11 : Immunolocalisation de QSOX1 dans les cellules de l'adénohypophyse de Rat en microscopie électronique. Le marquage est associé à la membrane du réticulum endoplasmique



(à gauche, flèches), des vésicules de sécrétion (à gauche, pointes de flèches) et de l'appareil de Golgi (à droite) coupé sur le plan longitudinal (flèches) ou transversalement (pointes de flèches). L'anticorps utilisé reconnaît les deux formes de la protéine. D'après Tury *et al*, 2004).

Dans les cellules épithéliales des glandes apocrines de peau, le marquage immunohistochimique montre la présence de QSOX1 à la surface luminale sécrétrice des cellules, et au niveau périnucléaire (figure 10A). Cette localisation subcellulaire est en accord avec une implication de QSOX1 dans les modifications des protéines sécrétées, dans le réticulum endoplasmique et le Golgi (Thorpe *et al*, 2002). L'expression ectopique de la protéine hQSOX1-L dans des cellules de mammifères confirme que la forme longue de QSOX1, qui possède un domaine transmembranaire potentiel à son extrémité C-terminale, est localisée dans la membrane de l'appareil de Golgi (Chakravarti *et al*, 2007).

Plusieurs données permettent de montrer qu'une partie au moins des protéines QSOX1 est sécrétée. Elle est détectée dans le surnageant de culture des fibroblastes humains rendus quiescents par une déplétion sérique (Coppock *et al*, 2000) La protéine recombinante QSOX1 de Cobaye est détectée dans le surnageant des cellules MCF-7 transfectées de façon stable par un vecteur permettant sa surexpression, et l'activité sulfhydryl oxydasique est détectée dans le surnageant de culture de ces cellules (figure 9) (Amiot *et al*, 2004). Dans les cellules épithéliales de rein (Pt-K2) transfectées par un vecteur d'expression de la protéine QSOX1 de peau de Souris, la distribution de QSOX1 apparaît dans le cytoplasme et sous forme précipitée à l'extérieur des cellules, adjacente à la membrane plasmique. Le marquage des ponts disulfures est également observé dans le surnageant et colocalisés avec QSOX1 (figure 12) (Matsuba *et al*, 2002).

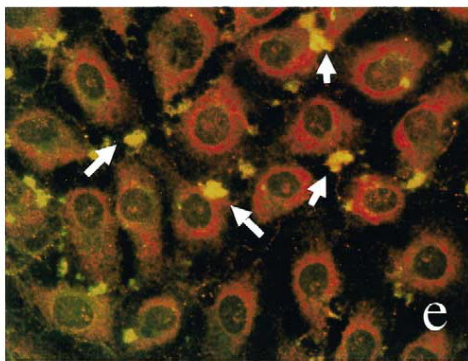


Figure 12 : Détection de la protéine recombinante QSOX1 de Souris et distribution des ponts disulfures dans les cellules Pt-K2. La protéine QSOX1 est marquée par immunocytochimie (marquage rouge). Les ponts disulfures sont marqués par le réactif fluorescent DACM (marquage vert), après avoir neutralisé les résidus -SH libres et avoir réduit les ponts S-S par le DTT. L'image présentée correspond à la superposition des deux images (rouge et vert) où le marquage jaune montré par les flèches correspond aux doubles marquages. D'après Matsuba *et al*, 2002.

Des études plus anciennes ont montré que des sulfhydryl oxydases pouvaient être associées à la mitochondrie ou dans la matrice mitochondriale dans les cellules de testicules (Aumuller *et al*, 1991). L'immunoréactivité de ces protéines apparaît dans les cellules à des niveaux variables dans les différents stades de la spermatogenèse chez le Rat, le Hamster et l'Homme. Les cellules de Sertoli et les spermatozoïdes matures ne sont pas marqués. Le marquage est le plus important dans les spermatocytes pachytènes, pouvant servir de marqueur pour les stades précoces de la spermatogenèse (Kumari *et al*, 1990 ; Bergmann *et al*, 1991 ; Bergmann *et al*, 1992). Chez le Rat, les mitochondries marquées sont éliminées dans les corps résiduels et les sulfhydryl oxydases sont absentes des spermatozoïdes matures (Kumari *et al*, 1990). Les sulfhydryl oxydases du tractus reproductif mâle apparaissent être impliquées dans l'activation ou l'état fonctionnel des cellules (Bergmann *et al*, 1990 ; Benayoun *et al*, 2001). Dans le cerveau, aucun marquage QSOX1 n'a pu être observé dans les mitochondries en microscopie électronique (Mairet-Coello *et al*, 2004 ; Tury *et al*, 2004).

La protéine hQSOX2 est principalement localisée dans le cytoplasme et au niveau de la membrane nucléaire (Wittke *et al*, 2003).

Régulation de l'expression de la protéine QSOX1

Chez le Cobaye, si le transcrit *QSOX1-S* est détecté à la fois abondamment dans les cellules épithéliales glandulaires et faiblement dans les cellules stromales de l'endomètre, la protéine QSOX1 est présente uniquement dans les cellules épithéliales glandulaires (figure 13) (Musard *et al*, 2001). Ce résultat intéressant montre que l'expression du gène QSOX1 pourrait être régulée au niveau transcriptionnel comme au niveau traductionnel.

Au cours du cycle estrien de Cobaye, l'expression de la protéine QSOX1 a été étudiée dans l'utérus (Musard *et al*, 2001). Pendant le premier jour du cycle, correspondant à l'estrus, le taux de E₂ est élevé et le taux de progestérone bas. La protéine QSOX1 est peu détectable dans l'utérus. Au 10^{ème} jour du cycle estrien, au cours duquel les rapports des taux en E₂ et progestérone sont inversés, la protéine QSOX1 est fortement exprimée dans les cellules épithéliales glandulaires de l'endomètre utérin (figure 13) (Musard *et al*, 2001). Ces résultats obtenus *in vivo*, au cours du cycle estrien, posent cependant la question de savoir s'il s'agit d'une régulation positive par la progestérone ou d'une régulation négative par les estrogènes.

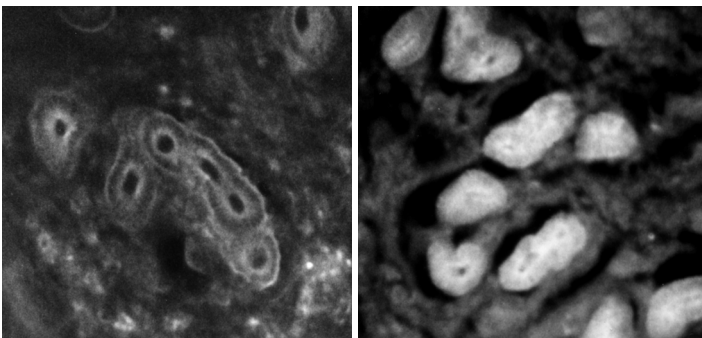


Figure 13 : Analyse par immunohistochimie de l'expression de la protéine QSOX1 dans l'endomètre utérin de Cobaye au cours du cycle estrien. Les utéri ont été préparés par cryosection au premier jour du cycle estrien (à gauche) et au 10^{ème} jour (à droite). D'après Musard *et al*, 2001.

4. Les rôles cellulaires possibles de QSOX

Les rôles spécifiques des protéines QSOX dans la physiologie de la cellule ou de l'organisme pourront être définis précisément lorsque ses substrats *in vivo* seront connus. Bien qu'ils n'aient pas encore été identifiés, différents indices, comme la distribution de l'enzyme QSOX1 et l'abondance des messagers, permettent de formuler quelques hypothèses sur les rôles que pourrait jouer QSOX1 dans la cellule.

Rôle dans les changements de conformation des protéines nouvellement synthétisées

Dans le réticulum endoplasmique des mammifères, la forme majoritaire de la PDI est la forme réduite (PDI-[SH/S⁻]) responsable de l'isomérisation des ponts disulfures mal placés et du repliement correct des protéines (figure 14 et voir la deuxième partie, figure 21). La PDI peut être oxydée par la protéine Ero1p (pour endoplasmic reticulum oxidase 1) et la forme oxydée (PDI-[S-S])

est capable d'oxyder les protéines pour créer les ponts disulfures (figure 21). Une accumulation rapide de PDI oxydée (PDI-[S-S]) pourrait favoriser la formation de ponts disulfures, mais priverait le réticulum endoplasmique de PDI réduite (PDI-[SH/S⁻]) indispensable pour que les protéines acquièrent une conformation fonctionnelle. La PDI ne serait donc pas chargée de l'oxydation directe de toutes les protéines dans le réticulum endoplasmique, ce qui serait le rôle d'autres protéines. Hooper *et al* (1999b) ont montré pour la première fois que la protéine QSOX1 pourrait coopérer avec la PDI afin de réarranger correctement les ponts disulfures nécessaires à l'activité de la RNase, *in vitro*. Thorpe et Coppock (2007) suggèrent que QSOX1, qui introduit des ponts disulfures très rapidement dans les protéines réduites, interviendrait avant la PDI chargée de leur isomérisation (figure 14). L'intervention d'une sulfhydryl oxydase est probablement dépendante du type cellulaire et du type de protéine substrat.

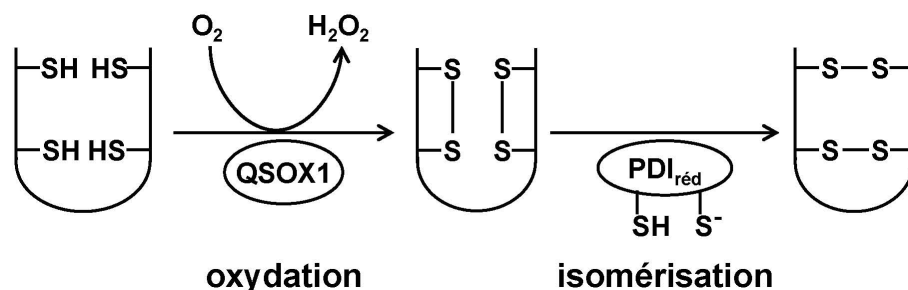


Figure 14 : Un modèle de coopération entre QSOX1 et la PDI réduite. La protéine QSOX1 pourrait être chargée de l'oxydation des résidus cystéyls pour former des ponts disulfures de manière aléatoire au sein des protéines substrats. La PDI réduite serait alors responsable de l'isomérisation des ponts disulfures pour permettre le repliement correct des substrats. D'après Thorpe et Coppock, 2007.

Les travaux de Chakravarti et collaborateurs (2007) permettent de donner des premiers éléments pour confirmer cette hypothèse. Les souches de levure ayant subi une délétion de l'expression de la PDI et transfectées par un plasmide d'expression de la protéine hQSOX1-L ne survivent pas. Seules les levures contenant la PDI sont capables de se développer sur des milieux contenant du glucose ou du galactose (Chakravarti *et al*, 2007). Ces résultats montrent qu'en dépit de la capacité de QSOX1 à oxyder directement les protéines, la fonction d'isomérisation de la PDI est indispensable à la viabilité des cellules. En revanche, la surexpression de hQSOX1-L, dans les cellules présentant une délétion complète de Ero1p, restaure la formation des ponts disulfures et empêche la mort de ces cellules (Chakravarti *et al*, 2007).

La formation de ponts disulfures dans les protéines sécrétées

Dans l'hypophyse de Rat, des analyses en immunohistochimie ont montré que les cellules qui présentent le plus fort marquage rQSOX1 sont celles également reconnues par des anticorps

dirigés contre les hormones hypophysaires LH et FSH (pour luteinizing hormone et follicle-stimulating hormone). Ces hormones contiennent des résidus cystéyls liés sous forme de ponts disulfures. Le repliement correct des protéines est nécessaire à la dimérisation des sous-unités formant l'hormone active. QSOX1 pourrait donc participer à différentes étapes d'oxydation de ces hormones.

D'importants changements surviennent au cours des stades terminaux de la différenciation de l'épiderme, comme la formation de la CCE (pour cornified cell envelope). La CCE est une structure hautement spécialisée à la périphérie des cellules, servant de barrière physique pour l'organisme et aidant à maintenir l'intégrité structurale de l'épiderme supérieur. La formation de ponts disulfures entraîne des changements de conformation des protéines associées à la membrane, et intervient dans la mise en place de la CCE (Hashimoto *et al*, 2000). Les résidus -SH libres sont distribués dans les cellules vivantes de l'épiderme, mais les ponts disulfures en sont absents et apparaissent à la surface des cellules localisées dans la zone de transition entre les cellules vivantes et les couches cornées (Hashimoto *et al*, 2000). La suite de ces travaux a montré que les ponts disulfures et QSOX1 sont toujours distribués ensemble dans l'épiderme de Rat, même quand les cellules sont exposées à certains agents chimiques (TPA (pour 12-O-tétradecanoyl-phorbol-13-acetate) ou acide rétinoïque), ou soumises aux UVB (Hashimoto *et al*, 2001). Ces auteurs ont pensé que ces résultats corroborent l'idée que QSOX1 est responsable de la formation des ponts disulfures. Les protéines précurseurs de la CCE, comme la loricine ou l'involucrine, pourraient être de bons substrats de QSOX1 dans l'épiderme supérieur (Hashimoto *et al*, 2001).

Il est ainsi actuellement supposé que la protéine QSOX1 puisse exercer une activité sulfhydryl oxydasique sur des protéines sécrétées ou de la matrice extracellulaire (Coppock *et al*, 1998 ; 2000 ; Hooper *et al*, 1999b ; Thorpe *et al*, 2002). Bien qu'aucun substrat n'ait été identifié *in vivo* pour corroborer cette hypothèse, cette idée est renforcée par la localisation des protéines QSOX1 dans les organes à vocation de sécrétion (figures 10 et 13) et dans le système endomembranaire (figure 11) et dans le surnageant de culture (figures 9 et 12).

Implications de la production de peroxyde d'hydrogène

La production de H₂O₂ lors de la réaction catalysée par les protéines QSOX n'est pas sans conséquence et pourrait jouer des rôles bénéfique ou délétère pour l'organisme. En effet, Ostrowski et Kistler (1980) ont supposé que QSOX1 pourrait exercer un rôle antimicrobien dans le fluide séminal grâce au peroxyde d'hydrogène qu'elle produit. Inversement, les cellules sécrétrices peuvent exporter de grandes quantités de protéines contenant des ponts disulfures et pourraient ainsi être soumises à des stress oxydants dans le réticulum endoplasmique (Marciniak et Ron, 2006). Enfin, les stress oxydants sont l'un des premiers événements de la maladie d'Alzheimer et l'hippocampe

est une des premières régions du cerveau à être touchée par la perte des cellules nerveuses. QSOX1 est hautement présente dans l'hippocampe (Mairet-Coello *et al*, 2004 ; Mairet-Coello *et al*, 2002) et pourrait participer à la production de H₂O₂ lors du déclenchement de la maladie.

Rôle dans le développement embryonnaire

QSOX1 pourrait intervenir dans le développement embryonnaire. En effet, dans le cerveau de Rat, des variations de l'expression de QSOX1 ont été rapportées au cours de différents stades embryonnaires et en fonction des aires cérébrales (Mairet-Coello *et al*, 2005). De plus, la protéine QSOX1 bovine est présente dans le sérum fœtal (4 mois de gestation) et son niveau diminue avec le temps après la naissance (de P1 à P60) (Zanata *et al*, 2005). Ces auteurs ont également démontré que l'activité sulfhydryl oxydasique est corrélée à l'expression de QSOX1 dans le sérum fœtal, suggérant un rôle dans la modulation rédox des programmes du développement.

Rôle dans le contrôle négatif du cycle cellulaire

Le rôle de QSOX1 dans le contrôle négatif du cycle cellulaire est fort probable. La découverte de QSOX1 dans les fibroblastes quiescents est un premier argument (Coppock *et al*, 1993). L'augmentation de l'expression des messagers QSOX1 dans les cellules décollées des boîtes de culture et dans les cellules confluentes corrobore cette hypothèse (Coppock *et al*, 2000). En effet, dans ces situations, les cellules envoient et reçoivent des signaux inhibant la prolifération. QSOX1 pourrait jouer un rôle dans les voies de signalisation ou les processus effecteurs afin de ralentir le cycle cellulaire. L'expression des messagers QSOX1 augmente également dans les cellules soumises à une déplétion sérique et diminue lorsque ces cellules reviennent dans le cycle cellulaire après stimulation mitogène par le sérum (Musard *et al*, 2001). Là encore, les mécanismes mis en jeu dans la régulation de l'expression de QSOX1 et son rôle dans ce processus ne sont pas connus.

L'expression de QSOX1 a été étudiée dans la muqueuse olfactive des Souris soumises à un traitement chimique par le ZnSO₄. Un tel traitement est utilisé pour dégrader la muqueuse olfactive et suivre ensuite sa régénération et en particulier celle des neurones olfactifs (Bon *et al*, 2005). Dans le tissu sain, la protéine QSOX1 est exprimée par les cellules de la *lamina propria* (figure 15). Quatre jours après un traitement par le ZnSO₄, les taux de messagers et de protéine QSOX1, estimés par northern blotting/hybridation et western blotting/immunomarquage, diminuent fortement tandis que l'épithélium olfactif est très dégradé (figure 15) et restent faibles 14 jours après le traitement. Les niveaux de messagers et de protéines QSOX1 augmentent à nouveau, pour atteindre le niveau contrôle, 25 jours après le traitement, lorsque les capacités olfactives sont récupérées (Bon *et al*, 2005). La diminution de l'expression de QSOX1 pourrait être liée au fait que les cellules basales doivent proliférer après la lésion causée par le ZnSO₄. Lorsque la muqueuse est régénérée, la

prolifération pourrait être ralentie par QSOX1.

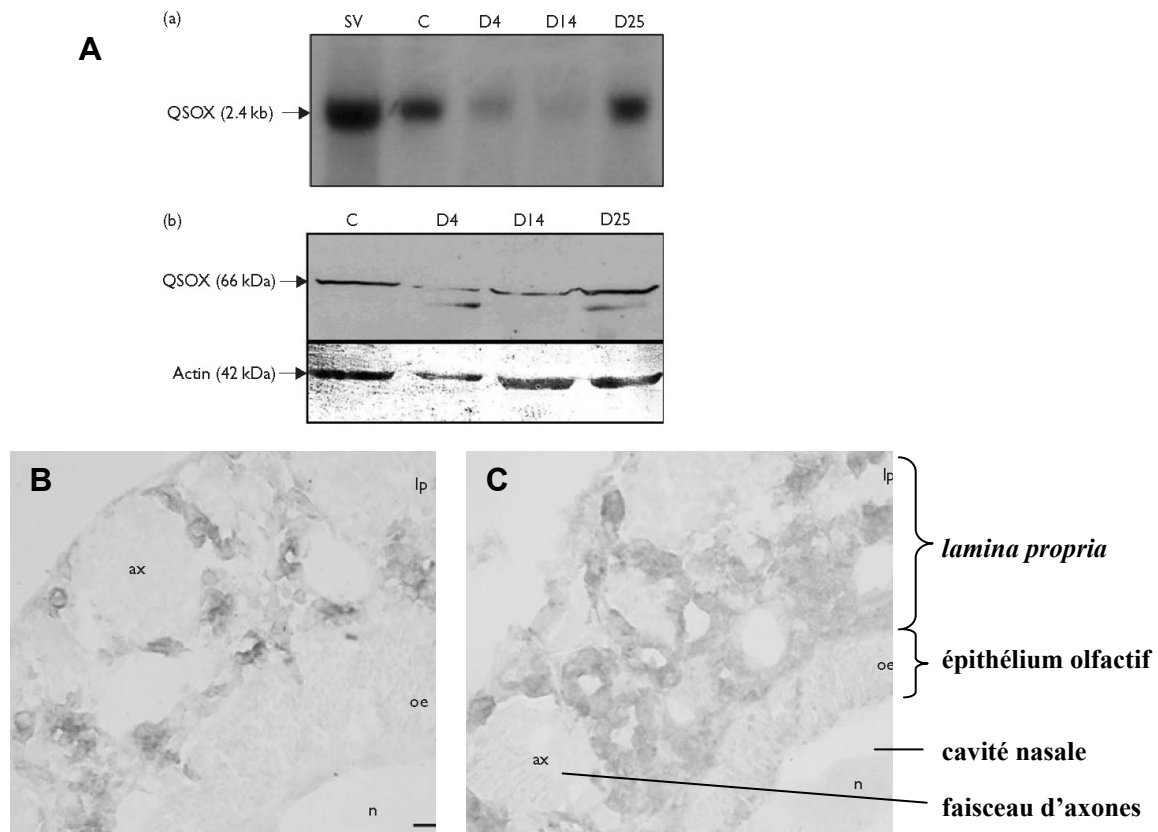


Figure 15: A. Analyse par northern blotting/hybridation (en haut) et western blotting/immunomarquage (en bas) de l'expression de QSOX1 dans les vésicules séminales (SV), et dans la muqueuse olfactive saine (C), 4 jours (D4), 14 jours (D14) et 25 jours (D25) après le traitement par $ZnSO_4$. Voir texte page 37. B, C. Localisation de QSOX1 par immunomarquage dans la muqueuse olfactive de Souris saine (B) et 4 jours après traitement par le $ZnSO_4$ (C). L'épaisseur de l'épithélium olfactif a diminué de plus de la moitié de l'épaisseur contrôle. Le marquage QSOX1 est observé dans les cellules de la *lamina propria* mais est absent des faisceaux d'axones. Ici, le marquage par immunohistochimie n'est pas quantitatif. D'après Bon *et al*, 2005.

Rôle dans l'apoptose

Le gène *hQSOX2*, initialement appelé *SOXN* (pour neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase), a été découvert lors d'une étude visant à identifier des gènes dont l'expression intervient dans la sensibilisation à la mort cellulaire induite par l'interféron γ (IFN- γ) (Wittke *et al*, 2003). Une technique antisens pour *QSOX2* permet de diminuer l'expression de QSOX2. Ce traitement confère aux cellules une résistance à l'apoptose induite par IFN- γ . Inversement, l'expression ectopique de QSOX2 induit la sensibilisation à la mort des cellules. Ces résultats placent QSOX2 comme un acteur majeur dans la régulation de la sensibilisation des cellules de neuroblastome à l'apoptose induite par IFN- γ (Wittke *et al*, 2003).

Deuxième partie :

**Régulation de l'état rédox
dans des conditions physiologiques
normales et pathologiques**

I. Les mécanismes de régulation de l'état d'oxydoréduction cellulaire

L'oxygène est essentiel pour le métabolisme aérobie en tant qu'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire, mais son utilisation implique la formation des molécules dérivées de l'oxygène appelées ROS (pour reactive oxygen species). Parmi les ROS on trouve notamment le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} . Les ROS sont un danger pour les cellules dans la mesure où elles peuvent oxyder les protéines, les lipides et l'ADN. Mais les ROS participent également à la signalisation cellulaire et sont indispensables à différents processus physiologiques. La cellule possède donc des moyens fins de régulation de la production et de la dégradation de ces molécules (figure 16).

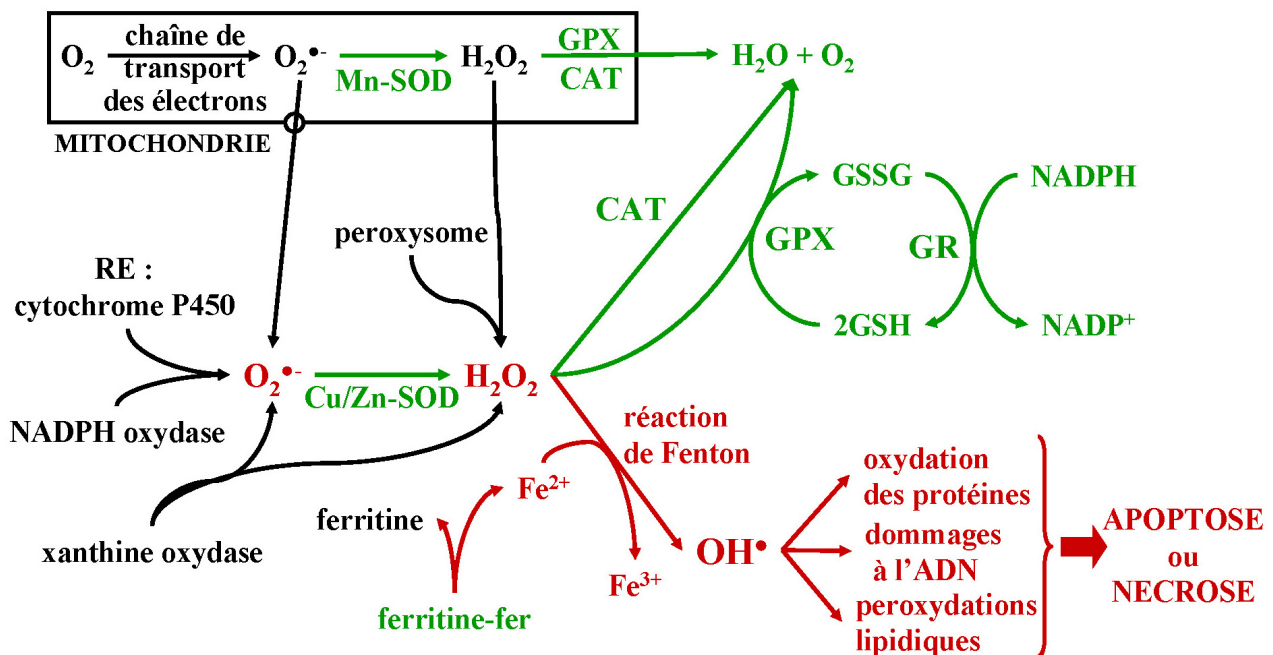


Figure 16 : Schéma représentant les sources de ROS et les systèmes de détoxification de la cellule. Les ROS sont produites par des mécanismes cellulaires très divers (en noir). RE : réticulum endoplasmique. La cellule possède des systèmes enzymatiques qui permettent la transformation de H_2O_2 en eau (en vert). Mn- et Cu/Zn-SOD : superoxyde dismutase dépendante du manganèse (dans la mitochondrie) ou du cuivre et du zinc (dans le cytoplasme) ; CAT : catalase ; GPX : glutathion peroxydase ; GR : glutathion réductase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé. En présence de fer libre intracellulaire, le radical hydroxyle est produit à partir de H_2O_2 et peut oxyder les constituants de la cellule (en rouge). D'après Kamata et Hirata, 1999 et Matès et Sánchez-Jiménez, 2000.

1. Les sources d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Dans la mitochondrie, neuf enzymes sont responsables d'une production de ROS (figure 17). Elles sont présentes de façon ubiquitaire dans les mitochondries des mammifères mais leur capacité à produire des ROS varie en fonction des tissus et des espèces (Andreyev *et al*, 2005).

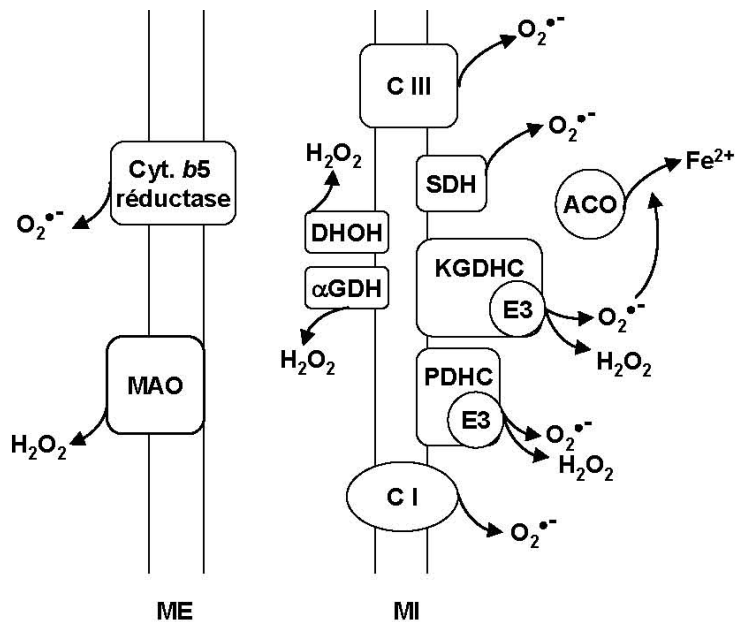


Figure 17 : Les sources de ROS dans la mitochondrie. MAO : monoamine oxydase ; Cyt. *b5* réductase : cytochrome *b5* réductase ; C III : complexe III ; C I : complexe I ; SDH : succinate déshydrogénase ; DHOH : dihydroorotate déshydrogénase ; α GDH : α -glycérophosphate déshydrogénase ; KGDHC : complexe α -cétoglutarate déshydrogénase ; PDHC : complexe pyruvate déshydrogénase ; ACO : aconitase ; ME et MI : membranes externe et interne mitochondriales. Adapté d'après Andreyev *et al*, 2005

La **cytochrome *b5* réductase** catalyse la réduction du cytochrome *b5* à partir du NAD(P)H cytosolique. Whatley *et al* (1998) rapportent que la cytochrome *b5* réductase pourrait produire $O_2^{\bullet-}$. Les **monoamine oxydases** (MAO-A/B) catalysent l'oxydation des amines qui s'accompagne d'une libération de H_2O_2 (Hauptmann *et al*, 1996). Les MAO des mitochondries du cerveau jouent un rôle dans la synthèse des neurotransmetteurs à monoamine (dopamine, sérotonine). Les MAO pourraient être une source importante de H_2O_2 au cours de l'ischémie (Kunduzova *et al*, 2002) et du vieillissement (Maurel *et al*, 2003).

La **dihydroorotate déshydrogénase** (DHOH) intervient dans la synthèse des nucléotides pyrimidiques en convertissant le dihydroorotate en orotate. En absence de son accepteur naturel d'électrons, le coenzyme Q situé dans la membrane interne mitochondriale, la DHOH peut produire H_2O_2 *in vitro* (Löffler *et al*, 1996).

L' **α -glycérophosphate déshydrogénase** (ou **glycérol-3-phosphate déshydrogénase**) utilise également le coenzyme Q comme accepteur d'électrons. Cette enzyme, dépendante du FAD, catalyse l'oxydation du glycérol-3-phosphate impliquée dans le métabolisme des lipides et dans la navette du glycérol-3-phosphate. Une production de H_2O_2 a été démontrée (Kwong et Sohal, 1998).

La **succinate déshydrogénase** (SDH) et l'**aconitase** mitochondriales sont deux enzymes qui interviennent dans le cycle de Krebs. La succinate déshydrogénase est une flavoprotéine qui oxyde le succinate en fumarate en utilisant le coenzyme Q comme accepteur d'électrons. Elle pourrait produire $O_2^{\bullet-}$, probablement via le FAD réduit en absence du coenzyme Q (Zhang *et al*, 1998). L'aconitase est responsable de la conversion du citrate en isocitrate. $O_2^{\bullet-}$ inhibe l'aconitase en induisant la libération de Fe^{2+} qui induit la formation de OH^{\bullet} (Gardner, 2002).

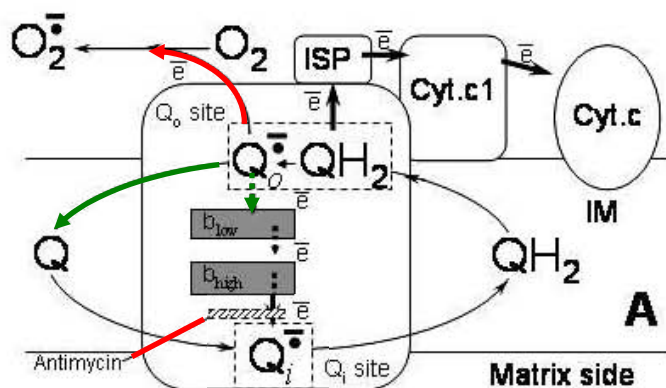
L'enzyme **dihydrolipoamide déshydrogénase**, également appelée **E3**, est une flavoprotéine commune aux complexes **α -cétoglutarate déshydrogénase** (KGDHC) et **pyruvate**

déshydrogénase (PDHC). Ce sont des complexes enzymatiques constitués de trois enzymes (nommées E1, E2, E3). Plusieurs équipes ont montré que l'enzyme E3 peut produire $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 (Starkov *et al*, 2004 ; Bunik et Sievers, 2002). La production de ROS par le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase est stimulée par une faible disponibilité en NAD^+ qui est l'accepteur final des électrons de ce complexe (Starkov *et al*, 2004).

Dans les cellules non phagocytaires, une grande partie de $O_2^{\bullet-}$ est produite lors des réactions de la chaîne de transport des électrons. Le **complexe I** de la chaîne respiratoire serait le principal producteur d'anion superoxyde, mais le mécanisme moléculaire de la réaction reste controversé (Grivennikova et Vinogradov, 2006). Les études les plus récentes montrent que les ROS pourraient être produites par l'un des centres fer-soufre du complexe (Genova *et al*, 2001 ; Andreyev *et al*, 2005). A ce jour, aucun consensus n'a pu être trouvé en raison des difficultés expérimentales. Il est en effet impossible de réaliser ces expériences sur les mitochondries entières à cause des différentes enzymes pouvant produire des ROS. Les protocoles utilisent des particules submitochondriales (SMP) ou le complexe I isolé *in vitro* et des inhibiteurs spécifiques d'une partie de la réaction enzymatique mais ne permettent probablement pas de décrire le processus *in vivo*.

La production d'anion superoxyde par le **complexe III** de la chaîne respiratoire est mieux expliquée. Ce complexe enzymatique oxyde le coenzyme Q (QH_2) en utilisant le cytochrome *c* comme accepteur d'électrons. L'oxydation de QH_2 se déroule en plusieurs réactions appelées « cycle Q » (figure 18). Grâce à des inhibiteurs spécifiques de chaque réaction, il a été démontré que la semiquinone ($Q^{\bullet-}$) formé au site Q_o est responsable de la formation d'anion superoxyde.

Figure 18 : Cycle d'oxydation du coenzyme Q par le complexe III de la chaîne respiratoire. La réaction débute par l'oxydation de l'ubiquinol (QH_2) au site Q_o . Un premier électron est transféré à une protéine fer-soufre (ISP) puis transmis au cytochrome *c*1 et au cytochrome *c* pour poursuivre la chaîne. La semiquinone ($Q_o^{\bullet-}$) qui en résulte n'est pas stable et donne le deuxième électron à une chaîne moins réductrice constituée des cytochromes b_{low} et b_{high} qui conduisent l'électron au site Q_i (réactions surlignées en vert). Cet électron réduit une nouvelle molécule de coenzyme Q. La réduction complète d'une molécule de CoQ quinone au site Q_i nécessite deux QH_2 oxydées au site Q_o en deux cycles successifs. Ainsi, le premier électron qui atteint le site Q_i génère une



semiquinone stable ($Q_i^{\bullet-}$) qui est réduite en ubiquinol (QH_2) par un second électron. L'antimycine A empêche le transfert de ces électrons au site Q_i et provoque l'accumulation de semiquinone instable au site Q_o responsable de la production d'anion superoxyde (réactions surlignées en rouge). ISP : iron-sulfure protein ; Cyt.c1 : cytochrome *c*1 ; Cyt.c : cytochrome *c* ; IM : inner membrane. D'après Andreyev *et al*, 2005.

Les NADPH oxydases (Nox) : La première source d'anion superoxyde étudiée a été celle des cellules phagocytaires. La production d'espèces réactives de l'oxygène est, en effet, un moyen de défense pour l'organisme. L'anion superoxyde est produit par les protéines de la famille des NADPH oxydases (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase). La première Nox identifiée a été la Nox2 des cellules phagocytaires. Ce complexe enzymatique utilise les électrons provenant du NADPH intracellulaire pour générer $O_2^{\bullet-}$ qui est ensuite transformé en H_2O_2 et autres ROS. Ces molécules oxydantes sont à la base des défenses contre les pathogènes bactériens ou fongiques (Orient *et al*, 2007). L'activité de la Nox2 (également appelée gp91^{phox}) est hautement régulée par des protéines cytosoliques (figure 19) (Quinn et Gauss, 2004).

Les protéines de la famille Nox sont réparties dans différents tissus de l'organisme et participeraient à différentes fonctions (revue de Orient *et al*, 2007). Par exemple, les enzymes Duox1 et 2 (pour dual oxydase, également appelées Thox ou Tox, pour thyroid oxydases) participent à la synthèse de l'hormone thyroïdienne (De Deken *et al*, 2000). La Nox4 rénale (aussi appelée Renox) participerait à la détection des taux d'oxygène sanguin et pourrait réguler la production d'érythropoïétine (EPO) dans les reins (Geiszt *et al*, 2000). Enfin, la Nox1 intervient dans la régulation de la pression artérielle (Gavazzi *et al*, 2006).

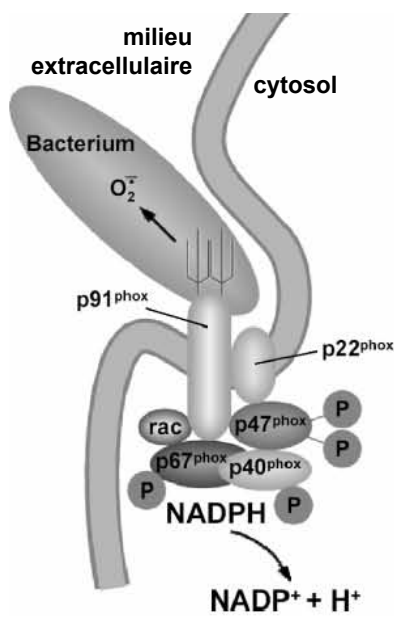


Figure 19 : Composition moléculaire de la NADPH oxydase phagocytaire. Le complexe enzymatique est localisé dans la membrane du phagosome pendant la phagocytose. L'enzyme Nox2 (ou gp91^{phox}) est étroitement associée à la petite sous-unité p22^{phox}; elles forment les deux parties du flavocytochrome b₅₅₈. Les protéines p47^{phox}, p67^{phox} et Rac2 sont des régulateurs essentiels de Nox2, étant donné qu'une déficience de l'une de ces protéines entraîne une immunodéficience. L'activation de la Nox2 nécessite la translocation des régulateurs cytosoliques vers le cytochrome b₅₅₈ inactif localisé dans la membrane. Les protéines p67^{phox} et Rac semblent réguler la catalyse tandis que p47^{phox} est un adaptateur liant p67^{phox} à gp91^{phox}. D'après Orient *et al*, 2007.

Les sources mineures de ROS

Dans le réticulum endoplasmique (RE), l'enzyme **NADH-cytochrome P450 réductase** peut céder des électrons au dioxygène et produire des molécules de $O_2^{\bullet-}$ (figure 16).

Le même processus peut également se produire suite à l'action du système **désaturase** qui introduit des doubles liaisons carbone-carbone dans les acides gras insaturés. Ce système comprend le FADH₂ et le cytochrome b₅ qui peut céder des électrons au dioxygène .

Les autres sources biologiques d'anion superoxyde sont la membrane nucléaire, la décomposition de l'oxyhémoglobine, la photo-irradiation du tryptophane et de l'eumélanine par les rayons UV, des réactions enzymatiques comme celle catalysée par les dioxygénases ou les oxydases (Matès and Sanchez-Jiménez, 2000).

Le peroxyde d'hydrogène est le plus souvent produit par une dismutation du $O_2^{\bullet-}$ mais peut également être produit par des enzymes des peroxysomes (figure 16) ou par des oxydases (voir le chapitre concernant les sulfhydryl oxydases). Une autre source de ROS peut également être la xanthine oxydase (figure 16). Cette flavoprotéine catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine à partir de l'oxygène et produit du $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 .

2. Les modulateurs de l'état rédox

Afin de réguler la présence des ROS dans les différents compartiments cellulaires, de nombreuses défenses anti-oxydantes existent. Ce paragraphe présentera certains systèmes, enzymatiques ou non, qui interviennent dans l'élimination des ROS. H_2O_2 est la forme réactive de l'oxygène la mieux éliminée car les cellules possèdent des enzymes capables de la réduire en eau. Il s'agit notamment du système glutathion ou de la catalase. Mais l'anion superoxyde doit tout d'abord subir une dismutation pour être éliminé par les cellules, c'est le rôle des SOD. De plus, de nombreuses protéines possèdent dans leur structure des ponts disulfures (-S-S-) entre 2 résidus thiols (-SH). Inversement, la formation inappropriée de ponts disulfure dans les protéines peut conduire à leur déstabilisation et à l'exposition de domaines hydrophobes. La thiorédoxine peut agir comme agent réducteur en acceptant les électrons des protéines oxydées.

Les SOD

La superoxyde dismutase (SOD) contenant du manganèse (MnSOD ou SOD2) (figure 16) est exclusivement située dans la matrice mitochondriale et protège les enzymes contenant des centres fer-soufre de $O_2^{\bullet-}$ (Gardner *et al*, 1995). La SOD cytosolique contient du cuivre et du zinc (Cu/ZnSOD). Le rôle des SOD est de faciliter la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène selon la réaction : $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (Matès et Sanchez-Jiménez, 2000). Cette dismutation peut se produire de façon spontanée à pH neutre, à une vitesse d'environ $10^5 M^{-1}.s^{-1}$. Les SOD augmentent cette vitesse jusqu'à $10^9 M^{-1}.s^{-1}$ (Liochev et Fridovich, 2007). Dans des conditions physiologiques, lorsque $O_2^{\bullet-}$ est produit, la présence de H_2O_2 est donc inévitable. Il est donc souvent admis que $O_2^{\bullet-}$ est peu réactif du fait de cette rapidité à être dismuté en H_2O_2 .

La catalase

La superoxyde dismutase élimine $O_2^{\bullet -}$ mais génère une autre ROS, H_2O_2 , qui peut être toxique et doit être éliminée par d'autres enzymes. L'une d'elle est la catalase qui convertit H_2O_2 en eau et en dioxygène (figure 16), selon la réaction : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. La famille des catalases comprend de nombreux membres (Kirkman et Gaetani, 2007 ; Chelikani *et al*, 2004). La catalase des mammifères est active sous la forme d'un homotétramère. Chaque sous-unité (d'environ 60 kDa) contient un noyau hème (ferriprotoporphyrine IX) dans son site catalytique. Celui-ci ayant la forme d'un couloir étroit, seules les molécules de petite taille peuvent être le substrat des catalases (Putnam *et al*, 2000). La catalase, plus d'un siècle après sa découverte, est toujours l'objet de nombreuses recherches.

Le système glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéyl-glycine) présent dans toutes les cellules animales. Il existe sous deux formes, une forme réduite, GSH, et une forme oxydée, GSSG (figure 20). Dans la lumière du réticulum endoplasmique, la proportion de GSH est plus importante, ce qui est favorable à la formation de ponts disulfures dans les protéines.

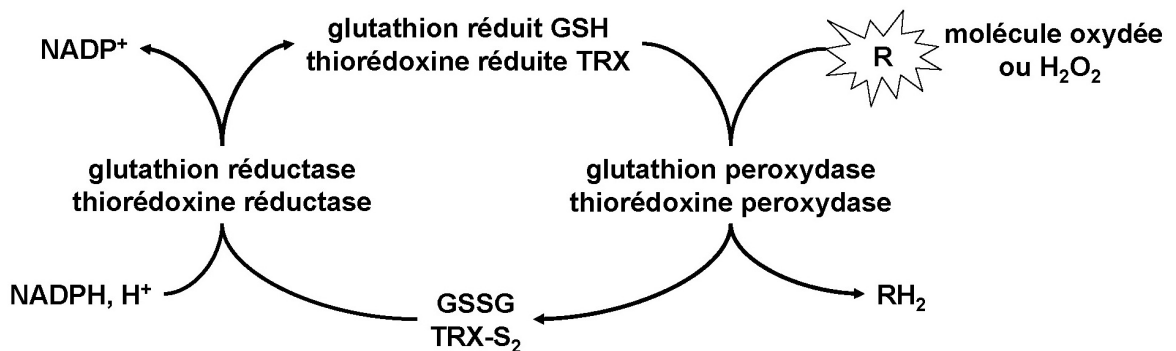


Figure 20 : Régulation de l'état redox des systèmes glutathion et thiorédoxine. En présence d'un oxydant R, le glutathion ou la thiorédoxine réduit(e) est oxydé(e) par une peroxydase pour former du glutathion (GSSG) ou de la thiorédoxine (TRX-S₂) oxydé(e). L'oxydant est ainsi réduit (RH₂). La régénération de glutathion et de thiorédoxine réduits fait intervenir une réductase et le NADPH, H⁺ qui est oxydé en NADP⁺.

L'équilibre du système glutathion est maintenu par la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (figure 20). Afin de réduire les molécules oxydées (R), la glutathion peroxydase catalyse l'oxydation du glutathion réduit (GSH) et entraîne la formation de disulfure de glutathion (GSSG). Le glutathion réduit doit être régénéré par une glutathion réductase, ou être expulsé de la cellule. La glutathion réductase, en plus de la régénération de GSH, joue un rôle en régulant les taux de NADPH dans les organes où la production de ce métabolite est élevée. La **phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase** (GPx4) fait partie de la famille des glutathion peroxydases.

C'est la seule enzyme connue pour réduire les phospholipides peroxydés dans les membranes (Imai et Nakagawa, 2003).

Outre ce rôle dans le maintien de l'état rédox, le glutathion joue un rôle dans la formation de ponts disulfures dans les protéines. La formation d'une liaison disulfure dans une protéine implique deux réactions d'échange thiol/disulfure avec le glutathion. Le groupe SH d'un résidu cystéyl réagit d'abord avec l'un des deux atomes de soufre de la liaison disulfure GSSG pour former une liaison disulfure Cys-S-S-G, et une molécule de glutathion réduit GSH. Dans un second temps, un autre résidu cystéyl de la protéine réagit avec la liaison Cys-S-S-G en donnant une liaison disulfure Cys-S-S-Cys et une deuxième molécule de GSH.

Les systèmes non enzymatiques

D'autres défenses non enzymatiques existent sous la forme de molécules qui piègent les ROS. Ces défenses secondaires sont notamment la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (α -tocophérol), le β -carotène, la vitamine A, la N-acétyl cystéine (NAC), le NADH et l'urate.

L' α -tocophérol est capable de piéger les radicaux libres (comme OH^\bullet) et il est soluble dans les membranes. Il peut donc réduire les phospholipides oxydés. Dans la membrane mitochondriale, il est régénéré par le coenzyme Q ou par l'acide ascorbique à la surface des membranes.

Dans l'espace intermembranaire des mitochondries, le **cytochrome c** est capable de supprimer $\text{O}_2^{\bullet-}$. Il peut être utilisé par la chaîne respiratoire mais également être réduit par l'anion superoxyde (McCord et Fridovich, 1970). Il est à nouveau régénéré lors de son oxydation par la cytochrome c oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire). Il est intéressant de constater que cet antioxydant est capable de produire de l'énergie en donnant des électrons au complexe IV, tout en éliminant les molécules de $\text{O}_2^{\bullet-}$ produites accidentellement précédemment dans la chaîne respiratoire (Mailer, 1990). C'est pourquoi il est qualifié d'antioxydant idéal (Pereverzev *et al*, 2003).

Le système thiorédoxine

La thiorédoxine (TRX) est une petite protéine très conservée (environ 12 kDa), identifiée pour la première fois chez *E. coli* (Holmgren, 1985). La thiorédoxine 1, la thiorédoxine 2 et p32^{TrxL}, qui sont des protéines apparentées à la thiorédoxine, ont été identifiées chez les mammifères. La thiorédoxine 1 (TRX-1) et p32^{TrxL} sont cytosoliques tandis que la thiorédoxine 2 est localisée dans la mitochondrie.

Le site catalytique conservé des thiorédoxines est constitué de la séquence Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys. Les deux résidus cystéyls de ce site peuvent être réversiblement oxydés par une thiorédoxine peroxydase pour former un pont disulfure. Ils sont ensuite réduits par l'action d'une thiorédoxine réductase en présence de NADPH (figure 20), selon la réaction : $\text{NADPH}, \text{H}^+ + \text{thiorédoxine-S}_2 \rightarrow$

NADP⁺ + thiorédoxine-(SH)₂. Les thiorédoxines possèdent de multiples activités biologiques : la détoxification des oxydants, un rôle de facteurs de croissance, de cofacteurs ou de régulateurs de l'activité de facteurs de transcription et d'enzymes et dans l'inhibition de l'apoptose (revues de Powis *et al*, 2000 ; Powis et Montfort, 2001). Les propriétés anti-oxydantes de la TRX-1 incluent l'élimination de H₂O₂ et des radicaux libres et la protection cellulaire contre les stress oxydants. C'est également un donneur d'électrons pour la glutathion peroxydase plasmatique humaine. La TRX-1 exerce la plupart de ses propriétés anti-oxydantes *via* la thiorédoxine peroxydase. En effet, la thiorédoxine peroxydase, sous forme réduite, s'homo- ou s'hétéro-dimérise avec d'autres membres de la famille des thiorédoxines peroxydases par l'intermédiaire de ponts disulfures. La thiorédoxine peroxydase est ensuite réduite en une forme monomérique par l'oxydation de la TRX-1. Ainsi, la thiorédoxine est réversiblement oxydée au cours de la détoxification des ROS, selon la réaction : $2R-SH + H_2O_2 \rightarrow R-S-S-R + H_2O$.

Les protéines disulfures isomérases (PDI) et Ero1p

La PDI est une protéine essentielle à la viabilité de *Saccharomyces cerevisiae*, isolée pour la première fois en 1963 (Goldberger *et al*, 1963). Elle est très abondante dans le réticulum endoplasmique pour lequel elle possède une séquence de rétention (KDEL). La famille des PDI regroupe de nombreuses protéines apparentées impliquées dans la maturation des protéines, dans le réticulum endoplasmique. Elles sont caractérisées par la présence d'un ou plusieurs domaines de 95 à 110 amino-acyls apparentés à la thiorédoxine (Ferrari et Söling, 1999). On trouve, dans cette famille la PDI elle-même, Erp57, PDIp, P5, Erp72 et les protéines PDI-D (Ferrari et Söling, 1999). Dans le réticulum endoplasmique, la PDI catalyse 3 réactions : formation de ponts disulfures (oxydation), réduction et isomérisation des disulfures. Elle est composée de 4 domaines thiorédoxines dont deux seulement possèdent la séquence consensus **Cys-Gly-His-Cys**. Ces 2 motifs, l'un en position N-terminale, l'autre en C-terminale, indépendants l'un de l'autre ne sont pas fonctionnellement équivalents et oscillent entre un état dithiol et un état disulfure (figure 21). Outre ces fonctions dans l'oxydoréduction et l'isomérisation de thiols et disulfures, la PDI possède des fonctions de protéine chaperon, en réarrangeant des ponts disulfure formés prématurément ou de façon erronée lors de la synthèse protéique (Gilbert, 1997 ; Ferrari et Söling, 1999). Ces fonctions de chaperon vont de pair avec son activité isomérase (figure 21).

La protéine Ero1p (Endoplasmic réticulum oxidoreductin 1 protein) est associée à la membrane du réticulum endoplasmique. Elle oxyde *in vivo* les protéines nouvellement synthétisées (Frand et Kaiser, 1998 ; Pollard *et al*, 1998) et également la PDI (figure 21). Cette oxydation est nécessaire à l'activité de la PDI (Frand et Kaiser, 1999 ; Woycechowsky et Raines, 2000).

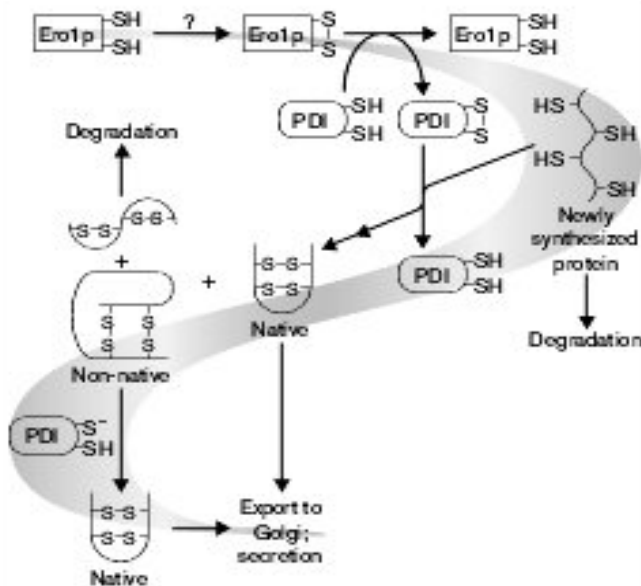


Figure 21 : Rôles de la PDI et de Ero1p dans la formation et le réarrangement de ponts disulfure dans le réticulum endoplasmique. Le site actif de la PDI sous forme disulfure est un oxydant qui catalyse la formation de ponts disulfures dans les protéines substrats. Le rôle de la protéine Ero1p est d'oxyder la PDI afin de régénérer la forme disulfure. La PDI à l'état rédox dithiol catalyse le réarrangement des ponts disulfures. D'après Woycechowsky et Raines, 2000.

Les **sulphydryl oxydases** participent à la modulation de l'état rédox des cellules. Les enzymes oxydases utilisent toujours l'oxygène moléculaire pour oxyder leurs substrats. Les sulphydryl oxydases forment des ponts disulfures à partir de thiols réduits et produisent H_2O_2 (cf. première partie de l'introduction).

3. Le déclenchement d'un stress oxydant

Les facteurs déclenchant les stress oxydants peuvent être divers. Les mutations génétiques héréditaires ou acquises, les facteurs environnementaux (radiations, toxines) ou les fluctuations métaboliques dues au hasard (Andreyev *et al*, 2005) peuvent déclencher des déséquilibres rédox. Il semble que la vraie origine d'un stress oxydant ne soit pas la génération de ROS elle-même, mais le déséquilibre spatiotemporel entre la production de ROS et leur élimination. L'équilibre peut être rompu lorsque la production est trop importante ou lorsque les systèmes de détoxification sont trop peu présents ou mal localisés. Dans la mitochondrie, la formation de ROS est significativement augmentée par les molécules induisant un découplage de la membrane interne, un traitement en oxygène hyperbare, des conditions pathologiques comme le phénomène d'ischémie/circulation ou le vieillissement.

L'anion superoxyde est souvent considéré comme étant peu réactif en lui-même du fait de sa rapide dismutation en H_2O_2 . Pourtant, il peut induire la libération de Fe^{2+} des centres fer-soufre ou de la ferritine (Genestra, 2007). Contrairement à $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 est capable de franchir les membranes. Dans le cytosol, H_2O_2 peut réagir avec les ions fer ou cuivre pour former le radical hydroxyle (Lipscomb *et al*, 1998). Ces réactions, dites de Fenton ou de Haber-Weiss, peuvent être catalysées par des ions fer ou cuivre libres ou du fer séquestré au sein d'un complexe ferritine, lactoferrine,

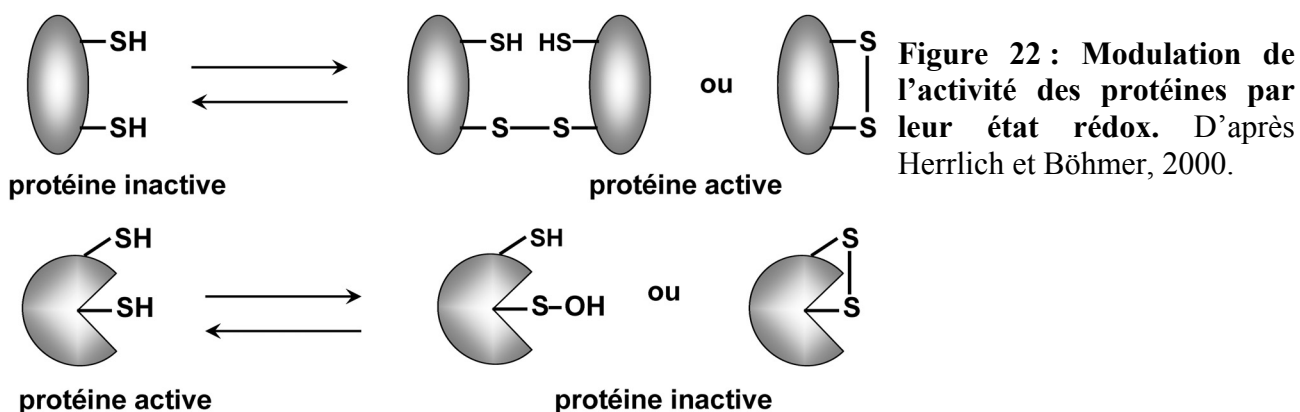
hémoglobine ou myoglobine : Réaction de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$

Réaction de Haber-Weiss : $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$

Le radical hydroxyle peut être éliminé en étant piégé par différentes molécules. Mais son accumulation anormale dans une cellule déclenche l'oxydation des molécules biologiques qui constitue le **stress oxydant** (figure 16). OH^\bullet provoque la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines mais devient particulièrement dangereux lorsqu'il entraîne des dommages à l'ADN (Kamata and Hirata, 1999). Si les lésions engendrées par les ROS sont trop importantes, la cellule peut déclencher la mort programmée appelée apoptose.

