



HAL
open science

Cycle redox quinone-quinone réductase 2 et conséquences sur la production d'espèces oxygénées réactives dans le contexte cellulaire

Laure-Estelle Cassagnes

► **To cite this version:**

Laure-Estelle Cassagnes. Cycle redox quinone-quinone réductase 2 et conséquences sur la production d'espèces oxygénées réactives dans le contexte cellulaire. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30148 . tel-01284055

HAL Id: tel-01284055

<https://theses.hal.science/tel-01284055>

Submitted on 7 Mar 2016

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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Laure-Estelle CASSAGNES

le lundi 28 septembre 2015

Titre :

Cycle redox quinone/quinone réductase 2 et conséquences sur la production d'espèces oxygénées réactives dans le contexte cellulaire

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :

Laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement (PHARMA-DEV)

Directeur/trice(s) de Thèse :

Professeure Françoise NEPVEU

Jury :

Dr Catherine BERTHOMIEU, CEA Cadarache

Dr Béatrice TUCCIO-LAURICELLA, Université Aix-Marseille

Pr Myriam MALET-MARTINO, Université Toulouse 3, Paul Sabatier

Dr Jean Albert BOUTIN, Institut de Recherche Servier, Croissy-sur-Seine

Dr Gilles FERRY, Institut de Recherches Servier, Croissy-sur-Seine

Dr Karine Reybier, Université Toulouse 3, Paul Sabatier

Pr Françoise NEPVEU, Université Toulouse 3, Paul Sabatier

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Invité

Invité

Invité

Directrice de Thèse

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein de l'équipe RedSTress dirigée par la professeure Françoise NEPVEU du Laboratoire « Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement », PHARMA-DEV, UMR 152 IRD-Université (Dir. N. Fabre).

Ce travail a été mené en étroite collaboration scientifique avec messieurs Jean Boutin et Gilles Ferry du Département de Biotechnologie, Pharmacologie moléculaire et cellulaire de l'Institut de Recherche Servier (IdRS). Outre le financement de la bourse de thèse et de son fonctionnement, l'IdRS a contribué par l'apport de produits spécifiques et d'un fort soutien logistique permettant la réalisation d'expériences originales à l'interface chimie-biologie. Un certain nombre d'expériences ont également été menées au sein de l'Institut lors d'un séjour effectué en début de formation doctorale. Ainsi, à l'issue de ce travail, je souhaite remercier tous ceux qui ont permis sa réalisation.

Je remercie Jean Boutin pour son soutien scientifique et son implication permanente dans ce projet. Je remercie Gilles Ferry pour son appui et sa disponibilité. Je ne saurais vous dire à quel point votre aide à tous les niveaux m'a permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions qu'on puisse espérer.

Je remercie Régis Gayon et Raphaël Sevrain de la société Vectalys pour la production des lignées cellulaires et leur aide précieuse sur tout le travail biologique.

Je remercie également Natacha Moulharat, Mathias Antoine, Estelle Marcheteau et Christine Ouvry de l'Institut de Recherche Servier pour leur accueil, leurs conseils et leur soutien.

Je remercie Madame la Professeure Françoise Nepveu, ma directrice de thèse, pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche. Votre soutien, vos conseils précieux mais également nos discussions enflammées sur les merveilles de la science m'ont permis d'assouvir ma passion.

Je remercie très sincèrement Madame le Docteur Karine Reybier pour avoir également encadré et suivi mes travaux durant ces trois années. Ta bienveillance et ton soutien m'ont

permis de me rassurer et de relativiser au cours de ces trois années mais aussi de pouvoir continuer dans la recherche.

Je remercie Madame le Docteur Béatrice Tuccio-Lauricella, maître de conférences à l'Université Aix-Marseille et Madame le Docteur Catherine Berthomieu, directrice de recherches au Laboratoire des Interactions Protéine Métal au CEA Cadarache, pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je souhaite également remercier Madame la Professeure Myriam Malet-Martino du Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêts Biologiques à l'Université Toulouse III Paul Sabatier pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury.