4. La régulation de l'expression génique induite par les stress oxydants

Bien que les espèces réactives de l'oxygène soient la plupart du temps le déclencheur de dommages causés aux structures biologiques, il est maintenant admis que des concentrations physiologiques faibles et même anormalement élevées de ROS peuvent réguler de nombreux processus. Les ROS, et en particulier H_2O_2 , sont des messagers secondaires impliqués dans la signalisation cellulaire (Stone et Yang, 2006). Ces mécanismes interviennent dans la réponse immunitaire, l'adhérence cellule-cellule, la prolifération cellulaire, l'inflammation, le métabolisme, la sénescence ou l'apoptose. Ainsi, la régulation de l'expression génique par l'état rédox apparaît fondamentale dans la Biologie cellulaire (revues de Suzuki *et al*, 1997 ; Kamata et Hirata, 1999).



Différentes enzymes impliquées dans les voies de signalisation cellulaire sont des cibles potentielles pour l'oxydation par des ROS, en particulier les phosphatases, la guanylyl cyclase, les phospholipases C, A2 et D (revue de Genestra, 2007), et les canaux ioniques comme les canaux calcium (Hajnoczky *et al*, 2006). Le mécanisme général est présenté dans la figure 22. La régulation de l'activité des protéines impliquées dans les différentes voies de signalisation implique souvent leur phosphorylation-déphosphorylation. Ces réactions sont catalysées respectivement par des protéines kinases et des protéines phosphatases. Leurs substrats cellulaires sont phosphorylés ou déphosphorylés au niveau de résidus séréyls/thréonyls ou tyrosyls. De plus en plus d'arguments

suggèrent que les ROS modulent directement l'activité enzymatique des kinases et des phosphatases (Chiarugi et Fiaschi, 2007 ; Charest *et al*, 2006). Les protéines phosphatases possèdent, dans leur site catalytique, un résidu cystéyl conservé (Von Monfort *et al*, 2006). Le domaine catalytique doit être à l'état réduit pour une activation complète. H₂O₂ inhiberait les phosphatases, par l'oxydation directe du résidu cystéyl dans le site actif de ces enzymes. L'exposition à des fortes concentrations en H₂O₂ ou à des changements importants dans la balance thiols/ponts disulfures entraîne une augmentation de la phosphorylation des tyrosyls de nombreuses protéines (Wang et Johnson, 2005). Cet effet serait en partie dû à l'inhibition par l'oxydation des protéines tyrosyls-phosphatases. H₂O₂ peut être produit dans certains types cellulaires en réponse aux cytokines ou aux facteurs de croissance. Ensuite, H₂O₂ agit comme second messager en stimulant les cascades des kinases induisant l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation ou dans le contrôle du cycle cellulaire (Marciniak *et al*, 2006).

La TRX-1 module sélectivement la liaison à l'ADN de facteurs de transcription, en modulant leur état rédox. Des changements de l'état rédox des groupements thiols des facteurs de transcription conduisent à des changements de conformation qui, en fonction de la protéine, peuvent soit augmenter, soit diminuer l'activité de liaison à l'ADN, moduler la liaison de sous-unités inhibitrices, ou encore moduler la formation de complexes protéiques.

Le facteur de transcription NF- κ B est la cible d'une régulation rédox qui a fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B requiert la réduction de résidus cystéyls catalysée par la TRX-1 (revues de Allen et Tresini, 2000 ; Powis et Montfort, 2001). L'activité transcriptionnelle de facteurs de transcription comme le facteur Ref-1 (redox factor-1) ou encore les récepteurs des hormones stéroïdes peut être modulée par oxydoréduction par le système thiorédoxine (Peleg *et al*, 1989). En effet, il apparaît que le récepteur des estrogènes est très sensible à l'état rédox cellulaire. Ainsi, la surexpression de TRX-1 dans des cellules dérivées de cancer du sein humain se traduit par une augmentation de l'activité transcriptionnelle du récepteur des estrogènes, suggérant qu'au moins une partie des récepteurs des estrogènes est séquestrée dans un état transcriptionnellement inactif, probablement par oxydation des résidus thiols du domaine de liaison à l'ADN (Hayashi *et al*, 1997). Ces résultats sont à rapprocher du fait que, au cours de la promotion tumorale et de la progression cancéreuse, les cellules sont la cible de stimuli autocrines et paracrines par de nombreux facteurs de croissance et cytokines, entraînant un stress oxydant. Ce stress oxydant induit l'expression de TRX-1, et une expression augmentée de TRX-1 a été observée dans de nombreux cancers. Gallegos *et al* (1996) ont rapporté qu'un mutant dominant négatif de TRX inhibait la croissance de cellules tumorales de sein humain. Comme le récepteur des estrogènes joue un rôle important dans la prolifération et la progression des cellules cancéreuses de sein humain dépendantes des estrogènes, les résultats de Hayashi *et al* (1997) suggèrent que le

récepteur des estrogènes est une cible majeure de TRX-1 dans les cancers, et que la TRX est impliquée dans la prolifération et la progression des cellules cancéreuses mammaires *via* la régulation rédox du récepteur des estrogènes.

De nombreux autres facteurs de transcription (figure 23), tels que p53, AP1 ou Spl, voient également leur activité modulée par oxydoréduction (revues de Sun et Oberley, 1996 ; Kamata et Hirata, 1999). L'activité du facteur de transcription AP1 est modulée par oxydation d'un résidu cystéyl dans le domaine de liaison à l'ADN de FOS et de JUN, conduisant à l'inactivation de ces protéines qui ne sont plus capables de lier l'ADN. A l'inverse, FOS et JUN peuvent être la cible de l'activité rédox de Ref-1 qui, en réduisant les résidus Cys²⁷² de JUN et Cys¹⁵⁴ de FOS, stimule l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription (figure 23) (Xanthoudakis *et al*, 1992).

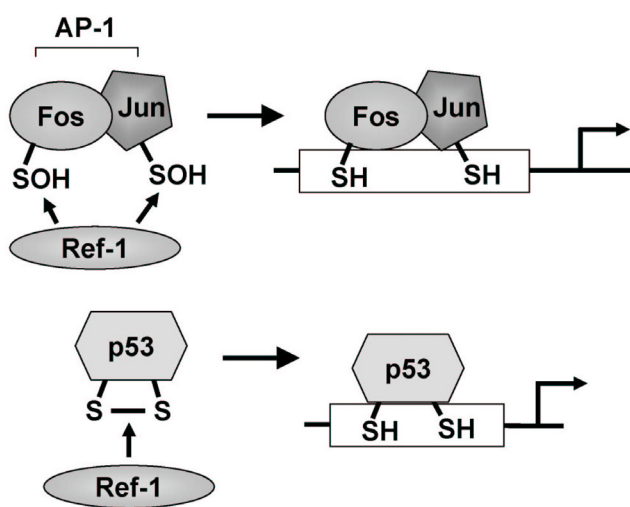


Figure 23 : La protéine Ref-1, exprimée ubiquitairement, est responsable de la réduction enzymatique des cystéines oxydées dans le domaine de liaison à l'ADN de certains facteurs de transcription. Le mécanisme par lequel Ref-1 réalise la réduction des thiols est compris de manière incomplète. De plus, l'état d'oxydation des facteurs de transcription dans le noyau est faiblement caractérisé. Deux scénarios sont possibles pour des cibles connues, la réduction de la forme sulfénique de AP-1 ou de pont disulfure dans la protéine suppresseur de tumeur p53. D'après Liu *et al*, 2005.

De plus, l'activité de liaison à l'ADN de p53 est inhibée suite aux stress oxydants. Velu et al (2007) ont montré que p53 est soumise à une modification post-traductionnelle réversible appelée S-glutathionylation dans les états de stress. Le niveau de S-glutathionylation, faibles dans les cellules tumorales, augmente fortement après traitement par des agents endommageant l'ADN. L'inhibition de p53 est levée par un traitement anti-oxydant induisant la déthiolation de p53 qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression de p21^{Cip1} (Velu *et al*, 2007). Ce mécanisme pourrait être activé dans les défenses contre la mort des cellules par apoptose induite par p53 et pourrait avoir des conséquences sur l'oncogenèse.

II. La mort cellulaire induite par les stress oxydants

1. Le contrôle des lésions l'ADN pendant les phases G₁ et G₂ et l'arrêt du cycle cellulaire

La phase G₁ est la phase clé pour le devenir d'une cellule. La cellule peut progresser en phase G₁ et continuer un cycle de division cellulaire. Inversement, si les nutriments font défaut, ou si elle reçoit un stimulus antiprolifératif, tel qu'un signal de différenciation terminale, elle peut retarder sa progression dans le cycle en phase G₁ ou arrêter de se diviser et entrer dans un état de quiescence, appelé phase G₀. Le point de contrôle effectué en fin de phase G₁ est appelé point de restriction (point start ou encore G₁ check point). Sous l'effet de signaux mitotiques, la cellule peut franchir ce point et entrer en phase S. La progression dans le cycle cellulaire se déroule alors sans nouveau stimulus mitotique. Le point de restriction est un point de non retour et constitue donc une protection essentielle pour la cellule et l'organisme. Ce point de contrôle est perdu dans de nombreuses cellules cancéreuses. Un contrôle est effectué afin de détecter les lésions éventuelles que pourrait comporter l'ADN. Lorsque des lésions de l'ADN sont détectées, le point de contrôle ne peut être franchi, laissant à la cellule la possibilité de réparer ces lésions.

Un des processus implique la **protéine p53**, qualifiée de gardien du génome, joue un rôle important dans ce processus en régulant négativement la progression du cycle cellulaire. C'est pourquoi le gène p53, codant cette anti-oncoprotéine, est classé parmi les gènes suppresseurs de tumeur (anti-oncogènes). Lorsqu'elle est phosphorylée, la protéine **p53** est un facteur de transcription qui régule l'expression de très nombreux gènes. Le taux de p53 est maintenu à un niveau faible par l'action de la protéine **Mdm2** (pour mouse double minute 2). Cette oncoprotéine se lie à p53 pour l'inhiber et former un dimère reconnu, dans le cytoplasme, par le système ubiquitine/protéasome. Etant donné que p53 stimule l'expression de Mdm2, un mécanisme de rétrocontrôle négatif s'effectue entre ces deux protéines. Lorsqu'une lésion de l'ADN est détectée, suite notamment à un stress oxydant, la protéine p53 est la cible des kinases **ATM/ATR**. Une fois p53 phosphorylée, Mdm2 ne peut plus la séquestrer. Par conséquent, p53 est stabilisée et sa concentration dans le noyau augmente (Fritsche *et al*, 1993). Parmi les gènes régulés positivement par p53, on trouve le gène de l'inhibiteur de CDK (cyclin-dépendent kinase) **p21^{Cip1}** et le gène **Rb**. Au cours de la phase G₁, la protéine p21^{Cip1} se lie aux complexes cycline D-CDK4/6 et stoppe la progression du cycle cellulaire en inhibant la phosphorylation de **pRb** (Shiloh, 2001). La protéine **pRb** non phosphorylée inhibe le facteur de transcription **E2F/DP1** pour empêcher la transition G₁/S. Le cycle cellulaire est donc bloqué en phase G₁.

La protéine p53 induit également l'expression de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Si les lésions peuvent être réparées, la protéine p53 n'est plus

phosphorylée. Elle est alors séquestrée par Mdm2 et exportée vers le cytoplasme où elle est dégradée par le protéasome. Le point de restriction peut être franchi et le cycle cellulaire se poursuit.

Au cours des phases S et G₂, les copies de l'ADN nouvellement répliquées sont contrôlées. C'est le point de contrôle des lésions de l'ADN en G₂ qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire et retarde l'entrée en mitose. A l'image du processus de la phase G₁, la détection de lésions de l'ADN entraîne la phosphorylation et l'activation de p53. En phase G₂, p53 augmente l'expression de la protéine **14-3-3** (Hermeking *et al*, 1997) qui peut se lier et retenir le complexe **cycline B1-CDK1** (également connu sous le nom de **MPF**, pour maturation promoting factor) dans le cytoplasme et ainsi empêcher la transition vers la mitose. De plus, p53 régule négativement l'expression de la **cycline B1** (Innocente *et al*, 1999). Le gène **gadd45** (pour growth arrest and DNA damage) a été identifié sur la base de son induction lors d'une irradiation aux UV et aux rayons X (Fornace *et al*, 1988 ; 1989). Son expression est régulée positivement par le facteur de transcription p53 activé. **GADD45** est un des acteurs clés de l'arrêt de croissance en G₂/M (Wang *et al*, 1999). Il interagit avec p21^{Cip1} et pourrait inhiber directement l'activité du complexe cycline B1-CDK1 en interagissant avec CDK1 (Zhan *et al*, 1999 ; Jin *et al*, 2000). Une fois l'ADN contrôlé et si besoin réparé, les cellules entrent en mitose.

Ainsi, en causant des lésions au sein des molécules d'ADN, les stress oxydants entraînent l'arrêt du cycle cellulaire, appelé arrêt de croissance « senescence-like ». Il se caractérise par une population cellulaire possédant simultanément des cellules arrêtées en phase G₁ et d'autres arrêtées en phase G₂. L'arrêt de prolifération cellulaire permet aux cellules de réparer l'ADN endommagé. Cependant, si les dommages causés à l'ADN sont trop importants et ne peuvent être réparés, la protéine p53 peut induire l'apoptose. Elle agirait donc à un carrefour décisionnel essentiel au maintien de l'intégrité du génome.

2. Le déclenchement de l'apoptose

La mort des cellules peut survenir suivant deux processus différents. Il existe la mort cellulaire accidentelle, appelée nécrose, et une mort programmée de la cellule, appelée apoptose. La première description morphologique de la mort cellulaire programmée a été réalisée par Kerr et Willye en 1972. Pour le fonctionnement normal d'un organisme, l'apoptose est extrêmement importante au cours du développement embryonnaire, pour l'homéostasie tissulaire, l'établissement de la tolérance du soi dans l'immunité, l'élimination des agents étrangers ou de cellules infectées par les cellules effectrices de l'immunité. C'est un processus hautement régulé qui peut devenir

pathologique s'il est suractivé, dans le cas des maladies neurodégénératives, les désordres immunitaires ou le vieillissement, ou s'il est inhibé dans le cas de certains cancers.

Les membres de la famille Bcl-2 et la régulation de l'apoptose

Le gène **Bcl-2** a été identifié dans les lymphomes de cellules B (Bcl pour B cell lymphomas) possédant une translocation chromosomique t(14:18) (Tsujimoto *et al*, 1984 ; Cleary *et al*, 1986). Les études qui ont suivi ont montré que la protéine Bcl-2 est une nouvelle oncoprotéine qui prévient l'apoptose au lieu de favoriser directement la prolifération cellulaire (Korsmeyer, 1992). Bcl-2 a été le premier d'une grande famille de régulateurs de l'apoptose qui favorisent la survie cellulaire ou facilitent l'apoptose (revue de Schmitt *et al*, 2007). Certaines protéines de la famille Bcl-2 sont également impliquées dans le ralentissement du cycle cellulaire et le fonctionnement des points de contrôles (Schmitt *et al*, 2007). Les protéines apparentées à Bcl-2 sont constituées de régions homologues conservées appelées BH (pour Bcl-2 homology domains) (tableau III). Les différents homologues Bcl-2 fonctionnent, au moins en partie, via des interactions protéine-protéine, formant un réseau dynamique complexe d'homo- et d'hétérooligomères, en fonction de l'environnement cellulaire et de leur localisation subcellulaire. Des expériences de mutagenèse ont suggéré que les facultés de dimérisation des protéines apparentées à Bcl-2 sont influencées par leurs combinaisons spécifiques de domaines BH (Yin *et al*, 1994).

L'hétérodimérisation entre des protéines pro- et anti-apoptotiques peut neutraliser leur activité, suggérant que la concentration relative d'une protéine par rapport à l'autre influence le devenir de la cellule (Oltvai *et al*, 1993). Parce qu'il intervient dans les interactions, le domaine BH3 est un médiateur efficace de la mort cellulaire et est souvent uniquement nécessaire pour l'induction de l'apoptose (Chittenden *et al*, 1995 ; Polster *et al*, 2001).

classification	domaines	membres
anti-apoptotique		BH2 et BH4 Bcl-xES
	2 à 4 domaines BH et un domaine TM	BH1, BH2 et BH3 A1/Bfl-1
pro-apoptotique		4 domaines Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Brag-1, Boo/Diva, BclB/Bcl2-L-10
	2 ou 3 domaines BH et un domaine TM	BH1, BH2 et BH3 Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-rambo
		BH2 et BH3 Bcl-gL
"BH3 only"		BH4 et BH3 Bcl-XS
	un domaine BH3 et un domaine TM	Bim, Bik, BNIP3, BNIP3L
		un domaine BH3 Bid, Bad, Noxa, Puma, Bmf, Beclin-1

Tableau III : Les membres de la famille Bcl-2. BH : domaine d'homologie à Bcl-2 ; TM : domaine transmembranaire. D'après Mellor et Harris, 2007 et Schmitt *et al*, 2007.

Plusieurs gènes cibles de p53, dont ceux de la famille Bcl-2, jouent des rôles cruciaux dans l'induction de l'apoptose. Parmi eux, le gène Bax est régulé positivement par p53 (Miyashita et Reed, 1995) tandis que l'expression de Bcl-2 est régulée négativement (Miyashita *et al*, 1994 ; Basu

et Haldar, 1998). D'autres membres de la famille Bcl-2 sont des cibles de p53, comme les protéines à domaine BH3 : Bid (Sax *et al*, 2002), Puma et Noxa (Villunger *et al*, 2003 ; Shibue *et al*, 2003). D'autres études ont permis de mettre en évidence que p53 est capable de s'associer aux protéines pro-apoptotiques Bax et Bad au niveau de la mitochondrie et de les activer. (Chipuk *et al*, 2004 ; Perfettini *et al*, 2004). L'interaction de p53 avec Bak induit la dissociation du complexe Bak-Mcl1 dans lequel Bak est inactivé (Leu *et al*, 2004). Les protéines p63 et p73 sont d'autres membres de la famille p53 (Jost *et al*, 1997). Elles sont activées lorsque les cellules sont endommagées et contribuent à l'induction de l'apoptose, en présence ou en absence de p53 (Yuan *et al*, 1999). L'activité de transactivation de p73 et p63 a fait l'objet de différentes études (Fontemaggi *et al*, 2002) qui ont montré notamment qu'une surexpression de p73 peut directement induire la transactivation de Puma (Melino *et al*, 2004). Le facteur de transcription E2F1 participe à l'induction de l'apoptose, en présence ou en absence de p53. En effet, la surexpression de E2F1 peut activer la transcription de p73 (Stiewe et Pützer, 2000) et réguler l'expression de différents gènes impliqués dans l'apoptose, comme Bak, Bid, Bad, Bim, Noxa, Puma, la protéine adaptatrice Apaf-1 et les caspases 3 et 7 (Pediconi *et al*, 2003). L'activation des facteurs de transcription NF- κ B et c-Jun/Ap-1 joue également un rôle important dans l'induction ou l'inhibition de l'apoptose dépendante ou indépendante de p53 et induite par les dommages à l'ADN (Ryan *et al*, 2000). Les membres de la famille Bcl-2 sont généralement localisés dans des compartiments subcellulaires différents en absence de signal de mort. Les protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-2 sont localisées généralement au niveau de la membrane externe mitochondriale, du réticulum endoplasmique et sur la face externe de l'enveloppe nucléaire. Les protéines pro-apoptotiques Bax, Bad et Bid sont libres dans le cytosol tandis que Bak semble être localisée dans la membrane externe mitochondriale. Enfin, Bim et Bmf sont associées au cytosquelette en se liant au complexe moteur dynéine des microtubules et au complexe moteur myosine de l'actine, respectivement. Sous l'effet d'un signal de mort, les protéines pro-apoptotiques, comme Bax, changent de conformation et se localisent au niveau des membranes intracellulaires, notamment mitochondriales.

La voie mitochondriale d'activation de l'apoptose

La régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale est le principal moyen par lequel les protéines apparentées à Bcl-2 exercent leurs effets sur le contrôle de l'apoptose. La mitochondrie est le lieu de convergence de multiples stimuli apoptotiques et le centre de décision qui contrôle la vie ou la mort de la cellule. Suite à un stimulus apoptotique, différents facteurs, localisés dans l'espace intermembranaire des mitochondries, sont libérés dans le cytosol. Le contrôle de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale s'effectue par les protéines de la famille Bcl-2 en formant des canaux autonomes dans la membrane ou en interférant avec les

composants des pores de perméabilité transitoire (figure 24). Dans les deux premiers cas, les protéines apparentées à Bcl-2 modulent la perméabilité de la membrane externe sans altérer les fonctions mitochondriales, le potentiel transmembranaire et la production d'ATP. Ceci est important, car en absence d'ATP ou de d'ATP, l'apoptosome ne peut pas se former (voir p59).

Les pores de transition membranaire (mPTP pour mitochondrial permeability transition pore) se forment entre les membranes interne et externe des mitochondries (figure 24). La composition moléculaire exacte des mPTP reste incertaine, mais dans celle actuellement retenue, le mPTP est composé des protéines VDAC (pour voltage-dépendant anion channel, également appelée porine), ANT (pour adénine nucléotide translocateur) et de la cyclophiline D (figure 24). La cyclophiline D serait indispensable à la formation du pore (Schinzel *et al*, 2005), mais pas la protéine VDAC. En effet, les souris invalidées pour le gène codant la protéine VDAC1 présentent une formation de pores mitochondriaux (Krauskopf *et al*, 2006). En ce qui concerne la protéine ANT, différentes isoformes pourraient être capables de former des mPTP mais ne possèdent pas toutes la même efficacité (Kokoszka *et al*, 2004). La présence d'une protéine ANT semble être indispensable aux mPTP.

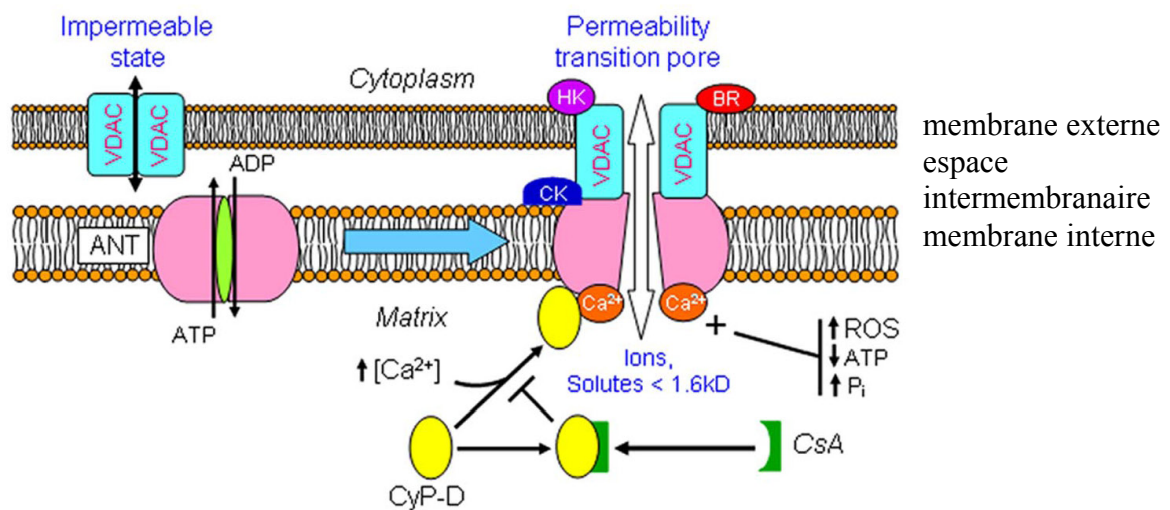


Figure 24 : Le mécanisme communément retenu de formation du pore de perméabilité transitoire mitochondrial (mPTP). Comme décrit dans le texte, les composant du mPTP sont la cyclophiline D (CyP-D), la translocase de nucléotides adénylés (ANT) et le canal anionique dépendant du voltage (VDAC). Le récepteur des benzodiazépines (BR), une créatine kinase (CK) et une hexokinase (HK) pourraient jouer un rôle de régulation dans l'ouverture du pore. La concentration en Ca^{2+} , les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la disponibilité en ATP influencent l'ouverture du pore. CsA : cyclosporine A. D'après Javadov et Karmazyn, 2007.

L'ouverture du pore de perméabilité transitoire entraîne la dépolarisation de la mitochondrie et, par conséquent, la perte du potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$), le découplage de la phosphorylation oxydative et le gonflement de la mitochondrie suite à l'entrée d'eau dans la matrice. La membrane externe peut se rompre suite à cette expansion de la matrice entraînant la libération

Les molécules contenues dans l'espace intermembranaire et libérées dans le cytosol suite à un stimulus apoptotique sont le cytochrome *c*, le facteur DIABLO/Smac qui induit l'activation des caspases par son effet sur les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), l'activateur de nucléases AIF (pour apoptosis-inducing factor), la nucléase apoptotique Endo G, la protéine HtrA2 (pour high-temperature requirement protein A2) inhibitrice des IAP (figure 25) et certaines procaspases, comme la procaspase 9, (Krajewski *et al*, 1999), la procaspase 3 (Mancini *et al*, 1998) et la procaspase 8 (Qin *et al*, 2001). Les nucléases Endo G et les protéines AIF pourraient participer à une voie menant à l'apoptose indépendante des caspases.

Lorsque le cytochrome *c* est libéré dans le cytosol, il recrute une protéine adaptatrice appelée Apaf-1 qui à son tour se lie à la procaspase 9. Le cytochrome *c* se lie à une molécule de dATP permettant que la procaspase 9 s'auto-protéolyse et devienne la caspase 9 activée qui initie la cascade d'activation des caspases (figure 25). Ce complexe constitué du cytochrome *c*, d'Apaf-1 et de la caspase 9 est appelé apoptosome responsable de l'activation de la caspase 3 (figure 25).

La voie des récepteurs de mort

Les stress oxydants induisent également la mort cellulaire par l'activation de la voie des récepteurs de mort. Cette voie de signalisation implique des domaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol nommés radeaux lipidiques (lipid rafts) (revue de Morgan *et al*, 2007). Plusieurs études ont montré que les stress oxydants, comme un traitement par H₂O₂, induisent l'expression, à la fois des messagers et des protéines, du récepteur de mort Fas (également appelé APO et CD95) et/ou de son ligand FasL dans différents types cellulaires (Vogt *et al*, 1998), notamment les PC12 différenciées par le NGF (pour nerve growth factor) (Facchinetti *et al*, 2002). Par ailleurs, certains agents endommageant l'ADN (cisplatine, irradiation γ), induisent l'apoptose dépendante des ROS en déclenchant l'agrégation de Fas, alors que les chélateurs des ROS préviennent efficacement l'oligomérisation des récepteurs Fas induit par ces stimuli (Huang *et al*, 2003). Ces informations suggèrent qu'une partie du rôle des ROS dans l'initiation de l'apoptose dépendante de Fas, pourrait être due à la formation de radeaux lipidiques (Morgan *et al*, 2007).

La liaison du ligand FasL au récepteur Fas sous formes de trimères constitue un stimulus apoptotique pour la cellule. La cascade d'événements déclenchée par cette liaison est décrite dans la figure 25.

Les bouleversements moléculaires et cellulaires de l'apoptose

Les caspases (pour Cystein ASPartate proteASES) sont des protéases, possédant un résidu cystéyl au niveau de leur site actif (QACXG), qui clivent leur substrat en aval d'un résidu aspartate. En absence de stimulus apoptotique, elles sont sous la forme de procaspases (figure 26). Les

caspases initiatrices (à prodomaine long : caspases 8, 9 et 10) sont activées par auto-protéolyse lorsqu'elles sont recrutées par des molécules adaptatrices suite à un stimulus apoptotique, la caspase 9 par la voie mitochondriale et la caspase 8 par la voie des récepteurs de mort. Leur rôle est de cliver les caspases effectrices (à prodomaines courts : caspases 3, 6 et 7). Les substrats des caspases effectrices sont différentes protéines du cytosol et du noyau (figure 27). Leur clivage est responsable des changements morphologiques de la cellule et de la mort cellulaire *in fine*.

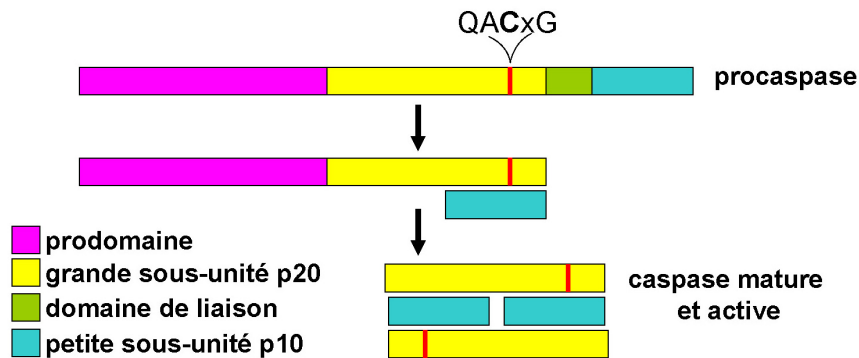


Figure 26 : La maturation des procaspases en caspases actives. Les procaspases sont constituées de 3 ou 4 domaines : la région N-terminale est un prodomaine de longueur variable, suivie de la grande sous-unité qui contient le site actif (appelée également p20), d'un domaine de liaison dans certaines caspases et d'une petite sous-unité dans sa partie C-terminale (p10). La procaspase doit être clivée pour libérer les deux sous-unités qui s'associent pour constituer la caspase active sous la forme d'un tétramère.

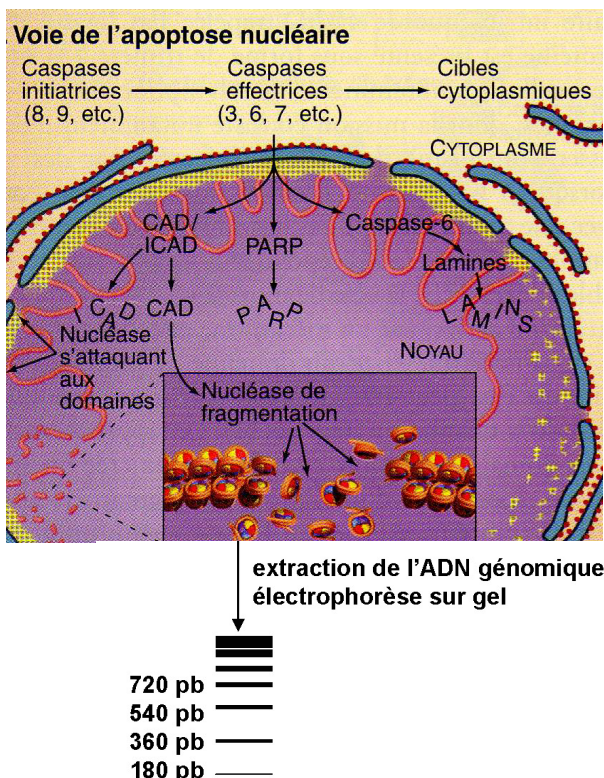


Figure 27 : Quelques rôles joués par les caspases dans le désassemblage du noyau. Dans le noyau, la caspase 3 clive notamment ICAD qui libère la nucléase CAD responsable de la fragmentation de l'ADN génomique. CAD clive l'ADN entre les nucléosomes, produisant ainsi une échelle caractéristique de fragments d'ADN, de longueurs multiples de 180 pb, lorsque l'ADN est isolé et soumis à une électrophorèse. La PARP intervient dans la réparation de l'ADN en reconnaissant les cassures de l'ADN et en interagissant avec des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (ADN polymérase β , ADN ligase). Son clivage par la caspase 3 l'empêche de réparer les fragments d'ADN clivés par CAD. Enfin, le clivage des lamines nucléaires entraîne la déstabilisation des structures nucléaires. CAD : caspase-activated DNase ; ICAD : inhibiteur de CAD ; PARP : poly-(ADP ribose) polymérase. D'après Pollard et Earnshaw, 2004.

Au niveau cellulaire, les conséquences du clivage des substrats des caspases se caractérisent par d'importants bouleversements des structures cellulaires. La cellule commence par s'arrondir et rompre ses jonctions avec les cellules voisines. Elle présente ensuite une chromatine condensée et fragmentée. La condensation de la chromatine est due à l'action de la protéine ACINUS, clivée par la caspase 3. A un stade plus tardif du processus apoptotique, le noyau se fragmente et des protubérances se forment au niveau de la membrane plasmique. La cellule se divise enfin en petits fragments cellulaires. Au sein d'un organisme, ces corps apoptotiques sont éliminés par les macrophages ou les cellules voisines par phagocytose. En effet, les cellules apoptotiques sont reconnues grâce à des changements au niveau de leur membrane ; la phosphatidylsérine, toujours localisée dans le feuillet interne de la membrane plasmique, se retrouve dans le feuillet externe lors du processus apoptotique. Dans une culture de cellules, les corps apoptotiques ne sont pas éliminés par les autres cellules et peuvent être retrouvés dans le surnageant de culture longtemps après le stimulus apoptotique.

III. Pathologies liées à la perte de contrôle de l'état rédox, du cycle cellulaire et de l'apoptose

Les stress oxydants sont impliqués dans de nombreuses pathologies humaines. Ils sont la cause ou la conséquence de perturbations profondes du métabolisme et engendrent la mort cellulaire ou les mutations génétiques responsables du développement de la maladie. Les stress oxydants sont impliqués dans le vieillissement et dans les maladies neurodégénératives, comme les maladies de Parkinson, de Huntington et d'Alzheimer, les sclérose latérales amyotrophiques (SLA = CHARCOT), dans les accidents vasculaires cérébraux (AVC) responsables d'ischémies, dans les infarctus cardiaques, les pathologies du foie comme l'IRI (ischemia/reperfusion injury), dans certains cancers, l'hypertension ou certaines pathologies des articulations comme l'arthrite. La perte du contrôle de l'apoptose et du cycle cellulaire est l'objet de recherches importantes dans la compréhension de ces pathologies.

1. Les stress ischémiques et hypoxiques

Les accidents vasculaires cérébraux sont une cause importante de mortalité dans les pays industrialisés et sont, la plupart du temps, d'origine ischémique. Une ischémie cérébrale survient lorsqu'un obstacle, comme un caillot sanguin, bloque la circulation sanguine et empêche le sang d'irriguer une partie du cerveau (figure 28). Les cellules qui ne sont plus irriguées par le sang ne reçoivent plus l'apport normal en oxygène et subissent une hypoxie. Si la réduction de l'apport

sanguin est suffisamment sévère ou prolongé, le territoire hypoperfusé est détruit, ce qui constitue un infarctus cérébral. Parce que les cellules nerveuses sont les plus sensibles à l'hypoxie, la localisation et la taille de l'infarctus déterminent la nature et la sévérité des conséquences du point de vue neurologique. Les processus mis en jeu lors d'une ischémie cérébrale sont complexes et sont l'objet de nombreuses recherches.

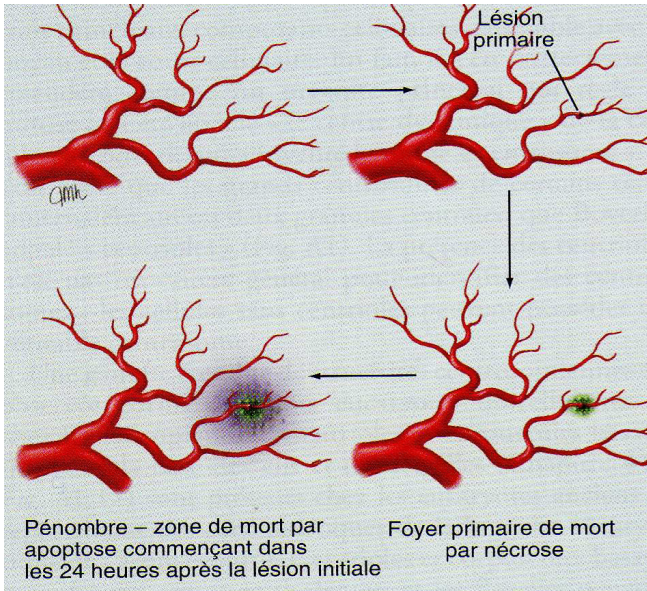


Figure 28 : L'occlusion d'une artère intracérébrale entraîne, dans un premier temps la mort par nécrose des cellules privées de sang. Dans un second temps, la perte des cellules nerveuses se propage à une zone plus importante appelée pénombre. La mort par apoptose secondaire, due à l'absence d'oxygène dans la pénombre, augmente fortement la zone du cerveau affectée lors d'un accident vasculaire cérébral. D'après Pollard et Earnshaw, 2004.

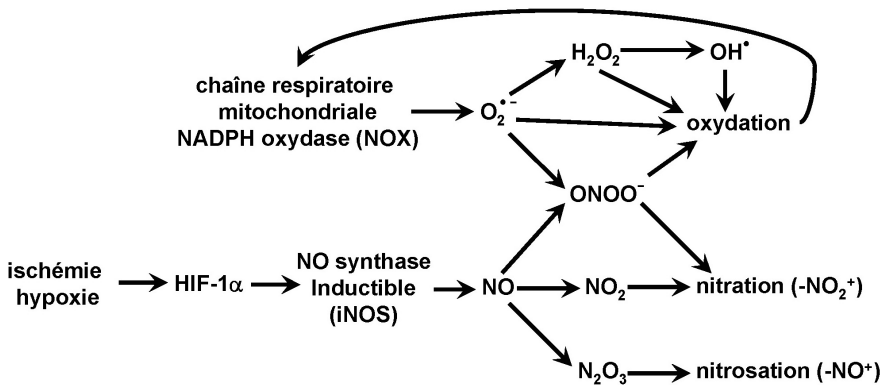


Figure 29 : Interaction entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). D'après Brown et Borutaite, 2006.

L'hypoxie tissulaire conduit à une augmentation du taux de protéine **HIF-1α** (pour hypoxia inducible factor-1α), un facteur de transcription qui induit l'expression de nombreux gènes. L'expression du facteur de croissance **VEGF** (pour vascular endothelial growth factor), de l'**érythropoïétine** ou d'enzymes intervenant dans la glycolyse, comme la **GAPDH** (pour glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), augmente suite à une hypoxie. Ces facteurs sont chargés de s'opposer à l'ischémie en favorisant la vascularisation (VEGF), la maturation des érythrocytes (érythropoïétine) ou l'apport énergétique (GAPDH). Inversement, HIF-1α est impliqué dans l'induction de l'apoptose en induisant la transcription de gènes codant des protéines

impliquées dans l'apoptose, comme la NO synthase inductible (iNOS) (figure 29), la protéine pro-apoptotique Bnip3 (ou Nip3) de la famille Bcl-2 (Bruick, 2000) ou la caspase 9 (Nishiyama *et al*, 2001). Récemment, Van Hoecke *et al* (2007) ont montré que les niveaux d'expression de HIF-1 α et de la procaspase 3 augmentent suivant un profil similaire en réponse à une ischémie. Le promoteur du gène de la procaspase 3 possède un site spécifique de liaison du facteur de transcription HIF-1 α (Van Hoecke *et al*, 2007). Ces résultats montrent une relation causale entre HIF-1 α et l'induction de la caspase 3 par l'activation transcriptionnelle du gène de la procaspase 3 par HIF-1 α .

L'induction de la protéine iNOS est à l'origine d'une cascade d'événements débutant par la production en excès d'oxyde nitrique (NO) et aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. La réaction entre le NO et O₂^{•-} génère du peroxy-nitrite, très réactif (Kikugawa *et al*, 2004), qui oxyde les constituants cellulaires et entraîne une diminution du potentiel de membrane mitochondrial (figure 29). Comme nous l'avons vu au début de la deuxième partie, la chute du potentiel membranaire engendre une production accrue d'anion superoxyde et de ROS. La voie mitochondriale de l'apoptose est activée, la cascade d'événements décrite dans la première section se produit et la cellule meurt par apoptose (Nomura, 2004).

Au contraire des neurones, qui sont particulièrement sensibles à l'hypoxie, les cellules gliales possèdent une certaine tolérance à de tels stress. Différents travaux rapportent que le pré-conditionnement hypoxique ou ischémique induit une relative neuroprotection contre une hypoxie ou ischémie ultérieure qui aurait eu des effets dramatiques sur le tissu nerveux (Liu *et al*, 1992). Cet effet bénéfique sur le cerveau passe par la régulation de l'expression de différents gènes (Abe et Nowak, 1996). En réponse à une hypoxie, l'expression de la PDI est régulée positivement dans les cellules gliales. La PDI protège les cellules et serait partiellement impliquée dans l'acquisition de la tolérance aux stress ischémiques. L'expression de l'ubiquiline, identifiée comme une protéine qui interagit avec la PDI dans le réticulum endoplasmique, augmente également sous l'effet de l'hypoxie. La co-expression de la PDI et de l'ubiquiline dans des cellules de neuroblastome entraîne une plus grande résistance à l'apoptose induite par l'hypoxie que l'expression de la PDI ou l'ubiquiline seule, suggérant leur coopération dans l'induction de la tolérance à l'hypoxie (Ko *et al*, 2002). Une hypoxie transitoire courte n'entraîne pas de dommages neuronaux mais induit une augmentation progressive et maintenue de l'expression des protéines hème oxygénase-1 (HO-1) et MnSOD (Garnier *et al*, 2001). Ces deux enzymes possèdent des effets protecteurs contre les dommages d'une ischémie cérébrale (Panahian *et al*, 1999). Ces résultats montrent qu'une hypoxie transitoire augmente les défenses enzymatiques anti-oxydantes du cerveau qui sont capables d'augmenter la tolérance des neurones aux stress suivants. L'activation des astrocytes dans ces conditions montre qu'une hypoxie transitoire est capable d'initier la réaction des cellules gliales.

Etant donné que les astrocytes activés sont impliqués dans les défenses antioxydantes du cerveau, la réaction des astrocytes pourrait également représenter une réponse adaptative du cerveau aux stress oxydants induits par hypoxie (Garnier *et al*, 2001). Les cellules endothéliales cérébrales (CEC), formant la barrière hémato-encéphalique (BBB, pour blood-brain barrier), pourraient participer de la même manière au pré-conditionnement du cerveau contre les stress ischémiques. En effet, une augmentation de l'expression de HO-1 et MnSOD est observée dans ces cellules sous l'effet d'un faible stress oxydant (Méthy et al, 2004).

Les épisodes d'ischémie/reperfusion

Lorsque l'origine d'une ischémie ou d'une hypoxie disparaît (dissolution du caillot sanguin, par exemple), des dommages surviennent lorsque le sang afflue à nouveau. En effet, les cellules reçoivent brutalement une grande pression en O₂ qui entraîne la production de O₂[•] par différents complexes enzymatiques précédemment mentionnés. La reperfusion est connue pour exacerber la production de ROS par les cellules, en commençant par les cellules endothéliales cérébrales, qui possèdent une forte expression de xanthine oxydase et de NADPH oxydase. Les pores de perméabilité transitoire mitochondriaux restent fermés pendant une ischémie cardiaque mais s'ouvrent pendant la reperfusion et déclenchent l'activation des caspases et de l'apoptose (Griffiths et Halestrap, 1995).

Stress oxydants et cycle cellulaire

Comme dans les autres tissus, le cycle cellulaire est hautement régulé dans le système nerveux central. Les précurseurs neuronaux se divisent pour produire les neurones nécessaires et ceux en excès sont éliminés par apoptose sélective. Une fois que les cellules nerveuses ont atteint le stade de différenciation terminale, elles ne peuvent plus se diviser et entrer dans le cycle cellulaire. L'idée que les stress oxydants puissent activer le cycle cellulaire n'est pas intuitive. Nous l'avons vu, l'augmentation des ROS endommage l'ADN puis induit un arrêt du cycle cellulaire. Cependant, différents travaux ont montré qu'une ischémie cérébrale transitoire induit l'activation de protéines mitotiques (Wen *et al*, 2004). Les neurones des personnes ayant subi un infarctus cérébral ou un arrêt cardiaque présentent des niveaux élevés de cycline D1 de CDK2 et de moindre importance de CDK4 (Love, 2003). Ces résultats indiquent que l'ischémie cérébrale induit l'entrée de certains neurones de la phase G₀ à la phase G₁ du cycle cellulaire, et suggèrent un rôle thérapeutique potentiel des inhibiteurs de CDK contre les chocs ischémiques.

2. Les maladies neurodégénératives : exemple de la maladie d'Alzheimer

Dans différentes pathologies, comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, l'état oxydant des cellules est déséquilibré et les ROS causent des lésions cellulaires qui peuvent entraîner la mort (revue de Sayre *et al*, 2005).

De nombreuses études ont démontré l'implication d'un métabolisme cérébral ralenti dans la maladie d'Alzheimer (Blass, 2000). Ces anomalies précèdent les diminutions fonctionnelles et l'atrophie du cerveau. Il est possible que des épisodes d'ischémie/hypoxie transitoires faibles mais répétés, d'hypoperfusion, d'hypoglycémie, ou de déficience en vitamines, soient à l'origine des perturbations mitochondriales dans le développement précoce de la maladie d'Alzheimer (Zhu *et al*, 2007). Les autres causes du développement de la maladie incluent les mutations sporadiques dans l'ADN mitochondrial, qui peuvent aboutir à des protéines mitochondriales non fonctionnelles.

Les mitochondries endommagées produisent moins d'ATP tandis que les ROS sont produites plus efficacement. La diminution de la production d'énergie, l'augmentation des stress oxydants, et l'augmentation des mitochondries endommagées sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Castellani *et al*, 2002). Ces mitochondries présentent des déficiences de certaines enzymes clés du métabolisme, incluant le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase (KGDHC) et le complexe pyruvate déshydrogénase (PDHC) (figure 17), et la cytochrome oxydase (Mauer *et al*, 2000).

La perte de l'homéostasie du fer et du cuivre dans le cerveau est accompagnée de conséquences neurologiques sévères. La plupart des stress oxydants se produisant dans la maladie d'Alzheimer, la glycation, l'oxydation des protéines, la peroxydation lipidique et l'oxydation des acides nucléiques, résultent directement ou indirectement de la formation de radical hydroxyle catalysée par des métaux de transition, le fer et le cuivre (figure 16). Une accumulation significative de fer peut être observée, et colocalisée avec les lésions caractéristiques de la maladie, dans l'hippocampe, le cortex et les noyaux de la base, de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer. Les stress oxydants induisent la mort des cellules cérébrales en activant la voie mitochondriale de l'apoptose, décrite précédemment. Les conséquences au niveau tissulaire sont l'apparition de deux types de lésions, comme les plaques amyloïdes extracellulaires, appelées plaques séniles (SP) et les enchevêtrements neurofibrillaires interneuronaux (NFT pour neurofibrillary tangles) (Smith *et al*, 1996). Les plaques séniles contiennent principalement le peptide amyloïde β alors que les NFT sont composés essentiellement de la protéine associée aux microtubules **tau** hyperphosphorylée.

Comme dans le cas de l'ischémie, au cours de la maladie d'Alzheimer, les stress oxydants induisent l'entrée des neurones quiescents en phase G₁ du cycle cellulaire. Les neurones touchés par la maladie d'Alzheimer peuvent présenter une duplication chromosomique mais ne franchissent pas

la mitose avant de mourir par apoptose. Ces observations suggèrent que les cellules ont traversé la phase S et s'arrêtent au point de contrôle de la phase G₂ avant d'enclencher l'apoptose (Klein et Ackerman, 2003).

Troisième partie :

Régulation de l'expression génique et neuroprotection par les estrogènes

L'hormone stéroïde estradiol-17 β , appelée E₂, est l'une des principales hormones impliquées dans la reproduction. Chez les femmes, avant la ménopause, les ovaires sont la principale source d'E₂, qui agit, comme hormone circulante, sur ses tissus cibles. Cependant, chez les femmes après la ménopause, lorsque les ovaires cessent de produire des estrogènes, et chez les hommes, d'autres organes sont capables de sécréter E₂, qui n'est plus seulement un facteur endocrinien. E₂ est produit par des cellules du tissu adipeux, dont celles du sein, des cellules osseuses, des cellules de l'endothélium vasculaire et des muscles lisses aortiques et des cellules de différentes zones dans le cerveau (Simpson, 2003). Dans ces tissus, l'hormone agit localement comme facteur paracrine ou intracrine. L'estradiol-17 β fait partie des hormones stéroïdes qui sont synthétisées à partir du cholestérol. La testostérone est transformée en estradiol-17 β par une aromatasase.

Les estrogènes exercent de nombreux effets sur les cellules cibles de l'organisme. En effet, E₂ joue un rôle important dans la reproduction en régulant la prolifération, la différenciation et la fonction des cellules des organes reproducteurs primaires et secondaires, chez la femme mais également chez l'homme. Mais l'action des estrogènes ne se limite pas à la reproduction, et participe à la régulation de différents processus dans tout l'organisme et en particulier dans le cerveau. Les données expérimentales et cliniques s'accumulent permettant de mieux comprendre le rôle de E₂ dans la neurogenèse au cours du développement embryonnaire et de la vie adulte. En effet, les estrogènes peuvent moduler la formation des synapses, la plasticité et la différenciation sexuelle des systèmes nerveux central et périphérique. De plus, E₂ possède des effets protecteurs sur le cerveau en agissant à plusieurs niveaux : sur le système vasculaire cérébral, les cellules gliales, ou directement sur les neurones en inhibant la mort cellulaire programmée. Ces effets neuroprotecteurs permettent d'améliorer ou de maintenir la mémoire, la cognition, l'équilibre, le mouvement... C'est pourquoi les recherches sur la régulation de l'expression génique par les estrogènes dans le système nerveux central et les mécanismes de neuroprotection, sont en constante progression.

I. Les récepteurs des estrogènes

Les estrogènes modulent l'expression de nombreux gènes et agissent sur les cellules cibles par des mécanismes dont certains sont encore mal connus. Ils interagissent avec les récepteurs des estrogènes (ER) répartis en deux catégories, les récepteurs nucléaires et les récepteurs associés à la membrane plasmique.

1. Les récepteurs nucléaires des estrogènes ER α et ER β

Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires

La superfamille des récepteurs nucléaires regroupe des facteurs de transcription qui possèdent une organisation structurale et fonctionnelle commune. L'activité des récepteurs nucléaires dépend de la fixation de ligands liposolubles capables d'entrer à l'intérieur de la cellule. En absence de ligand, certains de ces récepteurs sont localisés dans le noyau et les autres dans le cytoplasme. C'est la liaison du ligand au récepteur qui entraîne l'entrée de ces récepteurs dans le noyau. Dans les deux cas, l'interaction entre un ligand et son récepteur constitue un signal pour la cellule cible qui module l'expression génique et son activité en réponse à ce signal.

Les récepteurs nucléaires appartiennent à trois groupes. Le premier est le groupe des récepteurs ayant pour ligand les hormones stéroïdes. Ces hormones dérivées du cholestérol sont les estrogènes, la progestérone, les androgènes, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes. Les récepteurs du deuxième groupe sont les récepteurs des hormones thyroïdiennes (RT), les récepteurs des acides rétinoïques (RAR, RXR), les récepteurs de la vitamine D (RVD) et les récepteurs des activateurs de prolifération des peroxyosomes (PPAR). En absence de l'hormone, ces récepteurs se lient à l'ADN sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères et possèdent un effet répressif sur la transcription génique. La liaison du ligand lève cette répression et permet d'activer la transcription. Le troisième groupe contient les récepteurs orphelins, ayant des homologies de structure avec les récepteurs des autres groupes, capables de réguler la transcription génique mais dont les ligands sont inconnus.

La **structure primaire** des récepteurs nucléaires est représentée schématiquement dans la figure 30. Les différentes activités sont réparties dans cinq domaines présentant des homologies variables entre les différents membres de la superfamille (Altucci et Gronemeyer, 2001).

Le **domaine A/B** contient la fonction AF-1 (Activation Function-1), responsable de l'activation de la transcription, indépendamment de la fixation du ligand.

Le **domaine C** forme deux doigts de zinc responsables de la liaison à l'ADN au niveau de séquences spécifiques, appelées éléments de réponse à l'hormone (HRE), situées dans la région

régulatrice des gènes cibles. Les doigts de zinc contiennent des résidus cystéyls qui établissent des liaisons de coordination avec les ions Zn^{2+} . La boîte P (pour proximale) joue un rôle dans la reconnaissance des demi-sites des HRE tandis que la boîte D (pour distale) intervient dans la reconnaissance de l'espacement entre les demi-sites des HRE (figure 30 b). Le **domaine D** est une petite région charnière entre les domaines C et E. Il participe à la fonction de dimérisation des récepteurs et de liaison de l'ADN du domaine D (figure 30).

Le **domaine E** est le domaine de liaison de l'hormone. Il participe également à d'autres fonctions, telles que la dimérisation des récepteurs, la localisation nucléaire dépendante du ligand, la liaison avec hsp90 et la transactivation dépendante du ligand, ou fonction d'activation AF-2 (Activation Function-2) (figure 30). Le domaine E contient une large proportion d'acides aminés hydrophobes, constituant une poche de liaison pour l'hormone. La connaissance des structures 3D des domaines de liaison de l'hormone de certains récepteurs nucléaires a permis de mieux comprendre les mécanismes d'activation du domaine AF-2. La comparaison des structures liées et non liées à l'hormone, suggère que la liaison de l'hormone induit un mouvement de l'hélice α H12 C-terminale qui vient recouvrir la poche de liaison du ligand. Cette hélice α ainsi positionnée forme une surface d'interaction avec les cofacteurs transcriptionnels qui servent eux-mêmes de pont avec la machinerie transcriptionnelle (Wurtz *et al*, 1996).

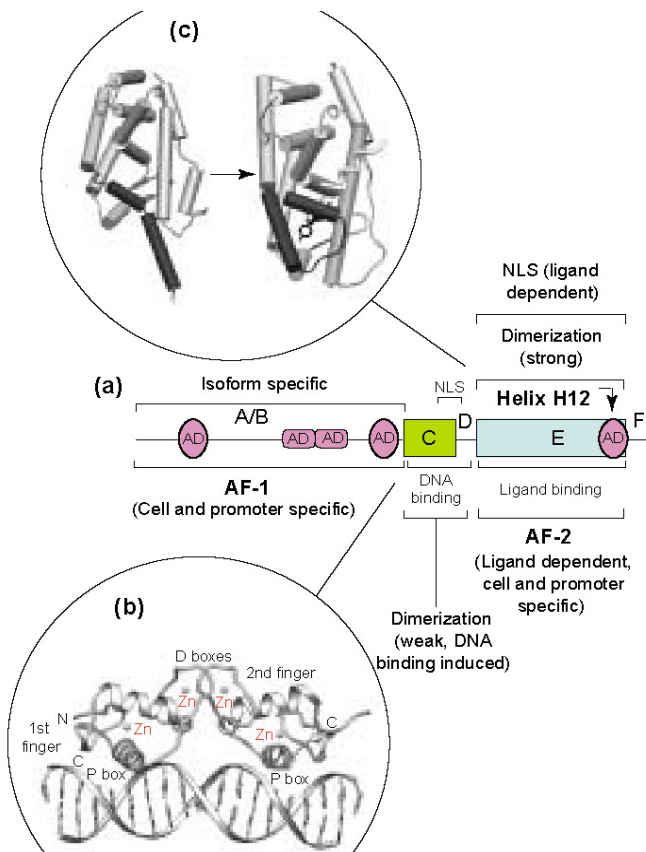


Figure 30 : Structure générale des récepteurs nucléaires et fonctions associées aux différents domaines (a). Les domaines C et E, les plus conservés, sont encadrés des régions plus variables, les domaines A/B, D et F. Un ou plusieurs domaines d'activation (AD) peuvent constituer une fonction d'activation (AF). Les séquences de localisation nucléaire (NLS), peuvent être constitutivement actives ou activées par la liaison du ligand (dans le domaine E), et permettent la reconnaissance du récepteur au niveau des pores nucléaires et sa translocation du cytoplasme vers le noyau. **La fixation des récepteurs à l'ADN sur l'élément de réponse (b)** fait intervenir des structures en doigt de zinc du domaine C. La reconnaissance des demi-sites des HRE et de la distance qui les sépare est assurée par la boîte P (P box) et la boîte D (D box). **Le changement de position de l'hélice α H12 (c)** permet l'interaction des récepteurs liés à l'hormone avec les corégulateurs transcriptionnels. D'après Altucci et Gronemeyer, 2001.

Les récepteurs des estrogènes ER α et ER β

Le récepteur des estrogènes α (ER α) humain a été cloné en 1986 (Green *et al*, 1986). La découverte, dix ans plus tard, d'un second récepteur, appelé ER β , a soulevé de nombreuses questions sur ce 2^{ème} récepteur (Kuiper *et al*, 1996). Chez l'homme, les récepteurs des estrogènes α et β sont codés par deux gènes différents situés sur deux chromosomes distincts (6 et 14 respectivement) (Green *et al*, 1986 ; Mosselman *et al*, 1996). Les récepteurs ER α et ER β présentent une forte identité dans leur séquence primaire mais aussi dans leur structure tertiaire (figure 31). Les domaines C de ER α et ER β possèdent 97% d'homologie (figure 31). Ils reconnaissent donc la même séquence de l'ADN, appelée élément de réponse aux estrogènes (ERE). Inversement, leurs domaines de liaison de l'hormone diffèrent de manière significative (figure 31). L'activation de la transcription par les récepteurs des estrogènes est influencée par les interactions entre les régions N et C terminales du récepteur (Kraus *et al*, 1995). Ces données suggèrent que l'affinité pour les ligands n'est pas la même pour les deux isoformes et que l'activation transcriptionnelle des gènes cibles pourrait être différente. De plus, le domaine F de ER α jouerait un rôle dans la régulation de l'expression génique (Montano *et al*, 1995). En fonction du ligand fixé, la conformation adoptée par les récepteurs est différente et conduit à une action agoniste ou antagoniste du ligand (Pike *et al*, 2001). Différentes études montrent que les 2 récepteurs ne présentent pas le même profil d'expression tissulaire. Ainsi, ER α est majoritairement exprimé dans l'utérus et la glande mammaire alors que ER β l'est dans l'ovaire, le testicule et la prostate. Les deux isoformes coexistent dans la plupart des organes et notamment le cerveau. Certaines régions du cerveau présentent une densité importante de récepteurs, comme l'hypothalamus et l'hippocampe (Shimizu *et al*, 2005).

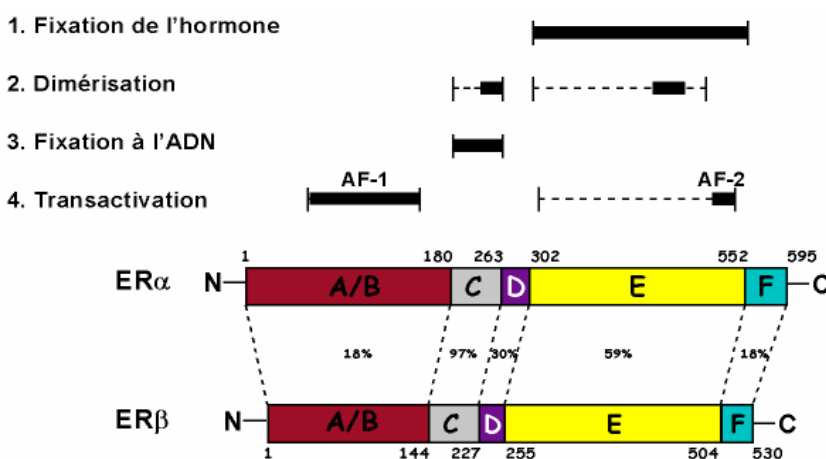


Figure 31 : représentation schématique des domaines fonctionnels de ER α et ER β humains. Les pourcentages d'identité entre les deux récepteurs sont précisés, ainsi que la fonction des différents domaines. D'après Delage-Mouroux et Jouvenot, 2001

Actions génomiques directes

Différents gènes dont l'expression est régulée par les estrogènes ont été identifiés au fil des années. Le temps qui s'écoule entre la stimulation par E₂ et l'apparition des messagers ou des protéines varie en fonction des gènes étudiés. De plus, les expériences ont montré que la

transcription de certains gènes peut être activée sans synthèse protéique *de novo*. Inversement, la transcription des autres gènes n'a pas lieu en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique comme la cycloheximide (CHX). Il est donc apparu nécessaire de classer ces gènes en différentes catégories en tenant compte de ces critères et selon un modèle en cascade décrit par Rories et Spelsberg en 1989 et par Dean et Sanders en 1996. Dans les minutes qui suivent la stimulation estrogénique, une première série de gènes est exprimée. Il s'agit des **gènes précoces** ou **gènes de réponse primaire** (early genes ou primary response genes) dont l'expression est directement induite par les récepteurs des estrogènes activés (figure 32). Les protéines codées par ces gènes ont différentes fonctions. Certaines sont des facteurs de transcription (FOS, JUN, MYC), d'autres sont des cytokines (TGF- α), des facteurs neuroendocrines (prolactine, ocytocine), des enzymes (créatine kinase B, cathepsine D), ou des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2). Dans les heures voire les jours qui suivent la stimulation, deux catégories de gènes sont régulées : les **gènes tardifs** ou **gènes de réponse secondaire** (late genes ou secondary response genes) et les **gènes précoces retardés** (delayed primary response genes) (figure 32). Les facteurs de transcription exprimés lors de la réponse primaire sont capables de réguler la transcription d'autres gènes. L'expression des gènes tardifs dépend uniquement de l'activation de la transcription par ces facteurs de transcription (figure 32). Les gènes précoces retardés sont régulés à la fois par la liaison directe des récepteurs de estrogènes activés et par la liaison d'une protéine précocement induite sur sa séquence cible. En présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, les facteurs de transcription codés par les gènes précoces ne sont pas produits et ne peuvent donc pas enclencher la transcription des gènes tardifs et précoces retardés (figure 32). Les gènes appartenant à ces trois groupes codent des protéines responsables de diverses fonctions cellulaires (tableau IV).

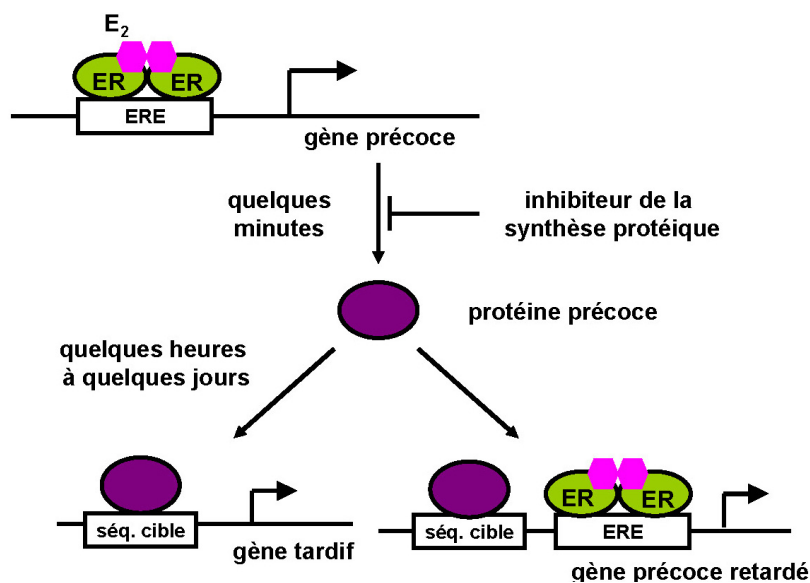


Figure 32 : Activation de la transcription des gènes précoces, précoces retardés, et tardifs par les estrogènes. ER : récepteur des estrogènes ; ERE : élément de réponse des estrogènes.

Gènes précoces		Gènes tardifs et précoces retardés*	
Catégories de gènes	Références	Catégories de gènes	Références
Facteurs anti-apoptotiques		Facteurs de transcription	
CIF	Zhang <i>et al</i> , 2001	CCNA1	Inoue <i>et al</i> , 2002
Bcl-2	Garnier <i>et al</i> , 1997	CCT2	Charpentier <i>et al</i> , 2000
Bcl-XL	Gollapudi et Oblinger, 2001	CCND1*	Prall <i>et al</i> , 1997
Nip2	Garnier <i>et al</i> , 1997		
Facteurs de transcription		Enzymes	
Histone desacétylase 6	Inoue <i>et al</i> , 2002	Tryptophanyl-tRNA synthetase	Inoue <i>et al</i> , 2002
pS2	Inoue <i>et al</i> , 2002	Lysozyme	Oursler <i>et al</i> , 1993
c-fos	van Straaten <i>et al</i> , 1983	Asparagine synthase	Inoue <i>et al</i> , 2002
c-myc	Huet-Hudson <i>et al</i> , 1989	Enolase 2	Inoue <i>et al</i> , 2002
c-jun	Webb <i>et al</i> , 1993	Enolase 3	Inoue <i>et al</i> , 2002
récepteur de la progestérone	Rocheffort, 1995	Q6 (quiescin)	Inoue <i>et al</i> , 2002
EGR-3	Pedram <i>et al</i> , 2002	Phosphosérine aminotransférase	Inoue <i>et al</i> , 2002
EGR-2	Pedram <i>et al</i> , 2002		
Facteurs de croissance-Hormones-Récepteurs		Autres	
EPO	Pedram <i>et al</i> , 2002	ovalbumine	McKnight et Palmiter, 1979
IFN	Pedram <i>et al</i> , 2002	vitellogénine	Spelsberg <i>et al</i> , 1989
EGF	Lingham <i>et al</i> , 1988		
IGF-1	Murphy et Ghahary, 1990		
IGF-2	Pedram <i>et al</i> , 2002		
EFP	Ikeda <i>et al</i> , 2000		
TGF- α	Reddy <i>et al</i> , 1994		
Prolactine	Scully <i>et al</i> , 1997		
Ocytocine	Young <i>et al</i> , 1998		
récepteur GABA _A (α 2 et γ 1)	Herbison <i>et al</i> , 1995		
Récepteur au PGE2	Pedram <i>et al</i> , 2002		
Enzymes			
Protéine kinase C (δ)	Inoue <i>et al</i> , 2002		
créatine kinase B	Inoue <i>et al</i> , 2002		
cathepsine D	Rocheffort, 1995		
HMG CoA réductase	Di Croce <i>et al</i> , 1999		
δ -9-désaturase	Inoue <i>et al</i> , 2002		
hCox-2	Pedram <i>et al</i> , 2002		
retinol deshydrogenase	Pedram <i>et al</i> , 2002		
MAPs			
MAP1B	Inoue <i>et al</i> , 2002		
MAP-2	Matsuno <i>et al</i> , 1997		
Tau	Matsuno <i>et al</i> , 1997		
Gec1/GABARAPL1	Pellerin <i>et al</i> , 1993		

Tableau IV : Quelques exemples de gènes précoces et de gènes tardifs.

Mode d'activation de la transcription

En absence de ligand, les récepteurs des estrogènes sont associés à deux protéines de choc thermique **hsp90** (heat shock protein) et une protéine chaperon de 23 kDa, appelée **p23** (figure 33). Dans le cas de ER α , les hsp90 peuvent être associées à hsp70 et une protéine p55. E₂ est une molécule liposoluble qui franchit la membrane plasmique puis l'enveloppe nucléaire. Dans le noyau, la fixation du ligand entraîne la dissociation du complexe protéique formé par le récepteur et les protéines chaperons (figure 33). Les récepteurs activés et liés à l'ADN recrutent et interagissent avec des corégulateurs pour activer la transcription de gènes cibles. Les récepteurs des estrogènes

ER α et ER β activés peuvent alors se lier à l'ADN sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères ER α /ER β ou interagir avec d'autres facteurs de transcription pour moduler l'expression génique.

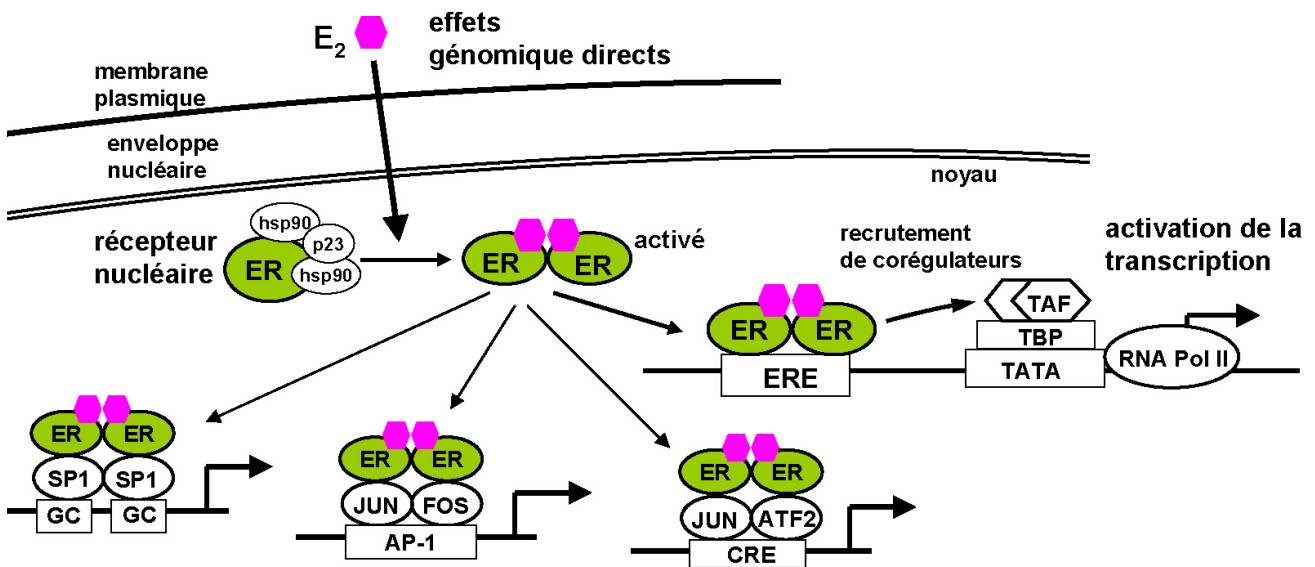


Figure 33 : Mécanisme général de l'activation des récepteurs nucléaires des œstrogènes et les séquences cibles par l'intermédiaire desquelles les récepteurs des œstrogènes modulent l'expression génique. ER : récepteurs des œstrogènes ; hsp90 : protéine de choc thermique de 90 kDa ; TAF : facteurs associés à la TATA-binding protein ; TBP : TATA-binding protein ; RNA Pol II : ARN polymérase II.

Les récepteurs des œstrogènes activés modulent l'expression des gènes en se liant directement ou indirectement à une séquence cible de l'ADN. La liaison directe des récepteurs à l'ADN s'effectue au niveau de séquences ERE. La séquence ERE consensus est un palindrome parfait de 15 paires de bases (5'-AGGTCAnnnTGACCT-3'). Il agit comme un « enhancer » transcriptionnel quelle que soit la distance qui le sépare du promoteur, son orientation et sa position par rapport au site d'initiation de la transcription. Certaines séquences ERE diffèrent de cette séquence consensus et les récepteurs peuvent s'y lier avec moins d'affinité. Plusieurs autres séquences de l'ADN sont responsables d'une activation indirecte de la transcription des gènes cibles (figure 33) (revues de O'Lone *et al*, 2004 ; Björnström et Sjöberg, 2005). Le **site Sp1** (pour promoter-specific transcription factor-1), ou boîte **GC**, correspond à la séquence consensus 5'-GGGCGG-3' sur laquelle se lie le facteur de transcription Sp1. Les récepteurs des œstrogènes peuvent interagir avec ce facteur et moduler l'expression génique. Les gènes qui contiennent des séquences **AP-1** (activator protein-1) (5'-TGAGTACA-3') sont régulés de la même manière par l'interaction des ER avec les complexes formés d'homodimères **JUN/JUN** ou d'hétérodimères plus stables **FOS/JUN**. La transcription qui dépend de AP-1 peut également être réprimée par ER activé. L'élément de réponse à l'AMP cyclique, ou **CRE** (pour cyclic AMP response element), correspond à la séquence consensus 5'-TGACGTCA-3' à laquelle se lient les facteurs de transcription de la famille CREB/CREM/ATF (pour CRE binding protein, CRE modulator, activating transcription

factor). Le récepteur des estrogènes ER α interagit avec le dimère JUN/ATF-2 pour activer la transcription *via* le CRE. L'expression du gène IL-6 par E₂ est réprimée par l'interaction de ER avec deux facteurs de transcription, le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) et la protéine C/EBP β (pour CCAAT/enhancer binding protein β) (Stein *et al*, 1995).

La chromatine est composée d'ADN enroulé autour de noyaux d'histones, formés de deux paires d'histones H3/H4 et H2A/H2B et d'une histone H1. Lorsque les histones ne sont pas acétylées, les nucléosomes forment une structure compacte inaccessible à la machinerie de transcription. Les cofacteurs des récepteurs nucléaires sont des protéines régulatrices qui participent à la modulation de l'expression des gènes cibles. Ces cofacteurs regroupent des coactivateurs et des corépresseurs. Les corépresseurs possèdent une activité histone désacétylase (HDAC) qui maintient la chromatine dans son état compacté et empêche la transcription des gènes. Inversement, les coactivateurs possédant une activité histone acétyl transférase (HAT), permettent le remodelage de la chromatine (figure 34). Les séquences promotrices (boîte TATA) sont alors accessibles aux facteurs généraux de la transcription qui recrutent l'ARN polymérase II (figure 34).

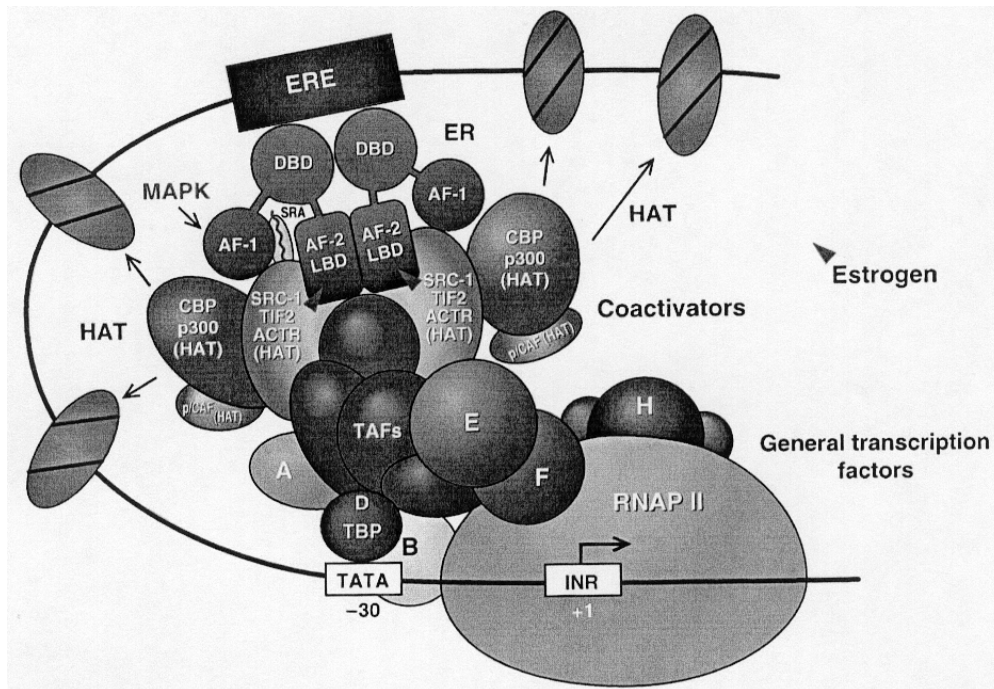


Figure 34 : Modèle schématique du complexe d'initiation de la transcription formé sur la boîte TATA du promoteur d'un gène cible avec un ERE. Les récepteurs des estrogènes activés par le ligand et/ou par phosphorylation recrutent des protéines à activité acétyl transférase (SRC-1 et CBP/p300) permettant de remodeler la chromatine. Les interactions entre l'ARN polymérase II (RNAP II), les facteurs généraux de la transcription et les complexes ER-coactivateurs protéiques sont schématisées. D'après Muramatsu et Inoue, 2000.

Lorsque les récepteurs des estrogènes sont activés et liés à l'ADN, ils recrutent des coactivateurs à activité histone acétyl transférase, tels que SRC-1 (pour steroid/nuclear receptor coactivator-1) et

CBP/p300 (pour CREB binding protein). Une fois les histones acétylées au voisinage du promoteur du gène cible, la machinerie de transcription est assemblée à partir du promoteur, ce qui permet l'activation de la transcription (figure 34). La proportion variable de ces cofacteurs dans les cellules des divers tissus cibles permet d'expliquer, en partie, la spécificité tissulaire des réponses aux estrogènes (Margueron et al, 2004).

2. Actions génomiques indirectes et actions non génomiques

Les actions génomiques indépendantes du ligand

La modulation de l'expression génique, ne passant pas par liaison de E₂ aux récepteurs nucléaires, utilise plusieurs voies de transduction du signal. Il s'agit de l'activation par les facteurs de croissance, la mobilisation du calcium intracellulaire et la voie de signalisation des phosphatidylinositol-3 kinases (PI3-kinase).

En absence de ligand, l'activité des récepteurs des estrogènes peut être modulée par la phosphorylation de certains résidus sérils. Les facteurs de croissance, comme l'IGF-I (pour insulin-like growth factor-I) ou l'EGF (pour epidermal growth factor), et d'autres activateurs de protéines kinases déclenchent une cascade d'activations de protéines kinases MAPK. Ces réactions peuvent aboutir à la phosphorylation des récepteurs des estrogènes (figure 35). Ces phosphorylations peuvent, notamment, augmenter l'affinité du récepteur pour la séquence ERE et activer la transcription de gènes cibles (figure 35).

Les récepteurs membranaires des estrogènes

Certains auteurs ont suggéré que les effets non génomiques des estrogènes sont initiés par la liaison à une sous-population de récepteurs, localisés au niveau de la membrane plasmique (Razandi *et al*, 1999). La protéine GRP30 est un récepteur couplé à une protéine G transmembranaire qui lie E₂ avec une grande affinité (Filardo *et al*, 2005) et dont l'expression a été montrée dans le cerveau. D'autres auteurs supposent qu'il s'agit des récepteurs ER α ou ER β situés au niveau de cavéoles où ils activent une cascade de phosphorylation par des kinases (Kim *et al*, 1999). Les cavéoles sont des structures spécialisées dans l'invagination de la membrane qui facilitent la transduction du signal en regroupant les protéines impliquées. Les ER ne contiennent pas de domaine transmembranaire et l'association à la membrane pourrait être due à une palmitoylation (Acconcia *et al*, 2004). Ils seraient fonctionnels sous forme de dimères lorsqu'ils sont activés par les estrogènes (Razandi *et al*, 2000).

Les récepteurs des estrogènes membranaires sont associés à une variété de molécules signalantes comme les protéines G (Razandi *et al*, 1999), la kinase Src, Ras, (Migliaccio *et al*, 1998), la sous-

unité régulatrice de la PI3-kinase (Simoncini *et al*, 2000) et Shc (Song *et al*, 2002) (figure 35).

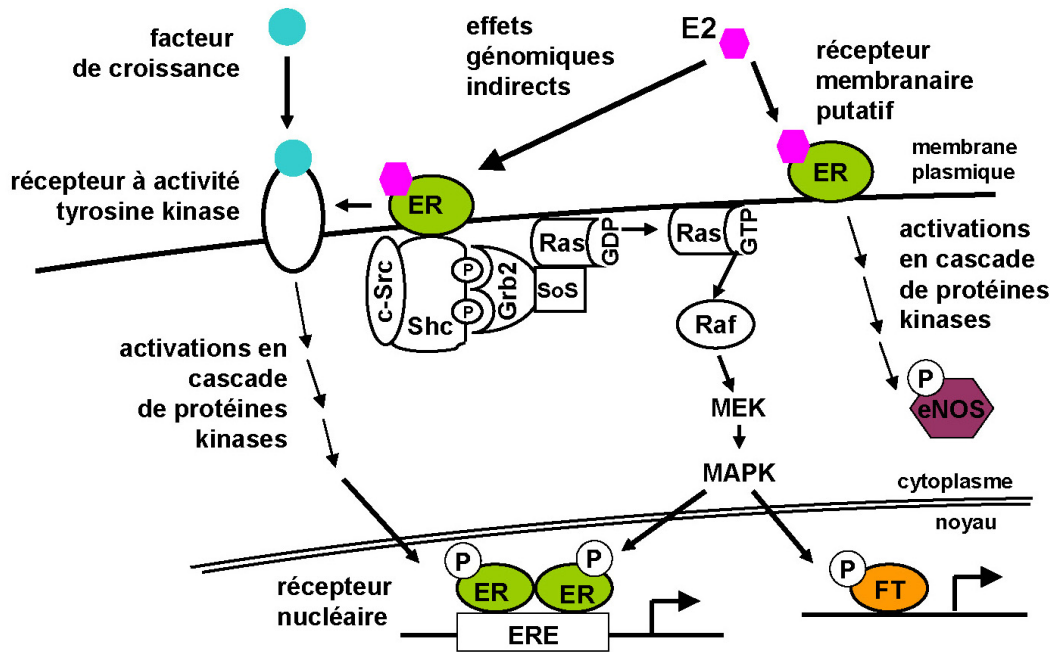


Figure 35 : Les actions génomiques indirectes et les actions non génomiques des estrogènes. Les facteurs de croissance déclenchent une cascade d'activation de protéines kinases conduisant à la phosphorylation et à l'activation des ER nucléaires. E₂ peut se lier à un récepteur associé à la membrane qui initie une cascade d'interactions protéines-protéines incluant Shc, Grb-2, et SoS. Ensuite, GDP-Ras est convertie en GTP-Ras qui active Raf, MEK et MAP kinase. Enfin, les actions non génomiques passent par l'activation d'une cascade de protéines kinases conduisant à la modification de l'activité de protéines cytoplasmiques, comme la eNOS. FT : facteur de transcription. D'après Björnström et Sjöberg, 2005 et Santen *et al*, 2002.

En plus de la modulation de l'expression génique, les estrogènes peuvent avoir des effets directs indépendamment de ces processus. Parmi ces effets, E₂ est capable d'induire la vasodilatation des artères. En effet, l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS) est stimulée par les estrogènes par un mécanisme rapide passant par la liaison de E₂ à ER α mais n'induisant pas la modulation de l'expression génique (figure 35) (Kim *et al*, 1999 ; Bucci *et al*, 2002). Cependant, le rôle relatif que jouent les mécanismes non génomiques dans l'action des estrogènes reste à déterminer.

II. La protection du cerveau par les estrogènes

Si le rôle des estrogènes dans la reproduction est connu depuis longtemps, des données s'accumulent pour mettre en évidence les effets neuroprotecteurs des estrogènes. L'incidence des attaques cérébrales naturelles est moins importante chez les femmes, avant la ménopause, que chez les hommes, au même âge. La suppression de sources d'estrogènes par ovariectomie abolit ce

bénéfice qui est restauré par un traitement estrogénique de remplacement (figure 36). Lorsqu'une ischémie survient, les animaux femelles présentent moins de dommages neuronaux (Alkayed *et al*, 1998). La perte de ces effets bénéfiques lors d'une ovariectomie, de traitements pharmacologiques (antagonistes des estrogènes, inhibiteur d'aromatase) ou du vieillissement (ménopause et perte de la production d'estrogènes) montrent l'origine estrogénique de cette protection (revue de McCullough et Hurn, 2003).

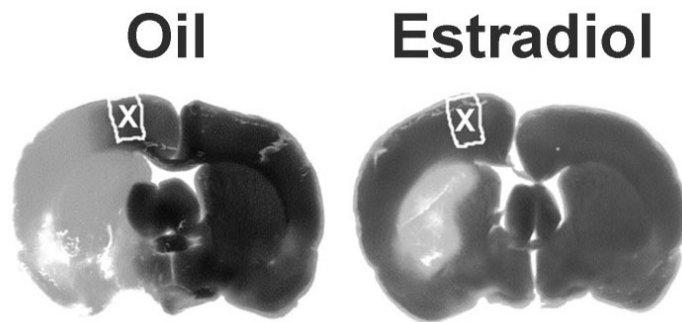


Figure 36 : Coupes de cerveaux de Rats ovariectomisés, traités ou non par E₂, et ayant subi une ischémie permanente par occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Le tissu infarcté est lumineux tandis que le tissu vivant est sombre. D'après Rau *et al*, 2003a.

1. Les effets protecteurs des estrogènes sur le système nerveux central

Les actions bénéfiques des estrogènes s'exercent à plusieurs niveaux et résultent en une protection globale du système nerveux central. Tous les types cellulaires du cerveau peuvent être la cible des estrogènes dans la prévention des dommages d'une ischémie et/ou dans la régénération du tissu cérébral (figure 37). En effet, les vaisseaux sanguins, les éléments du sang, les neurones et les cellules gliales (les astrocytes et les microglies), peuvent répondre aux estrogènes pour une protection du cerveau. Il est bien établi que E₂ exerce une partie de ses effets neuroprotecteurs indépendamment de l'activation des récepteurs des estrogènes (Behl et Manthey, 2000), et l'autre partie par l'intermédiaire des récepteurs et en interaction (cross-talk) avec la signalisation des facteurs de croissance (Garcia-Segura *et al*, 2000 ; 2006). Le récepteur membranaire des estrogènes et ER α sont régulés positivement par l'ischémie (Toran-Allerand *et al*, 2002). De plus, *in vivo*, la délétion de ER α , et non de ER β , chez des souris *knock out* abolit complètement l'action protectrice de E₂ sur le cerveau soumis à une ischémie (Dubal *et al*, 2001). Chez ces animaux, l'expression des récepteurs ER α augmente peu de temps après l'ischémie tandis que celle de ER β survient plus tardivement (Dubal *et al*, 2006). Les auteurs ont également montré que les estrogènes permettent une diminution de la mort cellulaire par apoptose de la phase secondaire qui suit une ischémie (figure 28). L'effet neuroprotecteur des estrogènes passe également par la régulation de l'expression de gènes dont très peu ont été identifiés à ce jour. Ces gènes pourraient coder des protéines régulant l'état d'oxydation de la cellule (protéines pro- et anti-oxydantes) ou liées aux processus de mort neuronale (protéines pro- et anti-apoptotiques) (Belcredito *et al*, 2000).

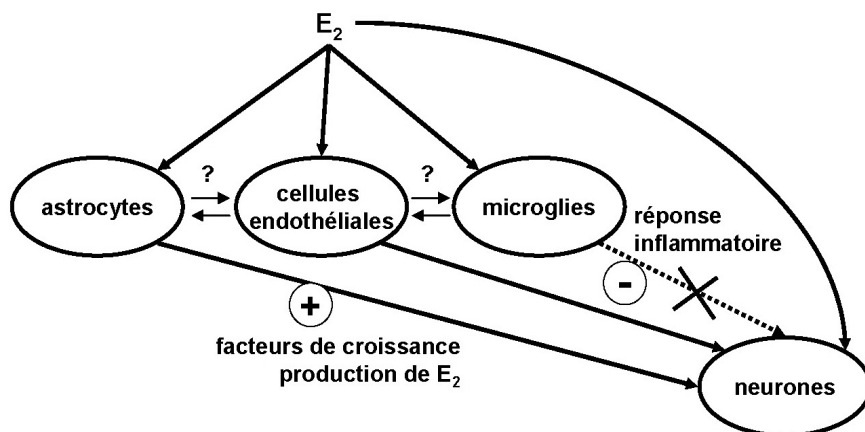


Figure 37 : Mécanisme multicellulaire de la neuroprotection induite par les estrogènes. D'après Brann *et al*, 2007.

Les **vaisseaux sanguins** peuvent être considérés comme des cibles pour les estrogènes dans la protection du cerveau. Le traitement par E₂ augmente l'expression des protéines de choc thermique (hsp25/27 et hsp70) et l'hème oxygénase-1 (HO-1) protégeant les cellules des stress oxydants, dans les artères du cerveau normal et soumis à une ischémie. E₂ induit la vasodilatation, par l'activation par phosphorylation de la eNOS, et facilite de flux sanguin dans le cerveau (Hurn et Macrae, 2000). En plus de ces effets non génomiques, E₂ augmente l'expression des messagers et de la protéine eNOS dans les microvaisseaux cérébraux (McNeill *et al*, 1999). L'angiogenèse, un processus dépendant de la prolifération et de la migration de cellules endothéliales, permet la formation de vaisseaux sanguins. Elle est essentielle à la régénération tissulaire après une ischémie (Krupinski *et al*, 1994). E₂ induit la prolifération et la migration des cellules endothéliales par un mécanisme dépendant des récepteurs (Soares *et al*, 2003). En effet, E₂ augmente l'expression du VEGF et de ses récepteurs (VEGF-R1 et -2) (Mueller *et al*, 2000).

La neuroprotection induite par les estrogènes peut être indirecte *via* les **cellules gliales**. Différentes études *in vitro* ont montré l'effet protecteur de E₂ sur des explants organotypiques de cortex ou des cocultures de neurones et d'astrocytes, et ont mis en évidence que cet effet implique les astrocytes (Wilson *et al*, 2002). Il a été montré que le TGF- β (transforming growth factor- β) dérivé des astrocytes joue un rôle dans la protection des neurones corticaux et de l'hippocampe contre la mort induite par une déplétion sérique ou le peptide amyloïde β (Dhandapani *et al*, 2005 ; Sortino *et al*, 2004). Le TGF- β possède des effets neuroprotecteurs lors d'une ischémie alors que ses antagonistes augmentent la mort neuronale et la taille de l'infarctus (Zhu *et al*, 2002 ; Dhandapani et Brann, 2003). Dhandapani et al ont montré que E₂ induit la libération de TGF- β par des astrocytes en culture (Dhandapani *et al*, 2005). Les estrogènes augmentent l'expression de la glutamine synthétase (Mong et Blutstein, 2006), essentielle à la production de glutamine qui est utilisée par les neurones pour produire le glutamate. Ils augmentent également l'expression des transporteurs du glutamate des astrocytes, GLAST (glutamate/aspartate transporter) et GLT-1

(glutamate transporter-1) qui peuvent protéger les neurones en réduisant les niveaux extracellulaires toxiques de glutamate (Pawlak *et al*, 2005). Les astrocytes pourraient participer à la production d'estrogènes dans le cerveau, étant donné qu'ils expriment l'aromatase. Après un choc ischémique et dans certains désordres neurodégénératifs, les microglies activées sécrètent des facteurs pro-inflammatoires qui contribuent à la progression des dommages neuronaux. De nombreuses études ont suggéré que les estrogènes peuvent atténuer l'action des microglies, ce qui pourrait participer à la neuroprotection induite par les estrogènes (Bruce-Keller *et al*, 2000). E₂ diminue la réponse pro-inflammatoire lors d'une ischémie cérébrale transitoire, notamment en diminuant la phosphorylation de I- κ B, et donc l'activation de NF- κ B. Les microglies sécrètent du NO qui participe à l'inflammation. E₂ diminue l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) des microglies, ce qui contribue à limiter la mort neuronale (Wen *et al*, 2004).

Enfin, les estrogènes ont un effet direct sur la survie des **cellules nerveuses**, leur différenciation et la transmission synaptique. Les cellules PC12 ont souvent servi de modèle à l'étude de la protection des cellules nerveuses par E₂. Ces cellules se différencient sous l'effet du NGF (nerve growth factor) en cellules apparentées à des neurones qui présentent des extensions nerveuses, appelées neurites. La différenciation par le NGF constitue à elle seule une protection des cellules PC12 contre la mort induite par une déplétion sérique (Gollapudi et Oblinger, 1999a). Ces cellules expriment ER β à un niveau basal faible mais n'expriment pas ER α . De nombreuses études ont montré que E₂ protège les PC12 transfectées de façon stable par un vecteur d'expression de ER α mais pas les cellules contrôles (Gollapudi et Oblinger, 1999b). De plus, le traitement des cellules à la fois par E₂ et le NGF protège les cellules de manière synergique contre la déplétion sérique. Le traitement par E₂ augmente la croissance des neurites induite par le NGF, ainsi que la proportion des cellules possédant des neurites (Gollapudi et Oblinger, 2001). Ces auteurs ont également observé que E₂ et le NGF agissent en synergie pour induire l'expression de différents messagers codant des protéines du cytosquelette, par un mécanisme dépendant de ER α . De plus, E₂ pourrait exercer ses effets neuroprotecteurs et neurotrophiques grâce à la régulation de l'expression de gènes codant des facteurs de croissance et leurs récepteurs. En effet, différentes études, *in vitro* ou *in vivo*, ont montré que E₂ augmente l'expression du NGF, du **BDNF** (brain derived neurotrophic factor) et de **NT-3** (neurotrophin-3), c'est-à-dire les facteurs neurotrophiques, et augmente l'expression de leurs récepteurs **trkA**, **trkB** et **trkC** (Sohrabji *et al*, 1994 ; Singh *et al*, 1995 ; Gibbs, 1998 ; Bora *et al*, 2005). Les estrogènes sont impliqués dans la régulation de la formation des synapses durant le développement et de la plasticité neuronale dans le cerveau adulte (Parducz *et al*, 2006). E₂ augmente l'expression de protéines associées aux microtubules, permettant l'extension neuritique en favorisant la polymérisation ou la stabilité des microtubules. Parmi ces

protéines induites par E₂, **MAP-2** et **Tau** sont deux protéines associées aux microtubules (**MAP**), qui favorisent l'assemblage de la tubuline en microtubules (Matsuno *et al*, 1997). Le GABA (acide γ -aminobutyrique) est le neurotransmetteur inhibiteur majeur du système nerveux central. Plusieurs observations ont montré un effet stimulateur des estrogènes sur le « turnover » de GABA (Demling *et al*, 1985). De plus, il a été montré que l'expression des messagers codant les sous-unités $\alpha 2$ et $\gamma 1$ du récepteur GABA_A sont surexprimés lors d'une stimulation estrogénique (Herbison et Fenelon, 1995). Des études menées dans notre laboratoire, ont permis de montrer que la protéine GEC1, apparentée à GABARAP (pour GABA_A receptor-associated protein), interagit avec la tubuline et le récepteur GABA_A et favorise la polymérisation de la tubuline et l'assemblage des microtubules (Mansuy *et al*, 2004). L'expression du gène *gec1* est sous la dépendance d'un ERE fonctionnel et stimulée par E₂ (Vernier-Magnin *et al*, 2005). L'ensemble de ces résultats montre l'implication des estrogènes dans l'amélioration de la transmission synaptique et suggère leur importance dans la régénération du tissu nerveux à la suite de dommages cérébraux d'origine ischémique ou pathologique.

2. Rôle des estrogènes dans la modulation de l'état rédox

Comme cela a été présenté dans la deuxième partie, le cerveau est très sensible aux stress oxydants. Les ROS sont impliquées dans le vieillissement cérébral et dans les maladies neurodégénératives. Les estrogènes ont des propriétés anti-oxydantes qui s'exercent par l'intermédiaire de la régulation de l'expression de certains gènes, mais également par des effets non génomiques.

Les effets non génomiques

Différents auteurs ont proposé l'idée que les estrogènes protègent les cellules des stress oxydants (Bar et Amelink, 1997 ; Behl *et al*, 1995). Certains estrogènes ont une puissante activité anti-oxydante pour les lipides, particulièrement le 2-hydroxyestrone et le 2-hydroxyestradiol, et, à des niveaux moindres, l'estrone et l'estradiol-17 β . Le stéréoisomère estradiol-17 α , pour lequel les récepteurs des estrogènes ont une très faible affinité, est un anti-oxydant aussi efficace que l'estradiol-17 β , *in vitro* (Gélinas *et al*, 2004) et *in vivo* (Green *et al*, 2001). E₂ atténue la neurotoxicité des ROS, même en présence de l'antagoniste tamoxifène ou de cycloheximide, suggérant un mécanisme indépendant des récepteurs des estrogènes et de la modulation de l'expression génique (Culmsee *et al*, 1999). L'estradiol-17 β et l'estrone possèdent la capacité intrinsèque de piéger les radicaux hydroxyles, ce qui produit un quinol non phénolique (Prokai *et al*, 2003). Le quinol est ensuite converti en estrogènes grâce au NAD(P)H comme accepteur

d'électrons. L'élimination des ROS par E₂ constitue donc une protection pour les cellules.

Les effets génomiques

Plusieurs gènes, codant des protéines impliquées dans le contrôle de l'état rédox cellulaire, sont régulés par les estrogènes. Dans les cellules endothéliales vasculaires bovines, les estrogènes augmentent l'expression des différents modulateurs de l'état rédox : la PDI, la thiorédoxine, la thiorédoxine réductase et la glutarédoxine (Ejima *et al*, 1999). L'expression de la catalase est induite d'un facteur 3,4 dans les cellules de neuroblastome surexprimant le récepteur ER α (Manthey et Behl, 2006). Différentes études ont montré que les estrogènes régulent le système enzymatique du glutathion en induisant l'expression de la glutathion peroxydase et en stimulant l'activité de la glutathion réductase (Massafra et al, 2000). Cette action des estrogènes a été confirmée pour des cellules de neuroblastome surexprimant le récepteur ER α : dans ce modèle, l'expression de la glutathion peroxydase est induite d'un facteur 2 (Manthey et Behl, 2006). L'action anti-oxydante de E₂ pourrait donc être due à la réduction des molécules oxydées par la glutathion peroxydase et au maintien du taux important de glutathion réduit grâce à la stimulation de l'activité glutathion réductase.

Ainsi, en augmentant les taux ou l'activité de protéines anti-oxydantes, E₂ peut prévenir la mort des cellules cérébrales induite par les stress oxydants lors d'épisodes d'ischémie/reperfusion ou d'hypoxie/réoxygénation.

3. Les effets des estrogènes sur le contrôle de l'apoptose

Un grand nombre de résultats suggère fortement que E₂ protège le cortex, l'hippocampe et le striatum lors d'une ischémie en diminuant la mort cellulaire programmée.

Dans les cellules neuronales en culture NT2, un traitement par E₂ augmente l'expression de Bcl-2, protégeant les cellules de la mort induite par H₂O₂ (Singer *et al*, 1998). E₂ induit l'expression des transcrits codant les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL et diminue celle de Bad dans les cellules PC12 (Gollapudi et Oblinger, 1999a ; 1999b). *In vivo*, l'augmentation du taux de messagers Bcl-2, dans les zones du cerveau environnant un infarctus cérébral, est plus importante chez les femelles ou les animaux traités par E₂ que chez les animaux ovariectomisés (Dubal *et al*, 1999). De plus, E₂ inhibe l'expression de la protéine pro-apoptotique Bad et réduit la translocation du cytochrome c, l'activation de la caspase 3 et la fragmentation de l'ADN (Rau *et al*, 2003a ; Shughrue et Merchenthaler, 2003). Le gène *nip2*, codant la protéine pro-apoptotique NIP2, est une cible de l'action anti-apoptotique des estrogènes. Dans les cellules de neuroblastome humain SK-N-BE/ER α , privées de glucose ou traitées par le peptide amyloïde β , le taux de messagers nip2

augmente. Cette augmentation ne survient pas en présence de E₂ et cet effet inhibiteur de E₂ implique les récepteurs nucléaires spécifiques (Garnier *et al*, 1997 ; Maggi *et al*, 2000 ; Maggi, 2000).

En plus de ces effets passant par la modulation de l'expression génique, les estrogènes ont des effets non génomiques sur l'inhibition de l'apoptose. En effet, E₂ active la voie des kinases ERK (extracellular signal-regulated kinases) et la voie PI3-kinase-Akt (Singh *et al*, 1999). E₂ active Akt dans le cortex et l'hippocampe lors d'une ischémie globale ou focale (Choi *et al*, 2004). Akt peut phosphoryler et inhiber Bad et la kinase GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β), ce qui peut constituer un autre mécanisme de protection par les estrogènes (Goodenough *et al*, 2005). D'autres résultats montrent l'inhibition par E₂ de la voie pro-apoptotique MLK3-MKK4/7-JNK1/2 (mixed lineage kinase-3/MAP kinase kinase 4/7/c-jun-N-terminal kinase) par un effet non génomique.

Ainsi, grâce à un ensemble complexe d'actions génomiques et non génomiques, les estrogènes assurent une protection du cerveau dans différentes conditions de stress. Les effets neuroprotecteurs passent par le maintien de l'intégrité du tissu cérébral en influençant toutes ses cellules. Ces répercussions remarquables seraient en partie responsables de la meilleure longévité des femmes par rapport aux hommes (Borras *et al*, 2007). Elles expliqueraient également l'incidence des accidents vasculaires cérébraux plus importante chez les hommes et des maladies neurodégénératives plus élevée chez les femmes ménopausées ne recevant pas de traitement hormonal substitutif. C'est pourquoi ces thèmes intéressent la recherche clinique dans le but d'améliorer les traitements préventifs et curatifs de ces pathologies dramatiques.

MATERIELS

ET METHODES

Première partie : les modèles d'étude

I. Les Cellules établies en lignées

1. Culture cellulaire

a. Les cellules PC12

Les cellules PC12 de Rat sont issues d'une tumeur appelée phéochromocytome qui touche la glande corticosurrénale.

Lorsque les cellules PC12 sont cultivées en présence du NGF, elles se différencient partiellement et acquièrent un phénotype neuronal (Gollapudi et Oblinger, 1999). En effet, des prolongements, appelés neurites, se forment progressivement à partir du corps cellulaire. Elles sont alors dites cellules apparentées à des cellules nerveuses ou « neuron-like cells » (résultats, figure 52).

Les cellules dont nous disposons sont des cellules PC12 transfectées de façon stable par un vecteur d'expression du récepteur des estrogènes ER α (cellules PC12/ER α). Les cellules contrôles ont été transfectées par le vecteur vide dans les mêmes conditions (cellules PC12 naïves). Ces cellules ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec les équipes « Mort Neuronale, Neuroprotection et Neurotransmission » de l'Université de Caen et « Interactions Cellulaires et Moléculaires » de l'Université de Rennes 1. Elles nous ont été généreusement données par les professeurs D. Duval et C. Saligaut.

b. Les cellules MCF-7/QSOX1 et MCF-7/pcDNA

Les cellules MCF-7 sont issues d'un cancer du sein humain. Elles ont été établies en lignée en 1973 et sont toujours très utilisées dans les laboratoires de recherche pour étudier les effets des hormones sur les cellules tumorales ou tester des traitements anti-cancéreux.

Au cours d'une thèse précédente, Jean-François Musard a établi une lignée de cellules MCF-7 transfectées de façon stable par un vecteur d'expression de QSOX1-S de Cobaye, appelées MCF-7/QSOX1. La construction du plasmide utilisé est présentée dans la figure 38. Les cellules contrôles ont été transfectées par le vecteur vide (MCF-7/pcDNA). Les cellules MCF-7/QSOX1 surexpriment la protéine QSOX1-S de Cobaye active dans le surnageant de culture (introduction, figure 9).

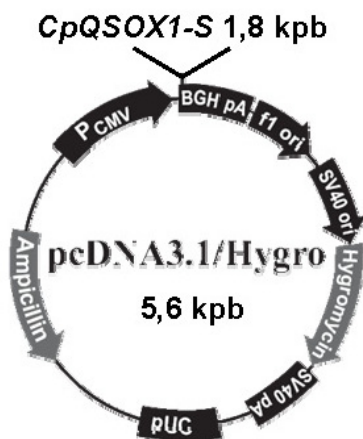


Figure 38 : Vecteur d'expression de la protéine QSOX1-S de Cobaye (CpQSOX1-S). L'ADNc *CpQSOX1-S*, de 1,8 kpb, a été inséré dans le plasmide pcDNA3.1/Hygro. Ce vecteur permet l'expression d'une protéine recombinante chez les eucaryotes. Il possède un promoteur constitutif CMV et exprime les gènes de résistance à l'ampicilline et à l'hygromycine.

c. Entretien des cellules établies en lignées

Milieux et conditions de culture

Les cellules sont cultivées en incubateur, à 37°C sous atmosphère saturée en vapeur d'eau à 5% CO₂ et 95% d'air.

Les cellules PC12 sont cultivées en milieu complet constitué de DMEM additionné de sérum de veau fœtal déstéroïdé 10% (SVF), de sérum de cheval déstéroïdé 5% (HS), de L-Glutamine 2 mM, de D-Glucose 4g/L, Hepes 15 mM (1,5 M, pH 6,9 initial), d'antibiotiques (Pénicilline 100 U/ml et Streptomycine 100 µg/ml) et d'amphotéricine B 250 µg/ml.

Les cellules MCF-7 sont cultivées en milieu complet constitué de DMEM additionné de sérum de veau fœtal 5%, L-Glutamine 2 mM, d'Hepes 15 mM (1,5 M, pH 6,9 initial), d'antibiotiques (Pénicilline 100 U/ml et Streptomycine 100 µg/ml) et d'amphotéricine B 250 µg/ml.

Passage des cellules et ensemencement

Les cellules PC12 sont sous-cultivées 2 fois par semaine et ensemencées à raison de 13 000 cellules /cm² dans des boîtes de culture de 75 cm² dans du milieu complet frais. Le milieu est éliminé et remplacé par du milieu complet frais tous les deux jours, entre deux sous-cultures.

Les cellules PC12 tolèrent mal l'incubation en présence de trypsine, c'est pourquoi elles sont décollées du fond des boîtes par un flux de milieu. Lors d'un passage, le surnageant de culture est éliminé et remplacé par 10 ml de milieu complet frais. Il est ensuite aspiré et refoulé sur la surface de culture plusieurs fois. Afin de vérifier que la totalité des cellules a été prélevée, la suspension cellulaire est collectée et du milieu frais (10 ml) est à nouveau ajouté dans la boîte de culture pour recommencer l'opération. La quantité de cellules nécessaire est ensemencée dans une nouvelle boîte et du milieu complet est ajouté en quantité suffisante pour 10 ml.

Les cellules MCF-7 sont, quant à elles, décollées à l'aide de la trypsine. Le surnageant de culture est éliminé et remplacé par 3 ml de Hank's-EDTA 0,03% qui est ensuite éliminé après 3

minutes d'incubation. Elles sont incubées dans 1ml de trypsine pendant 10 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée par 4 ml de milieu complet. Les cellules sont prélevées et centrifugées pendant 5 minutes à 600 rpm (environ 200 g). Le culot cellulaire est repris dans 10 ml de milieu complet et la quantité de cellules nécessaire est placée dans une nouvelle boîte.

Lorsqu'elles sont utilisées pour une expérience, les cellules PC12 ou MCF-7 sont ensemencées en boîtes de cultures 6 puits, 96 puits ou en boîtes rondes de 84 mm de diamètre à raison de 40 000 cellules/cm² ou 15 000 cellules/cm².

2. Traitements des cellules

Dans les expériences concernant les stress oxydants, les cellules sont traitées par le complexe Fe(III)-HQ ou le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour induire un stress oxydant ou incubées en présence de staurosporine aglycone comme contrôle de l'induction de l'apoptose.

a. Traitement par le complexe Fe(III)-HQ

La préparation du complexe Fe(III)-HQ s'effectue de la manière suivante :

La solution mère de 8-hydroxyquinoline (HQ) est préparée à 400 mM dans l'éthanol absolu. La solution est agitée au vortex pendant quelques instants car la solubilisation peut être longue. Le fer, sous forme de FeCl₃ est dilué dans l'eau à 20 mM. Les solutions mères se conservent deux semaines à 4°C en flacons hermétiques mais les solutions doivent être vérifiées avant utilisation. La solution de fer est de couleur jaune citron et ne doit pas devenir de couleur rouille. La solution de HQ ne doit pas être cristallisée afin d'éviter les erreurs de concentration. De plus, HQ est sensible à la lumière, il est donc nécessaire de la manipuler dans un flacon fumé.

Extemporément, la solution mère de HQ est diluée cent fois dans l'eau ultrapure stérile (pour atteindre la concentration 4 mM), tandis que la solution mère de fer est diluée dix fois dans l'eau ultrapure stérile (pour atteindre la concentration 2 mM). Le complexe Fe(III)-HQ est obtenu en mélangeant un même volume de HQ 4 mM et de FeCl₃ 2 mM (figure 39). Le mélange des deux composés entraîne instantanément une coloration noirâtre de la solution. Le composé principal présent dans la préparation est un complexe formé par un atome de fer lié à deux HQ (Demougeot *et al*, 2000). Le complexe est dilué dans du milieu complet à la concentration finale désirée. Dans toutes les expériences, les concentrations indiquées correspondent à la concentration en fer, sachant que la concentration en HQ est deux fois plus importante. Les cellules contrôles sont traitées avec la même concentration en HQ que dans le traitement par Fe(III)-HQ.

Les cellules sontensemencées et cultivées en milieu complet pendant 24 heures. Les cellules sont traitées, au temps 0h, en ajoutant directement au surnageant de culture, la solution de traitement préparée de façon à obtenir la concentration finale désirée. Cela permet d'éviter de changer le milieu, ce qui est problématique pour les cellules PC12 qui se décollent facilement de la surface de culture lors des changements de milieu.

Les cellules restent en présence du complexe Fe(III)-HQ pendant 40 minutes. Il est ensuite éliminé et remplacé par une solution saline de Hank's (sans EDTA). La solution de lavage est à son tour éliminée et les cellules sont placées dans du milieu complet. Lorsque l'expérience dure plus de 72 heures, le milieu est remplacé par du milieu complet frais, au temps 72h.