Je remercie du fond du cœur Pierre Pério pour son aide vis-à-vis des soucis techniques, ses explications, sa bonne humeur et son amitié. Nos raids de déglçage du - 80°C ou de nettoyage après inondation d'eau distillée resteront parmi mes meilleurs souvenirs.

Je remercie Brice Ronsin et Philippe Cochard du Centre de Biologie du Développement, Université Paul Sabatier, pour leurs conseils et leur aide durant les essais de microscopie confocale.

Je remercie tous les membres, passés et présents, permanents et non permanents, du laboratoire qui m'ont permis de travailler dans une ambiance sympathique : Ennaji Najahi, Nambinina Rakotoarivelo, Stéphanie Caze-Subra, Paul-Louis Fabre, Cynthia Girardi, Fabrice Collin, Nicolas Fabre, Valérie Jullian, Geneviève Bourdy, Eric Deharo, Jan Sudor, Aida Chaker, Yen Nguyen, Thi Thu Vu, Luyen Hong Le, Solomiia Kozachok, German Gonzalez, Mireia Tomàs, Rachid Chawech, Sokhna Keita Alassane, Alexis Valentin, Rémi Manczak, Clémence Cheignon, Mireia Tomas, Mohamed Haddad et tous les membres du laboratoire PHARMA-DEV.

Je souhaite également remercier Éliane Pelissou et Franck Marie-Sainte dont le travail remarquable et la gentillesse m'ont permis de gérer toutes les questions administratives et les commandes.

Je remercie également mes amis membres de D-SMaRT, l'association qui m'a permis de voir plus loin que le labo, de rencontrer des doctorants de tous les horizons et d'en apprendre plus sur l'Université Paul Sabatier.

Finalement je remercie mes amis et ma famille pour leur soutien au cours de ces trois années. Caro tu es pour moi comme une grande sœur, je te remercie pour ta bonne humeur et ta bienveillance. Wesley, je ne saurais trouver les mots pour te remercier pour le soutien sans faille que tu m'apportes depuis le début. Ta patience et ton intérêt pour mon travail ainsi que toutes tes attentions m'ont permis d'être plus épanouie. Merci à mes parents et à mon frère qui m'ont encouragée et soutenue tout au long de mes études ; ce travail représente l'aboutissement de leurs efforts.

Je dédie cette thèse à mon grand-père, André, qui m'a transmis sa passion des sciences et qui, j'en suis sûre, aurait aimé lire mon manuscrit et serait fier de sa petite-fille.

Sommaire

Remerciements	i
Liste des symboles et des abréviations	vii
Introduction	1
Chapitre 1 – Revue bibliographique.....	3
1. La NAD(P)H : quinone réductase 1 (QR1)	5
1.1. Structure	6
1.2. Particularités.....	8
1.3. Mécanisme d’action.....	8
1.4. Détoxification des quinones.....	10
1.5. Rôle de QR1 dans l’équilibre redox cellulaire.....	11
1.6. Bioactivation de molécules bioréductibles.....	12
2. La NRH:quinone réductase 2 (QR2)	14
2.1. Structure génétique et protéique	14
2.2. Mécanisme d’action.....	17
2.3. Modulateurs de l’activité de QR2.....	19
2.4. Rôles de QR2	21
a) Réduction des quinones.....	21
b) QR2 comme site de fixation de la mélatonine	22
c) Polymorphisme de QR2 et pathologies associées	22
d) Rôle de QR2 dans l’équilibre redox cellulaire.....	25
Chapitre 2 –Étude des substrats, modulateurs et inhibiteurs de QR2	29
Introduction	31
1. Activité enzymatique de QR2	32
1.1. Détermination de l’activité spécifique de QR2.....	33
1.2. Détermination du K_M de différents substrats de QR2	35
2. Potentiels redox des substrats de QR1 et QR2.....	38
3. Étude de la production d’espèces réactives de l’oxygène liée à la métabolisation des substrats de QR2	45
3.1. <i>Para</i> -quinones substrats de QR1 et QR2	46
3.2. Pseudo-quinones substrats de QR2.....	50
3.3. <i>Ortho</i> -quinones substrats de QR1 et QR2	50
3.4. Polyphénols modulateurs de QR2	52
3.5. Comparaison de l’intensité de production totale d’espèces réactives de l’oxygène après métabolisation des différents substrats par QR2.....	54
Conclusion.....	56