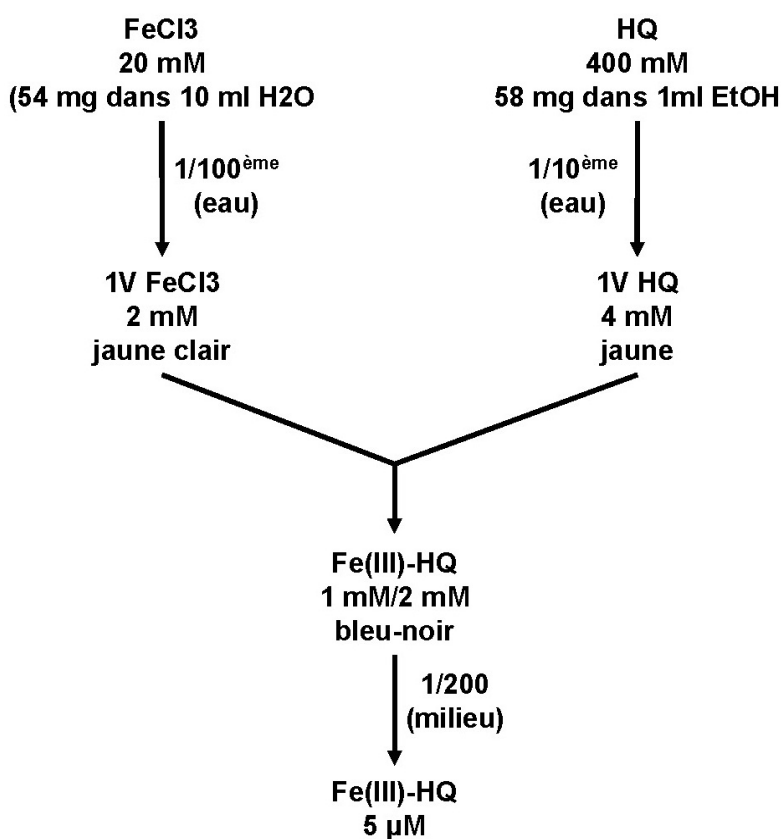


Figure 39 : Préparation du complexe Fe(III)-HQ.

b. Traitement par H₂O₂

Le traitement des cellules par H₂O₂ s'effectue de la manière suivante : la solution de H₂O₂ 30% (Sigma) est diluée au 1/1000^{ème} dans du milieu complet pour obtenir une solution de concentration 8,82 mM. Cette solution est diluée pour obtenir les solutions de travail qui sont ajoutées aux cellules de la même manière que pour le complexe Fe(III)-HQ. Les cellules sont laissées dans cette solution durant le temps indiqué pour chaque expérience. Ce milieu est remplacé par du milieu complet au temps 72h lorsque l'expérience dure plus longtemps. Les cellules contrôles sont traitées par un même volume de milieu complet.

c. Traitement par la staurosporine aglycone

La staurosporine aglycone est un analogue de la staurosporine qui est connu pour induire une mort des cellules par apoptose.

La solution stock de staurosporine aglycone est préparée à 10 mM dans du DMSO. La solution stock est diluée dans du milieu complet à la concentration finale désirée. Le milieu de culture est éliminé afin de pouvoir ajouter aux cellules un volume minimal de milieu de culture additionné de staurosporine aglycone. Les cellules sont laissées en présence de staurosporine aglycone pendant le temps indiqué dans les expériences. Les cellules contrôles reçoivent un même volume de milieu complet additionné de DMSO 0,2%.

d. Autres traitements

Le mannitol (Sigma) est ajouté au milieu de culture 45 minutes avant les traitements oxydants à la concentration finale de 100 mM.

Les solutions stocks de E_2 (10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M) sont préparées en solubilisant E_2 dans l'éthanol absolu et sont conservées dans des flacons hermétiques, à -20°C . Le traitement par E_2 s'effectue en ajoutant la solution stock de E_2 au milieu de culture, afin d'obtenir la concentration finale désirée. La solution stock doit être diluée au moins 10 000 fois afin de limiter la quantité d'éthanol en contact avec les cellules. Les cellules contrôles sont traitées avec la même quantité d'éthanol.

Le NGF est repris dans du milieu de base à la concentration de 500 $\mu\text{g/ml}$ et conservé à -80°C . Le traitement s'effectue en ajoutant un volume adéquat de la solution stock de NGF au milieu de culture pour atteindre une concentration finale de 50 ng/ml . Selon les expériences, la différenciation des PC12 est réalisée en milieu de déplétion sérique ou en milieu complet.

3. Etude de la viabilité cellulaire

a. Estimation de la viabilité cellulaire par exclusion du bleu trypan

Le bleu trypan est un composé toxique qui pénètre dans les cellules. Les cellules vivantes sont capables d'expulser le bleu trypan dans le milieu extracellulaire grâce aux transporteurs ABC (pour ATP binding cassette). Ces protéines membranaires utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme

source d'énergie pour expulser les molécules cytotoxiques hors de la cellule. Les cellules mortes, ne produisant plus d'ATP, sont incapables d'expulser le bleu trypan et apparaissent donc de couleur bleue.

Les cellules sontensemencées en plaques 6 puits. Trois puits sont consacrés à un même traitement. Elles sont ensuite décollées à l'aide d'un grattoir et trois prélèvements de 100 µl de suspension par puits sont effectués, soit neuf prélèvements par traitement. Les cellules sont placées en présence de bleu trypan à 0,02% final. Les cellules vivantes excluant le bleu trypan sont comptées sur une cellule de Malassez.

b. Estimation du nombre de cellules vivantes par la technique « MTT »

Le principe du test MTT est basé sur la réduction du Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) par les déshydrogénases mitochondriales dépendantes du NADH ou du NADPH (figure 40). Tandis que le MTT est de couleur jaune, le formazan, produit de la réaction, est de couleur violette. Les cellules mortes ne produisent pas de cristaux de formazan. L'intensité de la coloration violette est donc fonction de la proportion de cellules vivantes.

Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits. Elles sont traitées par les différents composés comme précédemment décrit et laissées le temps indiqué. Le milieu est alors éliminé et les cellules sont placées en présence de MTT (TLC, Sigma) à 100 mM dans la solution saline de Hank's, à raison de 100 µl par puits. Après deux heures d'incubation à 37°C les plaques sont centrifugées pendant 5 minutes à 300 g. Le MTT est éliminé en retournant vivement la plaque et par pression d'un papier absorbant sur les puits afin d'éliminer les traces de MTT. Du DMSO est ajouté à raison de 50 µl par puits. La quantité de cellules vivantes est estimée par la mesure de l'absorbance à 570 nm (ou à 490 nm) en utilisant un spectrophotomètre lecteur de microplaques (Bio-Tek instruments).

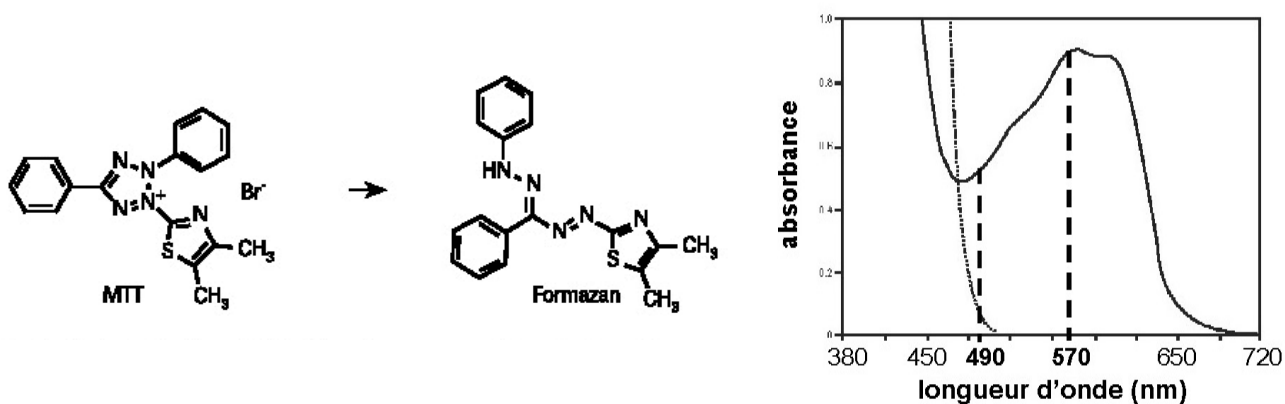


Figure 40 : Métabolisation du MTT en formazan par les cellules vivantes (à gauche) et comparaison des spectres d'absorbance (à droite) du MTT (en pointillés) et du formazan (en continu) après solubilisation.

4. Cycle cellulaire et cytométrie en flux

a. Etude de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire par cytométrie en flux

Sans élimination préalable du surnageant de culture, les cellules sont prélevées à l'aide d'un grattoir. Elles sont centrifugées 5 minutes à 300 g à 4°C. Le culot est lavé dans 5 ml de PBS 1X froid et centrifugé à nouveau. Le culot est repris dans 300 µl de PBS 1X froid auxquels sont ajoutés 700 µl d'éthanol absolu froid, goutte à goutte en agitant délicatement. L'éthanol a pour effet de fixer les noyaux mais de détruire partiellement les membranes plasmiques. Cette technique de fixation est donc pratique pour l'étude du cycle cellulaire mais n'est pas utilisable pour l'étude de l'expression d'une protéine cytoplasmique. Les échantillons peuvent être conservés deux semaines à 4°C dans l'éthanol.

Le jour de l'analyse, les suspensions sont centrifugées et lavées deux fois dans 1 ml de PBS. Le culot est repris dans 200 µl d'une solution préparée extemporanément en ajoutant 5 µl d'IP (iodure de propidium) (1 mg/ml) et 50 µl de RNase A (1 mg/ml) à 150 µl de PBS par échantillon.

Les échantillons sont analysés par cytométrie en flux (Beckman-Coulter). La quantification est réalisée à l'aide du logiciel Wincycle (Beckman-Coulter) (figures 41 et 42).

b. Etude de l'expression de la protéine QSOX1 par cytométrie en flux

Les cellules sont prélevées à l'aide d'un grattoir sans élimination du surnageant de culture. Elles sont centrifugées 5 minutes à 300 g. Le culot est lavé dans 5 ml de PBS 1X et centrifugé à nouveau. Le surnageant est éliminé et les cellules sont fixées par 1 ml de paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 minutes à température ambiante. Après une centrifugation, les sites de fixation du PFA libres sont saturés par 5 ml d'une solution de PBS-régilait 5% (w/v, préparé légèrement à l'avance et chauffé quelques minutes à 37°C). La suspension est centrifugée et le culot est lavé deux fois dans 5 ml de PBS. Le culot est repris dans 200 µl de saponine (0,5% w/v dans PBS) pendant 2 minutes. La suspension est diluée en ajoutant 5 ml de PBS. Après centrifugation, le culot peut être repris dans 5 ml de PBS et conservé à 4°C jusqu'au jour du marquage et de l'analyse. Chaque échantillon est alors divisé en deux et centrifugé. Le culot d'un échantillon est repris dans 100 µl de solution d'anticorps primaire (au 1/100^{ème}) tandis que le second culot est repris dans 100 µl de PBS et sert de témoin négatif (appelé isotype). L'anticorps primaire est un anticorps polyclonal de lapin produit à partir de la protéine QSOX1 de Rat. Il nous a été généreusement donné par le Professeur F. Esnard de l'équipe « Protéases et vectorisation pulmonaires » de l'Université François Rabelais de Tours. Les suspensions sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante puis

centrifugées et lavées deux fois dans 5 ml de PBS. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 minutes en présence d'anticorps secondaires anti-immunoglobuline G de lapin et conjugués à un analogue du FITC (pour isothiocyanate de fluoresceine) (FluoProbes[®] 488, Interchim). Les échantillons sont finalement lavés dans 5 ml de PBS puis dans 5 ml de PBS additionné de NaCl 300 mM. Le surnageant est éliminé par renversement mais les culots sont conservés dans un minimum de PBS, sachant que le volume est ajusté lors du passage au cytomètre (figure 43).

Pour étudier l'expression de QSOX1 au cours du cycle cellulaire, les culots sont repris dans 200 µl d'une solution préparée extemporanément en ajoutant 5 µl d'IP (1 mg/ml) et 50 µl de RNase A (1 mg/ml) à 150 µl de PBS par échantillon. Les échantillons sont analysés par cytométrie en flux (figure 44).

c. Analyse

L'analyse des données par cytométrie en flux permettant l'étude du cycle cellulaire et de l'expression de la protéine QSOX1 est présentée dans les figures 41 à 44. Lorsque le cycle cellulaire est analysé, il est nécessaire de ne pas prendre en compte les doublets de cellules. En effet, si deux cellules passent simultanément dans la chambre de mesure du cytomètre, celui-ci détecte un seul événement, dont la fluorescence correspond à la somme des fluorescences de chacune des cellules. Par exemple, si deux cellules en phase G₁ passent simultanément dans la chambre de mesure, le cytomètre détecte un événement possédant une fluorescence équivalente à celle d'une cellule en phase G₂ (figure 41). De plus, les événements contenus dans le pic sub-G₁ sont des débris cellulaires, comme des cellules en fin d'apoptose ou des cellules en nécrose. Elles ne sont pas prises en compte dans l'analyse du cycle cellulaire pour ne pas fausser la proportion de cellules en cycle. C'est pourquoi il est question de « nombre d'événement » et non pas de « nombre de cellules ». Lorsqu'une cellule est marquée par l'IP, la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN et permet de déterminer la phase du cycle dans laquelle elle se trouve (figures 41 et 42). De la même manière, lorsqu'une cellule est marquée par un anticorps dirigé contre une protéine, la fluorescence est proportionnelle à la quantité de marquage (figures 43 et 44).

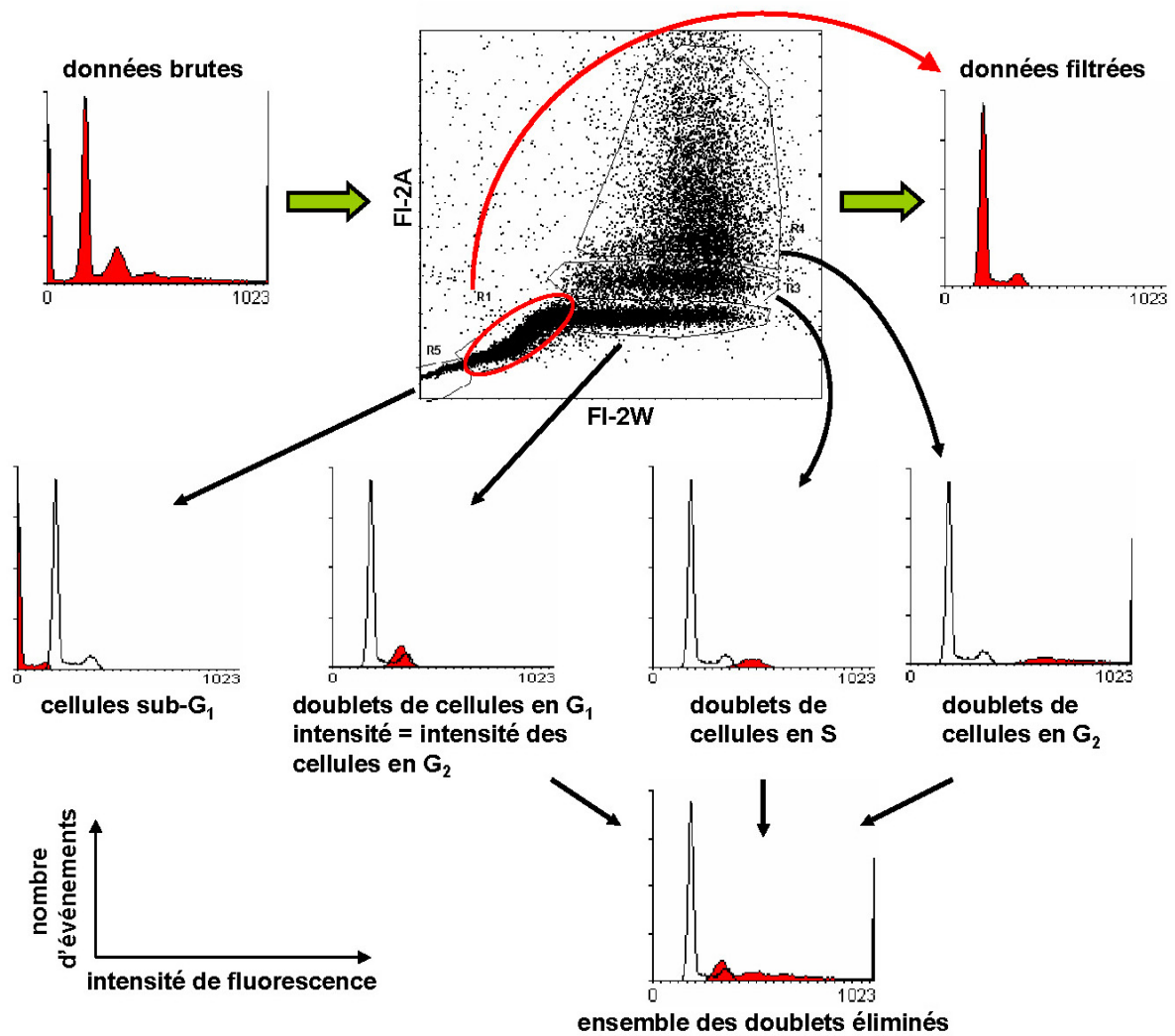


Figure 41 : Méthode permettant d'éliminer les doublets de cellules et les cellules sub-G₁ pour l'étude du cycle cellulaire. A partir du graphique FI-2A en fonction de FI-2W, les événements sub-G₁ et les doublets sont éliminés. Seuls les événements correspondant aux cellules au cours en cycle cellulaire sont conservés.

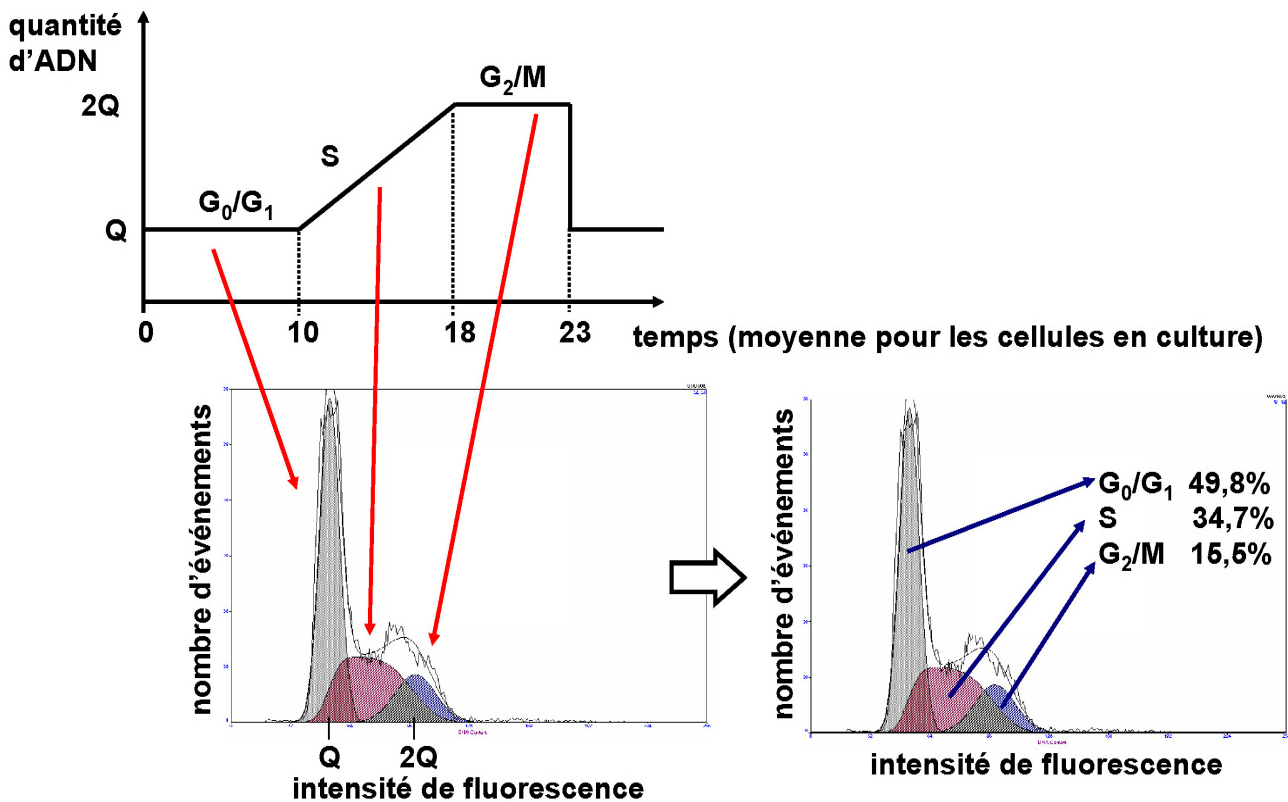


Figure 42 : Quantification des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Par cette technique, les cellules quiescentes (G_0) ne sont pas distinguables des cellules en phase G_1 étant donné qu'elles possèdent la même quantité d'ADN. La fluorescence de l'IP (mesurée par le photomultiplicateur FI-2, avec une échelle linéaire) est proportionnelle à la quantité d'ADN dans les cellules. Les cellules en phases G_0/G_1 possèdent une quantité d'ADN Q ce qui correspond à une certaine fluorescence. Ces cellules sont regroupées sous un même pic (en gris). Les cellules en phases G_2/M possèdent une quantité d'ADN deux fois supérieure après la répllication. Ces cellules sont regroupées sous un même pic de fluorescence (en bleu). Les cellules en phase S sont en cours de répllication et possèdent des quantités d'ADN différentes selon les cellules allant de Q à $2Q$ en fonction de l'avancée de la répllication. Elles sont regroupées sous un pic de fluorescence plus étalé (en rouge). Pour les études concernant le cycle cellulaire, les cellules du pic sub- G_1 et les doublets de cellules sont ignorés. Le logiciel calcule le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle en calculant l'aire de chaque pic.

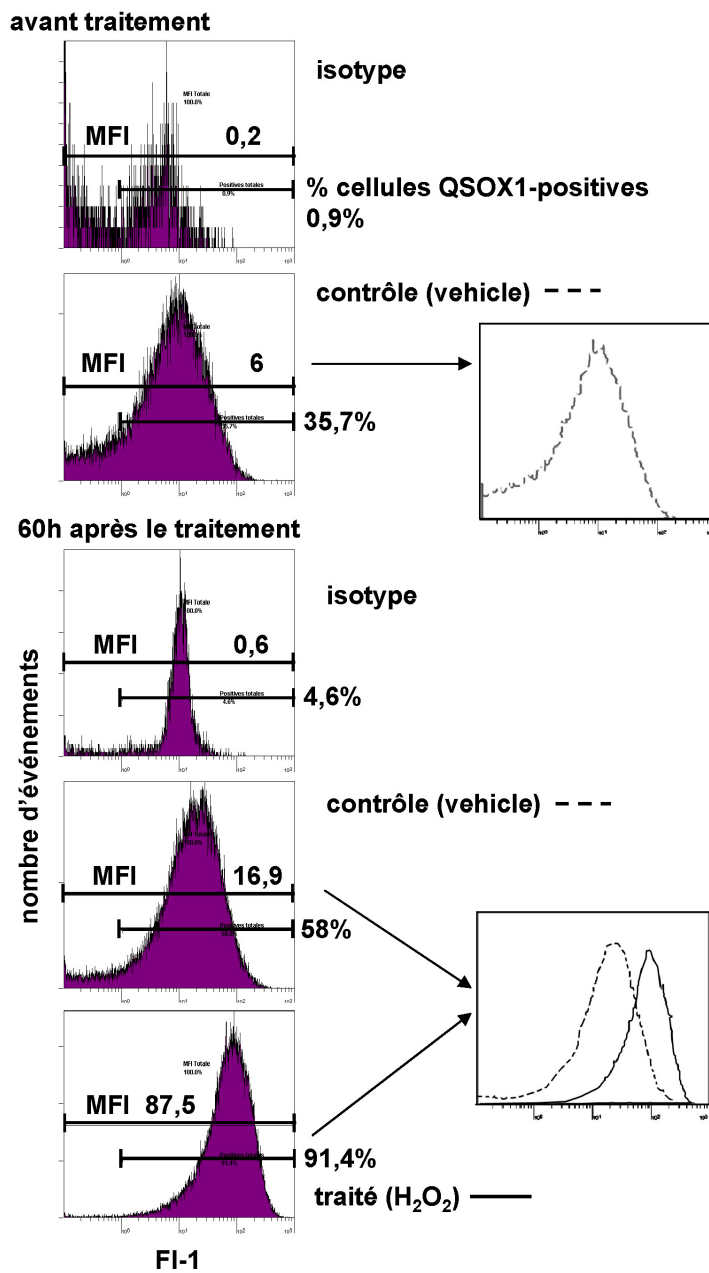


Figure 43 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la protéine QSOX1. L'intensité de fluorescence FI-1 est proportionnelle à l'intensité de marquage des anticorps dirigés contre QSOX1 dans chaque cellule. Le bruit de fond est tout d'abord fixé en analysant l'échantillon avant traitement et incubé en présence de l'anticorps secondaire seul. Les cellules sont considérées positives lorsque leur fluorescence est supérieure au bruit de fond. L'intensité de fluorescence moyenne (MFI) est déterminée sur l'ensemble des cellules.

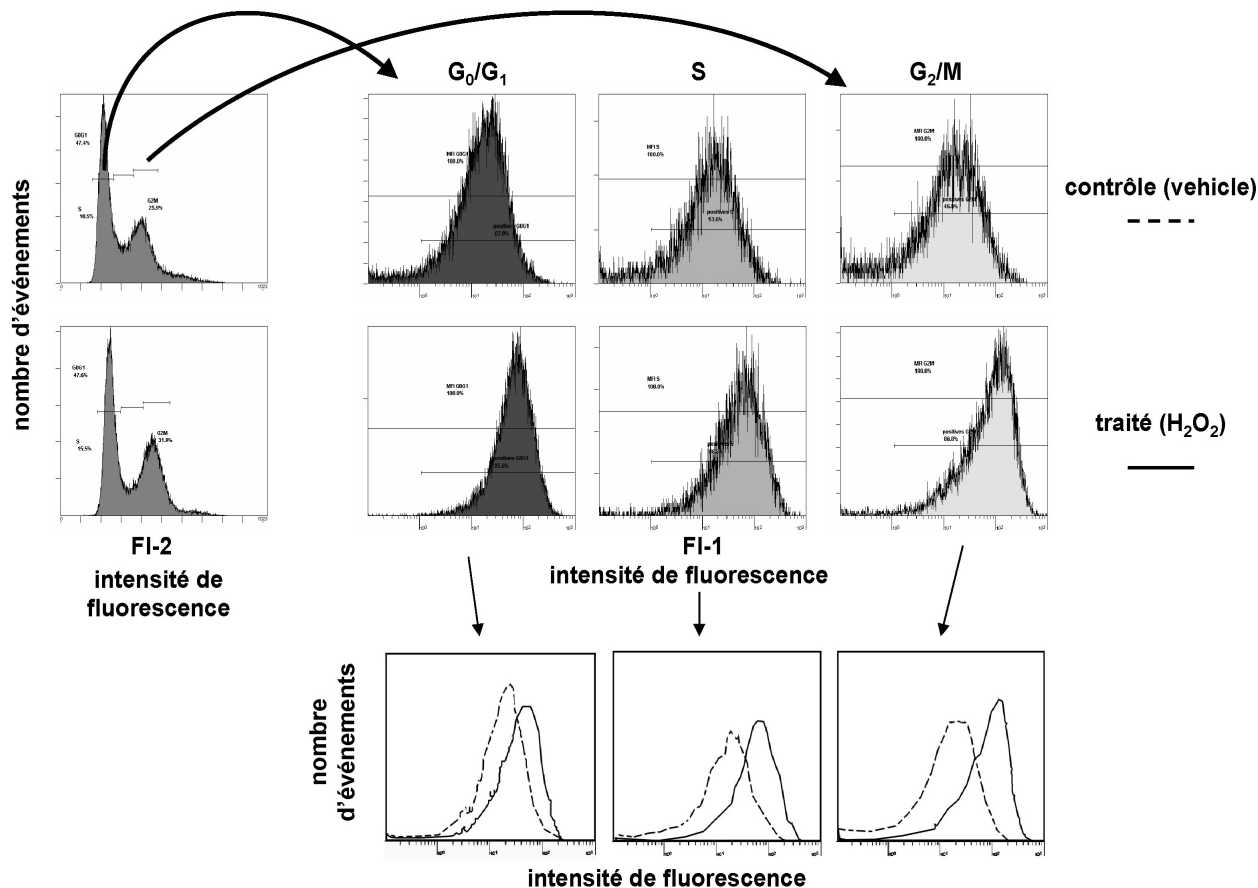


Figure 44 : Détermination de l'expression de la protéine QSOX1 dans les cellules au cours des phases du cycle cellulaire. La fluorescence de l'IP est détectée par le photomultiplicateur FI-2 tandis que la fluorescence due au marquage QSOX1 (anticorps secondaire conjugué à la fluoresceine est mesurée par le photomultiplicateur FI-1. Après avoir repéré les phases du cycle cellulaire, la fluorescence due au marquage QSOX1 est déterminée pour les cellules de chaque phase.

5. Etude des caractéristiques de l'apoptose

a. La morphologie des noyaux

Le Hoechst 33 342 est un composé qui s'intercale entre les acides nucléiques et devient fluorescent. Il permet d'observer les changements de morphologie des noyaux au cours de l'apoptose. Tandis que la chromatine des cellules saines est répartie dans tout le noyau et se présente sous la forme d'hétérochromatine et d'euchromatine, celle des cellules apoptotiques est condensée et intensément lumineuse et colorée. Le noyau des cellules apoptotiques est fragmenté (voir introduction).

Pour analyser les changements morphologiques du noyau après les traitements, les cellules sont cultivées sur des lamelles de microscopie, stérilisées par de l'alcool flambé, et placées dans le fond du puits de culture. Elles sont traitées par le complexe Fe(III)-HQ, par H₂O₂ ou par la staurosporine

aglycone (comme décrit précédemment). 24h après le début du traitement, le milieu est éliminé et remplacé par une solution de Hoechst 33 342 (0,02 mg/ml) pendant 10 minutes. Les lamelles sont alors retournées sur une lame de verre et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence sous un filtre UV.

b. La fragmentation de l'ADN génomique

La fragmentation de l'ADN génomique qui survient lors de la mort par apoptose est analysée par électrophorèse (figure 27). L'extraction de l'ADN génomique est réalisée en suivant le protocole publié par Kanno *et al* (2004).

Les cellules sontensemencées et traitées comme décrit précédemment. Au temps indiqué, les cellules (au moins 4 millions) sont décollées à l'aide d'un grattoir, prélevées et centrifugées 5 minutes à 300 g. Le culot est lavé dans 5 ml de PBS 1X et centrifugé à nouveau. Le culot peut être gardé à -80°C jusqu'au jour de l'extraction.

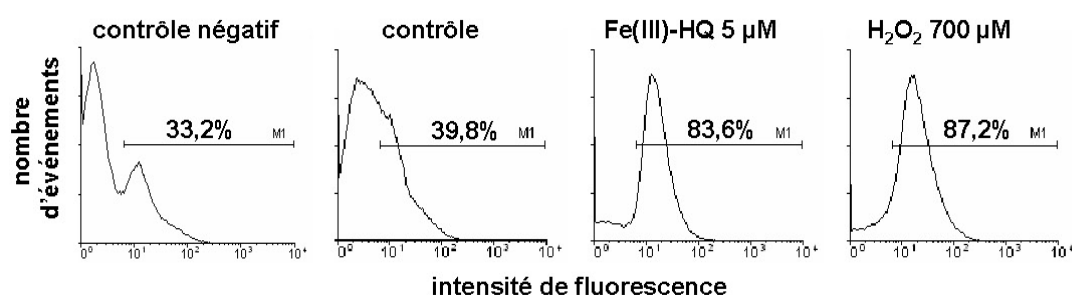
Les cellules sont lysées dans 100 µl de tampon contenant Nonidet P40 1% (Fluka), SDS 1%, EDTA 20 mM pH 8 et Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Le lysat est incubé 3 heures en présence de protéinase K (concentration finale 100 µg/ml) à 56°C puis la nuit en présence de RNase A (concentration finale 10 µg/ml) à 37°C. L'ADN est extrait en ajoutant un volume égal au lysat (environ 200 µl) de phénol alcalin (saturé en Tris-HCl pH 8,8)-chloroforme- alcool isoamylique (25:24:1, Biolsolv). Après une agitation vigoureuse de 10 secondes, une solution laiteuse et homogène est obtenue. Les tubes sont incubés 20 minutes dans la glace puis centrifugés 15 minutes à 10 000 g à 4°C. Deux phases apparaissent alors, la phase supérieure étant la phase aqueuse contenant l'ADN. Elle est prélevée délicatement en évitant de prélever la phase inférieure. Un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique, équivalent au volume prélevé (environ 250 µl), est à nouveau ajouté, puis le mélange est vortexé, incubé dans la glace et centrifugé. La phase supérieure est prélevée très délicatement sans prélever la phase organique. Deux volumes d'éthanol absolu (environ 400 µl), équivalent au volume prélevé, sont ajoutés. Les échantillons sont incubés 20 minutes à -20°C et centrifugés 15 minutes à 10 000 g et à 4°C. Le surnageant est éliminé très délicatement. Le culot est repris dans 30 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) et incubé au moins 1 heure à 50°C. La solution d'ADN est alors dosée à 260 nm. Les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose à 1,4% dans du TAE 0,5X. L'électrophorèse est réalisée sous 50 V et dure jusqu'à ce que le front de migration arrive à un centimètre du bas du gel. Le gel est incubé 20 minutes dans un bain de BET puis 20 minutes dans un bain d'eau. Le gel est observé sous lumière UV.

c. Détection de l'apoptose par la technique TUNEL

La technique TUNEL (pour terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling) est basée sur le marquage des extrémités des fragments d'ADN produits au cours de l'apoptose. La transférase terminale catalyse la polymérisation de nucléotides conjugués à la fluorescéine sur les extrémités 3'OH libres d'ADN.

Les cellules MCF-7 sont traitées par le complexe Fe(III)-HQ 5 μ M ou par H₂O₂ 700 μ M. Elles sont collectées 24 heures après le début des traitements à l'aide d'un grattoir et centrifugées 5 minutes à 300 g. Le culot est lavé par 5 ml de PBS 1X et centrifugé à nouveau. Les cellules sont fixées dans 1 ml de PFA 2% pendant 30 minutes puis centrifugées. Le culot est lavé dans 5 ml de PBS 1X et centrifugé. Les cellules sont perméabilisées par une solution de triton X-100 0,1% dans du citrate de sodium 0,1% pendant 2 minutes dans la glace. Un autre lavage est réalisé par 5 ml de PBS suivi d'une centrifugation.

La solution de marquage du kit (*In situ* cell death detection kit, fluorescein, Roche) est préparée en mélangeant, pour un échantillon, 5 μ l de solution de transférase terminale à 45 μ l de solution de marquage, contenant les nucléotides conjugués à la fluorescéine. Les cellules sont réparties en deux lots équivalents. Une partie des cellules est incubée, 60 minutes à 37°C dans le noir, en présence de 50 μ l du mélange enzyme + solution de marquage. Les cellules contrôles sont incubées en présence de 50 μ l de solution de marquage en absence d'enzyme. Après deux lavages au PBS, comme précédemment, les échantillons sont analysés en cytométrie en flux. L'émission TUNEL est observée avec le photomultiplicateur FI-1. Le pourcentage des cellules hautement marquées en TUNEL est déterminé suivant l'analyse des données présentée dans la figure 45.



$$\% \text{ cellules TUNEL-positives} = \% \text{ cellules contrôles ou traitées} - \% \text{ cellules contrôle négatif}$$

Figure 45 : Détermination du pourcentage de cellules TUNEL-positives. L'intensité de fluorescence est fonction de la proportion d'ADN fragmenté. Un traitement pro-apoptotique entraîne donc un décalage de la fluorescence vers les grandes intensités (vers la droite). Le contrôle négatif est tout d'abord défini en analysant l'échantillon incubé en présence de solution de marquage sans enzyme. Les cellules sont considérées positives lorsque leur fluorescence est supérieure à celle du contrôle négatif, la formule indiquée est donc appliquée aux échantillons contrôles (vehicle) ou traités par le complexe Fe(III)-HQ ou par H₂O₂.

d. La dépolarisation des membranes mitochondriales

Les changements de polarisation de la membrane mitochondriale sont évalués en utilisant le DiOC₆(3) (dihexyloxycarbocyanine iodide), un colorant cationique lipophile qui s'accumule dans les mitochondries polarisées.

Le DiOC₆(3) est solubilisé dans du DMSO pour réaliser une solution stock à 40 mM qui est diluée extemporanément dans du milieu complet.

Afin de servir de contrôle positif de la dépolarisation des mitochondries, des cellules contrôles sont traitées par du CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine). La solution de CCCP est préparée à 20 mM dans l'éthanol absolu et conservée à -20°C. La solution stock est diluée extemporanément dans du PBS.

Les cellules sont collectées comme précédemment et lavées dans 5 ml de PBS. Un lot de cellules contrôle est séparé et traité pendant 15 minutes par le CCCP 200 µM. Les cellules sont ensuite incubées en présence de DiOC₆(3) pendant 30 minutes à 37°C dans le noir. Les échantillons sont centrifugés et les culots sont lavés dans 5 ml de PBS avant d'être à nouveau centrifugés et analysés en cytométrie en flux (figure 46). Le pourcentage de cellules hautement marquées par le DiOC₆(3) est déterminé.

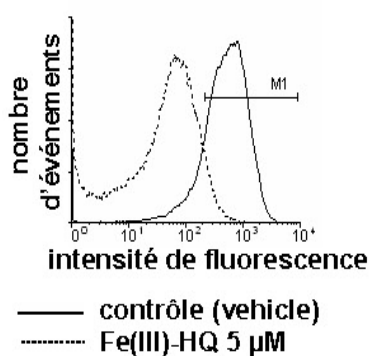


Figure 46 : Détermination du pourcentage de cellules hautement marquées par le DiOC₆(3). L'intensité de fluorescence est fonction de la proportion de mitochondries dont la membrane est polarisée. La dépolarisation des membranes mitochondriales entraîne un décalage de la fluorescence vers les petites intensités (vers la gauche). Dans l'exemple présenté, les cellules contrôles hautement marquées par le DiOC₆(3) représente 83,3%. Les cellules traitées par le complexe Fe(III)-HQ possèdent une grande majorité de mitochondries dépolarisées, les cellules hautement marquées par le DiOC₆(3) ne représentent que 3% des cellules totales.

II. Le modèle de Rates ovariectomisées

1. Elevage des rates

Nous disposons de rates de la souche Sprague-Dawley, commercialisées par Charles Rivers (Saint-Aubin, France). Ce sont des femelles âgées de 2 mois (200 à 250 g), maintenues au laboratoire dans des conditions contrôlées : température constante : 21°C, lumière : 12 heures nuit/ 12 heures jour, accès à une alimentation standard et à l'eau *ad libitum*.

2. Ovariectomie des rates et traitement par E₂

Pour éliminer la principale source d'estrogènes endogènes, les femelles, âgées de 8 à 10 semaines, sont ovariectomisées. Elles sont anesthésiées par une injection intramusculaire de ketamine/xylazine (3 ml/kg). L'ovariectomie bilatérale est pratiquée à l'aide d'ustensiles stériles. Les animaux sont rasés pour dégager le champ opératoire et la peau est recouverte de bétadine. Une incision est réalisée dans la peau et les muscles de l'abdomen sous les dernières côtes. Une ligature des oviductes est pratiquée avant la séparation des ovaires. Un point de suture est réalisé au niveau des muscles et un second dans la peau. Les animaux sont laissés au repos pendant une semaine. Les Rates sont séparées en deux lots, le premier lot (nommé OVX + E₂) recevant une injection, à la base du cou, d'estradiol benzoate (30 µg/animal) dissout dans de l'huile de sésame, le second lot (OVX + vehicle) recevant le même volume d'huile de sésame.

3. Sacrifice et dissection du cerveau

Après 24 ou 48 heures, les animaux sont tués par décapitation et les cerveaux sont disséqués. La boîte crânienne est dégagée et le cerveau est prélevé. Les différentes aires disséquées sont rapidement placées dans un cryotube placé dans la glace. Les deux hémisphères cérébraux sont séparés et un est conservé entier. Le second est séparé en sept grandes aires : le bulbe olfactif, le cervelet, le cortex, l'hippocampe, les noyaux de la base, le diencephale et le tronc. Les échantillons sont rapidement plongés dans l'azote liquide et placés à -80°C jusqu'au jour de l'extraction d'ARN.

Deuxième partie : Etude de l'expression des ARN messagers

1. Extraction des ARN totaux

a. A partir de cellules en culture

Les ARN totaux sont extraits en utilisant la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987). Aux temps indiqués, les cellules sont collectées à l'aide d'un grattoir en gardant le surnageant de culture. Elles sont centrifugées à 300 g pendant 10 minutes et lavées avec du PBS. Le culot est conservé à -80°C avant l'extraction d'ARN. Les cellules sont lysées en ajoutant 1ml de tampon de lyse (thiocyanate de guanidium 4,2 M (Fluka), citrate de sodium 25 mM pH 7, sarcosyl 0,5% et β -mercaptoéthanol 100 mM). Les ARN sont extraits en ajoutant 40 μ l d'acétate de sodium 2 M pH 4, 800 μ l de phénol saturé en eau (pH acide, Biosolv) et 80 μ l de chloroforme-alcool isoamylique (24 :1). La solution est incubée dans la glace pendant 20 minutes puis centrifugée 15 minutes à 10 000 g à 4°C. La phase aqueuse est prélevée et les ARN sont précipités avec un volume égal d'isopropanol froid, incubés à -20°C pendant 50 minutes et centrifugés. Cette opération est répétée deux fois. Le culot est lavé deux fois en ajoutant 100 μ l d'eau ultrapure stérile, 200 μ l d'éthanol absolu et 10 μ l d'acétate de sodium 3 M pH 5,2, en incubant à -20°C pendant 20 minutes et centrifugeant à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les culots sont enfin repris dans 100 μ l d'eau avant d'être dosés par la mesure de l'absorbance à 260 nm.

b. A partir de cerveau de Rat

Chacune des aires du cerveau est broyée dans 1 ml de Trizol (Invitrogen) pour 100 mg de tissu. Le broyat est incubé pendant 5 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé pendant 10 minutes à 12 000 g à 4°C. Le surnageant est prélevé et additionné de 0,2 ml de chloroforme pour 1 ml de Trizol initial. L'échantillon est agité vigoureusement à la main pendant 10 secondes et incubé pendant deux à trois minutes à température ambiante avant d'être centrifugé pendant 15 minutes à 12 000 g à 4°C. La phase aqueuse, d'environ 400 à 600 μ l (pour 1 ml de Trizol initial) est prélevée à laquelle est ajouté un volume équivalent d'isopropanol. L'échantillon est mélangé au vortex pendant 10 secondes à température ambiante et centrifugé pendant 10 minutes à 12 000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé. Le culot est lavé deux fois en ajoutant 100 μ l d'eau ultrapure stérile, 200 μ l d'éthanol absolu et 10 μ l d'acétate de sodium 3 M pH5,2, en incubant à -20°C pendant 20 minutes et en centrifugeant à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les culots sont enfin repris dans 100 μ l d'eau avant d'être dosés.

2. Préparation des échantillons

La concentration en ARN totaux est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260, sachant qu'une unité d'absorbance correspond à une concentration de 40 µg d'ARN par ml. Les échantillons sont aliquotés de deux manières : 5 µg d'ARN sont précipités en présence de 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,5 et de 2 volumes d'éthanol absolu, 1 ou 2 µg sont utilisés pour la transcription réverse.

La qualité des ARN est contrôlée en réalisant une électrophorèse en gel d'agarose à 1,4% (TAE 0,5X) des échantillons de 5 µg d'ARN totaux.

3. RT-PCR quantitative en temps réel

a. Transcription inverse (RT)

Cette technique permet d'obtenir, à partir d'un ARN le brin d'ADN complémentaire (ADNc). Nous avons utilisé 2 µg d'ARN totaux, dans le cas de l'expression de QSOX1 dans les PC12 soumises à des stress oxydants, et 1 µg dans le cas des cerveaux de Rates OVX. Les ARN totaux (dans 8 µl), et 3 µl d'amorce oligo(dT₂₀) à 10 µM (1,5 µM final), sont incubés à 65°C pendant 10 minutes puis rapidement placés sur la glace. Sont ensuite ajoutés 4 µl de tampon de l'enzyme 5X (first strand buffer), du DTT (10 mM final), les dNTPs, à une concentration de 0,5 mM chacun, et 1 µl (soit 10 U) (ou 0,5 µl, soit 5 U dans le cas des cerveaux de Rates OVX) de transcriptase réverse SuperScript II RT (Invitrogen). Les échantillons sont incubés 50 minutes (ou 30 minutes dans le cas des cerveaux de Rates OVX) à 42°C puis 15 minutes à 70 °C afin d'inactiver la transcriptase réverse. Dans la mesure du possible, les échantillons sont utilisés en PCR quantitative en temps réel tout de suite après.

b. PCR quantitative en temps réel

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel est réalisée par la méthode du Sybr Green (Applied Biosystems). Le mélange LightCycler DNA Master Mix (Roche) est préparé en ajoutant 10 µl de solution d'enzyme à 65 µl de solution contenant le tampon et les réactifs. Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer_3.cgi/). Ces amorces sont utilisées pour amplifier des fragments de 150 à 300 pb (tableau V). La normalisation est effectuée avec le niveau de transcrit *histones H3B-2* (cellules PC12) ou *18S* (cerveaux de Rates).

Le mélange réactionnel est composé de 1 µl du mélange Sybr Green, 2 µl d'ADNc totaux (selon les expériences, pur ou dilué au 1/10^{ème}), 1 µl de chaque amorce spécifique (10 µM), et 2,4 µl de MgCl₂ (25 mM) et 12,6 µl d'eau.

Le programme d'amplification est le suivant :

Dénaturation initiale (et activation de la polymérase)	95°C	8 minutes	
Amplification	95°C	5 secondes	
	40	58-62°C	4-12 secondes
		72°C	12 secondes

ADNc	numéro d'accèsion Genbank	amorces	séquence (5'-3')	température et temps d'hybridation (en °C / s)	temps d'élongation (en s)	longueur amplifiée (en pb)	température de fusion (en °C)
QSOX1	AF285078	sens	TGAAGAAAACGCATCCCTTC	60 / 5	12	159	88,4
		antisens	ACCACACCACCTCGAGCTAC				
ER α	NM_012689	sens	CTGGATGCTCATCGTCTTCA	62 / 4	8	172	89,7
		antisens	AGCCTGGGAGTTCTCAGATG				
ER β	NM_012754	sens	TTCTGTCTCCTTGCCCACTT	62 / 4	8	179	82,4
		antisens	TGGTCTAGAAGACGCCATCC				
18S	X01117	sens	AGGAATTGACGGAAGGGAC	60 / 5	12	283	88,5
		antisens	AATCTCGGGTGGCTGAACG				
histone H3B-2	BC087725.1	sens	GTGGTAAAGCACCCAGGAA	60 / 5	12	345	87,6
		antisens	GCTAGCTGGATGTCTTTTGG				

Tableau V : Amorces utilisées pour la PCR quantitative en temps réel sur des cellules (ou tissus) de Rat.

c. Analyse

L'appareil de PCR en temps réel « Light Cycler » (Roche) est un thermocycler rapide (à air pulsé), couplé à un microspectrofluorimètre. Il est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données. Le Sybr Green est un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin et devient alors fluorescent. Pendant la réaction de polymérisation et à chaque cycle d'amplification, le Sybr Green se lie à l'ADN nouvellement synthétisé. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation et augmente donc à chaque cycle d'amplification. Le tracé de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles représente une courbe sigmoïde (figure 47). Au cours de la phase exponentielle, la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée et permet de quantifier la quantité d'ADNc initiale et donc celle du messenger d'intérêt. Le cycle de PCR significatif est celui où le signal sort du bruit de fond, appelé Ct (pour cycle threshold), déterminé par l'appareil.

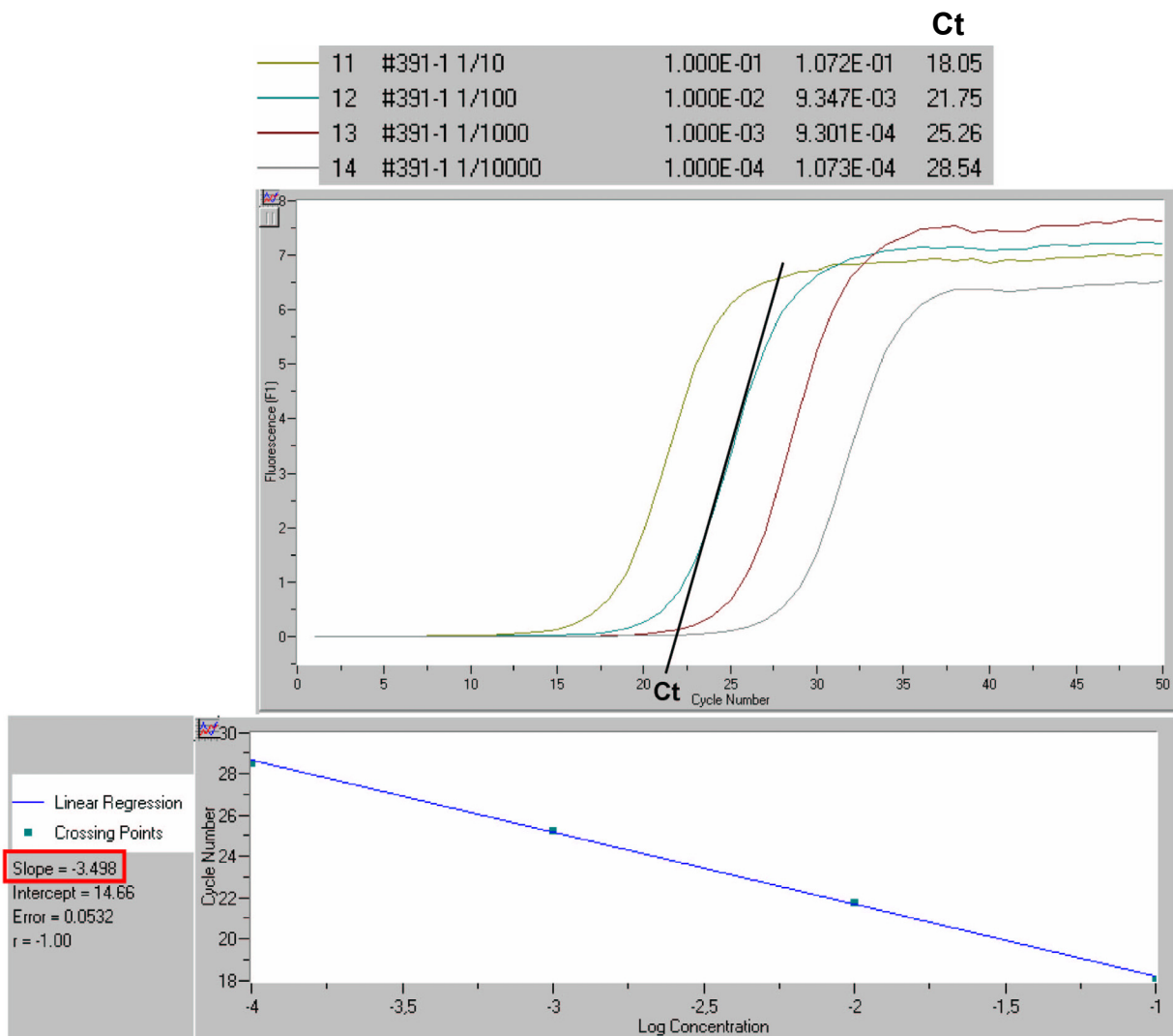


Figure 47 : Détermination du Ct et de l'efficacité. La fluorescence est mesurée à chaque cycle d'amplification. La courbe, représentant la fluorescence (F1) en fonction du nombre de cycles, dessine une sigmoïde (en haut). Le logiciel du Light Cycler calcule le cycle à partir duquel la fluorescence sort du bruit de fond (Ct). A partir d'une gamme de dilution, le logiciel détermine la pente (slope) de la droite représentant le nombre de cycles en fonction du logarithme de la concentration (en bas). Cette étape permet de calculer l'efficacité de la PCR pour chacun des couples d'amorces.

Pour nos expériences, nous avons choisi une quantification relative selon la méthode de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Des PCR effectuées en utilisant différentes dilutions d'ADNc (1/1, 1/10, 1/100, 1/1000) permettent d'obtenir la pente (slope) de la courbe $Ct = f(\log(\text{concentration}))$ donnée par l'appareil (figure 47). La formule $E = 10^{(-1/\text{pente})}$ permet de calculer l'efficacité E de la PCR pour chaque gène étudié. Le *ratio* du taux de messagers du gène d'intérêt « traité » par rapport au « contrôle » et normalisé par rapport au gène de référence se calcule selon la formule suivante :

	gène de normalisation	gène d'intérêt
standard	Ct_1	Ct_2
recherché	Ct_a	Ct_b

$$\Delta Ct_{\text{gène de normalisation, standard}} = Ct_1 - Ct_1 = 0$$

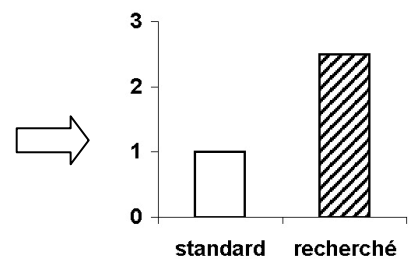
$$\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt, standard}} = Ct_2 - Ct_2 = 0$$

$$\Delta Ct_{\text{gène de normalisation, recherché}} = Ct_1 - Ct_a$$

$$\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt, recherché}} = Ct_2 - Ct_b$$

$$Ratio_{\text{standard}} = \frac{(E_{\text{gène d'intérêt}})^{(Ct_2 - Ct_2)}}{(E_{\text{gène de normalisation}})^{(Ct_1 - Ct_1)}} = 1$$

$$Ratio_{\text{recherché}} = \frac{(E_{\text{gène d'intérêt}})^{(Ct_2 - Ct_b)}}{(E_{\text{gène de normalisation}})^{(Ct_1 - Ct_a)}}$$



Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (T_f) spécifique, définie comme étant la température à laquelle 50% de l'ADN est sous forme double brin et 50% sous forme simple brin. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée jusqu'à la température d'hybridation des amorces, ce qui provoque l'hybridation de la totalité des brins d'ADN. La température est ensuite élevée lentement à 95°C. La fluorescence est mesurée en continu pendant cette remontée de la température. Lorsque la température atteint la température de fusion, les brins se dissocient, ce qui se traduit par une courbe sigmoïde (figure 48). La dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température est calculée par le logiciel et permet de déterminer la température de fusion du brin d'ADN polymérisé, qui correspond à la température atteinte au maximum du pic (figure 48).