Chapitre 3 – Détermination des activités de QR1 et QR2 <i>in cellulo</i>	58
Introduction	60
1. Réduction des substrats par des lignées cellulaires surexprimant ou non QR1 et QR2	62
1.1. Cellules CHO-k1-NT	63
1.2. Cellules CHO-k1-QR1	64
1.3. Cellules CHO-k1-QR2	66
1.4. Effet des inhibiteurs et modulateurs sur la réduction des substrats pour les CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2	68
1.4.1. Effet des inhibiteurs spécifiques de QR1 et QR2 sur la réduction des substrats pour les CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2	68
1.4.2. Effet des modulateurs de QR2 sur la réduction des substrats pour les CHO-k1-QR2 ..	70
2. Production des espèces réactives de l’oxygène par des lignées cellulaires surexprimant ou non QR1 et QR2	72
2.1. Métabolisation des <i>para</i> -quinones par les lignées cellulaires CHO-k1-NT, CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2	72
2.2. Métabolisation des <i>ortho</i> -quinones par les lignées cellulaires CHO-k1-NT, CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2	77
3. Production des espèces réactives de l’oxygène par une lignée cellulaire surexprimant naturellement QR2.....	80
4. Visualisation et localisation de la production d’espèces réactives de l’oxygène par des lignées cellulaires surexprimant ou non QR1 et QR2	85
Conclusion.....	88
Chapitre 4 – Analyse de la production du superoxyde <i>in cellulo</i>	91
Introduction	93
1. Principe de la quantification <i>in cellulo</i> du radical superoxyde	94
2. Mesure de l’oxydation du dihydroéthidium par screening.....	95
3. Identification et quantification des dérivés de l’oxydation du dihydroéthidium	97
Conclusion.....	101
Conclusion générale et perspectives	103
Partie expérimentale.....	106
1. Matériel.....	107
1.1. Préparation de l’enzyme purifiée	108
1.2. Souches cellulaires utilisées	109
2. Méthodes	109
2.1. Activité enzymatique et calcul de Vmax et KM.....	109
2.1.1. Préparation des solutions	110
2.1.2. Distribution sur plaque 96 puits	110
2.1.3. Mesure de fluorescence.....	110
2.1.4. Analyse des données cinétiques	110

2.2. Méthode voltammétrie cyclique	111
2.3. Expériences de résonance paramagnétique électronique sur enzyme purifiée et sur cellules	111
2.3.1. Préparation des solutions	111
2.3.2. Traitement par les inhibiteurs	113
2.3.3. Préparation des solutions d'analyse d'enzyme purifiée	113
2.3.4. Préparation des solutions d'analyse des cellules	113
2.3.5. Conditions d'enregistrement des spectres RPE	114
2.3.6. Analyse des données RPE sur cellules	114
2.4. Méthode spectrophotométrie UV-visible (sonde redox Fe^{3+}/Fe^{2+})	115
2.4.1. Ensemencement des cellules	115
2.4.2. Traitement par les inhibiteurs et modulateurs	115
2.4.3. Traitement par les réactifs	116
2.4.4. Mesure UV-visible	116
2.4.5. Analyse des données cinétiques	116
2.5. Méthode microscopie confocale de fluorescence	117
2.5.1. Préparation du mowiol et du paraformaldéhyde 4 % pour la fixation des cellules	117
2.5.2. Ensemencement des cellules	117
2.5.3. Traitement par les inhibiteurs	118
2.5.4. Traitement par les substrats et co-substrats	118
2.5.5. Traitement par les sondes fluorescentes et fixation des cellules	118
2.5.6. Microscopie confocale de fluorescence	119
2.6. Mesure de la fluorescence du dihydroéthidium sur cellules	119
2.6.1. Préparation des solutions	119
2.6.2. Préparation et traitement des cellules	119
2.6.3. Mesure de fluorescence	119
2.7. Mesure de la production du 2-hydroxyéthidium dans les cellules par HPLC-MS	120
2.7.1. Préparation des solutions	120
2.7.2. Traitement des cellules	121
2.7.3. Méthode HPLC-MS	121
Bibliographie	122