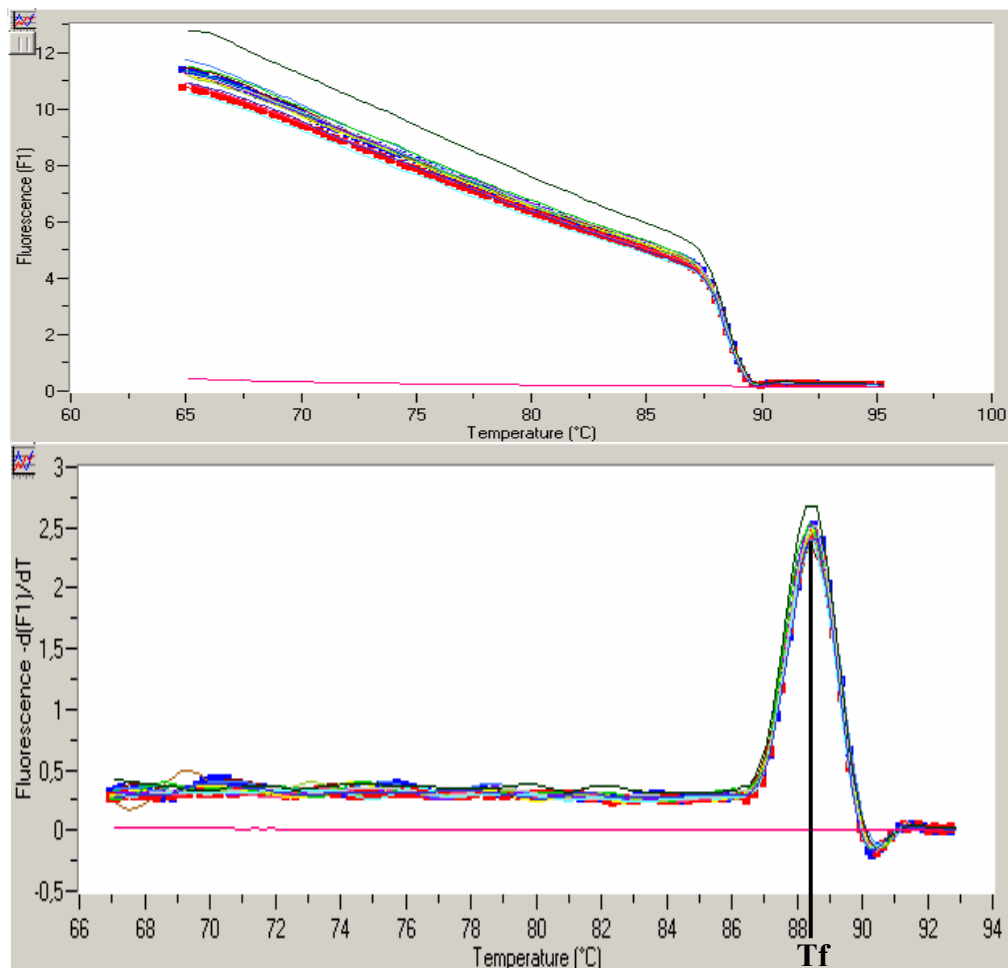


Figure 48: Détermination de la température de fusion. Après la déshybridation (95°C) puis l'hybridation (65°C) de la totalité des brins d'ADN, la température augmente lentement de 65 à 95°C. Pendant cette élévation de température, la fluorescence, mesurée en continu, diminue progressivement et lentement (en haut). Lorsque la température atteint la température de fusion des fragments amplifiés, ils se déshybrident massivement, sur la totalité de leur longueur. Le logiciel du Light Cycler calcule la dérivée $-d(F1)/dT$, avec $F1$ = fluorescence (en bas). La courbe obtenue montre un pic dont le maximum correspond à la température de fusion du brin amplifié (T_f). Le fait de n'avoir qu'un seul pic permet de s'assurer de la présence d'un seul produit d'amplification. Le tracé de couleur rose rectiligne est obtenu dans le contrôle négatif contenant le mélange des réactifs de la PCR sans ADNc (blanc).

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel R ou le logiciel SigmaStat. Pour les expériences de quantification de la survie cellulaire (test MTT) et de quantification de l'apoptose (essai TUNEL et dépolarisation mitochondriale), deux séries de données (MCF-7/QSOX1 *versus* MCF-7/pcDNA) ont été soumises à un test ANOVA puis comparées à l'aide d'un test de Tukey. Pour l'étude de l'expression des messagers QSOX1, les séries de données ont été soumises à un test ANOVA puis comparées à l'aide d'un test de Fischer (cellules PC12) ou d'un test de Tukey (cerveau).

RESULTATS

I. Mise au point d'un modèle de protection par E₂ des cellules PC12 soumises à un stress oxydant

Dans le but d'identifier les gènes et les protéines impliquées dans les effets neuroprotecteurs des estrogènes, nous avons choisi de mettre au point un modèle de cellules PC12 soumises à un stress oxydant et protégées de la mort par E₂. Nous avons tout d'abord recherché les effets de E₂ sur la survie cellulaire des cellules PC12 non différenciées avant de réaliser des essais de protection des cellules PC12 différenciées par le NGF.

1. Recherche des conditions de la protection par E₂ sur les cellules PC12 non différenciées

Afin d'améliorer la survie des cellules PC12 non différenciées, différentes conditions de prétraitement par E₂ ont été testées, du point de vue de la concentration, du temps de prétraitement et du traitement pro-oxydant. Des expériences ont également été réalisées en traitant les cellules simultanément par E₂ et les molécules pro-oxydantes. L'expression des messagers ER α a été vérifiée dans les cellules PC12/ER α par RT-PCR et est absente des cellules PC12 naïve (figure 49C). En revanche, aucun des deux clones n'expriment les messagers ER β .

Les cellules ont été cultivées en milieu complet contenant du sérum déstéroïdé et traitées par E₂ pendant 2 heures avant d'être soumises à des stress oxydants. Les résultats obtenus dans certaines conditions sont présentés dans la figure 49. Ils montrent que, dans ces conditions expérimentales, un prétraitement par E₂ à 10 nM ou 100 nM pendant 2h ne permet pas de protéger les cellules PC12 naïves traitées par H₂O₂ 100 μ M. Par contre, une légère amélioration de la survie des cellules PC12/ER α est constatée lorsqu'elles ont été prétraitées par E₂ à 10 nM ou 100 nM pendant 2h avant d'être traitées par H₂O₂ 100 μ M (figure 49). L'effet protecteur n'augmente pas avec la concentration de E₂. L'effet n'a pas été systématiquement obtenu lors des répétitions. Dans le cas d'un traitement par Fe(III)-HQ, ni les cellules naïves ni les cellules exprimant ER α ne montrent une survie améliorée par le prétraitement par E₂.

Dans les conditions décrites, l'effet protecteur est faible et non reproductible. De plus, il n'apparaît pas pour les deux types de stress oxydants. Nous avons donc fait varier les conditions de culture et de traitement afin d'augmenter l'effet protecteur.

D'autres conditions ont été testées : prétraitement de 48h, 72h, 14j ; concentrations de E₂ de 0,1 nM à 1 μ M ; traitement par le complexe Fe(III)-HQ 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M ; traitement par H₂O₂ 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M. Cependant les résultats obtenus, et non présentés, indiquent que la viabilité cellulaire n'est pas modifiée par E₂ ou que l'amélioration de la survie est minime.

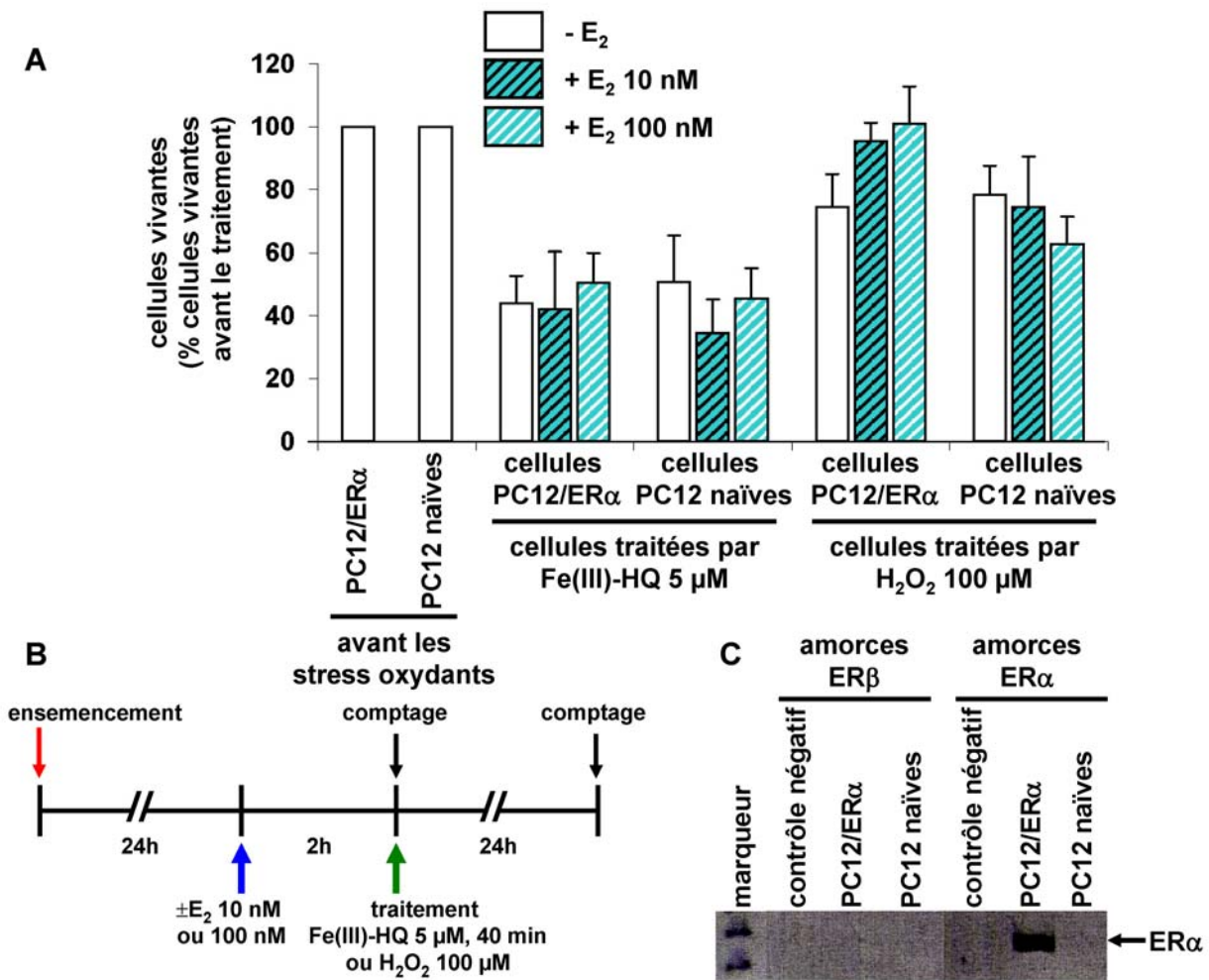


Figure 49 : A. Effet de E₂ sur la survie des cellules PC12/ER α et PC12 naïves soumises à un stress oxydant induit par le complexe Fe(III)-HQ ou H₂O₂. B. Schéma de l'expérience. Les cellules PC12 naïves et PC12/ER α ont été ensemencées en milieu complet contenant du sérum déstéroïdé, à raison de 40 000 cellules/cm² et cultivées pendant 24h. Elles ont été traitées par E₂ à 10 nM ou 100 nM ou par un milieu contenant de l'éthanol (- E₂) pendant 2h. Les cellules ont ensuite été traitées par Fe(III)-HQ 5 μ M, pendant 40 minutes puis placées en milieu complet, ou traitées par H₂O₂ 100 μ M. Les cellules vivantes (excluant le bleu trypan) ont été comptées 24 heures après le début des traitements. Les données représentent le pourcentage de cellules vivantes, 24h après le début des traitements, par rapport aux cellules vivantes avant les traitements par Fe(III)-HQ et H₂O₂. Cette figure représente la moyenne (\pm écart type) des résultats d'une expérience. Seuls les histogrammes présentés pour les cellules PC12ER α traitées par Fe(III)-HQ représentent une moyenne (\pm écart type) de trois expériences indépendantes (9 déterminations). **C. Détection par RT-PCR des messagers ER α et ER β dans les cellules PC12 naïves et PC12/ER α .** Les messagers ER β sont absents des deux types cellulaires alors que les messagers ER α sont présents dans les PC12/ER α et absents des PC12 naïves.

Aucune des conditions expérimentales utilisées n'a donc permis de montrer un effet neuroprotecteur net des estrogènes dans ce modèle de PC12 non différenciées, exprimant ER α ou non. Les cellules PC12 non différenciées ne présentent pas le phénotype neuronal. Nous avons donc testé l'effet protecteur de E₂ lorsque les cellules sont différenciées.

2. Recherche des conditions de la protection par E₂ sur les cellules PC12 différenciées

La différenciation des cellules PC 12 est contrôlée par le NGF. En présence de ce facteur, les cellules développent de longs prolongements cytoplasmiques ressemblant aux dendrites des cellules nerveuses. Nous avons utilisé 2 protocoles de différenciation présentés dans la figure 50.

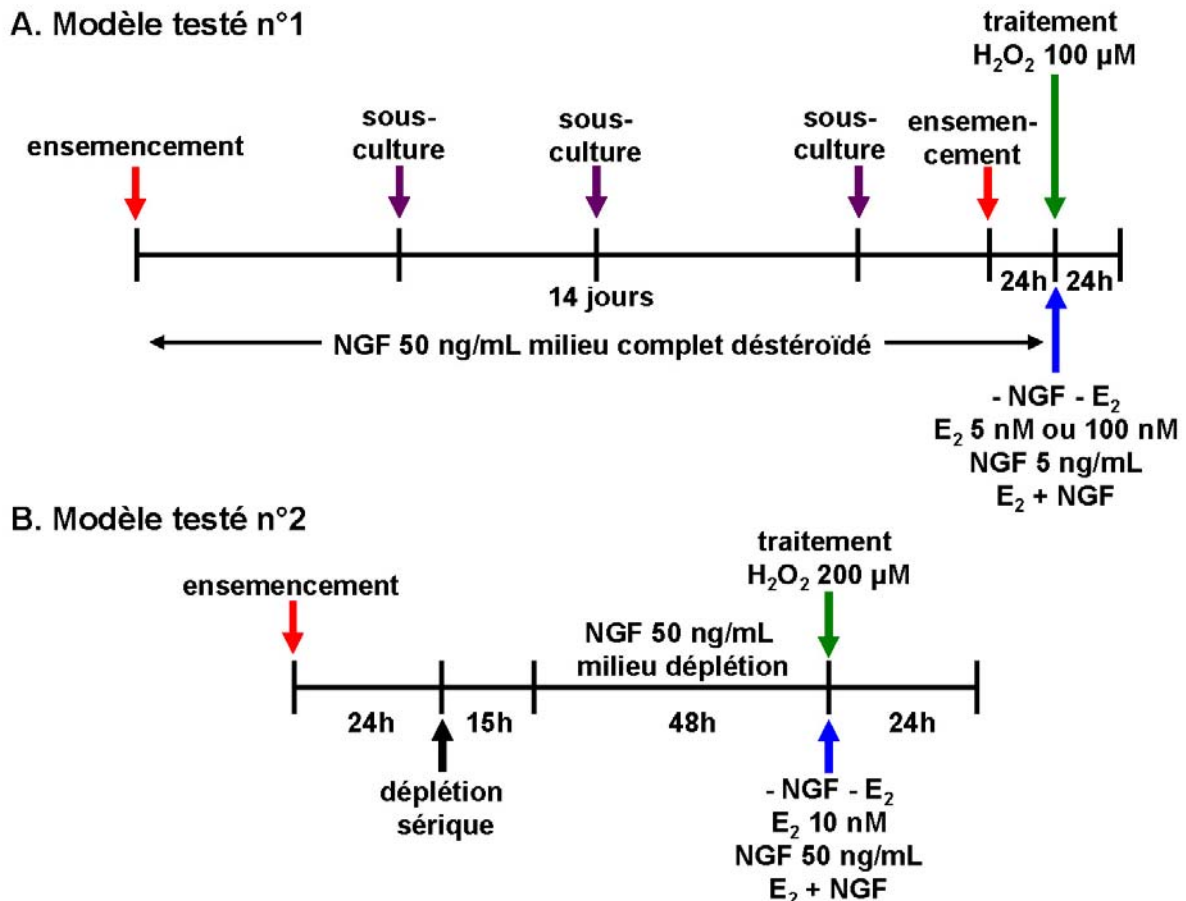


Figure 50 : Représentations des protocoles expérimentaux utilisés pour la mise au point d'un modèle de protection par E₂. A. Les cellules ont été différenciées en milieu complet déstéroïdé pendant 14 jours puis traitées par H₂O₂ 100 µM en présence de E₂ 5 nM ou 100 nM et/ou de NGF 5 ng/mL. B. Dans l'autre protocole, les cellules ont été placées en milieu de déplétion sérique pendant 15h avant d'être différenciées par le NGF 50 ng/mL pendant 48h. Simultanément au traitement par H₂O₂ 200 µM, les cellules ont été placées en présence de E₂ 10 nM et/ou de NGF 50 ng/mL pendant 24h.

Dans le premier modèle (figure 50A), les cellules sont cultivées en présence de sérum dépourvu d'hormones stéroïdes et additionné de NGF. Les cellules sont sous-cultivées régulièrement 2 fois par semaine. Elles sont ensemencées 24h avant d'être soumises au traitement oxydant qui est administré conjointement aux stimulations protectrices (E₂, NGF ou E₂ + NGF). Un lot de cellules est maintenu pendant les 24h dans le milieu ne contenant ni E₂, ni NGF. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 51.

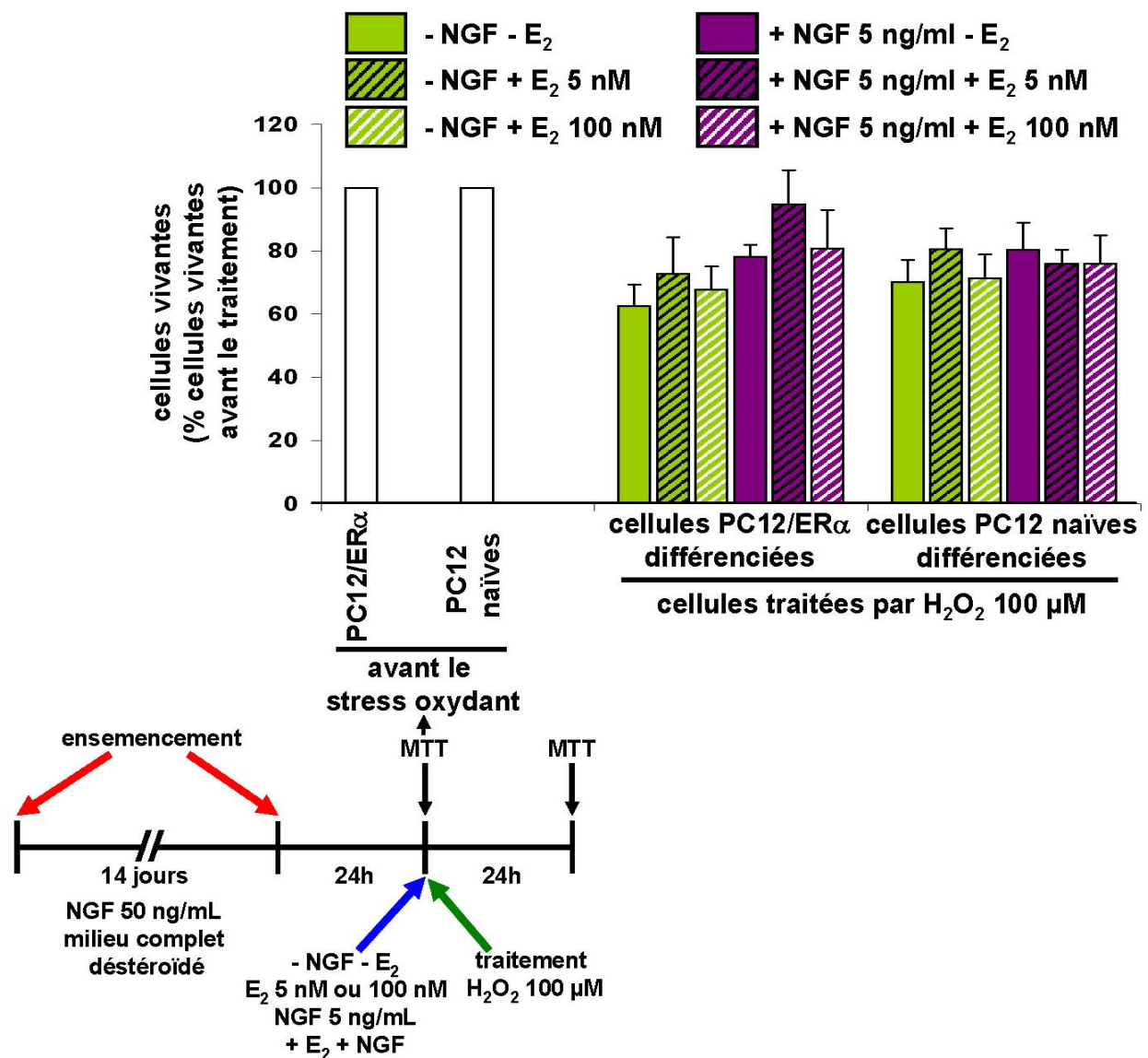


Figure 51 : Effet du NGF et de E₂ sur la survie des cellules PC12/ER α et PC12 naïves différenciées soumises à un stress oxydant induit par H₂O₂ à 100 μ M. Les cellules ont été différenciées par le NGF 50 ng/mL pendant 14 jours, en milieu complet déstéroïdé. Elles ont ensuite été traitées par H₂O₂ 100 μ M pendant 24 h en présence de E₂ 5 nM ou 100 nM et/ou de NGF 5 ng/mL. La viabilité cellulaire a été estimée avant le traitement et 24 h après le début du traitement par un test MTT. Les données représentent le pourcentage de cellules vivantes, 24h après le début du traitement par H₂O₂, par rapport aux cellules vivantes avant le traitement. Cette figure représente la moyenne (\pm écart type) des résultats d'une expérience (16 déterminations).

En l'absence de NGF, la viabilité des cellules PC12/ER α ne varie pas sous l'effet de E₂ 5 nM ou 100 nM. Utilisé seul, le NGF ne semble pas protéger les cellules PC12/ER α traitées par H₂O₂ non plus. Un effet protecteur semble être obtenu par l'association de E₂ 5 nM et NGF 5 ng/mL. Cependant l'utilisation de E₂ à la concentration 100 nM associé NGF 5 ng/mL, ne confirme pas l'effet observé avec E₂ 5 nM.

Dans nos conditions, la différenciation des cellules en milieu complet ne permet pas l'obtention de cellules susceptibles d'être protégées par E₂, par NGF ou par l'association des 2.

Le maintien des cellules en milieu complet pendant la différenciation crée une compétition entre prolifération et différenciation. En effet, le sérum induit la prolifération des cellules PC12 et diminue probablement la proportion de cellules différenciées ou l'état de différenciation. C'est pourquoi, nous avons tenté un autre protocole de différenciation (figure 50B). Dans ce second protocole, le sérum est éliminé complètement du milieu de culture pendant 15h. Le NGF est ensuite ajouté au milieu sans sérum pendant 48 h. Ce protocole permet la différenciation des cellules PC12 (figure 52) accompagnée d'un ralentissement de la prolifération. Simultanément au traitement oxydant par H_2O_2 200 μM , les cellules sont traitées par E_2 10 nM, NGF 50 ng/mL ou l'association des 2. La concentration de E_2 choisie est la concentration physiologique. L'estimation du nombre de cellules vivantes est réalisée 24 h après le début du traitement oxydant. Les résultats obtenus dans ces conditions expérimentales sont présentés dans la figure 53.

Il apparaît que le NGF, utilisé seul, protège les cellules PC12/ $\text{ER}\alpha$ et PC12 naïves et induit une augmentation du nombre de cellules vivantes après le traitement par H_2O_2 .

Par contre, ni la survie des cellules PC12 naïves ni celle des $\text{ER}\alpha$ n'est améliorée en présence de E_2 10 nM, dans ces conditions. Le léger effet observé sur les cellules PC12/ $\text{ER}\alpha$ traitées par E_2 n'a pas pu être confirmé par les expériences complémentaires. L'association NGF + E_2 n'augmente pas l'effet du NGF seul.

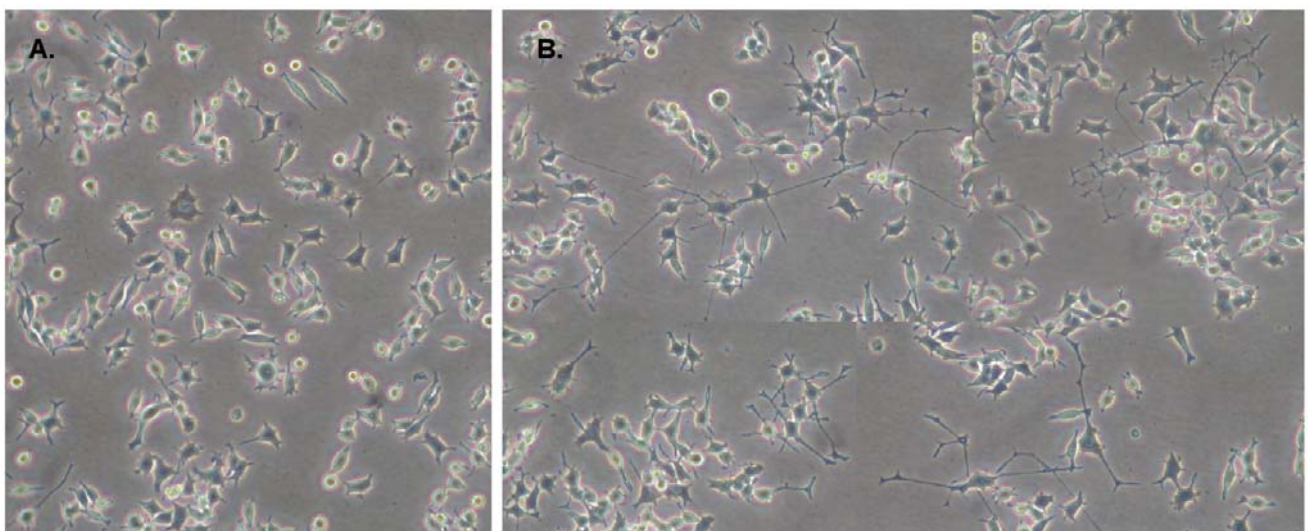


Figure 52 : Photographie des cellules PC12/ $\text{ER}\alpha$ en culture non différenciées (A) et différenciées par le NGF 50 ng/mL pendant 48h en milieu de déplétion sérique (B).

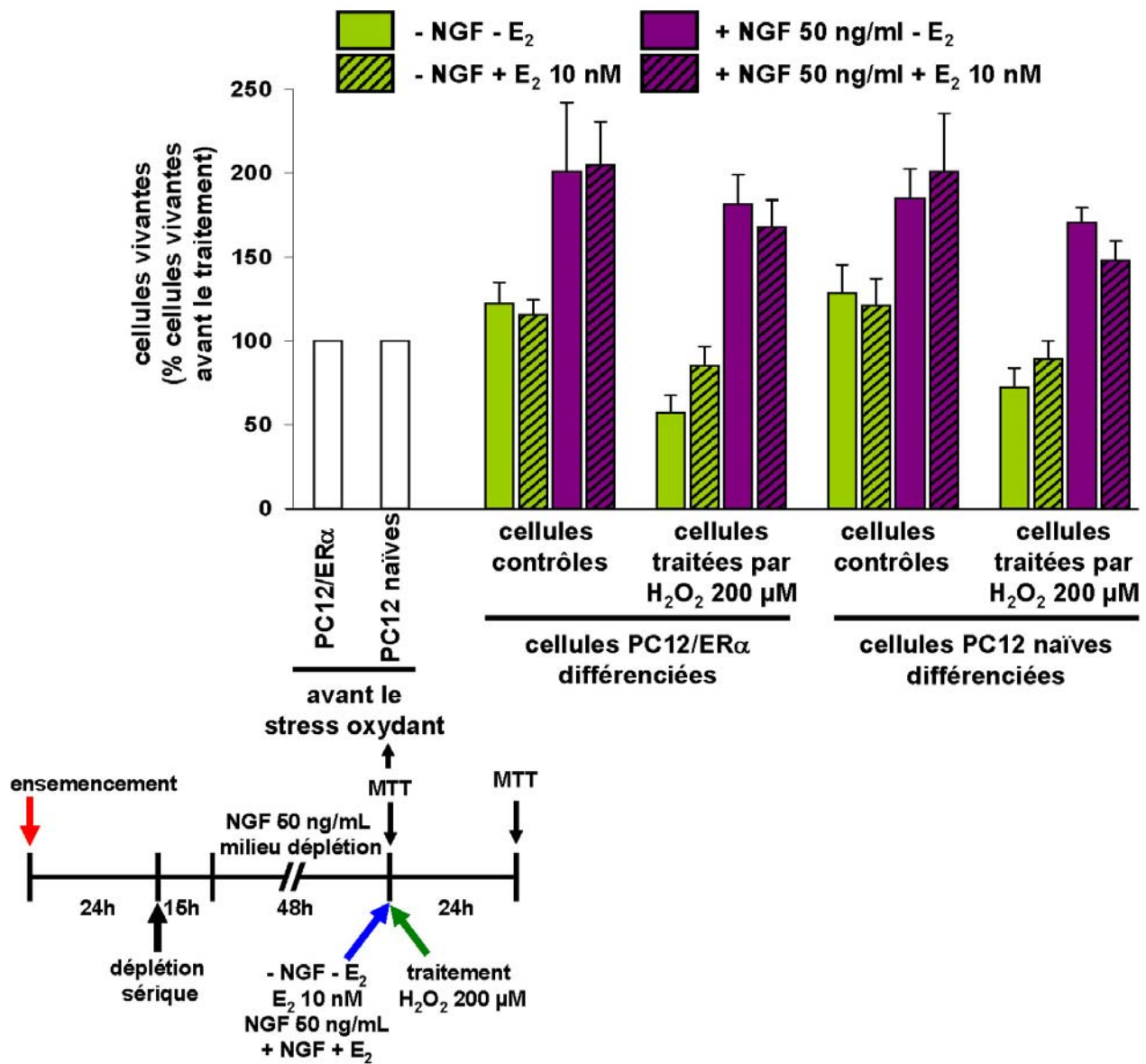


Figure 53 : Effet du NGF et de E₂ sur la survie des cellules PC12/ER α et PC12 naïves différenciées, pendant 48h en milieu de déplétion sérique, et traitées par H₂O₂ 200 μ M. Les cellules PC12/ER α et PC12 naïves ont été ensemencées à raison de 11 000 cellules/cm² et cultivées pendant 24h en milieu complet. Elles ont été placées pendant 15h en milieu de déplétion sérique avant d'être traitées par le NGF 50 ng/mL pendant 48h, en milieu déplété. Le milieu de différenciation a ensuite été éliminé et les cellules ont été traitées par H₂O₂ 200 μ M pendant 24 h en présence de E₂ 10 nM et/ou de NGF 50 ng/mL. La viabilité cellulaire a été estimée avant le traitement et 24 h après le début du traitement par un test MTT. Les données représentent le pourcentage de cellules vivantes, 24h après le début du traitement par H₂O₂, par rapport aux cellules vivantes avant le traitement. Cette figure représente la moyenne (\pm écart type) des résultats d'une expérience (16 déterminations).

Nos expériences n'ont donc pas permis d'établir des conditions de protection des cellules PC12 par E₂.

II. Etude de la régulation de l'expression de QSOX1 *in vitro* et *in vivo*

1. Etude de l'effet du NGF et/ou E₂ dans les cellules PC12 et les cellules MCF-7

a. Etude dans les cellules PC12

Les cellules PC12 ont été différenciées par le NGF selon le protocole décrit figure 50B. Les variations d'expression de la protéine QSOX1 sous l'effet du NGF ont été étudiées par immunomarquage et cytométrie en flux. Le taux de protéine QSOX1 a été déterminé dans les cellules ayant subi 15h de déplétion sérique (cellules « 15h déplétion sérique»), dans les cellules maintenues en absence de toute stimulation 48h supplémentaires (cellules « 15h + 48h déplétion sérique ») et dans les cellules stimulées pendant 48 h par le NGF après la phase de déplétion sérique (cellules « 15h déplétion sérique + 48h NGF »). Comme le montre la figure 54, dans ce dernier lot de cellules, le taux de la protéine QSOX1 augmente sous l'effet du NGF. Le taux est environ 3 fois inférieur dans les cellules privées de stimulation pendant 15h et reste inchangé lorsque les cellules sont maintenues en absence de stimulation 48h de plus (figures 54A et 54B). Par ailleurs, nous avons effectué une numération des cellules dans les 3 conditions. Les résultats présentés dans la figure 54C montrent que les cellules traitées pendant 48h par le NGF en absence de sérum sont plus nombreuses que les cellules cultivées en absence de NGF. Ces résultats suggèrent une action positive du NGF sur l'expression de QSOX1 simultanément à l'augmentation du nombre de cellules.

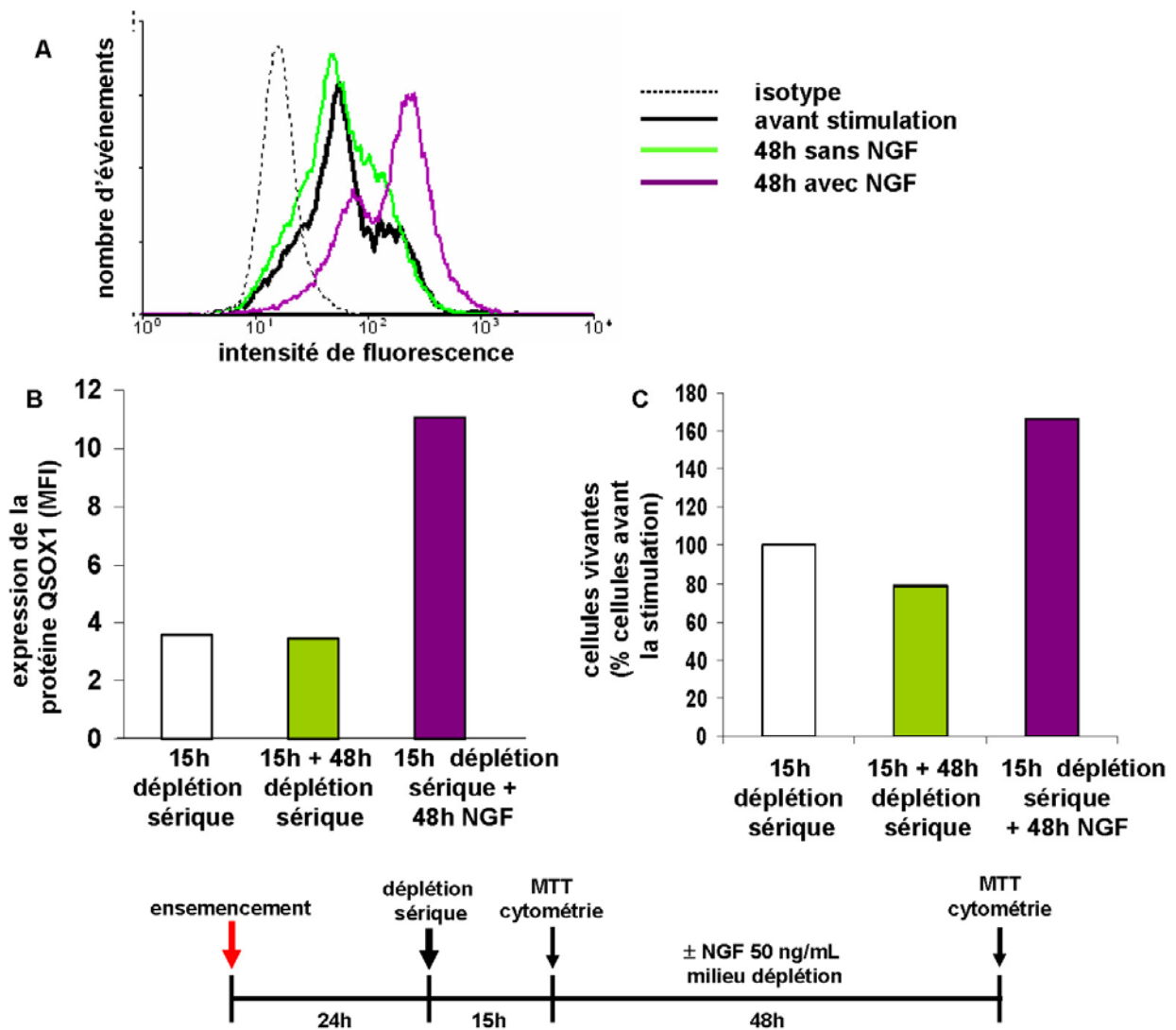


Figure 54 : Effet du NGF sur l'expression de la protéine QSOX1 (A, B) et la survie des cellules PC12/ER α (C). Les cellules ont été ensemencées à raison de 11 000 cellules/cm² et cultivées pendant 24h en milieu complet. Elles ont été placées pendant 15h en milieu de déplétion sérique avant d'être traitées ou non par le NGF 50 ng/mL pendant 48h, en milieu déplété. Avant le traitement par le NGF, et après 48h en présence ou en absence de NGF, la viabilité cellulaire a été estimée par la méthode MTT et les cellules ont été collectées et fixées. La protéine QSOX1 a été marquée par immunocytochimie et son expression analysée par cytométrie en flux. Cette figure représente les résultats d'une expérience.

Une expérience de RT-PCR quantitative en temps réel a été conduite sur les cellules PC12 naïves et PC12/ER α différenciées par le NGF. Le protocole de différenciation choisi correspond au modèle présenté dans la figure 50B, c'est-à-dire à un traitement des cellules par NGF 50 ng/mL, en absence de sérum, pendant 48h. Les cellules ont été ensuite traitées ou non pendant 24h par H₂O₂ 200 μ M en présence ou en absence de E₂ 10 nM, de NGF 50 ng/mL, ou des 2. Malheureusement, un problème expérimental a rendu inexploitable les données obtenues avec les cellules non soumises au stress oxydant. Seuls les résultats obtenus avec les cellules traitées par

H₂O₂ sont présentés dans la figure 55. Toutes les cellules sont soumises aux mêmes conditions de stress mais présentent des taux de messenger QSOX1 variables selon les stimulations associées au stress oxydant (E₂, NGF, ou NGF + E₂).

Le taux de messenger *QSOX1* est le plus bas lorsque les cellules sont traitées par le peroxyde d'hydrogène en absence de toute autre stimulation. Le taux est également bas et comparable lorsque le stress est appliqué en présence de E₂. Par contre, une augmentation importante est observée en présence de NGF. L'effet positif du NGF est obtenu dans les 2 types cellulaires. L'effet du NGF semble être légèrement amélioré par l'estradiol-17β dans les cellules PC12/ERα. Le résultat correspondant fait défaut pour les cellules naïves. Ces données, préliminaires et incomplètes, sont toutefois en accord avec les données obtenues pour l'expression de la protéine QSOX1 et tendent à indiquer que le NGF est un facteur régulant positivement l'expression de *QSOX1*. L'effet des estrogènes sur l'expression de *QSOX1* dans ce modèle n'a pas pu être observé.

Ces résultats donnent donc des indications intéressantes et prometteuses et l'expérience mérite d'être reproduite.

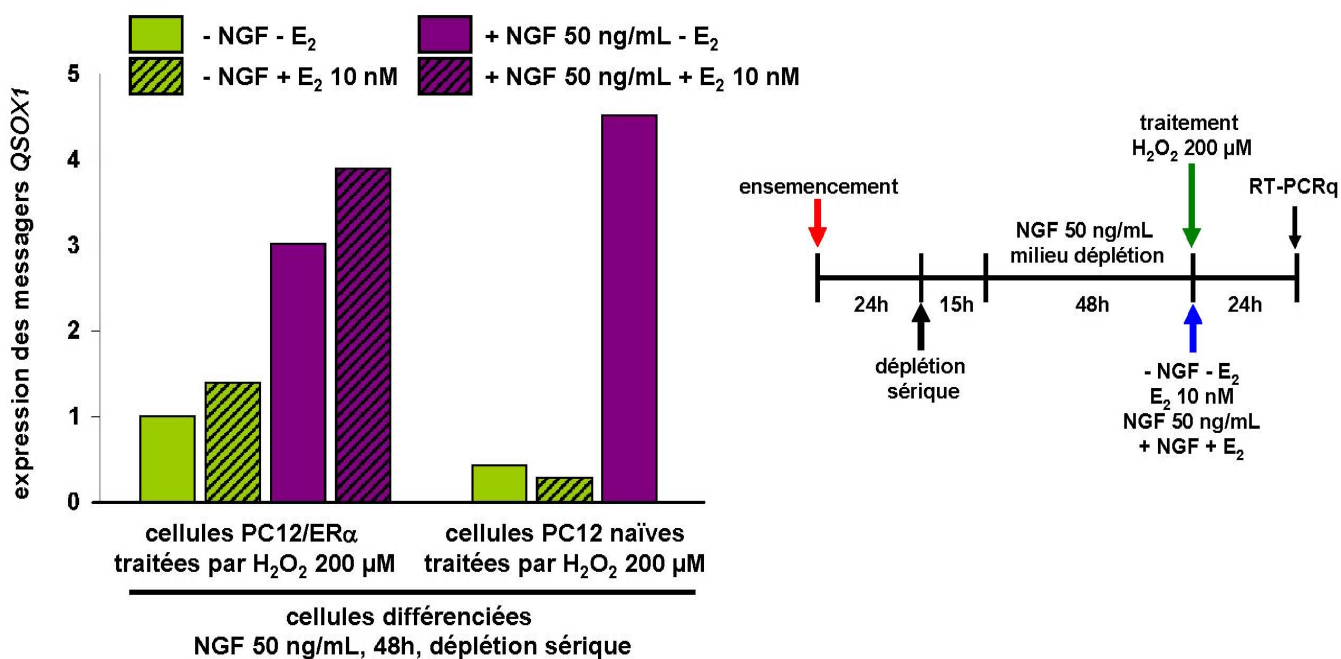


Figure 55 : Effet du NGF et de E₂ sur l'expression des messagers QSOX1 dans les cellules PC12 naïves et PC12/ERα différenciées et soumises à un stress oxydant par H₂O₂. Les cellules PC12/ERα et PC12 naïves ont été ensemencées à raison de 11 000 cellules/cm² et cultivées pendant 24h en milieu complet. Elles ont été placées pendant 15h en milieu de déplétion sérique avant d'être traitées par le NGF 50 ng/mL pendant 48h, en milieu déplété. Le milieu de différenciation a ensuite été éliminé et les cellules ont été traitées par H₂O₂ 200 μM pendant 24h en présence de E₂ 10 nM et/ou de NGF 50 ng/mL. 24 heures après le début du traitement par H₂O₂, les ARN totaux des cellules ont été extraits et soumis à une RT-PCR quantitative en temps réel. Cette figure présente les résultats d'une seule expérience. Pour la représentation graphique, la valeur standard de 1 a été attribuée au taux de messenger QSOX1 normalisé par le taux de messenger γ-actine obtenu dans les cellules PC12/ERα traitées par H₂O₂ en absence de toute autre stimulation.

L'ensemble de ces données montre une régulation positive de l'expression de QSOX1 par le NGF dans les conditions étudiées. Cette augmentation de l'expression de QSOX1 s'accompagne d'une augmentation de la proportion de cellules vivantes. La suite de nos travaux a consisté à étudier les variations de l'expression de *QSOX1* sous l'effet de E₂ dans le cerveau (publication n°1). De plus nous avons recherché l'implication de QSOX1 dans la protection des cellules soumises à un stress oxydant induisant l'apoptose (publication n°2).

b. Etude dans les cellules MCF-7

L'étude de la régulation de l'expression de *QSOX1* par les estrogènes a été entreprise *in vitro* dans le modèle de cellules MCF-7 qui expriment ER α de façon constitutive et répondent aux traitements par E₂. Les cellules MCF-7 ont été traitées par différentes concentrations d'estradiol-17 β , en milieu complet déstéroïdé, pendant 24 heures. Les variations du niveau de protéines QSOX1 ont été analysées par cytométrie en flux après immunomarquage.

Les résultats présentés dans la figure 56A et 56B montrent que le taux de protéine QSOX1 diminue lorsque la concentration de E₂ augmente entre 10⁻¹¹ M et 10⁻⁹ M. Ces résultats nous permettent de mettre en évidence une régulation négative de l'expression de QSOX1 par E₂ *in vitro*. Les variations du taux de protéines QSOX1 semblent dépendre de la concentration en E₂. Cette expérience réalisée une seule fois demande à être répétée avec une gamme de concentrations.

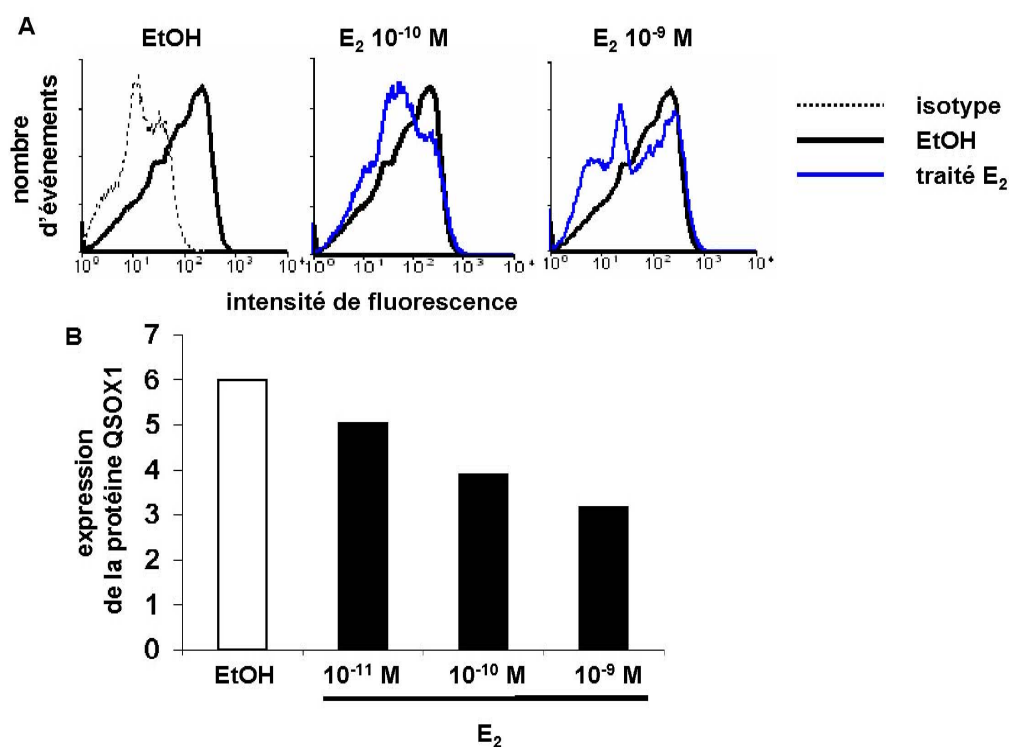


Figure 56 : Variations de l'expression de la protéine QSOX1 dans les cellules MCF-7 sous l'effet de E₂ à différentes concentrations. Les cellules MCF-7 ont été ensemencées à raison de 40 000 cellules/cm² et placées en milieu complet déstéroïdé pendant 24 heures. Elles ont été traitées par l'éthanol 0,01% (EtOH) ou E₂ à des concentrations croissantes entre 10⁻¹¹ M et 10⁻⁹ M. Après 24 heures de traitement, les cellules ont été collectées et fixées. La protéine QSOX1 a été marquée par immunocytochimie à l'aide de l'anticorps dirigé contre la protéine QSOX1 de Cobaye et reconnaissant également la protéine QSOX1 humaine. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux (A). La quantification est calculée en divisant l'intensité de fluorescence moyenne obtenue pour chaque échantillon par celle obtenue pour l'isotype (B).

2. Etude de l'effet de E₂ dans le cerveau de Rates

Publication n°1

Estradiol-17 β down-regulates sulfhydryl oxidase QSOX1 mRNAs in female rat brain

Carole Morel, Fabrice Tolle, Pascale Adami, Annick Fraichard,
Pierre-Yves Risold et Michèle Jouvenot

Soumis pour publication à **Neuroscience Letters**

Les estrogènes sont impliqués dans le développement, la régénération et la protection du cerveau par des mécanismes impliquant les récepteurs des estrogènes. Ces différentes actions des estrogènes dépendent de la modulation de l'expression de gènes cibles. Le gène *QSOX1* de Cobaye a été découvert lors de la recherche de gènes estrogéno-dépendants dans les cellules épithéliales glandulaires utérines. Depuis cette découverte, il a été montré, par immunohistochimie, une diminution des protéines QSOX1 dans ces cellules au cours du cycle estrien. De plus, il a été aussi observé (par microarray) une diminution de l'expression des messagers *QSOX1* dans les MCF-7 traitées par E₂. Nous avons donc voulu étudier l'expression de *QSOX1* dans le cerveau en présence et en absence de E₂.

Des Rates ont été ovariectomisées puis, après une semaine de repos, ont reçu une injection de E₂, sous forme d'estradiol benzoate dilué dans l'huile de sésame. Les Rates contrôles n'ont pas été traitées par E₂ et ont reçu le même volume d'huile de sésame. Nous avons réalisé une microdissection du cerveau puis utilisé la méthode de RT-PCR quantitative en temps réel afin d'étudier les variations de l'expression des messagers *QSOX1* dans 7 grandes aires du cerveau. Les résultats obtenus ont montré :

- **la présence des messagers *QSOX1* dans toutes les aires du cerveau à des niveaux variables ;**
- **une diminution du taux de messagers *QSOX1* seulement dans le diencephale, le cervelet et les noyaux de la base dans les cerveaux des Rates traitées par E₂ par rapport aux cerveaux des Rates contrôles.**

Les études antérieures ont établi des profils d'expression des messagers et des protéines ER α et ER β dans le cerveau grâce à des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie. Nous avons utilisé la technique de RT-PCR quantitative en temps réel pour définir les taux de messagers ER α et de ER β en présence ou en absence de E₂ dans les différentes aires cérébrales. Les résultats obtenus ont montré :

- **la présence des transcrits ER α et ER β à des niveaux très variables dans les différentes aires cérébrales ou non détectables ;**
- **une diminution des taux de messagers ER α et ER β dans le diencephale et les noyaux de la base.**

Ces résultats démontrent l'estrogéno-dépendance de *QSOX1* dans 3 aires cérébrales. L'expression des messagers ER α et ER β est régulée négativement sous l'effet de E₂ dans 2 de ces 3

aires. La régulation négative de QSOX1 ne peut pas être expliquée par cette régulation des récepteurs puisque, dans le cervelet, le taux de QSOX1 diminue alors que celui des messagers ER ne varie pas. L'ensemble de ces résultats est présenté dans la **publication n°1**.

Estradiol-17 β down-regulates sulfhydryl oxidase QSOX1 mRNAs in female rat brain

Running title: Negative regulation of QSOX1 by E₂ in brain

Carole **Morel**, Fabrice **Tolle**, Pascale **Adami**, Annick **Fraichard**, Pierre-Yves **Risold** and Michèle **Jouvenot**

Université de Franche Comté, U.F.R. Sciences et Techniques, E.A. 3922 Estrogènes, Expression génique et Pathologies du Système Nerveux Central, IFR 133 « Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire », Besançon, France

Corresponding author: Pr M. Jouvenot, Université de Franche Comté, U.F.R. Sciences et Techniques, E.A. 3922 Estrogènes, expression génique et pathologies du système nerveux central, IFR 133, 16 route de Gray, 25030 Besançon cedex France, tel : +33 381666540, fax : +33 381666267, e-mail adress: michele.jouvenot@univ-fcomte.fr

This work was supported by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité du Doubs and Comité du Jura) and the City of Besançon.

Abstract

We have identified the Quiescin/Sulphydryl oxidase QSOX1 as a 17β -estradiol (E_2) negatively regulated gene in uterus and shown its expression in neurons. Brain expresses nuclear estrogen receptors $ER\alpha$ and $ER\beta$, and estrogens are involved in brain development, regeneration or protection. We investigated E_2 regulation of QSOX1 and ER expression in the brain. Quantitative real time RT-PCR was performed on RNAs extracted from 7 brain areas of ovariectomized female rats treated or not by E_2 . QSOX1 mRNAs were detected in all brain areas but the E_2 treatment down-regulated QSOX1 level only in diencephalon, cerebellum, and basal nuclei. In basal nuclei and diencephalon, ER mRNA decreased under E_2 treatment as well. Since QSOX1 is estrogen-dependent, it may take part to the neuronal E_2 effects.

Keywords

Quiescin/Sulphydryl oxidase QSOX1; estrogen receptors; 17β -estradiol; rat brain

Introduction

The Quiescin/sulfhydryl oxidase QSOX1 belongs to a new class of FAD-linked enzymes that catalyse oxidation of sulfhydryl and reduce oxygen into H₂O₂ [7; 8]. QSOX1 cellular substrates are still unknown; as a consequence, the biological function of the protein remains to be understood. Human QSOX1 (initially called Q6) gene has been first identified as positively regulated in quiescence entering cells [4] and appeared involved in the negative control of the cell cycle. Rat QSOX1 cDNA has been cloned and the protein has been purified from seminal glands. Its abundance suggests a role in maturation of spermatozooids [2]. Recently, we have provided experimental data that have shown an involvement of QSOX1 in cell response to oxidative stress-induced injury [14]. The catalytic properties of the avian enzyme have been studied [8]. They indicated that preferential substrates of QSOX1 were probably proteins rather than small thiols like glutathione although QSOX1 was able to oxidize both. The guinea pig QSOX1 identification resulted of our investigations conducted to find new estrogen-regulated genes in guinea pig glandular epithelial endometrial cells [15]. We have sorted out QSOX1 as putatively negatively regulated by estrogens and we have shown that QSOX1 gene was regulated by steroid hormones (estrogens and/or progesterone) in guinea pig uteri since the highest level of QSOX1 protein was observed when estrogens were low and progesterone high during the estrus cycle [15]. The QSOX1 estrogen dependence has also been suggested by a microarray study that sorted out QSOX1 as being negatively regulated by 17 β -estradiol (E₂) in MCF-7 cells [9].

QSOX1 is expressed in a wide variety of organisms (yeasts, protozoa, animals and plants) [20]. In mammals, QSOX1 mRNAs are expressed in almost all tissues but their expression level varies from one tissue to another. We have previously detected the QSOX1 mRNA expression in rat brain [11]. Furthermore, QSOX1 protein has been located specifically in neurons [10]. It is well documented that E₂ is involved in many fundamental processes like development and regeneration in the brain. E₂ improves axonal elongation and synaptic transmission [22; 16]. Many experimental and epidemiological evidences also suggest a neuroprotective role of estrogens [1; 12]. The expression

of estrogen receptors α or β (ER α or ER β) has been reported in many brain areas [13]. Studies on transgenic mice knocked out for ER α or ER β have demonstrated that ER α was implicated in the estrogen-induced neuroprotection against ischemia injury [6] and ER β in behavior and reduction of anxiety [3]. Thus, the favourable E₂ effects in brain depend on gene regulation driven by the specific receptors ER α and/or ER β . Identification of estrogen-dependent genes will permit better understanding of these E₂ effects. In this study, we investigated the regulation of QSOX1 mRNA expression by E₂ in seven brain areas of ovariectomized rats before and after E₂ treatment and also looked for the expression patterns of ER α and ER β in these areas.