Liste des symboles et des abréviations

A

a : constante de couplage hyperfin
Å : angstrom
ACN : acétonitrile
ADNc : ADN complémentaire
AP : protéine activatrice
ARE : élément de réponse aux antioxydants
ARNm : ARN messenger
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : adénosine triphosphate

B

Bacmid : vecteur navette de baculovirus
BNAH : 1-benzyl-1,4-dihydro-nicotinamide

C

C : cysteine
Carboxy-H₂DCFDA : diacétate de 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine
CB1954 : 5-(1-aziridiny)-2,4-dinitrobenzamide
C/EBP α : CAAT/ *enhancer binding protein*
CHO : cellule ovaire de hamster chinois
CHO-k1-NT : CHO non transfectées
CHO-k1-QR1 : CHO transfectées avec le gène de QR1
CHO-k1-QR2 : CHO transfectées avec le gène de QR2
CI₅₀ : concentration requise pour 50% d'inhibition *in vitro*
CO₂ : dioxyde de carbone
Coenzyme Q0 ou CoQ0 : 2,3-dimethoxy-5-méthyl-*p*-benzoquinone

D

Da : dalton ou unité de masse atomique
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
dB : décibels
DCIP : 2,6-dichlorophénolindolphénol

DHE : dihydroéthidium
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMPO : 5,5-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde
DMSO : diméthylsulfoxyde
DPBS : tampon phosphate salin Dulbecco's
DTPA : acide diéthylènetriamine penta acétique

E

ϵ : coefficient d'absorption molaire
E⁺ : éthidium
E⁰_{ox} : potentiel d'oxydation (V)
E⁰_{red} : potentiel de réduction (V)
E : enzyme
ECS : électrode au calomel saturé
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
Epa : potentiel de pic anodique
Epc : potentiel de pic cathodique
EpRE : élément de réponse aux électrophiles
ES : complexe enzyme substrat

F

F : phénylalanine
FAD : flavine adénine dinucléotide
[Fe(CN)₆]³⁻ : ion ferricyanure
[Fe(CN)₆]⁴⁻ : ion ferrocyanure
FMN : flavine mononucléotide

G

g : facteur de Landé
G : glycine
G : gauss
Gd : gadolinium

H

H : histidine
H : hydrogène
HCl : acide chlorhydrique
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HO[•] : radical hydroxyle
UHPLC : chromatographie liquide ultra haute performance
Hz : hertz

I

I : isoleucine
I/D : insertion / délétion
IF : intensité de fluorescence

K

k₁, k₋₁, k₂ : constantes de vitesse
K562 : lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique humaine
K₃Fe(CN)₆ : ferricyanure de potassium
kb : kilobase
K_{cat} : constante catalytique (s⁻¹.M⁻¹)
Keap 1 : *Kelch-like ECH-associated protein*
K_M : constante de Michaelis (mol.L⁻¹)
KO : *knock out* : délété

L

λ : longueur d'onde
Lévodopa : L-3-(3,4-dihydroxyphényl) alanine
La : lanthane

M

M : concentration molaire en mol.L⁻¹
min : minute
M⁽ⁿ⁾⁺ : cation métallique
MnTBAP : manganèse (III) tétrakis (4-acide benzoïque) chlorure de porphyrine
MT : récepteur de la mélatonine
mW : milliwatt
m/z : ratio masse sur charge

N

N : asparagine
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOH : hydroxyde de sodium
NDS : nitrosodisulfonate de potassium
nm : nanomètre
NF-κB : facteur nucléaire kappa B

NMN : *N*-méthyl-nicotinamide
NMNH : nicotinamide mononucléotide réduit
Nrf2 : *nuclear factor (erythroid-derived) related factor* : facteur de transcription nucléaire

NRH : *N*-ribosyl-dihyronicotinamide

O

O : oxygène
O₂^{•-} : radical superoxyde
2-OH-E⁺ : 2-hydroxyéthidium

P

P : produit
PBS : tampon phosphate salin
PFA : paraformaldéhyde

Q

Q : quinone
Q^{•-} : radical semiquinone
QH₂ : hydroquinone
QR1 : NAD(P)H:quinone réductase 1
QR2 : NRH:quinone reductase 2
QR2H₂ : forme réduite de QR2

R

ref : référence
RPE : résonance paramagnétique électronique
ROS : espèces réactives de l'oxygène

S

s : seconde
S : substrat
S29434 : N-(2-(2-methoxy-6H-dipyrido(2,3-a-3,2-e)pyrrolizin-11-yl)ethyl)-2-furamide
SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium
Sf9 : lignée cellulaire de *Spodoptera frugiperda*
SOD : superoxyde dismutase
SP1 : protéine spécifique 1
SPE : extraction en phase solide
SQ : semiquinone
SUB10R : 1-(carbamoyle) dihyronicotinamide
SVF : sérum de veau fœtal

T

TBAP : tétrabutylammonium perchlorate

TIC : courant ionique total

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

U

U : unité

u.a : unité arbitraire

UDP : uridine diphosphate

UF : unité de fluorescence

μL : micro litre

μM : micro molaire

UT : non traduit

V

V : volt

V_i : vitesse initiale

V_{max} : vitesse initiale maximale

vs : *versus*

W

W : tryptophane

X

XRE : élément de réponse aux xénobiotiques

Y

Y : Tyrosine

Introduction

Les quinones réductases sont des enzymes dédiées à la réduction par deux électrons de molécules hautement réactives, les quinones. La NAD(P)H:quinone réductase 1 (QR1) et son isoforme, la NRH:quinone réductase 2 (QR2), sont deux enzymes responsables de la métabolisation des quinones dans l'ensemble du corps humain. La NAD(P)H:quinone réductase 1 est étudiée depuis de nombreuses années et est indispensable au métabolisme et à l'élimination des quinones. Des études sur la forme purifiée de la NRH:quinone réductase 2 ont mis en évidence sa capacité à accepter de plus nombreux substrats que son homologue QR1. Cependant, le rôle exact de QR2 dans l'équilibre redox cellulaire reste encore difficile à déterminer car elle présente de nombreuses particularités et peu d'études se sont intéressées aux conséquences de l'activité de cette enzyme au niveau cellulaire.

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier et de comparer l'impact de l'activité métabolique de QR2 sur le stress oxydant à différentes échelles biologiques vis-à-vis de QR1. La métabolisation de différents types de substrats par QR2 permet une comparaison et une classification de l'impact des différentes familles de substrats testés. Ces travaux cherchent aussi à déterminer et comparer les méthodologies les plus appropriées pour identifier et quantifier les espèces réactives de l'oxygène produites au cours du métabolisme des quinones par QR2.

L'originalité du travail réside dans l'étude de l'activité de QR2 et de la production d'espèces réactives de l'oxygène conséquentes à cette activité sur protéine purifiée mais également sur lignées cellulaires intactes, primo-cultures et tissus. Pour cela, différentes méthodes physico-chimiques ont été appliquées de façon complémentaire. Les spectrophotométries de fluorescence et UV-visible ont permis de suivre l'activité métabolique de l'enzyme alors que la résonance paramagnétique électronique et la microscopie confocale de fluorescence ont permis le suivi de la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Ce mémoire s'organise en quatre chapitres. La première partie est consacrée à l'étude bibliographique des rôles, mécanismes d'action et pathologies associées aux quinones réductases et en particulier à la NRH:quinone réductase 2.