Materials and methods

This study was carried on 8-10 weeks old female Spague-Dawley rats (200-250 g ; Charles Rivers Saint-Aubin, France). All animal experimental protocols were conducted according to the recommendations of our institution concerning animal care. Rats were maintained at constant temperature of 21°C with a 12 hours light/dark cycle and *ad libitum* access to standard food and water. To remove the main source of female hormones, 16 animals were bilaterally ovariectomized (OVX) under anaesthesia (i.m.) using ketamine/xylazine (3 ml/kg). One week after ovariectomy, 8 rats received one subcutaneous injection at the base of the neck of 17 β -estradiol benzoate (30 μ g/animal, Sigma) dissolved in sesame oil (OVX + E₂) and 8 rats received the same volume of sesame oil (OVX + vehicle). After 24 or 48 hours, 8 animals (4 OVX + vehicle and 4 OVX + E₂) were killed and brains were dissected as follows. One hemisphere (whole brain) was first separated. The second hemisphere was dissected in seven regions: cerebellum, olfactory bulb, cortex, hippocampus, basal nuclei, diencephalon and pons (Fig. 1). Total RNAs from whole brain and from each brain area were extracted by using Trizol reagent (Invitrogen). One microgram of total RNAs from the different samples was reverse transcribed using an oligo-dT₍₂₀₎ primer and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) for 30 minutes at 42°C. The reaction was stopped by 15 minute incubation at 70°C. Specific primer sequences for QSOX1, ER α , ER β and 18S rRNA (Table 1)

were designed using the primer3 software. Quantitative real-time PCR was performed with the LC FastStart DNA Master SYBR Green kit (Roche) using 2 μ l of cDNA from each sample, final concentrations of 3 mM MgCl₂, and 0.5 μ M of different primers in a 20 μ l final volume. Quantitative PCR was carried out using a Light Cycler (Roche) for 45 cycles at 95°C for 5 seconds, specific annealing temperature for 4-5 seconds and 72°C for 8-12 seconds (Table 1). Amplification specificity was checked using melting curve following the manufacturer's instructions. Indeed, a unique PCR product confirmed the correct amplification. QSOX1, ER α and ER β PCR were normalized with a control PCR made on 18S cDNA. For our data analysis, we used the relative Pfaffl mathematical model [17]. The relative expression ratio was calculated from the real time PCR efficiencies and the crossing point derivation of two samples (each QSOX1 mRNA level in each brain area versus QSOX1 mRNA level in the cortex of one animal arbitrary chosen as a reference). The levels were normalized to 18S rRNA which was used as a reference in the brain [21].

Statistical significance between data obtained in E₂ treated rats versus non treated rats was evaluated for each area by using ANOVA followed by Tukey test.

Table 1: oligonucleotide sequences for sense(s) and reverse (r) primers

cDNA	Genbank accession number	Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature and time (in °C/ sec)	Elongation time at 72°C (in sec)	Size of amplified cDNA (in pb)	Melting temperature (in °C)
QSOX1	AF285078	s	TGAAGAAAACGCATCCCTTC	60/ 5	12	159	88.4
		r	ACCACACCACCTCGAGCTAC				
ER α	NM_012689	s	CTGGATGCTCATCGTCTTCA	62/ 4	8	172	89.7
		r	AGCCTGGGAGTTCTCAGATG				
ER β	NM_012754	s	TTCTGTCTCCTTGCCCACTT	62/ 4	8	179	82.4
		r	TGGTCTAGAAGACGCCATCC				
18S	X01117	s	AGGAATTGACGGAAGGGAC	60/ 5	12	283	88.5
		r	AATCTCGGGTGGCTGAACG				

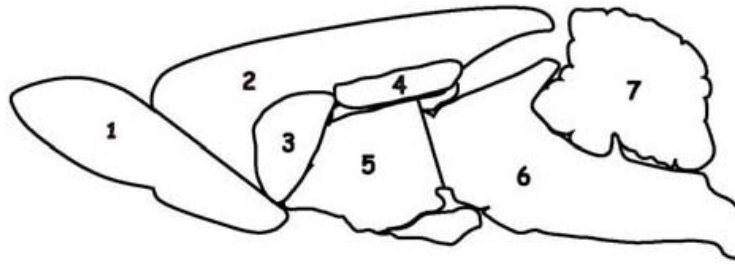


Fig. 1: Dissection of rat brain. The brain was dissected into two hemispheres and one hemisphere was further dissected into 7 distinct parts.

1: olfactory bulb, 2: cortex, 3: basal nuclei, 4: hippocampal formation, 5: diencephalon, 6: pons, 7: cerebellum.

Results

The relative level of QSOX1 mRNA was assessed by quantitative real time RT-PCR and the results are presented in Fig. 2. The data indicate that QSOX1 was expressed in every part of the brain, but its expression level varied from one area to the other. Thus, in untreated ovariectomized rats, we distinguished areas with low expression (olfactory bulb and hippocampal formation) from areas where the expression was comparable with that of the whole brain (cortex and pons). Three areas (cerebellum, basal nuclei and diencephalon) presented the highest QSOX1 mRNA level.

In the whole brain, the QSOX1 mRNA level did not vary 48 hours after E_2 injection to ovariectomized animals. On the other hand, a significant 2 fold decrease was observed in cerebellum, basal nuclei and diencephalon while there was no variation in the other areas.

When animals were killed 24h after hormonal treatment, no E_2 effect was observed on QSOX1 mRNA whatever the area (not shown).

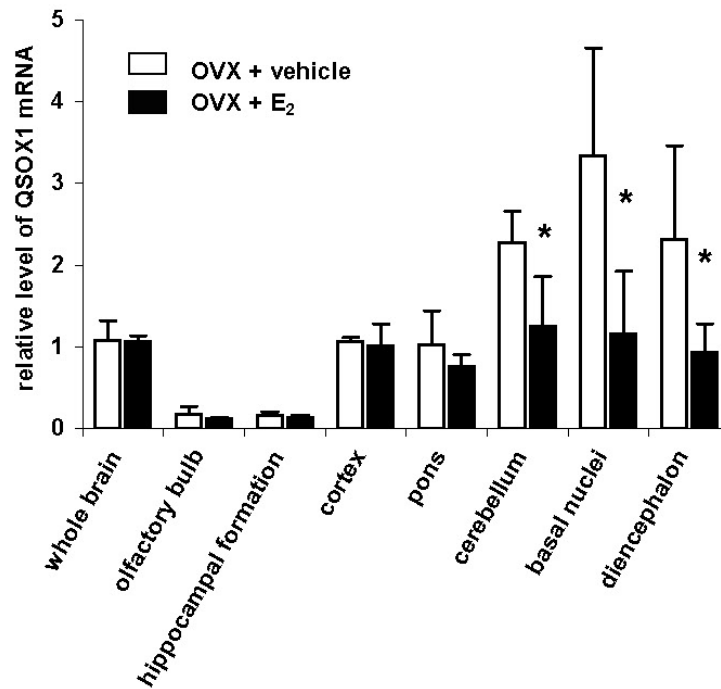


Fig. 2: Relative levels of QSOX1 mRNA in ovarioectomized rats treated or not by E₂.

Eight days after ovariectomy, female rats received one injection of E₂ and 48 h later, total RNAs from the different brain areas were extracted. A quantitative RT-PCR was performed on 1 µg of total RNAs. 18S cDNA was used for normalisation. All data are expressed relatively to the result obtained with the cortex of one control animal. Data are means ± S.D. of 4 rats. * indicates a significant difference between E₂-treated rats (OVX + E₂) and control rats (OVX + vehicle), at P < 0.05.

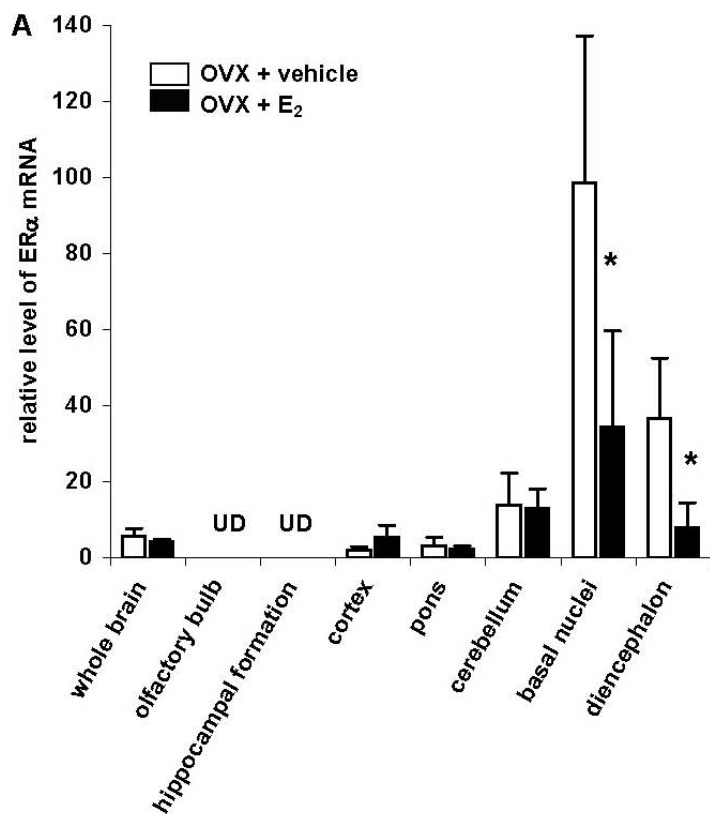
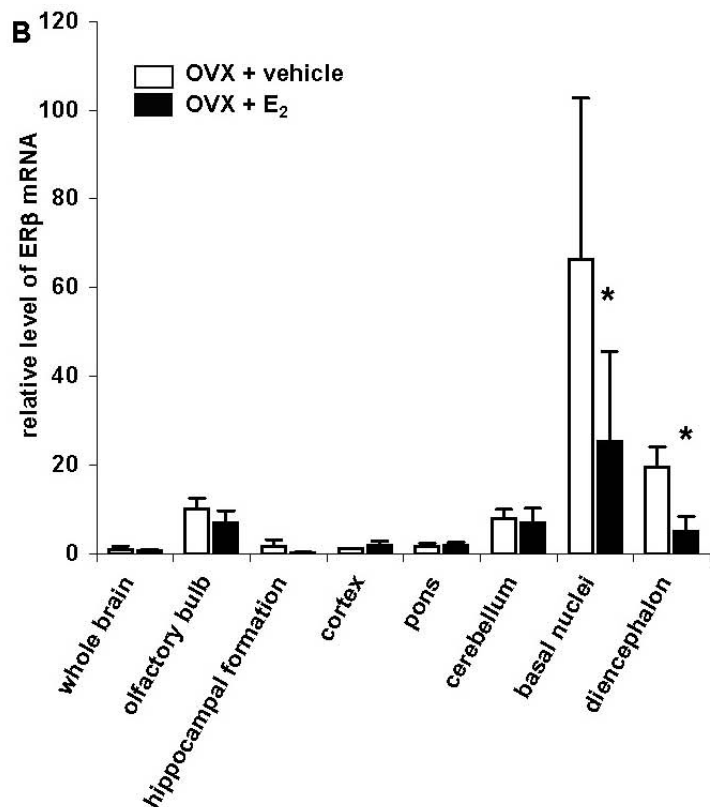


Fig. 3: Relative levels of ER α (A) and ER β (B) mRNAs in ovariectomized rats treated or not by E₂.

Eight days after ovariectomy, female rats received one injection of E₂ and 48 h later, total RNAs from the different brain areas were extracted. Quantitative RT-PCR was performed on 1 μ g of total RNAs. 18S cDNA was used for normalisation. All data are expressed relatively to the result obtained with the cortex of one control animal. Data are means \pm S.D. of 4 rats. * indicates a significant difference between E₂-treated rats (OVX + E₂) and control rats (OVX + vehicle), at $P < 0.05$. UD : undetectable.



The ER α and ER β mRNA levels were quantified in different brain areas (Fig. 3). In the whole brain of untreated ovariectomized rats, both transcripts were detected but the ER α mRNA was mostly expressed. ER α mRNA was revealed in 5 areas but undetectable in olfactory bulb and hippocampal formation (Fig. 3A). On the contrary, ER β was present in all areas (Fig. 3B). The basal nuclei and diencephalon displayed high levels of both transcripts.

Forty eight hours after E₂ injection, a significant 2 to 3 fold decrease of ER α and ER β mRNAs was observed in basal nuclei and diencephalon but no variation arose in the whole brain and in the other areas.

Discussion

QSOX1 has been identified in our group as negatively regulated by estrogens in uterine cells by differential screening of a cDNA bank [15]. Later on, the tissue distribution of QSOX1 expression has been investigated and an expression has been detected in many rat tissues and particularly in the brain. But so far, no convincing data has been brought out by us or other groups that confirmed *in vivo* the estrogen effect on QSOX1 expression. The aim of the present study was to analyse the dependence of QSOX1 mRNA expression on E₂ stimulation in the rat brain. Therefore we analysed, by a quantitative RT-PCR method, the QSOX1 mRNA level in brain of ovariectomized rats treated or not by E₂.

We have previously shown that QSOX1 protein was differently expressed in different brain areas of male rats [10]. The quantification of QSOX1 mRNA in seven large brain regions of untreated rats was in accordance with the uneven distribution of the protein.

While no variation of mRNA level was observed in the whole brain after E₂ stimulation, an E₂ effect was observed in three areas. Indeed, E₂ down regulation of QSOX1 expression occurred in cerebellum, basal nuclei and diencephalon where the control QSOX1 mRNA levels were the highest. For the first time, we bring evidence on an E₂ negative regulation of QSOX1 expression in brain.

It is well documented that estrogens exert their action via two different receptors ER α and ER β . These receptors are highly regulated at the mRNA and protein levels by many growth factors and hormones including E₂ itself [18; 19]. As reported by others, in our study, E₂ down regulated the level of its receptors but this occurred only in basal nuclei and diencephalon. Then, the decrease of QSOX1 mRNA cannot be explained by the decrease of the receptor mRNA levels. Indeed, no variation of ER level was observed in cerebellum where QSOX1 varied. The estrogenic effect being observed lately at 48 h suggests that the regulation might be indirect and require protein synthesis. Thus QSOX1 gene would belong to the primary delayed genes or to the secondary response genes of the estrogen action [5].

Although several hundred genes are known to be directly or indirectly regulated by estrogens, very few information about their regulation in brain is yet available. The identification of a new estrogen-regulated gene contributes to the better understanding of E₂ action in brain.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) and by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité du Doubs and Comité du Jura) and from the City of Besançon.

References

- [1] C. Behl, Oestrogen as a neuroprotective hormone, *Nat. Rev. Neurosci.* 3 (2002) 433-442.
- [2] B. Benayoun, A. Esnard-Feve, S. Castella, Y. Courty, F. Esnard, Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescein Q6 gene family, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 13830-13837.
- [3] C. Bodo, E.F. Rissman, New roles for estrogen receptor β in behavior and neuroendocrinology,

Front. Neuroendocrinol. 27 (2006) 217-232.

[4] D.L. Coppock, C. Kopman, S. Scandalis, S. Gilleran, Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts, *Cell Growth Differ.* 4 (1993) 483-493.

[5] D.M. Dean, M.M. Sanders, Ten years after: reclassification of steroid-responsive genes, *Mol. Endocrinol.* 10 (1996) 1489-1495.

[6] D.B. Dubal, H. Zhu, J. Yu, S.W. Rau, P.J. Shughurue, I. Merchenthaler, M.S. Kindy, P.M. Wise, Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 1952-1957.

[7] K.L. Hooper, B. Joneja, H.B. White, C. Thorpe, A sulfhydryl oxidase from chicken egg white, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 30510-30516.

[8] K.L. Hooper, C. Thorpe, Egg white sulfhydryl oxidase: kinetic mechanism of the catalysis of disulfide formation, *Biochemistry* 38 (1999) 3211-3217.

[9] A. Inoue, N. Yoshida, S. Omoto, T. Yamori, R. Kiyama, S. Hayashi, Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes, *J. Mol. Endocrinol.* 29 (2002) 175-192.

[10] G. Mairet-Coello, A. Tury, A. Esnard-Fève, D. Fellmann, P.-Y. Risold, B. Griffon, FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: Topographic, cellular and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.* 473 (2004) 334-363.

[11] G. Mairet-Coello, A. Tury, D. Fellmann, M. Jouvenot, B. Griffond, Expression of SOx-2, a membre of the FAD-dependent sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family, in rat brain, *Neuroreport* 13 (2002) 2049-2051.

[12] Y. Mérot, F. Ferrière, E. Debroas, G. Flouriot, D. Duval, C. Saligaut, Estrogen receptor alpha mediates neuronal differentiation and neuroprotection in PC12 cells: critical role of the A/B domain of the receptor, *J. Mol. Endocrinol.* 35 (2005) 257-267.

[13] S. Mitra, E. Hoskin, J. Yudkovitz, L. Pear, H.A. Wilkinson, S. Hayashi, D.W. Pfaff, S. Ogawa, S.P. Rohrer, J.M. Schaeffer, B.S. McEwen, S.E. Alves, Immunolocalization of estrogen receptor β

in the mouse brain: comparison with estrogen receptor α , *Endocrinology* 144 (2003) 2055-2067.

[14] C. Morel, P. Adami, J.-F. Musard, D. Duval, J. Radom, M. Jouvenot, Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis, *Exp. Cell Res.* In Press

[15] J.-F. Musard, M. Sallot, P. Dulieu, A. Fraïchard, C. Ordener, J.-P. Remy-Martin, M. Jouvenot, P. Adami, Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287 (2001) 83-91.

[16] A. Parducz, T. Hajszan, N.J. MacLusky, Z. Hoyk, E. Csakvari, A. Kurunczi, J. Prange-Kiel, C. Leranth, Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids, *Neuroscience* 138 (2006) 977-985.

[17] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.

[18] J.J. Pinzone, H. Stevenson, J.S. Strobl, P.E. Berg, Molecular and Cellular Determinants of Estrogen Receptor α Expression, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 4605–4612.

[19] N. Shima, Y. Yamaguchi, K. Yuri, Distribution of estrogen receptor beta mRNA-containing cells in ovariectomized and estrogen-treated female rat brain, *Anat. Sc.i Int.* 78 (2003) 85-97.

[20] C. Thorpe, K.L. Hooper, S. Rajee, N.M. Glynn, J. Burnside, G.K. Turi, D.L. Coppock, Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes, *Arch. Biochem. Biophys.* 405 (2002) 1-12.

[21] R.J. Walters, M.V. Brandt, A. Nastos, N. Hiroi, H.S. Willenberg, M.K. Oeff, W.A. Scherbaum, S.R. Bornstein, Insulin modulates the expression levels of dopamine β hydroxylase and phenylethanolamine N-methyl-transferase within PC12 cells, *Cellscience* (2002) (www.cellscience.com/18S.htm).

[22] P.M. Wise, D.B. Dubal, M.E. Wilson, S.W. Rau, Y. Liu, Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain, *Front. Neuroendocrinol.* 22 (2001) 33-66.

III. Etude de l'expression de QSOX1 sous l'effet d'un stress oxydant et effet d'une surexpression de QSOX1 sur la survie des cellules soumises à un stress oxydant

Publication n°2

Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis

Carole Morel, Pascale Adami, Jean-François Musard, Dominique Duval,
Jean Radom et Michèle Jouvenot

Experimental cell research (2007) 313, 3971-3982.

La version de cet article présenté ici n'est pas la version éditée.

La version éditée est disponible en ligne *via* le site www.elsevier.com/locate/yexcr

Le rôle de QSOX1 n'étant pas connu, nous avons supposé que la protéine pourrait intervenir dans le processus apoptotique.

Tout d'abord, nous avons utilisé le modèle de cellules PC12/ER α soumises à des stress oxydants induits par le complexe Fe(III)-HQ ou par H₂O₂. La staurosporine aglycone nous a servi de contrôle positif permettant de mettre en évidence les caractéristiques de l'apoptose. Les traitements étudiés ont induit une diminution de la survie cellulaire de manière dose dépendante. Pour les expériences qui ont suivi, nous avons donc choisi les traitements suivants : **Fe(III)-HQ 5 μ M, H₂O₂ 100 μ M et staurosporine aglycone 20 μ M**. Ces traitements entraînent **la fragmentation des noyaux et la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN génomique et l'augmentation de la proportion de cellules sub-G₁**, ce qui montre qu'ils induisent l'apoptose des cellules PC12. Les traitements par le complexe Fe(III)-HQ et par H₂O₂ entraînent un **ralentissement de la prolifération cellulaire et une augmentation de la proportion de cellules en phase G₂**.

Ce modèle ayant été établi, nous avons étudié les variations de l'expression de QSOX1 au niveau des messagers (par RT-PCR en temps réel) et de la protéine (par immunomarquage et cytométrie en flux) dans les cellules PC12 traitées par le complexe Fe(III)-HQ ou par H₂O₂. Les résultats de nos expériences montrent que :

- **le taux de messagers *QSOX1* et le taux de protéine QSOX1 augmentent suite aux deux traitements ;**
- **l'augmentation de l'expression de la protéine QSOX1 survient quelle que soit la phase du cycle cellulaire.**

Cette surexpression de QSOX1 s'accompagne de la reprise de la prolifération des cellules après les stress oxydants. Nous pouvons donc supposer que QSOX1 aurait un rôle positif sur la survie des cellules et pourrait participer à leur régénération. Nous avons voulu étudier l'effet d'une surexpression de QSOX1 sur la survie des cellules. Pour cela, les cellules MCF-7/pcDNA contrôles et les cellules MCF-7/QSOX1, surexprimant de manière constitutive la protéine QSOX1, ont été soumises aux mêmes traitements pro-apoptotiques. Les résultats de nos expériences sont les suivants :

- **les cellules MCF-7/QSOX1 prolifèrent moins rapidement que les cellules MCF-7/pcDNA ;**

- la proportion de cellules MCF-7/QSOX1 qui survivent aux traitements est plus importante que celle des cellules contrôles MCF-7/pcDNA. Cela se traduit par une diminution de l'apoptose des cellules MCF-7/QSOX1 mise en évidence par une diminution du marquage TUNEL ;
- la dépolarisation de la membrane mitochondriale est moins importante dans les cellules MCF-7/QSOX1.

L'ensemble de ces résultats, présenté dans la **publication n°2**, montre que QSOX1 intervient dans la protection des cellules soumises à un stress pro-apoptotique.

Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis

Running title: QSOX1 induces cell protection against apoptosis

**Carole Morel¹, Pascale Adami¹, Jean-François Musard², Dominique Duval³, Jean Radom¹
and Michèle Jouvenot¹**

¹ Université de Franche Comté, U.F.R. Sciences et Techniques, E.A.3922 Equipe « Estrogènes, Expression génique et Pathologies du Système Nerveux Central », IFR 133 « Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire », France

² Société RD-Biotech, Besançon, France

³ Université de Caen, équipe INSERM-Avenir « tPA in the working brain », Centre Cycéron, France

Corresponding author: Pr M. Jouvenot, Université de Franche Comté, UFR Sciences et Techniques, lab. Biochimie-Biologie Moléculaire, 16 route de Gray, 25030 Besançon cedex, France, tel : (33) 3 81 66 65 40, fax : (33) 3 81 66 62 67, michele.jouvenot@univ-fcomte.fr

Abstract

The QSOX1 protein, belonging to a new class of FAD-linked Quiescin/sulphydryl oxidase, catalyzes disulfide bond formation. To give new insight into the biological function of QSOX1, we studied its involvement in oxidative stress-induced apoptosis and cell recovery of PC12 cells. By real time RT-PCR and flow cytometric analysis, we show that the QSOX1 mRNA and protein levels increased late after the beginning of oxidative treatment and were sustained for 72 hours. These levels were still high when the PC12 cells were not dying but had resumed proliferation. The kinetics of QSOX1 expression suggest a more protective effect of QSOX1 rather than an involvement of this protein in apoptosis. Human breast cancer MCF-7 cell lines overexpressing the guinea pig QSOX1 protein submitted to the same treatments appeared less sensitive to cell death than the MCF-7 control cells. The protective effect is partly due to a preservation of the mitochondrial polarization generally lost after an oxidative stress. These results strengthen our hypothesis of a protective role of QSOX1 against apoptosis.

Keywords: Quiescin/Sulphydryl oxidase QSOX1; apoptosis; protection; oxidative stress.

Abbreviations: QSOX1: Quiescin/Sulphydryl oxidase 1; ER: estrogen receptor; NGF: nerve growth factor; ERV1: essential for respiration and vegetative growth; PDI: protein disulfide isomerase; PTP: permeability transition pore

Introduction

The *QSOX1* gene has been identified by our group in primary culture of guinea pig epithelial endometrial cells and was initially recorded in the data bank under the name gec3, (GenBank Accession No. U82982) [1]. The QSOX1 protein belongs to a family of FAD-dependent sulfhydryl oxidases that are expressed in all metazoans, in higher plants, and in several protozoan parasites of importance in human diseases. In the human genome, the *QSOX1* gene is located on chromosome 1. In different species, an alternative splicing generates a long (*QSOX1-L*) and a short (*QSOX1-S*) transcript [1, 2, 3]. The translation of the short transcript occurs ubiquitously whereas that of the longer one appears to be tissue specific [2]. The long form of the QSOX1 protein potentially retains a transmembrane segment that could allow the protein to be bound to the membrane. Indeed, when expressed in mammalian cells, the human QSOX1-L protein is a transmembrane protein localized primarily in the Golgi apparatus [4]. However, in human cultured fibroblasts, this long form has been detected in the culture medium [5].

A second gene, located on chromosome 9, encodes the QSOX2 protein, also named SOXN because of its expression in neuroblastoma cells [6]. The 3 proteins, QSOX1-S, QSOX1-L and QSOX2, share structural identities. They are constituted by the fusion of a thioredoxin domain and an ERV1 domain (Essential for Respiration and Vegetative growth) [7]. Human QSOX1 and QSOX2 proteins share an overall 40% identity in their primary structures and 68% in their functional thioredoxin and ERV1 domains. However, they are differently expressed in tissues and differently located in the cell [8]. QSOX1 has been detected extracellularly and in the mitochondria. QSOX2 has been shown to be associated with the plasma membrane and the nucleus [6]. In the rat and guinea pig brains, the use of polyclonal anti-QSOX1 antibodies has revealed that QSOX1 is expressed in neurons. The expression pattern has shown that, if QSOX1 is present in all brain areas, its expression level may vary [9].

The FAD-dependent sulfhydryl oxidases of the QSOX family catalyze the oxidation of thiols to disulfides by reducing oxygen to hydrogen peroxide following the reaction $2R-SH + O_2 \rightarrow$

R-S-S-R + H₂O₂ [10, 11]. *In vitro*, enzymatic studies on avian QSOX1 have demonstrated that this enzyme is able to catalyze both disulfide bridges of a large array of monothiol substrates (such as glutathione) and reduced proteins and peptides [12, 13]. Based on kinetic data from avian QSOX1, it appears that the natural substrates of QSOX1 are proteins instead of small thiols like glutathione. It seems also that QSOX1 is not a new disulfide isomerase but instead assists the Protein Disulfide Isomerase (PDI) by establishing the disulfide links in the mature proteins [11].

Thus, *in vivo*, as the biological substrates are still unknown, cellular and physiological functions of QSOX1 family members are not yet understood. A high level of *QSOX1* mRNA has been reported in quiescent human lung cells [5]. We have also shown an accumulation of mRNA in guinea pig endometrial epithelial cells made quiescent by serum depletion as well as a down regulation of the *QSOX1* mRNA level when these cells proliferated [1]. These experimental data suggest that QSOX1 could be connected to the negative control of the cell cycle.

Aerobic metabolism induces production of reactive oxygen species (ROS) [14] able to induce oxidative stress that promotes cell apoptosis. Brain is highly sensitive to oxidative stress because of its high oxygen need, its abundance of oxidizable substrates like polyunsaturated fatty acids, and its weakness in anti-ROS protective system. Indeed, in several neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's or Parkinson's disease, oxidative status is imbalanced and ROS can cause cell death [15]. The role of ROS in the genesis of cancer has also been reported [16]. Much experimental and epidemiological evidence suggests a neuroprotective role of estrogens. The generation of transgenic mice knocked out for estrogen receptors ER α or ER β has revealed the role of ER α in estrogen neuroprotection against ischemia injury [17]. Furthermore, expression of the estrogen receptors has been reported in many areas of the brain [18]. However, the proteins directly involved in the estrogen neuroprotective effect remain to be identified. We have initially identified QSOX1 as a potentially negative estrogen-regulated gene by differentially screening a guinea pig endometrial epithelial cell cDNA bank [1]. The estrogeno-dependence of *QSOX1* has been

confirmed by a microarray study concerning the MCF-7 cell line [19]. Thus, it is thought that the QSOX1 protein may be involved in some estrogen effects.

The estrogen-dependence of *QSOX1*, its expression in many brain areas, its biochemical activity of oxidizing proteins, and the concomitant production of H₂O₂ prompted us to study the involvement of QSOX1 in oxidative stress-induced apoptosis.

For this purpose, apoptosis was induced in rat pheochromocytoma PC12 cells either by the elevation of free cytoplasmic iron or by hydrogen peroxide. PC12 cells are of neural crest origin. When they are cultured in the presence of neuronal growth factor (NGF), they adopt a neuronal-like phenotype showing neuritic extensions and therefore are a widely used model of neuron-like cells. The present study showed an increase of QSOX1 mRNA or protein expression 24 hours after an oxidative treatment inducing cell death in PC12 cells. The overexpression was maintained during the time necessary for PC12 cells to resume proliferation. Furthermore, overexpression of QSOX1 protein in MCF-7 cells that have been stably transfected by a *QSOX1* expression vector protected cells against cell death induced by the same oxidative treatments. In these cells, the mitochondria membrane potential was maintained after an oxidative stress whereas it was lost in the control MCF-7 cells. These data suggested a positive role of QSOX1 protein against oxidative stress-induced apoptosis.

Materials and Methods

Cell culture

Rat pheochromocytoma PC12 cells were routinely kept in phenol red-free DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 5% horse serum, 4 g/L D-glucose, 2 mM L-glutamine, 15 mM HEPES pH 7.2, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 250 µg/ml amphotericin B at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Human breast cancer MCF-7 cells (control and overexpressing QSOX1) were cultured in phenol red-free DMEM supplemented with

5% FCS, 2 mM L-glutamine, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ insulin, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, and 250 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B at 37°C in a 5% CO₂ water saturated atmosphere.

Cell viability was estimated by counting Trypan Blue-excluding cells. Alternatively, cells were treated with Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (TLC, 0.5 mg/ml, Sigma) in Hank's saline solution (MTT test). After 2 hours at 37°C and centrifugation at 200 g for 5 minutes, TLC was eliminated and 50 μl DMSO were added. Cell viability was estimated at 490 nm.

Preparation of iron complex

8-hydroxyquinoline (HQ) was dissolved in absolute ethanol (400 mM) and then diluted in water to 4 mM. Fe(III)-8-hydroxyquinoline complex (Fe(III)-HQ) was made extemporaneously by mixing equal volumes of 4 mM HQ and 2 mM FeCl₃. The Fe(III)-HQ complex was then diluted in complete medium to final working concentrations. In all experiments, the mentioned concentrations were referred to the iron concentration. The HQ concentration was double since the main compound is a complex made by 1 iron chelated by 2 HQ [20]. Control cells were treated with the same HQ concentration as in Fe(III)-HQ assays.

Cell treatments

In all experiments, PC12 cells were plated in fresh medium at a density of 40,000 cells/cm² and grown for 24 hours. MCF-7 cells were seeded at a density of 15,000 cells/cm² for proliferation experiments and at a density of 40,000 cells/cm² for experiments with following treatments.

Fe(III)-HQ complex was added to the cell medium. The cells were incubated for 40 minutes and then washed once with Hank's saline solution. After the oxidative stress-inducing treatment, the cells were placed in fresh medium for the indicated times. After 72 hours, if necessary, the medium was replaced by complete medium. H₂O₂ was directly added to the cell medium at the final indicated concentrations and left for the indicated times. When necessary, fresh medium was added to the cells 72 hours after the beginning of the treatment. Staurosporine aglycone (Sigma) 10 mM in

DMSO was added to the culture medium at the final indicated concentrations and left in contact with the cells for the mentioned times.

The same procedures were applied in the experiments with both PC12 and MCF-7 cells.

To analyze changes in nuclear morphology, the cells were incubated for 10 minutes in Hoechst 33,342 (0.02 mg/ml) before visualizing with an epifluorescence microscope.

DNA fragmentation analysis

Qualitative damages to genomic DNA were estimated by agarose gel electrophoresis. Extraction of genomic DNA was performed as described [21]. After treatment, 4×10^6 cells were collected, centrifuged at 200 g for 10 minutes, and washed once with PBS. The cells were lysed by 100 μ l of lysis buffer (1% Nonidet P40, 1% SDS, 20 mM EDTA pH 8 and 50 mM Tris-HCl pH 7.4). The cell lysates were incubated for 3 hours with proteinase K (final concentration 100 μ g/ml) at 56°C, and overnight with RNase A (final concentration 10 μ g/ml) at 37°C. DNA was purified with equal volume of tris-saturated phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), incubated in ice for 20 minutes, and centrifuged for 15 minutes at 10,000 g at 4°C. This step was repeated twice. DNA was then precipitated in 66% ethanol. DNA samples (10 μ g of DNA/lane) were separated by electrophoresis on 1.4% agarose gel in TAE buffer. Gels were soaked in ethidium bromide and DNA was visualised under UV light.

QSOX1 mRNA level analysis

Total RNAs were extracted as previously described [22]. Five million cells were collected, centrifuged at 200 g for 10 minutes, and washed once with PBS. The cells were lysed by 1 ml of lysis buffer (4.2 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7, 0.5% sarcosyl and 100 mM β -mercaptoethanol). RNAs from 500 μ l of cell lysate were extracted with 40 μ l sodium acetate 2 M pH 4, 800 μ l water saturated phenol and 80 μ l chloroforme-isoamyl alcohol (24:1), incubated in ice for 20 minutes, and centrifuged for 15 minutes at 10,000 g at 4°C. RNAs in the aqueous phase were

precipitated by the addition of an equal volume of cold isopropanol, left at -20°C for 50 minutes, and centrifuged. The pellets were washed twice with sodium acetate 3 M pH 5.2 and 66% ethanol before being dissolved in water. The RNA quality was verified on a 1.4% agarose gel prior to analysis.

For the northern blot analysis, 40 µg of total RNAs were electrophoretically separated on a 1.2% agarose gel. After northern blotting onto nylon membrane, mRNAs were hybridized with a [³²P]-labelled cDNA probe corresponding to the nucleotides 16-813 of the rat *QSOX1-S* cDNA. The hybridization and washing conditions have been previously described [1].

For real time RT-PCR analysis, two µg of total RNAs were reverse transcribed using an oligodT₍₂₀₎ primer (1.5 µM) with a first strand buffer containing dNTP (0.5 mM), 0.01 M DTT, and 10 units of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) at 42°C for 50 minutes. Quantitative PCR was performed with 1 µl SYBRGreen PCR master mix (Roche Applied Science), 2 µl of single strand cDNA sample, 1 µl of each primer (10 µM), and 2.4 µl MgCl₂ (25 mM) in a 20 µl final volume. cDNA was amplified in the thermocycler as follows: 95° C for 8 minutes, then 40 cycles of 95° C for 5 seconds, 60° C for 5 seconds, and then 72°C for 12 seconds. The primer set used for rat *QSOX1* (GenBank Accession Number AF285078 [23]) was 5'-TGA AGA AAA CGC ATC CCT TC-3' (sens) and 5'-ACC ACA CCA CCT CGA GCT AC-3' (reverse). *QSOX1* PCR was normalized with a control PCR made on H3.3 like histone H3B-2 cDNA with the primer set 5'-GTG GTA AAG CAC CCA GGA A-3' (sens) and 5'- GCT AGC TGG ATG TCT TTT GG-3' (reverse) [23].

Immunocytochemistry and cell cycle analysis

Cells were treated with Fe(III)-HQ 5 µM or H₂O₂ 100 µM during the indicated time, washed in PBS, and fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 minutes. They were made permeable with 0.5% saponin in PBS and incubated with anti-rat *QSOX1* polyclonal antibody [24] for 30 minutes. After PBS wash, cells were incubated with anti-rabbit immunoglobulin FITC-conjugated secondary

antibody (Fluoprobes 488, Interchim) and subjected to fluorescence analysis using FACSCalibur (Becton Dickinson). Background labelling was estimated by incubation with the secondary antibody alone. Cells were considered positive when their fluorescence was higher than background.

For the cell cycle studies, the cells were marked with 2.5 μ M propidium iodide and the fluorescence data were analyzed with the Wincycle software (Beckman-Coulter). In some experiments, the analysis concerned only the cycling cells and ignored the sub-G1 cells and cell doublets.

TUNEL assay

MCF-7 cell apoptosis was detected by labelling DNA strand breaks with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) which catalyzes polymerisation of fluorescein-labelled nucleotides to free 3'-OH DNA ends. TUNEL-reaction was performed as described by manufacturer (*In situ* cell death detection kit, fluorescein, Roche). Briefly, MCF-7 cells were collected 24 hours after treatments with Fe(III)-HQ or H₂O₂, washed with PBS, and fixed with 2 % PFA for 30 minutes. Cells were washed and incubated with 0.1 % Triton X-100 in 0.1 % sodium citrate for 2 minutes on ice. Then, the cells were washed and suspended in 50 μ l TUNEL reaction medium. The negative controls received 50 μ l labelling solution without TdT enzyme in order to estimate the background fluorescence. Samples were incubated for 60 minutes at 37°C in the dark and washed twice with PBS. Fluorescein labels incorporated in nucleotide polymers were detected and quantified by flow cytometry. Cells were considered positive when showing a fluorescence higher than the background. The percentage of TUNEL-high stained cells was determined.

Determination of mitochondrial membrane polarization by flow cytometry

Changes in mitochondrial membrane polarization were evaluated using 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆(3)), a lipophilic cationic dye which accumulates into

polarized mitochondria. MCF-7 cells were treated with 5 μM Fe(III)-HQ or 700 μM H_2O_2 (as previously described). After 24 hours of treatment, cells were collected, washed in PBS, and incubated with 40 nM DiOC₆-(3) in DMEM for 30 minutes at 37°C in the dark. Fifteen minutes before the addition of DiOC₆-(3), a part of the control cells was incubated with 200 μM carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) as a positive control of mitochondria depolarization. Addition of 2.5 μM propidium iodide immediately before flow cytometry analysis allowed exclusion of necrotic cells. The percentage of DiOC₆-(3)-highly stained cells was determined.

Data analysis

Statistical significance between the two sets of data was evaluated by using an ANOVA followed by the Fischer LSD test (QSOX1 mRNA expression) or by Tukey HSD test (MCF-7/pcDNA versus MCF-7/QSOX1) with R software.

Results

Iron, H₂O₂ and staurosporine aglycone induce a concentration-dependent PC12 cell death.

PC12 cells were incubated with either a Fe(III)-HQ complex or hydrogen peroxide to induce oxidative stress. Staurosporine aglycone was also used as a promoter of cell apoptosis. As shown in figure 1, cell death was induced in a concentration dependent manner by the three treatments. Less than 50% of cell viability was obtained with 5 μM Fe(III)-HQ, 100 μM H_2O_2 , or with 20 μM staurosporine aglycone. Treatment with 5 μM Fe(III)-HQ was the strongest oxidative stress inducer since a brief 40 minute exposure reduced cell viability to 35% after 24 hours. A longer exposure to Fe(III)-HQ resulted in an almost complete cell mortality (not shown). For the following experiments, the 5 μM Fe(III)-HQ, 100 μM H_2O_2 , and 20 μM staurosporine aglycone concentrations were chosen as working concentrations since all three usually caused between 60% to 70% cell death.

Mannitol has been described as a free radical scavenger [25]. A 45 minute incubation with 100 mM mannitol prior to the oxidative treatments increased the number of living cells, indicating that H₂O₂ or Fe(III)-HQ complex induced the indirect production of hydroxyl radical OH[•] (not shown).

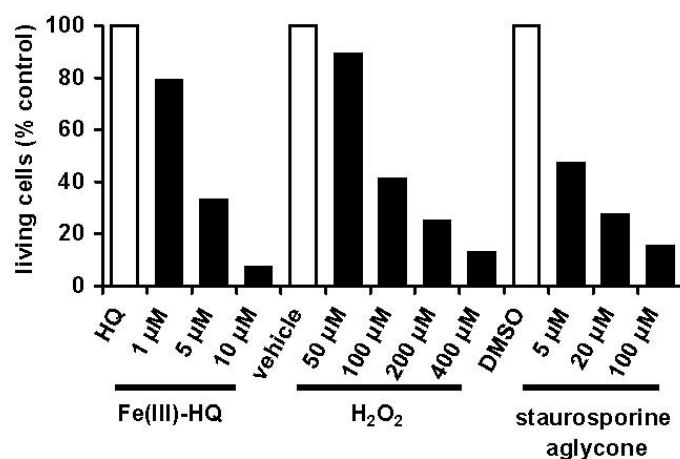


Figure 1: Dose-dependent PC12 cell death induced by the complex Fe(III)-HQ, H₂O₂ or staurosporine aglycone.

PC12 cells were plated at 40,000 cells/cm². Some cells were treated with Fe(III)-HQ for 40 minutes and then were back to complete medium for 24 h. Some cells were treated with H₂O₂ or staurosporine aglycone in 0.2% DMSO for 24 h. Living cells (excluding Trypan blue) were counted 24 hours after the beginning of treatments. 100 % represents the number of cells in the untreated PC12 control cells at 24 hours. The experiment was done 3 times; the results of one experiment is representative of the overall experiments.

Iron, H₂O₂ and staurosporine aglycone induce apoptosis.

To investigate whether the diminution of living cells reported in figure 1 was due to necrosis or apoptosis, chromatin condensation, internucleosomal fragmentation and sub-G1 cell fraction were analyzed on PC12 cells submitted to oxidative stress. As a positive control of apoptosis, cells were incubated in the presence of 20 μM staurosporine aglycone. Nuclei were then stained with the reagent Hoechst 33 342 to visualize chromatin. Normal nuclei (control) presented homogeneous chromatin dispersed over the entire nucleus (Figures 2A, C, E). Cells treated with staurosporine aglycone or submitted to oxidative stress showed condensed chromatin and fragmentation of nuclei

(Figures 2B, D, F). Internucleosomal fragmentation of DNA was also investigated. At different times after treatment with 5 μM Fe(III)-HQ, 100 μM H_2O_2 or 20 μM staurosporine aglycone, genomic DNA was extracted and electrophoresed. The DNA cleavage was detectable at 8 hours (not shown) of H_2O_2 treatment and peaked at 24 hours (Figure 2G). Indeed, control cell DNA (HQ, vehicle and DMSO) was not fragmented, whereas DNA extracted from iron-, H_2O_2 -, and staurosporine aglycone-treated cells presented the usual ladder pattern. PC12 cell DNA content was also analyzed by flow cytometry and the sub-G1 fraction increased notably after oxidative stress (Figure 2H). These observations supported the hypothesis that at least some of the PC12 cells died by apoptosis after oxidative treatments.

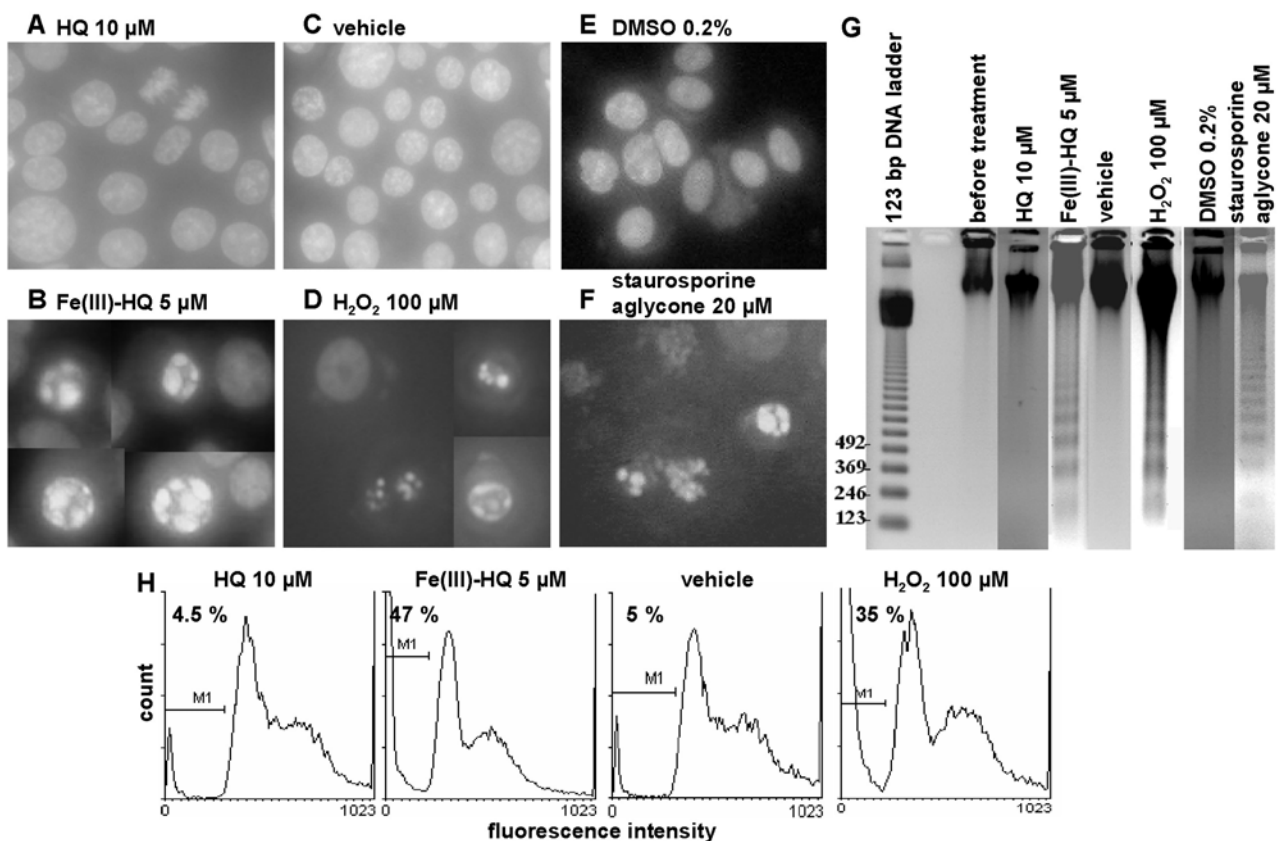


Figure 2: Apoptosis of PC12 cells treated with Fe(III)-HQ, H_2O_2 or staurosporine aglycone.

A-F. PC12 cells (plated at 40,000 cells/cm²) were incubated with HQ (A) or with 5 μM Fe(III)-HQ for 40 minutes (B), without (vehicle, C) or with 100 μM H_2O_2 for 24 hours (D), DMSO 0.2% (E) or 20 μM staurosporine aglycone (F) for 24 hours. 24 hours after the beginning of treatments, cells were labelled with Hoechst 33 342 fluorescent marker. **G.** Agarose gel electrophoresis analysis of DNA fragmentation. PC12 cells were treated as described for A-D. The genomic DNA was extracted 24 hours after the beginning of treatment. 10 μg of DNA were analysed by electrophoresis on 1.4 % agarose gel and visualized on U.V. light after incubation in ethidium bromide. **H.** Flow cytometry analysis of the PC12 DNA content. Cells were treated as described for A-D and labelled with propidium iodide. Then the cell fluorescence was recorded. The sub-G1 cell fraction was expressed as a percentage of the whole events.

Iron and H₂O₂ induce cell growth arrest.

The growth curves of PC12 cells treated or not with 5 μ M Fe(III)-HQ or 100 μ M H₂O₂ were established in order to identify when the cells were rescued from the treatment and recovered a normal exponential growth. The results presented in figure 3A showed that cells cultured in complete medium or in the presence of hydroxyquinoline had a normal exponential growth.

In contrast, the number of cells treated with 5 μ M Fe(III)-HQ decreased by about 50% during the 24 first hours following the 40 minute treatment. Some cells were still dying 48 hours after the oxidative stress. After this dramatic cell death, the number of living cells remained constant for 5 days following treatment indicating that the cells were no longer dying but not yet dividing. It is also possible that some cell divisions would compensate for the remaining cell death. Five days later, iron-treated cells were normally growing.

In the case of cells treated with 100 μ M H₂O₂, the living cell number decreased during the 24 first hours of treatment. Afterwards, the number of hydrogen peroxide-treated cells increased slowly. 72 hours after treatment, the cell population was exponentially growing (Figure 3A).

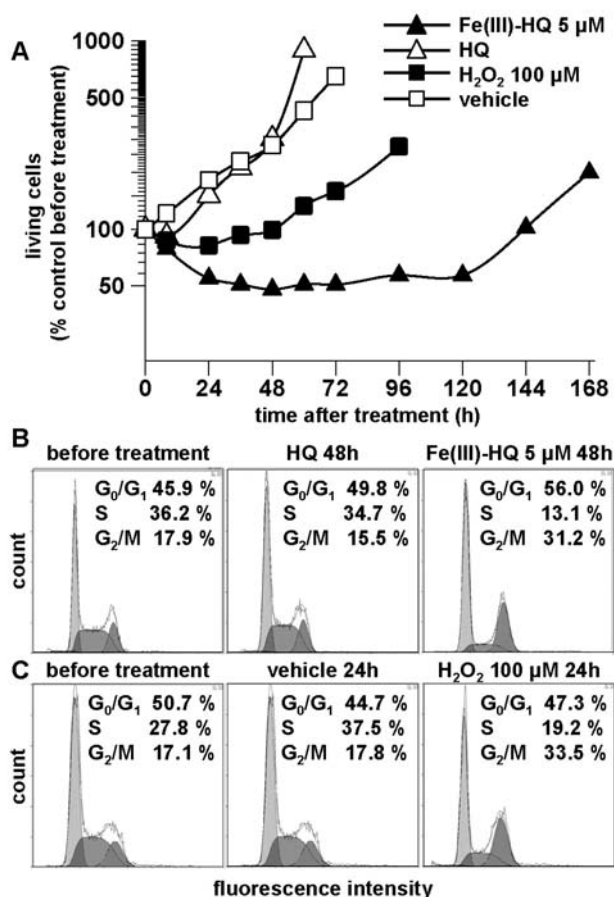


Figure 3: Iron and H₂O₂ induce PC12 cell growth arrest.

PC12 cells (plated at 40,000 cells/cm²) were treated with 5 μ M Fe(III)-HQ for 40 minutes, and then were back to complete medium, or treated with 100 μ M H₂O₂.

A. At the indicated times, Trypan Blue-excluding living cells were counted. Data are expressed relatively to the cell number before treatment (time zero).

B, C. Cells were fixed and labelled with propidium iodide before being analysed with FACS. For the analysis, only the living cells were taken into account. The sub-G1 peak corresponding to the dead cells was ignored.

The DNA content of cycling cells were analyzed in order to determine in which cell cycle phase they were arrested. The flow cytometry analysis shown in figures 3B and 3C indicated a preferential decrease of the S population and an increase of the G₂/M population when the cells were incubated in the presence of 100 μ M H₂O₂ or 5 μ M Fe(III)-HQ.

The levels of QSOX1 mRNA and of QSOX1 protein increased after the oxidative stress.

The relative level of *QSOX1* mRNA was assessed by quantitative real time RT-PCR and the results are presented in figures 4B and 4C. The PCR using the primers chosen did not distinguish between the long and the short forms of the *QSOX1* messenger. Indeed, a northern blot analysis showed that the *QSOX1-S* mRNA was much more expressed than the *QSOX1-L* mRNA but both transcripts seemed to increase under the oxidative Fe(III)-HQ treatment (Figure 4A).

In control cells (figure 4B and 4C), the level of *QSOX1* mRNA was low and did not vary. There was no rapid increase of *QSOX1* mRNA level when the cells were treated 8 hours with Fe(III)-HQ or 12 hours with H₂O₂. An increase of *QSOX1* mRNA level started 24 hours after the treatments. The maximum was obtained 48 hours after the 40 minute treatment with Fe(III)-HQ. Then, the mRNA level seemed to decrease and to reach the same level as the HQ control at 72 hours after the treatment. When oxidative stress was induced by 100 μ M H₂O₂, a progressive increase of *QSOX1* mRNA level was observed at 24 hours that was sustained until 72 hours.

To investigate the QSOX1 protein level, a flow cytometry analysis was made by using antibodies raised against the rat QSOX1-S protein [24]. The results presented in figures 4D and 4E showed an increase of the protein content as well as an increase of the percentage of QSOX1 positive cells after oxidative stress. The protein induction was observed from 24 hours after treatment until 60 hours. The decrease of QSOX1 protein level started after 72 hours (not shown).

In an attempt to correlate QSOX1 protein overexpression with an arrest in a definite cell cycle phase, the DNA content of the QSOX1 expressing cells was also analyzed. The analysis was done on every time point of the kinetic but only the results of one point are presented in figure 5.

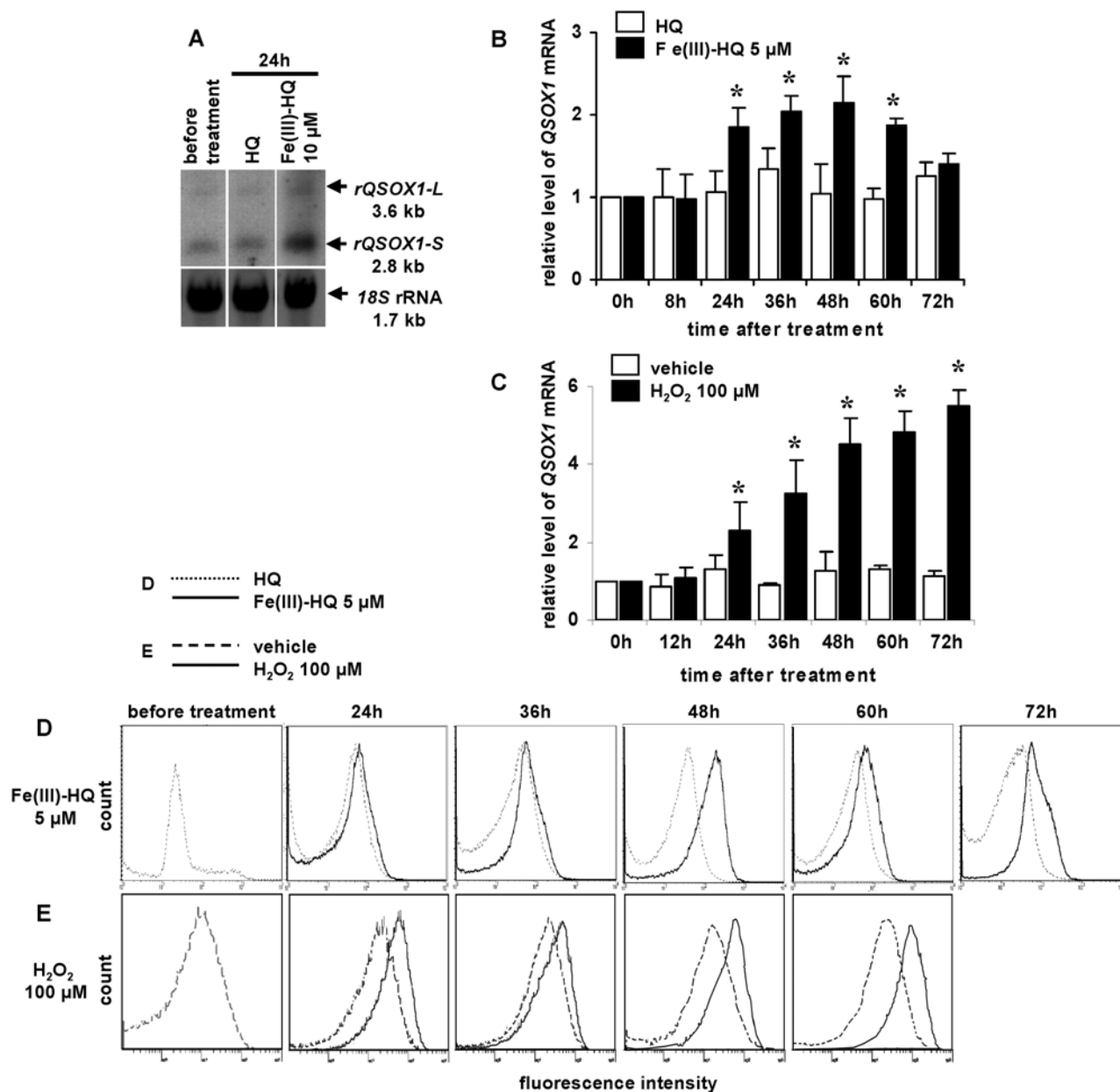


Figure 4: Iron- or H₂O₂-induced variations of relative level of *QSOX1* mRNA and protein in PC12 cells.