Le chapitre 2 décrit l'étude et la comparaison physico-chimique et enzymologique de différentes familles de substrats, modulateurs et inhibiteurs de QR2 ainsi que l'impact de la métabolisation des substrats par QR2 sur la production des espèces réactives de l'oxygène

afin de mieux comprendre les relations entre la structure des quinones réduites par QR2 et le stress oxydant généré.

Le chapitre 3 présente une étude comparative de la métabolisation de substrats par QR1 et QR2 au sein de différents modèles cellulaires et de la production d'espèces réactives de l'oxygène par ces différentes lignées.

Dans le chapitre 4, des approches méthodologiques complémentaires permettant de quantifier de manière sélective et spécifique la production intracellulaire du radical superoxyde ont été menées sur différentes lignées cellulaires.

La nomenclature et l'écriture des espèces réactives de l'oxygène sont faites selon les recommandations du journal « Free Radical Biology and Medicine » (**Forman H.J., 2015**). Les espèces oxygénées réactives étant particulièrement fugaces, les méthodes et protocoles utilisés ont été choisis pour leur robustesse et leur capacité à mesurer le plus directement possible l'analyte, notamment les radicaux libres. Les méthodes et protocoles ont également été ajustés aux recommandations les plus récentes des experts du domaine (**Clare L. Hawkins C.L, 2014 ; Balaraman Kalyanaraman et Kelvin J.A. Davies, 2011 ; Honglian Shi et Ke Jian Liu, 2005**).

Chapitre 1

Revue bibliographique

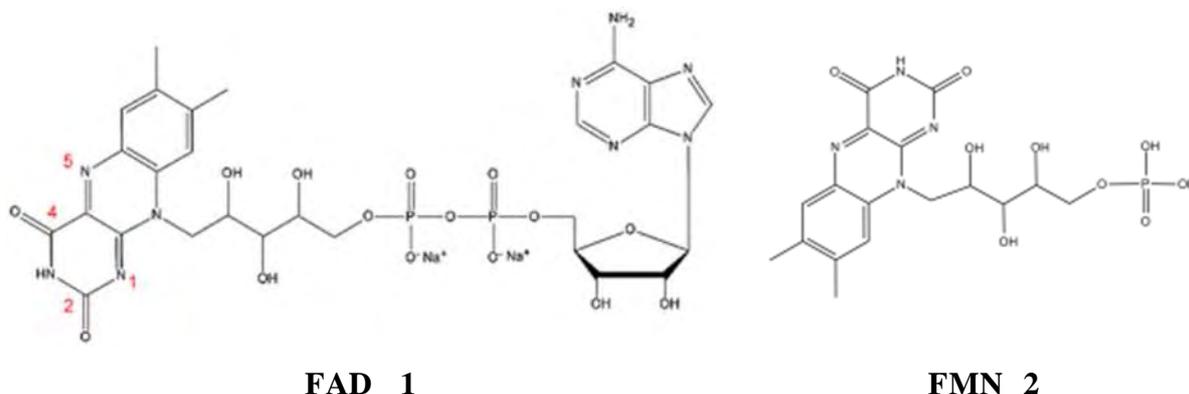
Revue bibliographique

Les quinones réductases.....	5
1. La NAD(P)H : quinone réductase 1 (QR1).....	5
1.1. Structure.....	6
1.2. Particularités	8
1.3. Mécanisme d'action	8
1.4. Détoxification des quinones	10
1.5. Rôle de QR1 dans l'équilibre redox cellulaire	11
1.6. Bioactivation de molécules bioréductibles	12
2. La NRH:quinone réductase 2 (QR2)	14
2.1. Structure génétique et protéique.....	14
2.2. Mécanisme d'action	17
2.3. Modulateurs de QR2	19
2.4. Rôles de QR2.....	21
a) Réduction des quinones	21
b) QR2 comme site de fixation de la mélatonine.....	22
c) Polymorphisme de QR2 et pathologies associées	22
d) Rôle de QR2 dans l'équilibre redox cellulaire	25

1. Les quinones réductases

Les quinones sont des composés organiques constitués d'un noyau benzène substitué par deux groupements oxo en 1,2 ou 1,4 (*ortho* ou *para*-quinones) et le plus souvent par d'autres groupements cycliques ou aliphatiques.

Les quinones réductases sont des oxydoréductases flavine dépendantes catalysant la réduction des quinones (**Liao S., 1961**). Elles sont ubiquitaires, cytosoliques et utilisent la flavine adénine dinucléotide (FAD, **1**) (mammifères, bactéries) ou la flavine mononucléotide (FMN, **2**) (plantes, champignons, bactéries) comme cofacteurs¹ (**Heyno E., 2009**). Ces enzymes du métabolisme de phase II² réduisent les quinones par deux électrons pour produire des hydroquinones stables éliminées après conjugaison avec le glutathion, l'acide glucuronique (glucuronoconjugaison), le sulfate (sulfoconjugaison), le groupement méthyle (alcylation) ou acétyle (acétylation), par d'autres enzymes du métabolisme de phase II



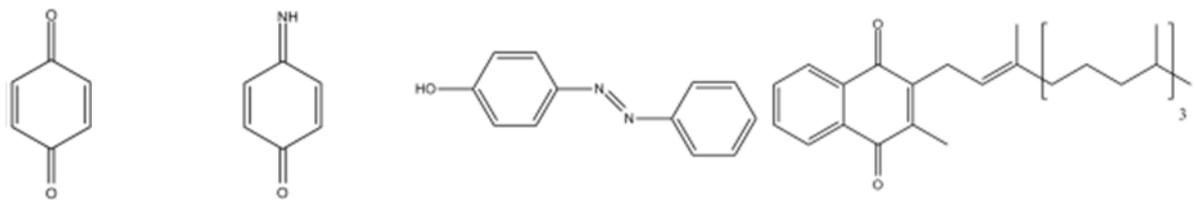
1. La NAD(P)H:quinone réductase 1 (QR1)

Parmi les quinones réductases, deux enzymes se détachent par leurs similitudes, leurs mécanismes de réduction des quinones et leurs intérêts en tant que cibles thérapeutiques potentielles. Il s'agit de la quinone réductase 1 et de la quinone réductase 2 faisant l'objet de ce mémoire.

¹ Un cofacteur est une substance chimique non protéique intervenant obligatoirement dans la réaction enzymatique et ayant pour rôle soit de transporter ou compléter un substrat, soit d'accepter un produit soit de participer à la structure de l'enzyme.

² Le métabolisme de phase I correspond majoritairement à des réactions d'oxydation par des mono-oxygénases, telles que le cytochrome P450, ou d'hydrolyse par des estérases des molécules circulantes dans le but de former des dérivés hydroxyles (-OH), amines (-NH₂) ou carboxyles (-COOH). Le métabolisme de phase II correspond à des réactions de conjugaison avec l'acide glucuronique, le sulfate, le glutathion ou les groupements méthyles et acétyles.

En 1958, Ernster et Navazio déterminent la présence d'une flavoprotéine capable d'oxyder la forme réduite du nicotinamide adénine dinucleotide (NADH, **7**) et fortement réactive dans la fraction soluble de microsomes de foie de rat. Ils la nomment DT-diaphorase³ et élucident au cours des années son fonctionnement cinétique, ses activateurs, ses inhibiteurs et la comparent à d'autres protéines utilisant le NADH comme co-substrat⁴ (**Ernster L., 1958**). Cette protéine également nommée NAD(P)H:quinone réductase 1 ou QR1 est une enzyme catalysant la réduction à deux électrons de quinones **3**, quinones imines **4** et de colorants azoïques **5**. Elle joue ainsi un rôle majeur dans la production de vitamine K1 ou phylloquinone **6** réduite nécessaire pour la γ -carboxylation de résidus glutamate de certaines protéines de la coagulation sanguine (**Wallin R., 1982**).