PC12 cells (plated at 40,000 cells/cm²) were treated with HQ or with 5 μM Fe(III)-HQ for 40 min. The treatment medium was then replaced by fresh complete medium. Cells treated with 100 μM H₂O₂ were kept in presence of the H₂O₂ containing medium as long as indicated in the figures. **A**. Northern blot analysis was performed on total RNAs extracted from Fe(III)-HQ-treated cells. The blot was hybridized with a rat *QSOX1* cDNA probe able to bind both *QSOX1-S* and *QSOX1-L* mRNAs. The normalization was done with the 18 S rRNA detected by ethidium bromide staining. **B, C**. Total RNAs were extracted from adherent cells as well as from cells in suspension. The RNA integrity was verified by gel electrophoresis and ethidium bromide staining before a reverse transcription was performed on 2 μg of total RNAs. Histone *H3B-2* mRNA was used for normalisation since it is 3'-polyadenylated. Furthermore, the gene *H3B-2* is not regulated. Data are means ± S.D. of 4 (**B**) or 3 (**C**) independent experiments. * indicates a significant difference between the level of *QSOX1* mRNA in treated cells (Fe(III)-HQ or H₂O₂) compared to the level of *QSOX1* mRNA before treatment, at P < 0.01. **D, E**. Cells were fixed and incubated with anti-*QSOX1* antibody and then with FITC-conjugated secondary antibody before being analysed by FACS. To estimate background labelling, cells were incubated with the secondary antibody alone. **D**. PC12 cells treated with HQ (dotted line) or 5 μM Fe(III)-HQ (solid line). **E**. PC12 cells treated without (vehicle in dashed line) or with 100 μM H₂O₂ (solid line).

No obvious link was observed that would suggest a preferential QSOX1 protein expression in a specific cell cycle phase. Indeed, the level of QSOX1 protein and the number of QSOX1 positive cells increased in the G₀/G₁ as well as in the S and G₂/M sub-populations. On the other hand, sub-G1 cells did not present an increase in QSOX1 protein expression (not shown).

High concentrations of H₂O₂, chosen to induce apoptosis, caused an increase of QSOX1 mRNA and protein. But, at low concentrations, H₂O₂ is also described as a signalling molecule [26]. Therefore, the regulation of *QSOX1* mRNA expression was studied when PC12 cells were treated with lower H₂O₂ concentrations (10 and 50 μM) that were not able to induce cell death (not shown). Neither *QSOX1* mRNA nor QSOX1 protein varied under these conditions (not shown).

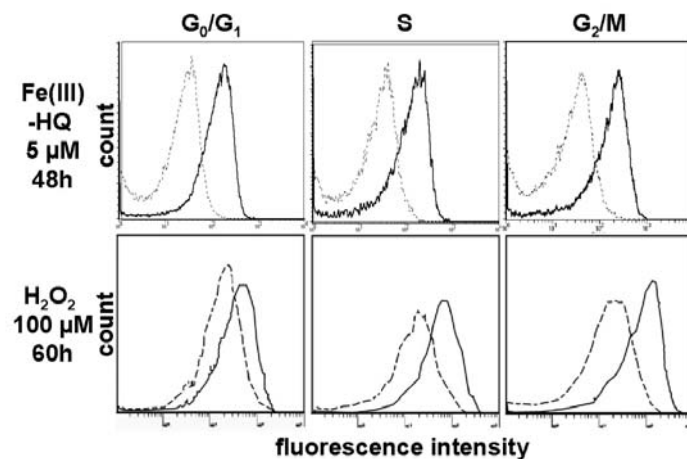


Figure 5: Iron- or H₂O₂-induced variations of QSOX1 protein level during cell cycle phases in PC12 cells.

PC12 cells (plated at 40,000 cells/cm²) were cultured and treated with 5 μM Fe(III)-HQ for 40 minutes, and then were back to complete medium for 48 hours, or with H₂O₂ 100 μM for 60 hours. At the indicated times, cells were fixed and incubated with anti-rat QSOX1 antibody, then with FITC-conjugated secondary antibody and finally were incubated with propidium iodide before being analysed with FACS. To estimate background labelling, cells were incubated with the secondary antibody alone. Top panel: PC12 cells treated with HQ (dotted line) or Fe(III)-HQ 5 μM (solid line). Bottom panel: PC12 cells treated without (vehicle in dashed line) or with H₂O₂ 100 μM (solid line).

Guinea pig QSOX1-S overexpression slows down proliferation and protects cells from oxidative stress-induced cell death.

We had previously transfected human mammary cancer MCF-7 cells with a pcDNA3.1-guinea pig *QSOX1-S* expression vector and established 3 MCF-7 cell lines overexpressing the short

guinea pig QSOX1 protein (gpQSOX1) (clones MCF-7/QSOX1-a, MCF-7/QSOX1-b and MCF-7/QSOX1-c) and 3 MCF-7 control cell lines transfected with the empty vector (clones MCF-7/pcDNA-A, MCF-7/pcDNA-B and MCF-7/pcDNA-C) [27]. The QSOX1 overexpression was analyzed by cytometry with a polyclonal antibody raised against the recombinant purified guinea pig QSOX1 protein [24]. The results presented in figure 6 showed a low level of human QSOX1 protein and moreover confirmed the overexpression of QSOX1 in the 3 stable cell lines compared with the empty vector-transfected cells. The proliferation of the different kinds of cell lines was compared and it appeared that the ectopic expression of gpQSOX1 slowed down cell growth (Figure 7).

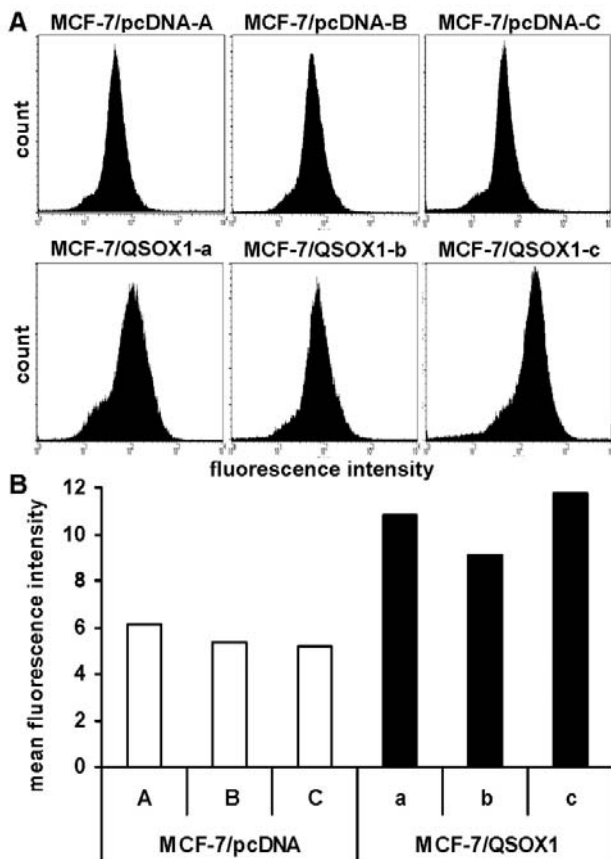


Figure 6: Ectopic expression of the guinea pig QSOX1-S protein in MCF-7/QSOX1 cells.

A. Control MCF-7/pcDNA and MCF-7/QSOX1 cells were collected at about 70 % of confluence. Fixed cells were incubated with anti-QSOX1 antibody and then with FITC-conjugated secondary antibody before being analysed by FACS. **B.** Quantitative analysis of QSOX1 fluorescence in MCF-7/pcDNA and MCF-7/QSOX1 cells.

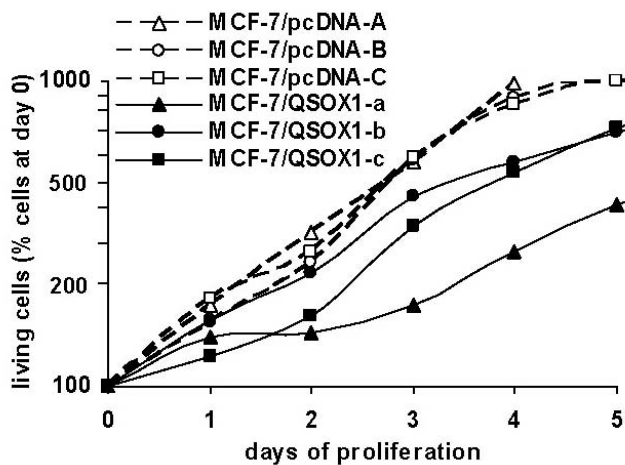


Figure 7: Cell proliferation of MCF-7/pcDNA and MCF-7 overexpressing the guinea pig QSOX1-S protein.

MCF-7/pcDNA and MCF-7/QSOX1 cells were plated at 15,000 cells/cm². Every day, cells were incubated with TLC solution for 2 hours and cell viability was estimated at 490 nm. Data are expressed relatively to the living cell number at day 0.

The different MCF-7 cell lines were then submitted to an oxidative stress induced by H₂O₂ or by the elevation of the cytoplasmic iron concentration or treated with staurosporine aglycone. The number of living cells was estimated by the MTT test. MCF-7 appeared to be more resistant to H₂O₂-induced oxidative stress than PC12 cells. A 700 μM H₂O₂ concentration was necessary to obtain 50 % of MCF-7 cell death whereas a 100 μM concentration was high enough to kill 50 % of PC12 cells (not shown). The results presented in figure 8B clearly indicate that the expression of gpQSOX1 protected the MCF-7/QSOX1 cells against oxidative stress-induced cell death. This effect was significantly observed on the three QSOX1-overexpressing cell lines under both oxidative treatments. When cells were treated with staurosporine aglycone, MCF-7/QSOX1-b and -c clones resisted to cell death but no significant protection on MCF-7/QSOX1-a clone was obtained. The same effects could also be observed 48 hours after treatment (not shown). The corresponding control treatments (HQ, vehicle or DMSO) induced no differences in the viability of the MCF-7/pcDNA cells versus MCF-7/QSOX1 cells (Figure 8A).

To assess that the survival of QSOX1 overexpressing MCF-7 was due to a decrease of apoptosis, a TUNEL assay was run that quantifies apoptotic cells. Only the data obtained with the clone c of QSOX1 overexpressing MCF-7 versus the clone C of pCDNA-empty vector transfected MCF-7 are given in figure 9. The TUNEL results confirm those obtained for cell viability. Indeed, figure 9 shows that 30 to 35% of the MCF-7/pcDNA-C cells were TUNEL-positive when treated with iron or H₂O₂. No significant TUNEL-positive population of MCF-7/QSOX1-c cells was

recorded after oxidative injuries. The same experiment was done twice on the other clones and gave similar results (not shown).

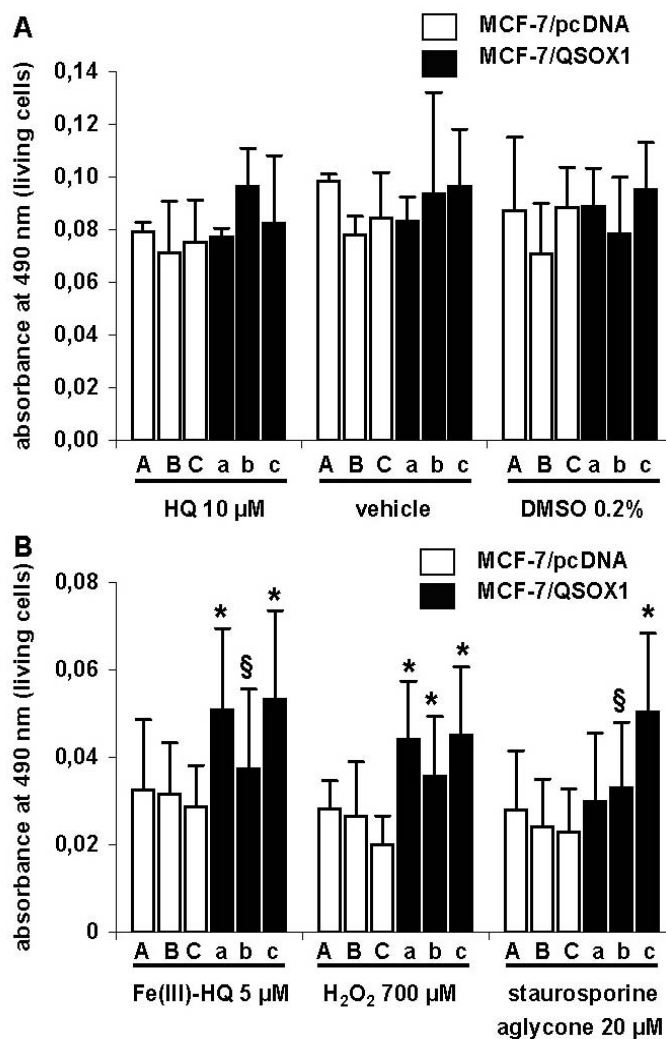


Figure 8: Cell death of MCF-7/pcDNA and MCF-7 overexpressing the guinea pig QSOX1-S protein.

MCF-7/pcDNA and MCF-7/QSOX1 cells (plated at 40,000 cells/cm²) were treated with 5 μM Fe(III)-HQ or 10 μM HQ for 40 min, and then were back to complete medium for 24 hours, treated or not with 700 μM H₂O₂ for 24 hours or treated with 20 μM staurosporine aglycone or 0.2% DMSO for 24 hours. 24 hours after the beginning of treatment, cells were incubated with TLC solution for 2 hours and cell viability was estimated at 490 nm. Data are means \pm S.D. of 8 independent experiments (Fe(III)-HQ/HQ and H₂O₂ or vehicle) or 4 independent experiments (staurosporine aglycone/DMSO). The data obtained with the control treatments (HQ, vehicle and DMSO) are presented in the upper panel (A). The data obtained with the death inducing treatments (Fe(III)-HQ, H₂O₂ and staurosporine aglycone) are presented in the lower panel (B). * indicates a significant difference, at P < 0.001, between MCF-7/QSOX1 clones compared to any of the three MCF-7/pcDNA clones and § indicates a significant difference between MCF-7/QSOX1 clones and 2 of the MCF-7/pcDNA clones.

The molecular mechanism of apoptosis decrease was assessed by measuring mitochondria depolarization. Cells were labelled with a fluorescent compound (DiOC₆(3)) sensitive to the mitochondria inner membrane potential. Only cells with polarized mitochondria were fluorescent. As shown in figure 10, in the QSOX1 overexpressing MCF-7 cells, the mitochondria kept an inner mitochondrial membrane potential. On the other hand, the mitochondria of MCF-7/pcDNA cells showed a decrease in the polarization induced by the oxidative treatments. The protective effect was observed in the 3 MCF-7/QSOX1 cell lines.

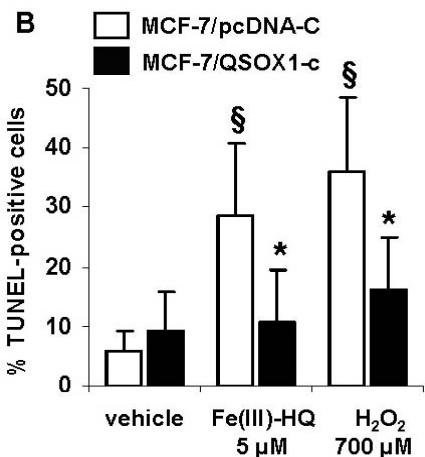
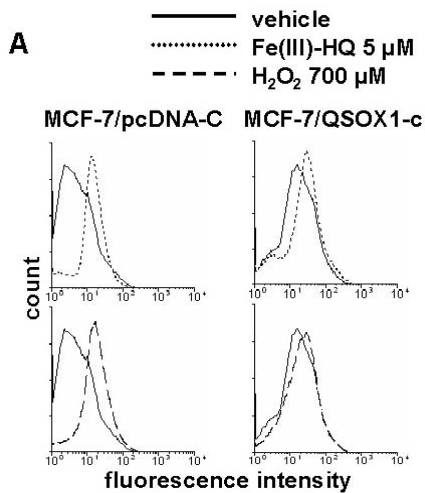


Figure 9 : TUNEL quantification of apoptosis of MCF-7/pcDNA and MCF-7 overexpressing the guinea pig QSOX1-S protein.

MCF-7/pcDNA-C and MCF-7/QSOX1-c cells (plated at 40,000 cells/cm²) were treated with 5 μM Fe(III)-HQ for 40 min, and then were back to complete medium, or treated with 700 μM H₂O₂. 24 hours after the beginning of treatment, cells were collected, fixed and incubated with TUNEL-reaction medium for 60 minutes. Cells were finally analysed by flow cytometry.

A. Flow cytometry analysis of MCF-7/pcDNA or MCF-7/QSOX1 cells treated without (vehicle in solid line) or with 5 μM Fe(III)-HQ (dotted line) or 700 μM H₂O₂ (dashed line). Results presented are representative of 7 experiments.

B. Data are means ± S.D. of 7 independent experiments for MCF-7/pcDNA-C and MCF-7/QSOX1-c clones. * indicates a significant difference, at P < 0.05, between MCF-7/QSOX1-c clone compared to the MCF-7/pcDNA-C clone for the same treatment. § indicates a significant difference between Fe(III)-HQ or H₂O₂ treated cells versus the vehicle-treated control cells.

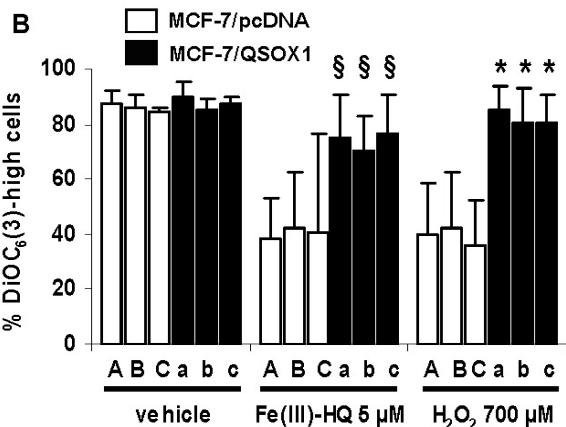
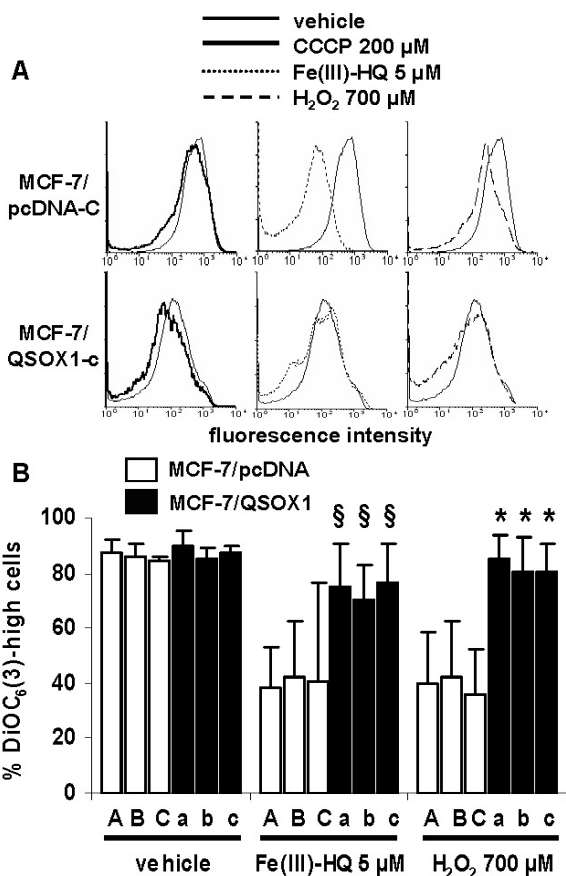


Figure 10 : Mitochondria depolarization induced by the treatment with Fe(III)-HQ or H₂O₂ in MCF-7/pcDNA and MCF-7 overexpressing the guinea pig QSOX1-S protein.

MCF-7/pcDNA and MCF-7/QSOX1 cells (plated at 40,000 cells/cm²) were treated with 5 μM Fe(III)-HQ for 40 min, and then were back to complete medium, or treated with 700 μM H₂O₂. 24 hours after the beginning of treatment, cells were collected and incubated with DiOC₆(3). Depolarization due to the uncoupling reagent CCCP was used as a positive control.

A. Flow cytometry analysis of MCF-7/pcDNA or MCF-7/QSOX1 cells treated without (vehicle in solid line) or with 5 μM Fe(III)-HQ (dotted line) or 700 μM H₂O₂ (dashed line). Results presented are representative of 4 experiments.

B. Quantification of cells having polarized mitochondria. Data are means ± S.D. of 4 independent experiments. * indicates a significant difference, at P < 0.05, between every MCF-7/QSOX1 clone compared to any of the three MCF-7/pcDNA clones and § indicates a significant difference between every MCF-7/QSOX1 clone and the MCF-7/pcDNA-A clone.

Discussion

QSOX1 is a sulfhydryl oxidase very likely involved in the regulation of the redox state of proteins [12, 13] and its overexpression in G₀-arrested cells seem to connect it to the negative control of the cell cycle [1]. In the present paper, we investigated the effects of oxidative stress on QSOX1 mRNA and protein expression in PC12 cells. PC12 cells were treated with H₂O₂ or with iron. H₂O₂ is a frequently used oxidative stress inducer in a large range of treatment concentrations and times. As previously described [20], iron was used as a lipid soluble complex Fe(III)-Hydroxyquinoline. In this form, iron crosses the plasma membrane, the free iron intracellular concentration increases, and consequently induces a very potent effect. Via Fenton-Haber chemistry, ferrous ion interacts with hydrogen peroxide (H₂O₂) to produce hydroxyl radicals that damage cell proteins, lipids and DNA [28]. As expected, iron, H₂O₂ and staurosporine aglycone induced a concentration-dependent PC12 cell death. Mannitol, described as a free radical scavenger [25], partially rescued PC12 cells from iron- and hydrogen peroxide-induced cell death indicating that, in both cases, cell death was induced by OH[•] formation. Furthermore, the presence of fragmented nuclei with condensed chromatin, the genomic DNA fragmentation, and the increase of the sub-G1 cell fraction indicate that H₂O₂- or iron-treated cells died by apoptosis. The same pattern was also obtained with staurosporine aglycone, used in our experiments as an apoptosis positive control.

Numbering the living cells during and after the oxidative stress was a way to follow the death and the recovery of PC12 cells. In the experiments with Fe(III)-HQ, the number of living cells decreased during the first day. Then, the part of living cells remained stable during the 4 next days, indicating that the surviving cells were not yet in a state of being able to proliferate. FACS analysis of DNA content confirmed the arrest of the cell cycle as attested by the increase of the G₂/M peak. Proliferation started again 5 days after treatment and the growing rate was then similar to the rate of the untreated cells. In the H₂O₂ treatment, the recovery of the cells was faster as attested by the resumption of proliferation happening as soon as 48 hours post-treatment. The

comparison of these 2 curves suggests that iron-induced oxidative stress was more important and cell injuries stronger, likely due to the efficiency of free Fe^{++} to catalyze the hydroxyl radical production.

The *QSOX1* mRNA level was analyzed by quantitative RT-PCR and the QSOX1 protein was estimated by immunolabelling and FACS analysis.

Preliminary northern blot experiments revealed that *rQSOX1-L* mRNA was much lower expressed than the short one. However, both forms were regulated in the same way and with the same induction factor. Therefore, we carried on the experiments on *QSOX1* mRNA expression without discriminating the long from the short *QSOX1* transcript. Although overexpression of *QSOX1* mRNA was observed in both iron and H_2O_2 treatments, the level of *QSOX1* mRNA was much higher when cells were incubated with 100 μM H_2O_2 than with 5 μM Fe(III)-HQ complex (6 fold versus 2 fold increase).

Following the accumulation of the *QSOX1* mRNAs, an increase of QSOX1 proteins was recorded in the living cells but not in the sub-G1 cell fraction. By flow cytometry analysis, only the cellular QSOX1 protein was quantified while the extracellular fraction was not taken into account. However, this cellular fraction reflects both resident and addressed proteins which are transiently present in the secretory pathway organelles.

Thus, an increase of QSOX1 expression was detected both at the mRNA and the protein levels. *QSOX1* mRNA and QSOX1 protein started to accumulate 24 hours after the beginning of the treatment. This overexpression appeared rather lately when apoptosis was already ongoing and went along with the recovery of the culture. These results seem to exclude QSOX1 from being an actor in the apoptosis process. The higher overexpression of QSOX1 in H_2O_2 treated cells could explain why the cells rescued better from the oxidative damages induced by H_2O_2 .

In order to give more evidence supporting this positive function of QSOX1 on cell relief, we applied the same oxidative stress to human breast cancer MCF-7 cell lines previously established in our laboratory [27]. MCF-7 cells were transfected with either pCDNA3.1 empty vector (control cell

lines) or pCDNA3.1 in which the guinea pig *QSOX1-S* coding sequence was cloned. When MCF-7 cells were treated with either H₂O₂ or Fe(III)-HQ, the decrease of the living cell number was attenuated by the overexpression of QSOX1. This effect was less obvious but still present when MCF-7 cells were treated with staurosporine aglycone. This difference in the living cell number could not be attributed to an increase in proliferation induced by QSOX1 since we showed that QSOX1 overexpression slowed down the proliferation rate of MCF-7 cells. Furthermore, when cells were treated with Fe(III)-HQ or H₂O₂ and then submitted to TUNEL assay, a significant difference was observed between MCF-7/pcDNA and MCF-7/QSOX1. The overexpression of QSOX1 seemed to offer a protection against apoptosis induced by oxidative stress in MCF-7 cells. These results are in good agreement with results previously obtained in our group. We have previously shown an accumulation of *QSOX1* mRNA in guinea pig endometrial cells in primary culture after these normally growing cells had been serum depleted for 60 hours [1]. Such a long serum depletion may have also induced apoptosis by privation of mitotic stimulation. Overexpression of QSOX1 might have helped cells to survive. Such a positive role of QSOX1 in the survival, the rescue, or the regeneration of cells or tissues has also been indirectly suggested by experiments on olfactory epithelium in mice [29]. QSOX1 protein was detected in the cells of the *lamina propria* but not in the olfactory neurons of the olfactory mucosa. Intranasal perfusion of ZnSO₄ led to a destruction of the olfactory mucosa and to a concomitant disappearance of QSOX1 mRNA and protein expression in the cells of the *lamina propria* that were not destroyed by ZnSO₄. The regeneration of the mucosa, which was observed 25 days later, occurred at the same time as the restoration of QSOX1 mRNA and protein expression.

Our experiments suggest a link between oxidative stress-induced apoptosis and QSOX1 expression. This connection has also been pointed out by another work [6]. These authors have been looking for genes that sensitized neuroblastoma cells to apoptosis. Using an antisense cDNA library to randomly inactivate a death-promoting gene, they have isolated *QSOX2* as a candidate able to increase the sensibility of Tet21N neuroblastoma cells to apoptosis induced by interferon γ and the

tetracycline-inducible MYCN gene expression. Concerning the role of the FAD-dependent sulfhydryl oxidase in apoptosis, the results obtained with QSOX1 and QSOX2 appeared contradictory. Indeed, QSOX1 and QSOX2 proteins share common features but also present differences like their sub-cellular localization. Furthermore, it has not been established yet whether the two genes encode proteins that express different functions or take on redundancy in their function. The question that remains is the precise nature of their substrates that may be different because of their different localizations in the cell. Then, QSOX1 and QSOX2 could display opposite functions depending on their own substrates, the cell type, and the apoptosis inducer.

The mechanism by which QSOX1 diminishes apoptosis remains to be elucidated. A first response element is given by our observation that the mitochondria of QSOX1 overexpressing cells remain polarized allowing the cells to continue their ATP synthesis. It is known that, in apoptotic cells, the uncoupling of oxidative phosphorylation causes the reverse mode activation of ATP synthase leading to ATP hydrolysis rather than ATP synthesis. The depletion in intracellular ATP leads to dysfunction of ATP dependent processes and turn on degradative enzymes. The opening of the mitochondrial Permeability Transition Pore (PTP) results in the loss of inner membrane potential as well as in the liberation of mitochondrial pro-apoptotic molecules such as cytochrome c [30]. It will be very interesting to investigate how QSOX1 influences the assembly or the biological activity of PTP as well as the function of other actors of the apoptotic process.

No information is available so far on estrogen regulation of *QSOX1* in the brain. However, the link between estrogens, neuroprotection, and QSOX1 expression and function remains to be elucidated. Nevertheless, the possibility that QSOX1 proteins may regulate the oxido-reduction state of proteins, and thus their biological function, emphasize the interest of their study.

Acknowledgments

We thank Pr Esnard (INSERM, U-618, Tours, F-37000 France, Université François Rabelais, Tours, F-37032, France), for the gift of antibodies against the rat QSOX1, Pr Marie (EA 3659 Pharmacodynamie et Physiologie pharmaceutique University of Bourgogne) for providing us the Fe(III)-HQ model for oxidative stress and Dr Michael Wilson (University of California San Diego, Department of Emergency Medicine) for the english editing. We are grateful to Dr Raoul (laboratoire de Biologie Environnementale, University of Franche-Comte) for helping us with statistical analysis of data. This work was supported by La Ligue Nationale Contre le Cancer du Jura and the City of Besançon for C. Morel PhD fellowship.

References

1. J.F. Musard, M. Sallot, P. Dulieu, A. Fraïchard, C. Ordener, J.P. Remy-Martin, M. Jouvenot, P. Adami, Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287 (2001) 83-91.
2. J. Radom, D. Colin, F. Thiebault, M. Dognin-Bergeret, G. Mairet-Coello, A. Esnard-Feve, D. Fellmann, M. Jouvenot, Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain, *Biochim. Biophys. Acta* 1759 (2006) 225-233.
3. D.L. Coppock, C. Kopman, J. Gudas, D.A. Cina-Poppe, Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 (2000) 604-610.
4. S. Chakravarthi, C.E. Jessop, M. Willer, C.J. Stirling, N.J. Bulleid, Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, *Biochem. J.* 404 (2007) 403-411.
5. D.L. Coppock, C. Kopman, S. Scandalis, S. Gilleran, Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts, *Cell Growth Differ.* 4 (1993) 483-493.

6. I. Whittke, R. Wiedemeyer, A. Pillmann, L. Savelyeva, F. Westermann, M. Schwab, Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells, *Cancer Res.* 63 (2003) 7742-7752.
7. D.L. Coppock, D. Cina-poppe, S. Gilleran, The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1, *Genomics* 54 (1998) 460-468.
8. D.L. Coppock, C. Thorpe, Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 300-311.
9. G. Mairet-Coello, A. Tury, A. Esnard-Feve, D. Fellmann, P.Y. Risold, B. Griffon, FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: Topographic, cellular and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.* 473 (2004) 334-363.
10. M.C. Ostrowski, W.S. Kistler, Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry* 19 (1980) 2639-2645.
11. K.L. Hooper, B. Joneja, H.B. White, C. Thorpe, A sulfhydryl oxidase from chicken egg white, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 30510-30516.
12. K.L. Hooper, S.L. Sheasley, H.F. Gilbert, C. Thorpe, Sulhydryl oxidase from egg white: a facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 22147-22150.
13. C. Thorpe, K.L. Hooper, S. Raje, N.M. Glynn, J. Burnside, G.K. Turi, D.L. Coppock, Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes, *Arch. Biochem. Biophys.* 405 (2002) 1-12.
14. H. Kamata, H. Hirata, Redox regulation of cellular signalling, *Cell. Signal.* 11 (1999) 1-14.
15. L.M. Sayre, P.I. Moreira, M.A. Smith, G. Perry, Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease, *Ann. Ist Super Sanita* 41 (2005) 143-164.
16. M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1-40.

17. D.B. Dubal, H. Zhu, J. Yu, S.W. Rau, P.J. Shughurue, I. Merchenthaler, M.S. Kindy, P.M. Wise, Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 1952-1957.
18. S. Mitra, E. Hoskin, J. Yudkovitz, L. Pear, H.A. Wilkinson, S. Hayashi, D.W. Pfaff, S. Ogawa, S.P. Rohrer, S.M. Schaeffer, B.S. McEwen, S.E. Alves, Immunolocalization of estrogen receptor β in the mouse brain: comparison with estrogen receptor α , *Endocrinology* 144 (2003) 2055-2067.
19. A. Inoue, N. Yoshida, S. Omoto, T. Yamori, R. Kiyama, S. Hayashi, Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes, *J. Mol. Endocrinol.* 29 (2002) 175-192.
20. C. Demougeot, C. Marie, A. Beley, Importance of iron location in iron-induced hydroxyl radical production by brain slices, *Life Sci.* 67 (2000) 399-410.
21. S. Kanno, A. Shouji, R. Hirata, K. Asou, M. Ishikawa, Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells, *Life Sci.* 75 (2004) 353-365.
22. P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156-159.
23. S.E. Wellman, P.J. Casano, D.R. Pilch, W.F. Marzluff, D.B. Sittman, Characterization of mouse H3.3-like histone gene, *Gene* 59 (1987) 29-39.
24. B. Benayoun, A. Esnard-Feve, S. Castella, Y. Courty, F. Esnard, Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescein Q6 gene family, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 13830-13837.
25. K.Z. Guyton, Y. Liu, M. Gorospe, Q. Xu, N.J. Holbrook, Activation of mitogen-activated protein kinase by H_2O_2 , *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 4138-4142.
26. J.R. Stone, S. Yang, Hydrogen peroxide: a signaling messenger, *Antioxid. Redox. Signal.* 8 (2006) 243-270.

27. C. Amiot, J.F. Musard, M. Hadjiyassemis, M. Jouvenot, D. Fellmann, P.Y. Risold, P. Adami, Expression of the secreted FAD-dependent sulfhydryl oxidase (QSOX) in the guinea pig central nervous system, *Mol. Brain Res.* 125 (2004) 13-21.
28. J.M. Matès, F.M. Sanchez-Jimenez, Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32 (2000) 157-170.
29. K. Bon, P. Adami, F. Esnard, M. Jouvenot, C. Botteri, Olfactory epithelium destruction by ZnSO₄ modified sulfhydryl oxidase expression in mice, *Neuroreport* 16 (2005) 179-182.
30. S. Javadov, M. Karmazyn, Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection, *Cell Physiol. Biochem.* 20 (2007) 02-22.

DISCUSSION -

CONCLUSION

L'équipe « Estrogènes, Expression génique et Pathologies du Système Nerveux Central » s'intéresse à l'identification des gènes régulés par les estrogènes dans les cellules du système nerveux central et au rôle de ces gènes dans l'effet neuroprotecteur des estrogènes contre la mort cellulaire neuronale. Dans le cadre de ce projet ambitieux, nous avons pour but d'établir un modèle *in vitro*, plus simple à mettre en oeuvre que les modèles animaux, afin d'étudier les effets neuroprotecteurs de E₂. Les cellules neuronales en culture primaire ne proliférant pas *in vitro*, la quantité de matériel disponible pour les expériences est insuffisante. C'est pourquoi nous avons eu recours aux cellules PC12 qui sont fréquemment utilisées comme modèle de cellules neuronales. Ces cellules n'expriment pas naturellement les récepteurs aux estrogènes, mais ont pu être transfectées de façon stable par un vecteur d'expression de ER α par l'équipe du Pr C. Saligaut de l'Université de Rennes 1.

Modèle cellulaire de neuroprotection par les estrogènes

Des stress oxydants ont été produits en traitant les cellules soit par le complexe Fe(III)-HQ soit par H₂O₂.

Le dérèglement de la biochimie du fer dans l'organisme a été impliqué dans les stress oxydants associés à différentes pathologies du cerveau. Dans un modèle *in vitro*, un stress oxydant peut être obtenu par l'augmentation de fer libre intracellulaire. L'entrée du fer dans le cytoplasme cellulaire dépend de la formation d'un complexe lipophile. Demougeot et collaborateurs (2000) ont comparé l'effet du fer complexé à un composé lipophile, la 8-hydroxyquinoline (HQ) ou à un ligand hydrophile (le citrate ammoniacal). Ils ont montré que le complexe Fe(III)-HQ était le plus efficace dans la production de radicaux hydroxyles OH[•] et la peroxydation lipidique. Ainsi, le complexe Fe(III)-HQ permet au fer de pénétrer dans les cellules où il catalyse la formation de radical hydroxyle à partir de H₂O₂, *via* la réaction de Fenton-Haber Weiss (Demougeot *et al*, 2000 ; Matès et Sanchez-Jimenez, 2000). L'augmentation du fer intracellulaire survient au cours d'un événement ischémique et il a été montré *in vivo*, que le chélateur de fer liposoluble 2,2'-dipyridyl, administré avant une ischémie cérébrale, diminue significativement le volume et les dommages de l'ischémie (Demougeot *et al*, 2004). Cette cytoprotection est associée à une réduction de la production des ROS. Nous avons donc choisi le traitement des cellules PC12 par le fer associé à l'hydroxyquinoline afin d'obtenir des conditions proches de celles induisant la mort par apoptose des cellules nerveuses au cours d'une ischémie.

L'augmentation de la concentration de H₂O₂ dans le milieu de culture est également une autre condition permettant d'induire un stress oxydant (pour revue Stone et Yang, 2006). En fonction de la concentration appliquée, H₂O₂ peut entraîner une augmentation de la prolifération cellulaire (Caporossi *et al*, 2003), l'arrêt du cycle cellulaire et/ou la mort cellulaire (figure 57).

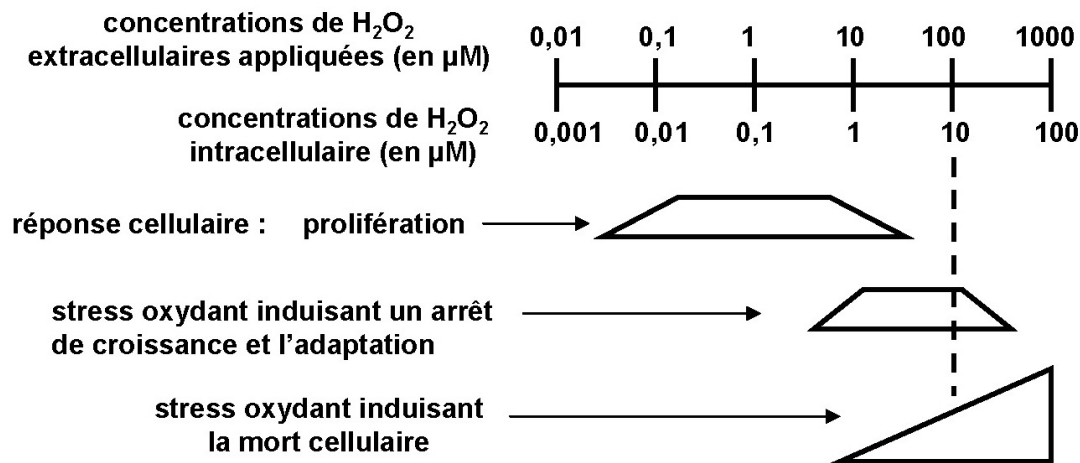


Figure 57 : Les réponses cellulaires à H₂O₂. L'application de faibles concentrations de H₂O₂ (0,1 à 7 µM) à des cellules en culture se traduit par une concentration intracellulaire de H₂O₂ de 0,01 à 0,07 µM et stimule la prolifération. A des niveaux plus importants (20 à 200 µM), H₂O₂ induit un arrêt de croissance qui peut être suivi par une adaptation au stress oxydant. La mort cellulaire survient avec des concentrations appliquées de H₂O₂ supérieures à 10 µM. La gamme de concentrations déterminant la réponse des cellules dépend du type cellulaire et des conditions de culture. D'après Stone et Yang, 2006.

Compte tenu de ces données, nous avons choisi des concentrations en H₂O₂ supérieures à 100 µM et comparé les effets de ces concentrations de H₂O₂ à ceux du complexe Fe(III)-HQ.

Nous avons mis en oeuvre différentes conditions de traitement par E₂ précédant l'induction du stress oxydant. En effet, dans un modèle animal, un prétraitement par E₂ s'est avéré efficace dans la diminution des dommages dus à un épisode ischémique (Rau *et al*, 2003a). Les effets de la concentration et du temps de prétraitement ont été testés sur la survie des cellules PC12 non différenciées soumises à des stress oxydants induits par le complexe Fe(III)-HQ ou H₂O₂ à différentes concentrations. Cependant, dans les conditions étudiées, nous n'avons pas observé d'amélioration importante de la viabilité des cellules PC12 non différenciées sous l'effet de E₂.

Nous avons également étudié l'effet de E₂ sur les cellules PC12 différenciées par le NGF afin de travailler sur des cellules plus proches du phénotype neuronal. Compte tenu des données publiées, nous avons recherché les effets d'une stimulation estrogénique sur la survie de cellules PC12 cultivées pendant 14 jours en présence de NGF dans du milieu complet. Cependant, les cellules étant stimulées par les facteurs de croissance du sérum, elles prolifèrent et se différencient difficilement. Les résultats obtenus n'ont pas montré d'amélioration de la survie cellulaire en présence de E₂ et/ou de NGF. Un second protocole a été utilisé afin de différencier les cellules PC12 par le NGF en absence de sérum. Une nette augmentation du nombre de cellules a été obtenue

dans ces conditions sous l'effet du NGF seul. Cependant, aucune amélioration de la survie des cellules soumises à un stress oxydant n'a pu être observée en présence de E₂ seul ou en association avec le NGF.

Ces différentes tentatives n'ont donc pas permis d'établir les conditions de protection par E₂ des cellules PC12/ER α différenciées ou non. Par contre, une protection contre le stress oxydant a été obtenue lorsque les cellules ont été préalablement différenciées par le NGF. Cette protection ne survient que lorsque la différenciation est maximale c'est-à-dire lorsqu'elle s'est opérée en absence de sérum de veau fœtal. Nos résultats sont discordants avec ceux obtenus par l'équipe de Saligaut et partiellement en accord avec ceux obtenus par Gollapudi et Oblinger. En effet, sur cette même lignée PC12/ER α non différenciée, l'équipe de C. Saligaut a montré les effets protecteurs d'une préincubation de 24 h avec E₂ dans le cas d'un stress oxydant induit par une inhibition de la synthèse de glutathion (Mérot *et al*, 2005). Ainsi, ces effets se traduisent par une diminution du nombre de cellules mortes d'environ 35%. Par ailleurs, Gollapudi et Oblinger ont aussi établi une lignée de cellules PC12 transfectées par le gène codant le récepteur ER α (lignée PCER) (Gollapudi et Oblinger, 1999a). Lorsque ces cellules sont différenciées par le NGF en présence de sérum de veau fœtal, une déplétion sérique de 48 h en absence de NGF provoque l'apoptose. Une protection est observée si le NGF est maintenu dans le milieu de déplétion. Si E₂ est ajouté au milieu de déplétion sérique contenant encore du NGF, le nombre de cellules vivantes augmente.

Le modèle de cellules transfectées par un vecteur d'expression est certes utile mais n'est pas le modèle idéal. En effet, la transfection du récepteur des estrogènes pourrait ne pas être suffisante car l'action des estrogènes implique des corégulateurs dont l'expression et l'activité sont régulées. La lignée entretenue dans notre laboratoire exprime toujours ER α car les messagers sont détectables par RT-PCR. Il serait cependant intéressant de vérifier si cette lignée a conservé l'expression de certains corégulateurs.

Pour de futures expériences, l'idéal serait de disposer d'une lignée, si possible d'origine neuronale, exprimant de façon naturelle le récepteur aux estrogènes et montrant une sensibilité à l'hormone. A défaut, des études sur des lignées estrogéno-dépendantes, même si elles ne sont pas de phénotype neuronal, pourraient donner des informations utiles sur l'action protectrice des estrogènes contre le stress oxydant.

Régulation de l'expression de QSOX1

L'étude des effets des estrogènes nous a amené à nous intéresser au gène estrogéno-dépendant *QSOX1* faisant l'objet d'un des thèmes de recherches de notre équipe.

Nous avons étudié l'expression de *QSOX1* dans les modèles de lignées cellulaires et *in vivo*.

Effet du NGF :

Une augmentation du taux de messenger *QSOX1* et de la protéine a été observée dans les cellules PC12 stimulées par le NGF. Ce facteur de croissance joue un rôle dans plusieurs processus cellulaires importants tels que l'apoptose, la survie cellulaire ou l'inflammation. Il agit via 2 types de récepteurs : le récepteur TrkA à activité Tyrosine kinase intrinsèque et le récepteur p75^{NTR} appartenant à la famille des récepteurs de mort. L'activation du récepteur TrkA conduit l'activation de la voie de la phospholipase C γ (PLC γ), la voie de la phosphatidyl-inositol 3- kinase (PI3K) et la voie des MAP kinases. Le récepteur p75^{NTR} agit *via* la voie pro-apoptotique impliquant la MAPK c-Jun N-terminal kinase (JNK), les céramides et la petite protéine G Rac. Il peut également activer la voie des MAPK conduisant à la survie cellulaire. Les 2 récepteurs peuvent ainsi phosphoryler l'inhibiteur I κ B et activer le facteur de transcription NF- κ B. (Freund-Michel et Frossard, 2007 ; Chao *et al*, 2006). L'analyse informatique des 1000 pb en amont du site d'initiation de transcription du gène *QSOX1* de Rat a permis d'identifier 5 sites potentiels de fixation de NF- κ B. La régulation de l'expression de *QSOX1* par le NGF pourrait impliquer NF- κ B.

Effet de E₂ :

Nous avons observé que E₂ n'a pas d'effet sur le taux de messagers *QSOX1* dans les cellules PC12. Par contre, le taux de protéine QSOX1 diminue dans les cellules MCF-7 après 24h de traitement par E₂. Il est possible que la différence de réponse entre PC12 et MCF-7 soit liée à la différence des éléments régulateurs au voisinage du gène *QSOX1* de Rat (PC12) et du gène *QSOX1* humain (MCF-7). Il n'est pas exclu que l'absence de réponse dans les PC12 soit, comme nous l'avons précédemment évoqué, liée à l'absence de certaines protéines nécessaires à la réponse aux estrogènes.

Les résultats obtenus dans les cellules MCF-7 indiquent une régulation négative de l'expression de *QSOX1* 24 h après un traitement par E₂. Cette régulation avait été supposée suite aux travaux sur les cellules utérines au cours du cycle estrien chez le Cobaye (Musard *et al*, 2001) et avait été observée dans les cellules MCF-7 plus de 60 h après un traitement par E₂ (Inoue *et al*, 2002).

Par la méthode de RT-PCR quantitative en temps réel, nous avons étudié les effets de E₂ sur l'expression de QSOX1 dans différentes aires du cerveau des Rates ovariectomisées. Nous démontrons pour la première fois, une estrogéno-dépendance de *QSOX1 in vivo*. En effet, chez les Rates traitées par E₂, nous avons constaté une diminution du taux de messagers *QSOX1* dans trois des sept aires étudiées : le cervelet, les noyaux de la base et le diencéphale. Cette diminution est observable 48 h après la stimulation estrogénique mais non 24 h après. Nous pouvons toutefois noter que le nombre de Rates dans chaque lot (ici 4) pourrait être augmenté afin d'obtenir des résultats indiscutables.

Un effet direct et précoce des estrogènes nécessite la liaison du récepteur activé sur une séquence ERE (Dean and Sanders, 1996). L'analyse informatique des 5 000 pb en amont du site d'initiation n'indique pas la présence d'un ERE. Toutefois, le gène *QSOX1* de Rat est un gène très long (37 750 pb), présentant 12 introns et 13 exons. Il n'est pas exclu qu'un ERE puisse exister en aval du site d'initiation comme cela a pu être démontré pour certains gènes estrogéno-dépendants (Vernier-Magin *et al*, 2005 ; Hyder *et al*, 1995). Toutefois, la cinétique de régulation s'apparente à celle observée pour les gènes précoces retardés ou les gènes tardifs et suggère que l'effet de E₂ sur l'expression de *QSOX1* puisse impliquer des facteurs de transcription précocement induits. Il existe plusieurs sites AP-1 au voisinage du promoteur (dont 2 dans les 2000 pb en amont du site d'initiation) sur lesquels se lient les dimères Fos-Jun ou Jun-Jun. Les gènes des familles Fos et Jun sont précocement régulés par les estrogènes dans le cerveau (Rau *et al*, 2003b). La régulation de *QSOX1* par E₂ pourrait dépendre de ces facteurs de transcription Fos et Jun. La présence des récepteurs des estrogènes a été vérifiée mais leur implication dans la régulation de *QSOX1* ne pourra être affirmée qu'après avoir montré qu'un anti-estrogène peut empêcher l'effet de E₂ (Katzenellenbogen *et al*, 2000). Il serait aussi intéressant de poursuivre l'étude de l'estrogéno-dépendance dans le cerveau au cours du cycle estrien.

L'identification de gènes régulés par les estrogènes dans le cerveau constitue un enjeu important dans la compréhension des effets de ces hormones et en particulier des effets neuroprotecteurs.

Implication de QSOX1 dans la protection contre le stress oxydant

Les rôles de QSOX1 restent hypothétiques à ce jour. La troisième partie de nos travaux a été consacrée à la recherche du rôle potentiel de QSOX1 dans la mort cellulaire induite par les stress oxydants. Dans ce but, nous avons étudié, dans un premier temps, l'expression de QSOX1 dans les cellules PC12 soumises à des stress oxydants, puis dans un deuxième temps, les effets d'une surexpression de QSOX1 sur la survie des cellules MCF-7 soumises à ces mêmes stress. Par RT-PCR en temps réel et analyse en cytométrie en flux, nous avons montré que l'expression de QSOX1 augmente et reste élevée jusqu'à 72 h après le stress oxydant alors que les cellules prolifèrent à nouveau. Cette cinétique suggère que QSOX1 joue un rôle protecteur contre l'apoptose. Ce rôle est démontré par l'étude réalisée avec les MCF-7 surexprimant QSOX1. En effet, dans cette lignée, le nombre de cellules entrant en apoptose sous l'effet d'un stress oxydant diminue significativement par rapport à celui observé dans la lignée MCF-7 contrôle. La chute du potentiel membranaire mitochondrial apparaît moindre dans les MCF-7 surexprimant QSOX1. Dans l'état actuel de nos travaux, nous n'avons que deux hypothèses pour expliquer cette action de QSOX1. Dans une première hypothèse, l'action de QSOX1 se situerait au niveau de la mitochondrie. La présence de

QSOX1 au niveau des mitochondries a été suggérée par des études dans le tractus génital mâle (Aumuller *et al*, 1991). Les substrats de QSOX1 dans ce compartiment cellulaire pourraient être impliqués dans le maintien de l'intégrité de la membrane externe mitochondriale et participer à l'effet anti-apoptotique de QSOX1. Cependant, la présence de QSOX1 au niveau des mitochondries n'a pas été confirmée par microscopie électronique et, à ce jour, reste controversée (Tury *et al*, 2004).

Dans la deuxième hypothèse, l'action de la protéine QSOX1 extracellulaire pourrait survenir en amont de la dépolarisation des mitochondries. Elle modifierait l'état redox de protéines membranaires ou extracellulaires qui, à leur tour, modifieraient l'activité des protéines de la famille Bcl-2 bloquant ainsi l'ouverture des pores. L'étude de l'impact de la surexpression de QSOX1 sur ces protéines contribuera à la compréhension du mécanisme moléculaire de la protection par QSOX1.

Liens entre stimulation par E₂, expression de QSOX1 et devenir des cellules ?

Pour tenter d'établir les liens entre la stimulation par E₂, l'expression de QSOX1 et le devenir des cellules, il faut prendre en compte les informations disponibles à ce jour concernant QSOX1, sa fonction et la régulation de son expression. Il a été montré précédemment, par nous et par d'autres, que *QSOX1* est surexprimé dans des cellules rendues quiescentes par déplétion sérique ou par inhibition de contact, dans des cellules décollées par action de la trypsine ou grattage, dans des cellules altérées par un stress oxydant. Toutes ces situations semblent indiquer que *QSOX1* augmente lorsque la cellule est en souffrance et que QSOX1 pourrait être impliquée dans un processus de réparation qui viserait à sauver cette cellule de la mort. A ce titre, QSOX1 pourrait être classée parmi les protéines chaperons. Lorsque QSOX1 est surexprimée, les cellules supportent mieux le stress cellulaire et l'apoptose diminuerait et à ce titre QSOX1 aurait un rôle de sauvegarde.

Nous avons montré que *QSOX1* apparaît régulé négativement par les estrogènes et positivement par le NGF. Les données de la littérature indiquent que les estrogènes exercent un effet neuroprotecteur sur les cellules du cerveau et un effet prolifératif sur certaines cellules hormono-sensibles telles que les cellules utérines. Le NGF peut stimuler la prolifération ou la différenciation, et favoriser ou inhiber l'apoptose selon les cellules et le type de récepteur exprimé (Freund-Michel et Frossard, 2007). Il apparaît alors difficile de placer toutes ces informations dans un schéma synthétique car une contradiction apparaît immédiatement : comment les estrogènes, neuroprotecteurs dans le cerveau peuvent-ils réguler négativement un gène codant une protéine dont l'action se traduit également par une inhibition de l'apoptose ? Il est probablement nécessaire de distinguer 2 situations :

En absence de stress dans des cellules prolifératives (figure 58A) :

Les estrogènes stimulent la prolifération cellulaire (par exemple des cellules utérines) et répriment *QSOX1*. En absence d'estrogènes et d'autres facteurs mitogènes, les cellules entrent en quiescence et surexpriment *QSOX1*. L'effet « réparateur » de *QSOX1* s'exercerait sur les cellules et retarderait le moment où elles entrent en apoptose du fait d'une privation en facteurs mitogènes trop prolongée.

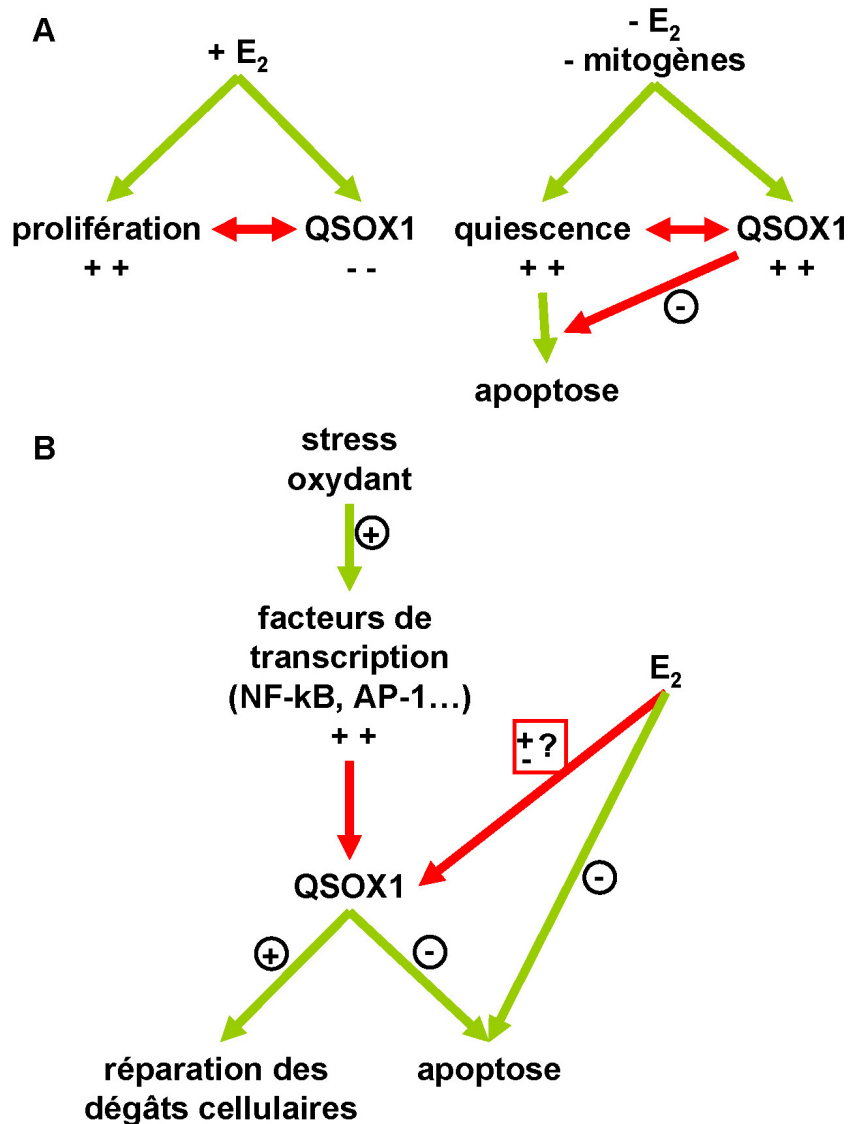


Figure 58 : Schéma des liens démontrés (en vert) ou potentiels (en rouge) entre la stimulation par E₂, l'expression de QSOX1 et le devenir des cellules. A. en absence de stress oxydant dans les cellules prolifératives. **B.** en condition de stress oxydant dans les cellules neuronales différenciées.

Dans des cellules neuronales différenciées en situation de stress oxydant (figure 58B) :

Nous avons démontré que l'expression de *QSOX1* augmente sous l'influence d'un stress oxydant, et ce, dès la 24^{ème} heure. Il est connu qu'un stress oxydant active différents facteurs de transcription et

en particulier NF- κ B et/ou AP-1 (Maher et Schubert, 2000). Il existe, au voisinage du gène *QSOX1*, des séquences cibles potentielles pour ces deux facteurs de transcription qui pourraient donc contribuer à l'induction de *QSOX1* dans des conditions de stress. L'expression accrue de *QSOX1* favorise la survie des cellules et diminue l'apoptose. Quel serait l'effet de E_2 sur l'expression de *QSOX1* dans cette situation ? Il est possible que E_2 diminue toujours l'expression mais son effet serait compensé et masqué par celui des facteurs de transcription activateurs. Il est possible au contraire que, dans le cas d'un stress oxydant, les estrogènes augmentent l'expression de *QSOX1*. Le stress oxydant pourrait moduler l'expression des corégulateurs des récepteurs aux estrogènes. En effet l'action des estrogènes dépend du rapport entre coactivateurs et corépresseurs dont l'expression est hautement régulée (site <http://www.nursa.org>). Le stress oxydant augmenterait le taux et l'activité des coactivateurs au détriment de ceux des corépresseurs. Si tel était le cas, les estrogènes en augmentant l'expression de *QSOX1* protégeraient de l'apoptose. C'est dans ce seul cas qu'on peut situer *QSOX1* dans l'action neuroprotectrice des estrogènes.

Perspectives

Compte tenu des différentes informations obtenues sur *QSOX1* et ses fonctions biologiques, le projet de notre équipe a pour objectifs : **i)** la poursuite des études de la régulation de l'expression du gène, **ii)** l'étude de l'implication de *QSOX1* dans l'apoptose, l'adhérence cellulaire, la prolifération tumorale et la migration métastatique et **iii)** l'identification des substrats de cette sulfhydryl oxydase.

Les travaux auront pour but de confirmer la régulation positive de l'expression de *QSOX1* par le NGF observée dans nos études, et, plus particulièrement, de définir le rôle de NF- κ B dans cette régulation.

Par ailleurs, les expériences conduites sur les Rates ovariectomisées traitées ou non par E_2 seront poursuivies sur un nombre d'animaux plus importants et l'effet des anti-estrogènes sera étudié. L'équipe s'intéressera également à la régulation de l'expression dans le cerveau au cours du cycle estrien. Des coupes de cerveaux de Rate prélevés à différents stades du cycle estrien sont déjà disponibles et seront analysées par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti-*QSOX1*.

L'étude de la régulation par E_2 de l'expression de *QSOX1* dans les cellules MCF-7 sera poursuivie. Dans ce modèle, il sera possible d'étudier la protection par E_2 lors d'un stress oxydant et d'établir les liens entre la stimulation par E_2 , l'expression de *QSOX1* et l'apoptose.

Les prochaines études devraient permettre de mieux comprendre les rôles biologiques de QSOX1.

En priorité, les recherches seront consacrées aux mécanismes par lesquels QSOX1 protège les cellules contre l'apoptose.

Un autre axe de recherche tentera de préciser le rôle de QSOX1 dans l'adhérence et la prolifération cellulaires. QSOX1 est une protéine sécrétée qui peut donc trouver ses substrats au niveau de la membrane plasmique ainsi que dans la matrice extracellulaire et pourrait de ce fait être impliquée dans l'adhérence. De plus, QSOX1 semble impliquée dans le contrôle négatif du cycle cellulaire. Des études *in vitro* et *in vivo* auront pour but de déterminer si QSOX1 joue un rôle dans la progression des cancers et la dissémination métastatique.

La recherche des substrats potentiels de QSOX1 sera menée en parallèle avec les études fonctionnelles de QSOX1. Pour ce faire, une approche protéomique sera mise en œuvre dans le cadre de la plateforme protéomique mise en place dans le cadre d'un projet transversal entre les secteurs de recherche "Sciences Pour l'Ingénieur" et "Homme, Environnement, Santé". Cette partie du travail s'intègre dans le PPF « Plateforme interrégionale protéomique, Ingénieries et Santé ». Définir les substrats de QSOX1 permettrait de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans la cellule.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont mis en évidence pour la première fois un rôle de la protéine QSOX1 contre l'apoptose induite par les stress oxydants. Ce rôle pourra encore être précisé dans d'autres modèles cellulaires et d'autres conditions de stress. Le lien entre estrogènes, expression de QSOX1 et neuroprotection sont encore incompris et restent à élucider. Néanmoins, la possibilité que QSOX1 possède des effets anti-apoptotiques relance l'intérêt de l'étude de ses propriétés et de son rôle dans les processus cellulaires. Les travaux futurs devront déterminer les substrats cellulaires de QSOX1 et comprendre le mécanisme par lequel QSOX1 protège les cellules.

L'ensemble des informations disponibles actuellement suggère un rôle de QSOX1 dans les grands évènements cellulaires (prolifération, quiescence, apoptose...) qui peuvent être dérégulés lors de l'oncogenèse. Des travaux en cours dans notre équipe devraient permettre de définir les corrélations entre l'expression de QSOX1 et la progression des méningiomes, des cancers du sein et des cancers de la vessie.

**LISTE
DES COMMUNICATIONS**

Communications orales

Morel Carole, Adami Pascale, Jouvenot Michèle. La protéine QSOX protège les cellules contre la mort induite par les stress oxydants.

XII^{ème} forum des jeunes chercheurs, 8 et 9 juin 2006 ; Besançon
prix de communication orale de la session biologie cellulaire et moléculaire

Morel Carole, Adami Pascale, Jouvenot Michèle. La protéine QSOX protège les cellules contre la mort induite par les stress oxydants.

XXXIII^{ème} forum des jeunes chercheurs de la SFBBM, 5 et 6 septembre 2006 ; Clermont-Ferrand

Carole Morel, Pascale Adami, Michèle Jouvenot, Jean Radom, Pierre-Yves Risold. Etudes structurales et fonctionnelles du gène estrogéno-dépendant QSOX1 et de sa protéine.

Actions de communication de l'IFR 133, séminaire interne, 6 novembre 2006 ; Besançon

Communications par affiche

Morel Carole, Adami Pascale, Jouvenot Michèle. Mise au point d'un modèle cellulaire permettant l'étude des effets protecteurs des estrogènes.

X^{ème} forum des jeunes chercheurs, 9 et 10 juin 2004 ; Besançon

Morel Carole, Adami Pascale, Jouvenot Michèle. Le gène QSOx, codant une Quiescine/Sulphydryl Oxydase est-il un nouveau gène pro-apoptotique ?

XI^{ème} forum des jeunes chercheurs, 9 et 10 juin 2005 ; Dijon

BIBLIOGRAPHIE

- Abe H., Nowak T.S., Jr.** Gene expression and induced ischemic tolerance following brief insults. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* (1996) 56, 3-8
- Acconcia F., Ascenzi P., Fabozzi G., Visca P., Marino M.** S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- α functions. *Biochem Biophys Res Commun* (2004) 316, 878-83
- Alkayed N.J., Harukuni I., Kimes A.S., London E.D., Traystman R.J., Hurn P.D.** Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* (1998) 29, 159-65; discussion 166
- Allen R.G., Tresini M.** Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* (2000) 28, 463-99
- Altucci L., Gronemeyer H.** Nuclear receptors in cell life and death. *Trends Endocrinol Metab* (2001) 12, 460-8
- Amiot C., Musard J.F., Hadjiyiassemis M., Jouvenot M., Fellmann D., Risold P.Y., Adami P.** Expression of the secreted FAD-dependent sulfhydryl oxidase (QSOX) in the guinea pig central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* (2004) 125, 13-21
- Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E., Starkov A.A.** Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* (2005) 70, 200-14
- Aumuller G., Bergmann M., Seitz J.** Immunohistochemical distribution of sulfhydryl oxidase in the human testis. *Cell Tissue Res* (1991) 266, 23-8
- Bar P.R., Amelink G.J.** Protection against muscle damage exerted by oestrogen: hormonal or antioxidant action? *Biochem Soc Trans* (1997) 25, 50-4
- Basu A., Haldar S.** The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* (1998) 4, 1099-109
- Behl C., Widmann M., Trapp T., Holsboer F.** 17- β estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 216, 473-82
- Behl C., Manthey D.** Neuroprotective activities of estrogen: an update. *J Neurocytol* (2000) 29, 351-8
- Behl C.** Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat Rev Neurosci* (2002) 3, 433-42
- Belcredito S., Brusadelli A., Maggi A.** Estrogens, apoptosis and cells of neural origin. *J Neurocytol* (2000) 29, 359-65
- Benayoun B., Esnard-Feve A., Castella S., Courty Y., Esnard F.** Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family. *J Biol Chem* (2001) 276, 13830-7
- Bergmann M., Kumari M., Aumuller G., Hoffmann K., Seitz J.** Distribution pattern of testicular sulphhydryloxidase immuno-activity in the djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) during photoperiodically induced involution and recrudescence. *Int J Androl* (1990) 13, 488-99
- Bjornstrom L., Sjoberg M.** Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* (2005) 19, 833-42

- Blass J.P.** The mitochondrial spiral. An adequate cause of dementia in the Alzheimer's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* (2000) 924, 170-83
- Bon K., Adami P., Esnard F., Jouvenot M., Versaux-Botteri C.** Olfactory epithelium destruction by ZnSO₄ modified sulfhydryl oxidase expression in mice. *Neuroreport* (2005) 16, 179-82
- Bora S.H., Liu Z., Kecojevic A., Merchenthaler I., Koliatsos V.E.** Direct, complex effects of estrogens on basal forebrain cholinergic neurons. *Exp Neurol* (2005) 194, 506-22
- Borras C., Gambini J., Vina J.** Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Front Biosci* (2007) 12, 1008-13
- Brann D.W., Dhandapani K., Wakade C., Mahesh V.B., Khan M.M.** Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* (2007) 72, 381-405
- Brohawn S.G., Miksa I.R., Thorpe C.** Avian sulfhydryl oxidase is not a metalloenzyme: adventitious binding of divalent metal ions to the enzyme. *Biochemistry* (2003) 42, 11074-82
- Brown G.C., Borutaite V.** Interactions between nitric oxide, oxygen, reactive oxygen species and reactive nitrogen species. *Biochem Soc Trans* (2006) 34, 953-6
- Bruce-Keller A.J., Keeling J.L., Keller J.N., Huang F.F., Camondola S., Mattson M.P.** Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology* (2000) 141, 3646-56
- Bruick R.K.** Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97, 9082-7
- Bucci M., Roviezzo F., Cicala C., Pinto A., Cirino G.** 17-beta-oestradiol-induced vasorelaxation in vitro is mediated by eNOS through hsp90 and akt/pkb dependent mechanism. *Br J Pharmacol* (2002) 135, 1695-700
- Bunik V.I., Sievers C.** Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species. *Eur J Biochem* (2002) 269, 5004-15
- Caporossi D., Ciafre S.A., Pittaluga M., Savini I., Farace M.G.** Cellular responses to H₂O₂ and bleomycin-induced oxidative stress in L6C5 rat myoblasts. *Free Radic Biol Med* (2003) 35, 1355-64
- Castellani R., Hirai K., Aliev G., Drew K.L., Nunomura A., Takeda A., Cash A.D., Obrenovich M.E., Perry G., Smith M.A.** Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* (2002) 70, 357-60
- Castilho R.F., Kowaltowski A.J., Meinicke A.R., Bechara E.J., Vercesi A.E.** Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radic Biol Med* (1995) 18, 479-86
- Chakravarthi S., Jessop C.E., Willer M., Stirling C.J., Bulleid N.J.** Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. *Biochem J* (2007) 404, 403-11

- Chang T.S., Morton B.** Epididymal sulfhydryl oxidase: a sperm-protective enzyme from the male reproductive tract. *Biochem Biophys Res Commun* (1975) 66, 309-15
- Chang T.S., Zirkin B.R.** Distribution of sulfhydryl oxidase activity in the rat and hamster male reproductive tract. *Biol Reprod* (1978) 18, 745-8
- Chao M.V., Rajagopal R., Lee F.S.** Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* (2006) 110, 167-73
- Charest A., Wilker E.W., McLaughlin M.E., Lane K., Gowda R., Coven S., McMahon K., Kovach S., Feng Y., Yaffe M.B., Jacks T., Housman D.** ROS fusion tyrosine kinase activates a SH2 domain-containing phosphatase-2/phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling axis to form glioblastoma in mice. *Cancer Res* (2006) 66, 7473-81
- Charpentier A.H., Bednarek A.K., Daniel R.L., Hawkins K.A., Laflin K.J., Gaddis S., MacLeod M.C., Aldaz C.M.** Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res* (2000) 60, 5977-83
- Chelikani P., Fita I., Loewen P.C.** Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* (2004) 61, 192-208
- Chiarugi P., Fiaschi T.** Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal* (2007) 19, 672-82
- Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N.M., Newmeyer D.D., Schuler M., Green D.R.** Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* (2004) 303, 1010-4
- Chittenden T., Flemington C., Houghton A.B., Ebb R.G., Gallo G.J., Elangovan B., Chinnadurai G., Lutz R.J.** A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* (1995) 14, 5589-96
- Choi Y.C., Lee J.H., Hong K.W., Lee K.S.** 17 Beta-estradiol prevents focal cerebral ischemic damages via activation of Akt and CREB in association with reduced PTEN phosphorylation in rats. *Fundam Clin Pharmacol* (2004) 18, 547-57
- Chomczynski P., Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* (1987) 162, 156-9
- Cleary M.L., Smith S.D., Sklar J.** Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* (1986) 47, 19-28
- Coppock D.L., Kopman C., Scandalis S., Gilleran S.** Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ* (1993) 4, 483-93
- Coppock D.L., Cina-Poppe D., Gilleran S.** The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. *Genomics* (1998) 54, 460-8
- Coppock D., Kopman C., Gudas J., Cina-Poppe D.A.** Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 269, 604-10

- Coppock D.L., Thorpe C.** Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxid Redox Signal* (2006) 8, 300-11
- Culmsee C., Vedder H., Ravati A., Junker V., Otto D., Ahlemeyer B., Krieg J.C., Kriegstein J.** Neuroprotection by estrogens in a mouse model of focal cerebral ischemia and in cultured neurons: evidence for a receptor-independent antioxidative mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* (1999) 19, 1263-9
- De Deken X., Wang D., Many M.C., Costagliola S., Libert F., Vassart G., Dumont J.E., Miot F.** Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* (2000) 275, 23227-33
- Dean D.M., Sanders M.M.** Ten years after: reclassification of steroid-responsive genes. *Mol Endocrinol* (1996) 10, 1489-95
- Demling J., Fuchs E., Baumert M., Wuttke W.** Preoptic catecholamine, GABA, and glutamate release in ovariectomized and ovariectomized estrogen-primed rats utilizing a push-pull cannula technique. *Neuroendocrinology* (1985) 41, 212-8
- Demougeot C., Van Hoecke M., Bertrand N., Prigent-Tessier A., Mossiat C., Beley A., Marie C.** Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model. *J Pharmacol Exp Ther* (2004) 311, 1080-7
- Demougeot C., Marie C., Beley A.** Importance of iron location in iron-induced hydroxyl radical production by brain slices. *Life Sci* (2000) 67, 399-410
- Dhandapani K.M., Wade F.M., Mahesh V.B., Brann D.W.** Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology* (2005) 146, 2749-59
- Dhandapani K.M., Brann D.W.** Transforming growth factor- β : a neuroprotective factor in cerebral ischemia. *Cell Biochem Biophys* (2003) 39, 13-22
- Di Croce L., Vicent G.P., Pecci A., Bruscalupi G., Trentalance A., Beato M.** The promoter of the rat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene contains a tissue-specific estrogen-responsive region. *Mol Endocrinol* (1999) 13, 1225-36
- Dubal D.B., Shughrue P.J., Wilson M.E., Merchenthaler I., Wise P.M.** Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* (1999) 19, 6385-93
- Dubal D.B., Zhu H., Yu J., Rau S.W., Shughrue P.J., Merchenthaler I., Kindy M.S., Wise P.M.** Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98, 1952-7
- Dubal D.B., Rau S.W., Shughrue P.J., Zhu H., Yu J., Cashion A.B., Suzuki S., Gerhold L.M., Bottner M.B., Dubal S.B., Merchenthaler I., Kindy M.S., Wise P.M.** Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ERalpha in estradiol-mediated protection against delayed cell death. *Endocrinology* (2006) 147, 3076-84
- Ejima K., Nanri H., Araki M., Uchida K., Kashimura M., Ikeda M.** 17 β -estradiol induces protein thiol/disulfide oxidoreductases and protects cultured bovine aortic endothelial cells from oxidative stress. *Eur J Endocrinol* (1999) 140, 608-13

- Facchinetti F., Furegato S., Terrazzino S., Leon A.** H₂O₂ induces upregulation of Fas and Fas ligand expression in NGF-differentiated PC12 cells: modulation by cAMP. *J Neurosci Res* (2002) 69, 178-88
- Ferrari D.M., Soling H.D.** The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J* (1999) 339 (Pt 1), 1-10
- Filardo E.J., Thomas P.** GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab* (2005) 16, 362-7
- Fontemaggi G., Kela I., Amariglio N., Rechavi G., Krishnamurthy J., Strano S., Sacchi A., Givol D., Blandino G.** Identification of direct p73 target genes combining DNA microarray and chromatin immunoprecipitation analyses. *J Biol Chem* (2002) 277, 43359-68
- Fornace A.J., Jr., Alamo I., Jr., Hollander M.C.** DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988) 85, 8800-4
- Fornace A.J., Jr., Nebert D.W., Hollander M.C., Luethy J.D., Papathanasiou M., Fargnoli J., Holbrook N.J.** Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol* (1989) 9, 4196-203
- Frand A.R., Kaiser C.A.** The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* (1998) 1, 161-70
- Frand A.R., Kaiser C.A.** Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* (1999) 4, 469-77
- Freund-Michel V., Frossard N.** The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol Ther* (2007)
- Fritsche M., Haessler C., Brandner G.** Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* (1993) 8, 307-18
- Gallegos A., Gasdaska J.R., Taylor C.W., Paine-Murrieta G.D., Goodman D., Gasdaska P.Y., Berggren M., Briehl M.M., Powis G.** Transfection with human thioredoxin increases cell proliferation and a dominant-negative mutant thioredoxin reverses the transformed phenotype of human breast cancer cells. *Cancer Res* (1996) 56, 5765-70
- Garcia-Segura L.M., Cardona-Gomez G.P., Chowen J.A., Azcoitia I.** Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. *J Neurocytol* (2000) 29, 425-37
- Garcia-Segura L.M., Sanz A., Mendez P.** Cross-talk between IGF-I and estradiol in the brain: focus on neuroprotection. *Neuroendocrinology* (2006) 84, 275-9
- Gardner P.R., Raineri I., Epstein L.B., White C.W.** Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem* (1995) 270, 13399-405
- Gardner P.R.** Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol* (2002) 349, 9-23
- Garnier M., Di Lorenzo D., Albertini A., Maggi A.** Identification of estrogen-responsive genes in neuroblastoma SK-ER3 cells. *J Neurosci* (1997) 17, 4591-9

- Garnier P., Demougeot C., Bertrand N., Prigent-Tessier A., Marie C., Beley A.** Stress response to hypoxia in gerbil brain: HO-1 and Mn SOD expression and glial activation. *Brain Res* (2001) 893, 301-9
- Gavazzi G., Banfi B., Deffert C., Fiette L., Schappi M., Herrmann F., Krause K.H.** Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett* (2006) 580, 497-504
- Geiszt M., Kopp J.B., Varnai P., Leto T.L.** Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97, 8010-4
- Gelinas S., Bureau G., Valastro B., Massicotte G., Cicchetti F., Chiasson K., Gagne B., Blanchet J., Martinoli M.G.** Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress. *Neurotox Res* (2004) 6, 141-8
- Genestra M.** Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* (2007) 19, 1807-19
- Genova M.L., Ventura B., Giuliano G., Bovina C., Formiggini G., Parenti Castelli G., Lenaz G.** The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* (2001) 505, 364-8
- Gibbs R.B.** Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. *Brain Res* (1998) 787, 259-68
- Gilbert H.F.** Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J Biol Chem* (1997) 272, 29399-402
- Goldberger R.F., Epstein C.J., Anfinsen C.B.** Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J Biol Chem* (1963) 238, 628-35
- Gollapudi L., Oblinger M.M.** Estrogen and NGF synergistically protect terminally differentiated, ERalpha-transfected PC12 cells from apoptosis. *J Neurosci Res* (1999a) 56, 471-81
- Gollapudi L., Oblinger M.M.** Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor (ERalpha): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. *J Neurosci Res* (1999b) 56, 99-108
- Gollapudi L., Oblinger M.M.** Estrogen effects on neurite outgrowth and cytoskeletal gene expression in ERalpha-transfected PC12 cell lines. *Exp Neurol* (2001) 171, 308-16
- Goodenough S., Schleusner D., Pietrzik C., Skutella T., Behl C.** Glycogen synthase kinase 3beta links neuroprotection by 17beta-estradiol to key Alzheimer processes. *Neuroscience* (2005) 132, 581-9
- Green S., Walter P., Greene G., Krust A., Goffin C., Jensen E., Scrace G., Waterfield M., Chambon P.** Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* (1986) 24, 77-83
- Green P.S., Yang S.H., Nilsson K.R., Kumar A.S., Covey D.F., Simpkins J.W.** The nonfeminizing enantiomer of 17beta-estradiol exerts protective effects in neuronal cultures and a rat model of cerebral ischemia. *Endocrinology* (2001) 142, 400-6

- Griffiths E.J., Halestrap A.P.** Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* (1995) 307 (Pt 1), 93-8
- Grivennikova V.G., Vinogradov A.D.** Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1757, 553-61
- Gross E., Sevier C.S., Vala A., Kaiser C.A., Fass D.** A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. *Nat Struct Biol* (2002) 9, 61-7
- Hashimoto Y., Suga Y., Matsuba S., Mizoguchi M., Takamori K., Seitz J., Ogawa H.** Immunohistochemical localization of sulfhydryl oxidase correlates with disulfide crosslinking in the upper epidermis of rat skin. *Arch Dermatol Res* (2000) 292, 570-2
- Hashimoto Y., Suga Y., Matsuba S., Mizoguchi M., Takamori K., Seitz J., Ogawa H.** Inquiry into the role of skin sulfhydryl oxidase in epidermal disulfide bond formation: implications of the localization and regulation of skin SOx as revealed by TPA, retinoic acid, and UVB radiation. *J Invest Dermatol* (2001) 117, 752-4
- Hauptmann N., Grimsby J., Shih J.C., Cadenas E.** The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* (1996) 335, 295-304
- Hayashi S., Hajiro-Nakanishi K., Makino Y., Eguchi H., Yodoi J., Tanaka H.** Functional modulation of estrogen receptor by redox state with reference to thioredoxin as a mediator. *Nucleic Acids Res* (1997) 25, 4035-40
- Herbison A.E., Fenelon V.S.** Estrogen regulation of GABAA receptor subunit mRNA expression in preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of female rat brain. *J Neurosci* (1995) 15, 2328-37
- Hermeking H., Lengauer C., Polyak K., He T.C., Zhang L., Thiagalingam S., Kinzler K.W., Vogelstein B.** 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* (1997) 1, 3-11
- Herrlich P., Bohmer F.D.** Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* (2000) 59, 35-41
- Holmgren A.** Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* (1985) 54, 237-71
- Hooper K.L., Joneja B., White H.B., 3rd, Thorpe C.** A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. *J Biol Chem* (1996) 271, 30510-6
- Hooper K.L., Glynn N.M., Burnside J., Coppock D.L., Thorpe C.** Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases. *J Biol Chem* (1999a) 274, 31759-62
- Hooper K.L., Sheasley S.L., Gilbert H.F., Thorpe C.** Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides. *J Biol Chem* (1999b) 274, 22147-50
- Hooper K.L., Thorpe C.** Egg white sulfhydryl oxidase: kinetic mechanism of the catalysis of disulfide bond formation. *Biochemistry* (1999) 38, 3211-7

- Huang H.L., Fang L.W., Lu S.P., Chou C.K., Luh T.Y., Lai M.Z.** DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation. *Oncogene* (2003) 22, 8168-77
- Huet-Hudson Y.M., Andrews G.K., Dey S.K.** Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology* (1989) 125, 1683-90
- Hurn P.D., Macrae I.M.** Estrogen as a neuroprotectant in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* (2000) 20, 631-52
- Hyder S.M., Shipley G.L., Stancel G.M.** Estrogen action in target cells: selective requirements for activation of different hormone response elements. *Mol Cell Endocrinol* (1995) 112, 35-43
- Ikeda K., Orimo A., Higashi Y., Muramatsu M., Inoue S.** Efp as a primary estrogen-responsive gene in human breast cancer. *FEBS Lett* (2000) 472, 9-13
- Imai H., Nakagawa Y.** Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* (2003) 34, 145-69
- Innocente S.A., Abrahamson J.L., Cogswell J.P., Lee J.M.** p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96, 2147-52
- Inoue A., Yoshida N., Omoto Y., Oguchi S., Yamori T., Kiyama R., Hayashi S.** Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol* (2002) 29, 175-92
- Janolino V.G., Sliwkowski M.X., Swaisgood H.E., Horton H.R.** Catalytic effect of sulfhydryl oxidase on the formation of three-dimensional structure in chymotrypsinogen A. *Arch Biochem Biophys* (1978) 191, 269-77
- Janolino V.G., Swaisgood H.E.** Isolation and characterization of sulfhydryl oxidase from bovine milk. *J Biol Chem* (1975) 250, 2532-8
- Javadov S., Karmazyn M.** Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* (2007) 20, 1-22
- Jin Y.H., Yoo K.J., Lee Y.H., Lee S.K.** Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *J Biol Chem* (2000) 275, 30256-63
- Jost C.A., Marin M.C., Kaelin W.G., Jr.** p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* (1997) 389, 191-4
- Kamata H., Hirata H.** Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* (1999) 11, 1-14
- Kanno S., Shouji A., Hirata R., Asou K., Ishikawa M.** Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *Life Sci* (2004) 75, 353-65

- Katzenellenbogen B.S., Choi I., Delage-Mourroux R., Ediger T.R., Martini P.G.V., Montano M., Sun J., Weis K., Katzenellenbogen J.A.** Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2000) 74, 279-85
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* (1972) 26, 239-57
- Kikugawa K., Hiramoto K., Ohkawa T.** Effects of oxygen on the reactivity of nitrogen oxide species including peroxynitrite. *Biol Pharm Bull* (2004) 27, 17-23
- Kim H.P., Lee J.Y., Jeong J.K., Bae S.W., Lee H.K., Jo I.** Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* (1999) 263, 257-62
- Kirkman H.N., Gaetani G.F.** Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci* (2007) 32, 44-50
- Klein J.A., Ackerman S.L.** Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest* (2003) 111, 785-93
- Ko H.S., Uehara T., Nomura Y.** Role of ubiquitin associated with protein-disulfide isomerase in the endoplasmic reticulum in stress-induced apoptotic cell death. *J Biol Chem* (2002) 277, 35386-92
- Kokoszka J.E., Waymire K.G., Levy S.E., Sligh J.E., Cai J., Jones D.P., MacGregor G.R., Wallace D.C.** The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* (2004) 427, 461-5
- Korsmeyer S.J.** Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* (1992) 15, 105-18
- Krajewski S., Krajewska M., Ellerby L.M., Welsh K., Xie Z., Deveraux Q.L., Salvesen G.S., Bredesen D.E., Rosenthal R.E., Fiskum G., Reed J.C.** Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96, 5752-7
- Kraus W.L., McInerney E.M., Katzenellenbogen B.S.** Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) 92, 12314-8
- Krauskopf A., Eriksson O., Craigen W.J., Forte M.A., Bernardi P.** Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1757, 590-5
- Krupinski K., Bielawiec M., Szpak A., Plonowski A.** Some haemorheological factors and transcutaneous PO₂ in patients with a peripheral arterial occlusive disease after treatment with naftidrofuryl. *Mater Med Pol* (1994) 26, 17-20
- Kuiper G.G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A.** Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93, 5925-30
- Kumari M., Aumuller G., Bergmann M., Meinhardt A., Seitz J.** Stage-dependent appearance of sulfhydryl oxidase during spermatogenesis in the testis of rat and hamster. An immunohistochemical study. *Histochemistry* (1990) 94, 365-71

- Kunduzova O.R., Bianchi P., Parini A., Cambon C.** Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* (2002) 448, 225-30
- Kwong L.K., Sohal R.S.** Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys* (1998) 350, 118-26
- Lange H., Lisowsky T., Gerber J., Muhlenhoff U., Kispal G., Lill R.** An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep* (2001) 2, 715-20
- Lash L.H., Jones D.P.** Characterization of the membrane-associated thiol oxidase activity of rat small-intestinal epithelium. *Arch Biochem Biophys* (1983) 225, 344-52
- Lash L.H., Jones D.P.** Purification and properties of the membranal thiol oxidase from porcine kidney. *Arch Biochem Biophys* (1986) 247, 120-30
- Leu J.I., Dumont P., Hafey M., Murphy M.E., George D.L.** Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* (2004) 6, 443-50
- Lingham R.B., Stancel G.M., Loose-Mitchell D.S.** Estrogen regulation of epidermal growth factor receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* (1988) 2, 230-5
- Liochev S.I., Fridovich I.** The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic Biol Med* (2007) 42, 1465-9
- Lipscomb D.C., Gorman L.G., Traystman R.J., Hurn P.D.** Low molecular weight iron in cerebral ischemic acidosis in vivo. *Stroke* (1998) 29, 487-92; discussion 493
- Lisowsky T.** Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* (1992) 232, 58-64
- Lisowsky T.** ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* (1994) 26, 15-20
- Liu Y., Downey J.M.** Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol* (1992) 263, H1107-12
- Liu H., Colavitti R., Rovira, II, Finkel T.** Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* (2005) 97, 967-74
- Loffler M., Becker C., Wegerle E., Schuster G.** Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria. *Histochem Cell Biol* (1996) 105, 119-28
- Love S.** Neuronal expression of cell cycle-related proteins after brain ischaemia in man. *Neurosci Lett* (2003) 353, 29-32
- Maggi A., Vegeto E., Brusadelli A., Belcredito S., Pollio G., Ciana P.** Identification of estrogen target genes in human neural cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2000) 74, 319-25
- Maggi A.** Estrogens, apoptosis and cells of neural origin. *J Neural Transm Suppl* (2000) 59, 115-23

- Mailier K.** Superoxide radical as electron donor for oxidative phosphorylation of ADP. *Biochem Biophys Res Commun* (1990) 170, 59-64
- Mairet-Coello G., Tury A., Fellmann D., Jouvenot M., Griffond B.** Expression of SOx-2, a member of the FAD-dependent sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family, in rat brain. *Neuroreport* (2002) 13, 2049-51
- Mairet-Coello G., Tury A., Esnard-Feve A., Fellmann D., Risold P.Y., Griffond B.** FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system. *J Comp Neurol* (2004) 473, 334-63
- Mairet-Coello G., Tury A., Fellmann D., Risold P.Y., Griffond B.** Ontogenesis of the sulfhydryl oxidase QSOX expression in rat brain. *J Comp Neurol* (2005) 484, 403-17
- Mancini M., Nicholson D.W., Roy S., Thornberry N.A., Peterson E.P., Casciola-Rosen L.A., Rosen A.** The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* (1998) 140, 1485-95
- Mansuy V., Boireau W., Fraichard A., Schlick J.L., Jouvenot M., Delage-Mourroux R.** GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* (2004) 325, 639-48
- Manthey D., Behl C.** From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen. *Neuroscience* (2006) 138, 845-50
- Marciniak A., Borkowska E., Kedra A., Rychlik M., Beltowski J.** Time-dependent transition from H₂O₂-extracellular signal-regulated kinase- to O₂-nitric oxide-dependent mechanisms in the stimulatory effect of leptin on renal Na⁺/K⁺-ATPase in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2006) 33, 1216-24
- Marciniak S.J., Ron D.** Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* (2006) 86, 1133-49
- Margueron R., Duong V., Bonnet S., Escande A., Vignon F., Balaguer P., Cavailles V.** Histone deacetylase inhibition and estrogen receptor alpha levels modulate the transcriptional activity of partial antiestrogens. *J Mol Endocrinol* (2004) 32, 583-94
- Massafra C., Gioia D., De Felice C., Picciolini E., De Leo V., Bonifazi M., Bernabei A.** Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *J Endocrinol* (2000) 167, 447-52
- Mates J.M., Sanchez-Jimenez F.M.** Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* (2000) 32, 157-70
- Matsuba S., Suga Y., Ishidoh K., Hashimoto Y., Takamori K., Kominami E., Wilhelm B., Seitz J., Ogawa H.** Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. *J Dermatol Sci* (2002) 30, 50-62
- Matsuno A., Takekoshi S., Sanno N., Utsunomiya H., Ohsugi Y., Saito N., Kanemitsu H., Tamura A., Nagashima T., Osamura R.Y., Watanabe K.** Modulation of protein kinases and microtubule-associated proteins and changes in ultrastructure in female rat pituitary cells: effects of estrogen and bromocriptine. *J Histochem Cytochem* (1997) 45, 805-13

- Maurel A., Hernandez C., Kunduzova O., Bompard G., Cambon C., Parini A., Frances B.** Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2003) 284, H1460-7
- Maurer I., Zierz S., Moller H.J.** A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging* (2000) 21, 455-62
- McCord J.M., Fridovich I.** The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem* (1970) 245, 1374-7
- McCullough L.D., Hurn P.D.** Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends Endocrinol Metab* (2003) 14, 228-35
- McKnight G.S., Palmiter R.D.** Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chick oviduct. *J Biol Chem* (1979) 254, 9050-8
- McNeill A.M., Kim N., Duckles S.P., Krause D.N., Kontos H.A.** Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke* (1999) 30, 2186-90
- Melino G., Bernassola F., Ranalli M., Yee K., Zong W.X., Corazzari M., Knight R.A., Green D.R., Thompson C., Vousden K.H.** p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* (2004) 279, 8076-83
- Mellor H.R., Harris A.L.** The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev* (2007)
- Merot Y., Ferriere F., Debroas E., Flouriot G., Duval D., Saligaut C.** Estrogen receptor alpha mediates neuronal differentiation and neuroprotection in PC12 cells: critical role of the A/B domain of the receptor. *J Mol Endocrinol* (2005) 35, 257-67
- Methy D., Bertrand N., Prigent-Tessier A., Stanimirovic D., Beley A., Marie C.** Differential MnSOD and HO-1 expression in cerebral endothelial cells in response to sublethal oxidative stress. *Brain Res* (2004) 1003, 151-8
- Migliaccio A., Piccolo D., Castoria G., Di Domenico M., Bilancio A., Lombardi M., Gong W., Beato M., Auricchio F.** Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *Embo J* (1998) 17, 2008-18
- Miyashita T., Harigai M., Hanada M., Reed J.C.** Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* (1994) 54, 3131-5
- Miyashita T., Reed J.C.** Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* (1995) 80, 293-9
- Mong J.A., Blutstein T.** Estradiol modulation of astrocytic form and function: implications for hormonal control of synaptic communication. *Neuroscience* (2006) 138, 967-75
- Montano M.M., Muller V., Trobaugh A., Katzenellenbogen B.S.** The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* (1995) 9, 814-25

- Morgan M.J., Kim Y.S., Liu Z.** Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid Redox Signal* (2007) 9, 1471-83
- Mosselman S., Polman J., Dijkema R.** ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* (1996) 392, 49-53
- Mueller M.D., Vigne J.L., Minchenko A., Lebovic D.I., Leitman D.C., Taylor R.N.** Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97, 10972-7
- Muramatsu M., Inoue S.** Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 270, 1-10
- Murphy L.J., Ghahary A.** Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. *Endocr Rev* (1990) 11, 443-53
- Musard J.F., Sallot M., Dulieu P., Fraichard A., Ordener C., Remy-Martin J.P., Jouvenot M., Adami P.** Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 287, 83-91
- Nishiyama J., Yi X., Venkatachalam M.A., Dong Z.** cDNA cloning and promoter analysis of rat caspase-9. *Biochem J* (2001) 360, 49-56
- Nomura Y.** Neuronal apoptosis and protection: effects of nitric oxide and endoplasmic reticulum-related proteins. *Biol Pharm Bull* (2004) 27, 961-3
- Nuclear Receptor Signaling Atlas (Program).** Nuclear receptor signaling the e-journal of NURSA. (www.nursa.org)
- O'Lone R., Frith M.C., Karlsson E.K., Hansen U.** Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* (2004) 18, 1859-75
- Oltvai Z.N., Millman C.L., Korsmeyer S.J.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* (1993) 74, 609-19
- Orient A., Donko A., Szabo A., Leto T.L., Geiszt M.** Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrol Dial Transplant* (2007) 22, 1281-8
- Ostrowski M.C., Kistler W.S., Williams-Ashman H.G.** A flavoprotein responsible for the intense sulfhydryl oxidase activity of rat seminal vesicle secretion. *Biochem Biophys Res Commun* (1979) 87, 171-6
- Ostrowski M.C., Kistler W.S.** Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry* (1980) 19, 2639-45
- Oursler M.J., Pederson L., Pyfferoen J., Osdoby P., Fitzpatrick L., Spelsberg T.C.** Estrogen modulation of avian osteoclast lysosomal gene expression. *Endocrinology* (1993) 132, 1373-80
- Panahian N., Yoshiura M., Maines M.D.** Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J Neurochem* (1999) 72, 1187-203

- Parducz A., Hajszan T., Maclusky N.J., Hoyk Z., Csakvari E., Kurunczi A., Prange-Kiel J., Leranth C.** Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids. *Neuroscience* (2006) 138, 977-85
- Pawlak J., Brito V., Kupperts E., Beyer C.** Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Res Mol Brain Res* (2005) 138, 1-7
- Pediconi N., Ianari A., Costanzo A., Belloni L., Gallo R., Cimino L., Porcellini A., Screpanti I., Balsano C., Alesse E., Gulino A., Levrero M.** Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* (2003) 5, 552-8
- Pedram A., Razandi M., Aitkenhead M., Hughes C.C., Levin E.R.** Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J Biol Chem* (2002) 277, 50768-75
- Peleg S., Schrader W.T., O'Malley B.W.** Differential sensitivity of chicken progesterone receptor forms to sulfhydryl reactive reagents. *Biochemistry* (1989) 28, 7373-9
- Pellerin I., Vuillermoz C., Jouvenot M., Ordener C., Royez M., Adessi G.L.** Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* (1993) 90, R17-21
- Pereverzev M.O., Vygodina T.V., Konstantinov A.A., Skulachev V.P.** Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans* (2003) 31, 1312-5
- Perfettini J.L., Kroemer R.T., Kroemer G.** Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak. *Nat Cell Biol* (2004) 6, 386-8
- Pfaffl M.W.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* (2001) 29, e45
- Pike A.C., Brzozowski A.M., Walton J., Hubbard R.E., Thorsell A.G., Li Y.L., Gustafsson J.A., Carlquist M.** Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen. *Structure* (2001) 9, 145-53
- Polimeno L., Lisowsky T., Francavilla A.** From yeast to man--from mitochondria to liver regeneration: a new essential gene family. *Ital J Gastroenterol Hepatol* (1999) 31, 494-500
- Pollard M.G., Travers K.J., Weissman J.S.** Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* (1998) 1, 171-82
- Pollard T.D., Earnshaw W.C.** *Biologie Cellulaire*. (2004) Elsevier
- Polster B.M., Kinnally K.W., Fiskum G.** BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J Biol Chem* (2001) 276, 37887-94
- Powis G., Mustacich D., Coon A.** The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med* (2000) 29, 312-22
- Powis G., Montfort W.R.** Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2001) 41, 261-95

- Pral O.W., Sarcevic B., Musgrove E.A., Watts C.K., Sutherland R.L.** Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem* (1997) 272, 10882-94
- Prokai L., Prokai-Tatrai K., Perjesi P., Zharikova A.D., Perez E.J., Liu R., Simpkins J.W.** Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100, 11741-6
- Putnam C.D., Arvai A.S., Bourne Y., Tainer J.A.** Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* (2000) 296, 295-309
- Qin Z.H., Wang Y., Kikly K.K., Sapp E., Kegel K.B., Aronin N., DiFiglia M.** Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem* (2001) 276, 8079-86
- Quinn M.T., Gauss K.A.** Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* (2004) 76, 760-81
- Radom J., Colin D., Thiebault F., Dognin-Bergeret M., Mairet-Coello G., Esnard-Feve A., Fellmann D., Jouvenot M.** Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1759, 225-33
- Raje S., Thorpe C.** Inter-domain redox communication in flavoenzymes of the quiescin/sulfhydryl oxidase family: role of a thioredoxin domain in disulfide bond formation. *Biochemistry* (2003) 42, 4560-8
- Razandi M., Pedram A., Greene G.L., Levin E.R.** Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* (1999) 13, 307-19
- Razandi M., Pedram A., Levin E.R.** Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol* (2000) 14, 1434-47
- Rau S.W., Dubal D.B., Bottner M., Wise P.M.** Estradiol differentially regulates c-Fos after focal cerebral ischemia. *J Neurosci* (2003a) 23, 10487-94
- Rau S.W., Dubal D.B., Bottner M., Gerhold L.M., Wise P.M.** Estradiol attenuates programmed cell death after stroke-like injury. *J Neurosci* (2003b) 23, 11420-6
- Reddy K.B., Yee D., Hilsenbeck S.G., Coffey R.J., Osborne C.K.** Inhibition of estrogen-induced breast cancer cell proliferation by reduction in autocrine transforming growth factor alpha expression. *Cell Growth Differ* (1994) 5, 1275-82
- Rochefort H.** Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer. *Ciba Found Symp* (1995) 191, 254-65; discussion 265-8
- Ryan K.M., Ernst M.K., Rice N.R., Vousden K.H.** Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* (2000) 404, 892-7
- Santen R.J., Song R.X., McPherson R., Kumar R., Adam L., Jeng M.H., Yue W.** The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2002) 80, 239-56

- Sax J.K., Fei P., Murphy M.E., Bernhard E., Korsmeyer S.J., El-Deiry W.S.** BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* (2002) 4, 842-9
- Sayre L.M., Moreira P.I., Smith M.A., Perry G.** Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanita* (2005) 41, 143-64
- Schinzel A.C., Takeuchi O., Huang Z., Fisher J.K., Zhou Z., Rubens J., Hetz C., Danial N.N., Moskowitz M.A., Korsmeyer S.J.** Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102, 12005-10
- Schmitt E., Paquet C., Beauchemin M., Bertrand R.** DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B* (2007) 8, 377-97
- Scully K.M., Gleiberman A.S., Lindzey J., Lubahn D.B., Korach K.S., Rosenfeld M.G.** Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol* (1997) 11, 674-81
- Sevier C.S., Cuozzo J.W., Vala A., Aslund F., Kaiser C.A.** A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat Cell Biol* (2001) 3, 874-82
- Shibue T., Takeda K., Oda E., Tanaka H., Murasawa H., Takaoka A., Morishita Y., Akira S., Taniguchi T., Tanaka N.** Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* (2003) 17, 2233-8
- Shiloh Y.** ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* (2001) 11, 71-7
- Shimizu S., Ide T., Yanagida T., Tsujimoto Y.** Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* (2000) 275, 12321-5
- Shimizu T., Kamegai J., Tamura H., Ishii S., Sugihara H., Oikawa S.** The estrogen receptor (ER) alpha, but not ER beta, gene is expressed in hypothalamic growth hormone-releasing hormone neurons of the adult female rat. *Neurosci Res* (2005) 52, 121-5
- Shimizu S., Tsujimoto Y.** Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97, 577-82
- Shughrue P.J., Merchenthaler I.** Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury. *Neuroscience* (2003) 116, 851-61
- Simoncini T., Hafezi-Moghadam A., Brazil D.P., Ley K., Chin W.W., Liao J.K.** Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* (2000) 407, 538-41
- Simpson E.R.** Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2003) 86, 225-30
- Singer C.A., Rogers K.L., Dorsa D.M.** Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport* (1998) 9, 2565-8

- Singh M., Meyer E.M., Simpkins J.W.** The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology* (1995) 136, 2320-4
- Singh M., Setalo G., Jr., Guan X., Warren M., Toran-Allerand C.D.** Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci* (1999) 19, 1179-88
- Smith M.A., Sayre L.M., Monnier V.M., Perry G.** Oxidative posttranslational modifications in Alzheimer disease. A possible pathogenic role in the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles. *Mol Chem Neuropathol* (1996) 28, 41-8
- Soares R., Guo S., Gartner F., Schmitt F.C., Russo J.** 17 beta -estradiol-mediated vessel assembly and stabilization in tumor angiogenesis requires TGF beta and EGFR crosstalk. *Angiogenesis* (2003) 6, 271-81
- Sohrabji F., Miranda R.C., Toran-Allerand C.D.** Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons. *J Neurosci* (1994) 14, 459-71
- Song R.X., McPherson R.A., Adam L., Bao Y., Shupnik M., Kumar R., Santen R.J.** Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* (2002) 16, 116-27
- Sortino M.A., Chisari M., Merlo S., Vancheri C., Caruso M., Nicoletti F., Canonico P.L., Copani A.** Glia mediates the neuroprotective action of estradiol on beta-amyloid-induced neuronal death. *Endocrinology* (2004) 145, 5080-6
- Spelsberg T.C., Rories C., Rejman J.J., Goldberger A., Fink K., Lau C.K., Colvard D.S., Wiseman G.** Steroid action on gene expression: possible roles of regulatory genes and nuclear acceptor sites. *Biol Reprod* (1989) 40, 54-69
- Starkov A.A., Fiskum G., Chinopoulos C., Lorenzo B.J., Browne S.E., Patel M.S., Beal M.F.** Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* (2004) 24, 7779-88
- Stein B., Yang M.X.** Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol* (1995) 15, 4971-9
- Stein G., Lisowsky T.** Functional comparison of the yeast scERV1 and scERV2 genes. *Yeast* (1998) 14, 171-80
- Stiewe T., Putzer B.M.** Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* (2000) 26, 464-9
- Stone J.R., Yang S.** Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* (2006) 8, 243-70
- Sugiyama T., Shimizu S., Matsuoka Y., Yoneda Y., Tsujimoto Y.** Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene* (2002) 21, 4944-56
- Sun Y., Oberley L.W.** Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med* (1996) 21, 335-48

- Suzuki Y.J., Forman H.J., Sevanian A.** Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* (1997) 22, 269-85
- Swaisgood H.E., Horton H.R.** Sulphydryl oxidase: oxidation of sulphydryl groups and the formation of three-dimensional structure in proteins. *Ciba Found Symp* (1979) 205-22
- Takamori K., Thorpe J.M., Goldsmith L.A.** Skin sulphydryl oxidase. Purification and some properties. *Biochim Biophys Acta* (1980) 615, 309-23
- Thorpe C., Hooper K.L., Raje S., Glynn N.M., Burnside J., Turi G.K., Coppock D.L.** Sulphydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch Biochem Biophys* (2002) 405, 1-12
- Thorpe C., Coppock D.L.** Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. *J Biol Chem* (2007) 282, 13929-33
- Toran-Allerand C.D., Guan X., MacLusky N.J., Horvath T.L., Diano S., Singh M., Connolly E.S., Jr., Nethrapalli I.S., Tinnikov A.A.** ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* (2002) 22, 8391-401
- Tsujimoto Y., Finger L.R., Yunis J., Nowell P.C., Croce C.M.** Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* (1984) 226, 1097-9
- Tury A., Mairet-Coello G., Poncet F., Jacquemard C., Risold P.Y., Fellmann D., Griffond B.** QSOX sulphydryl oxidase in rat adenohipophysis: localization and regulation by estrogens. *J Endocrinol* (2004) 183, 353-63
- Van Hoecke M., Prigent-Tessier A.S., Garnier P.E., Bertrand N.M., Filomenko R., Bettaieb A., Marie C., Beley A.G.** Evidence of HIF-1 functional binding activity to caspase-3 promoter after photothrombotic cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* (2007) 34, 40-7
- van Loo G., Schotte P., van Gurp M., Demol H., Hoorelbeke B., Gevaert K., Rodriguez I., Ruiz-Carrillo A., Vandekerckhove J., Declercq W., Beyaert R., Vandenabeele P.** Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* (2001) 8, 1136-42
- Velu C.S., Niture S.K., Doneanu C.E., Pattabiraman N., Srivenugopal K.S.** Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress. *Biochemistry* (2007) 46, 7765-80
- Vernier-Magnin S., Nemos C., Mansuy V., Tolle F., Guichard L., Delage-Mourroux R., Jouvenot M., Fraichard A.** Analysis of the guinea-pig estrogen-regulated *gec1/GABARAPL1* gene promoter and identification of a functional ERE in the first exon. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1731, 23-31
- Villunger A., Michalak E.M., Coultas L., Mullauer F., Bock G., Ausserlechner M.J., Adams J.M., Strasser A.** p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* (2003) 302, 1036-8

- Vogt M., Bauer M.K., Ferrari D., Schulze-Osthoff K.** Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Lett* (1998) 429, 67-72
- von Montfort C., Sharov V.S., Metzger S., Schoneich C., Sies H., Klotz L.O.** Singlet oxygen inactivates protein tyrosine phosphatase-1B by oxidation of the active site cysteine. *Biol Chem* (2006) 387, 1399-404
- Wang X.W., Zhan Q., Coursen J.D., Khan M.A., Kontny H.U., Yu L., Hollander M.C., O'Connor P.M., Fornace A.J., Jr., Harris C.C.** GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96, 3706-11
- Wang Y., Johnson P.** Expression of CD45 lacking the catalytic protein tyrosine phosphatase domain modulates Lck phosphorylation and T cell activation. *J Biol Chem* (2005) 280, 14318-24
- Webb D.K., Moulton B.C., Khan S.A.** Estrogen induces expression of c-jun and jun-B protooncogenes in specific rat uterine cells. *Endocrinology* (1993) 133, 20-8
- Wen Y., Yang S., Liu R., Brun-Zinkernagel A.M., Koulen P., Simpkins J.W.** Transient cerebral ischemia induces aberrant neuronal cell cycle re-entry and Alzheimer's disease-like tauopathy in female rats. *J Biol Chem* (2004) 279, 22684-92
- Whatley S.A., Curti D., Das Gupta F., Ferrier I.N., Jones S., Taylor C., Marchbanks R.M.** Superoxide, neuroleptics and the ubiquinone and cytochrome b5 reductases in brain and lymphocytes from normals and schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* (1998) 3, 227-37
- Wilson M.E., Liu Y., Wise P.M.** Estradiol enhances Akt activation in cortical explant cultures following neuronal injury. *Brain Res Mol Brain Res* (2002) 102, 48-54
- Wittke I., Wiedemeyer R., Pillmann A., Savelyeva L., Westermann F., Schwab M.** Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescine6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* (2003) 63, 7742-52
- Woycechowsky K.J., Raines R.T.** Native disulfide bond formation in proteins. *Curr Opin Chem Biol* (2000) 4, 533-9
- Wurtz J.M., Bourguet W., Renaud J.P., Vivat V., Chambon P., Moras D., Gronemeyer H.** A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* (1996) 3, 206
- Xanthoudakis S., Miao G., Wang F., Pan Y.C., Curran T.** Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *Embo J* (1992) 11, 3323-35
- Yamada H., Takamori K., Ogawa H.** Localization and some properties of skin sulfhydryl oxidase. *Arch Dermatol Res* (1987a) 279, 194-7
- Yamada H., Takamori K., Ogawa H.** Effect of divalent cations and proteases on skin sulfhydryl oxidase activity. *J Dermatol* (1987b) 14, 212-7
- Yamada H., Suga Y., Takamori K.** [Reaction mechanism catalyzed by skin sulfhydryl oxidase]. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* (1989) 99, 499-502

- Yamada H., Suga Y., Takamori K., Ogawa H.** Stoichiometry of the reaction catalyzed by skin sulfhydryl oxidase. *J Dermatol* (1994) 21, 394-6
- Yin X.M., Oltvai Z.N., Korsmeyer S.J.** BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* (1994) 369, 321-3
- Young L.J., Wang Z., Donaldson R., Rissman E.F.** Estrogen receptor alpha is essential for induction of oxytocin receptor by estrogen. *Neuroreport* (1998) 9, 933-6
- Yuan Z.M., Shioya H., Ishiko T., Sun X., Gu J., Huang Y.Y., Lu H., Kharbanda S., Weichselbaum R., Kufe D.** p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* (1999) 399, 814-7
- Zanata S.M., Luvizon A.C., Batista D.F., Ikegami C.M., Pedrosa F.O., Souza E.M., Chaves D.F., Caron L.F., Pelizzari J.V., Laurindo F.R., Nakao L.S.** High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. *Redox Rep* (2005) 10, 319-23
- Zhan Q., Antinore M.J., Wang X.W., Carrier F., Smith M.L., Harris C.C., Fornace A.J., Jr.** Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* (1999) 18, 2892-900
- Zhang L., Yu L., Yu C.A.** Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* (1998) 273, 33972-6
- Zhang Y., Tounekti O., Akerman B., Goodyer C.G., LeBlanc A.** 17-beta-estradiol induces an inhibitor of active caspases. *J Neurosci* (2001) 21, RC176
- Zhu Y., Yang G.Y., Ahlemeyer B., Pang L., Che X.M., Culmsee C., Klumpp S., Kriegstein J.** Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci* (2002) 22, 3898-909
- Zhu X., Su B., Wang X., Smith M.A., Perry G.** Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* (2007) 64, 2202-10