Quinone 3 quinone imine 4 colorant azoïque 5 phylloquinone 6

QR1 est ainsi une enzyme majeure du métabolisme des quinones et son induction, fréquemment coordonnée avec celle d'autres enzymes de détoxification de phase II, est reconnue pour son rôle protecteur contre les effets toxiques et carcinogènes des quinones (**Dinkova-Kostova A.T., 2000 ; Cadenas E., 1995 ; Ross D., 2004**).

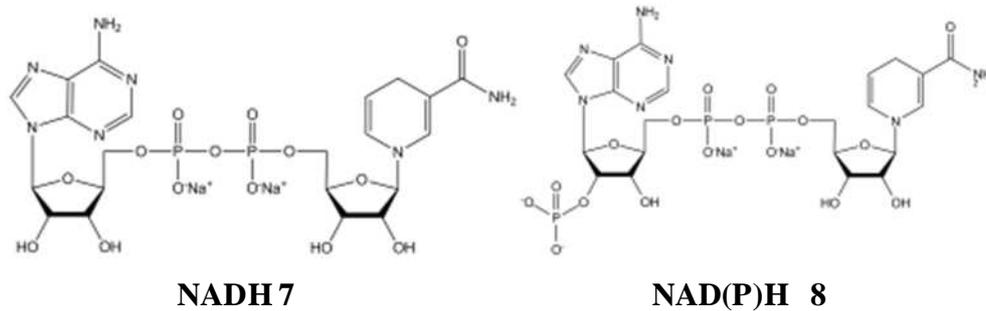
1.1. Structure

QR1 est une enzyme homodimérique fortement entrelacée, dont chaque monomère comporte 274 acides aminés (30 880 Da), codée par un gène localisé sur le chromosome 16q22 (**Jaiswal A.K., 1999**). Chaque sous-unité consiste en deux domaines, un domaine catalytique en structure α/β au niveau des résidus 1 à 220 et un domaine C-terminal plus court en épingle antiparallèle suivie par une hélice et plusieurs boucles. Ce domaine C-terminal forme une partie du site de liaison à la région hydrophile du NADH **7** ou du NAD(P)H **8** et contient le groupement prosthétique FAD **1** lié par des liaisons hydrogène entre ses deux oxygènes (O2

³ Du grec *diaphoros* pour différent. Le nom de DT-diaphorase est lié à la capacité de cette enzyme de catalyser la réduction de quinones et d'autres accepteurs d'électrons par le NADH et NADPH, auparavant nommés DPN (diphosphopyridine nucléotide) et TPN (triphosphopyridine nucléotide).

⁴ Un co-substrat est défini comme une substance chimique non protéique liée de façon transitoire et nécessaire à l'activité d'une enzyme.

et O4) et les azotes de ses cycles (N1 et N5) avec les groupements amines de la protéine (**Faig M., 2000**).



Le FAD **1** est orienté de telle sorte que son noyau isoalloxazine, capable d'accepter ou de relarguer un ou deux électrons, forme le plancher du site actif afin de faciliter les échanges d'électrons avec le co-substrat et le substrat⁵ (**Bianchet M.A., 2004**). Après le départ du NADP⁺, le substrat occupe une position fortement similaire à celle du co-substrat lié à l'enzyme en s'empilant sur le noyau isoalloxazine.

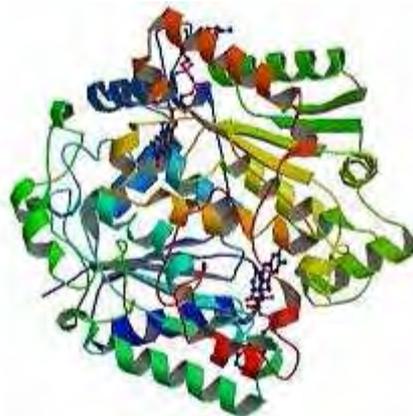


Figure 1. Structure cristalline de QR1. Chaque molécule de FAD (en bleu et rouge) est liée à une surface équivalente entre les deux monomères. Source Protein Data Bank (PDB), code 1d4a.

Le gène codant pour QR1 consiste en six exons et cinq introns et s'étend sur une région de 20 kb. L'exon un code pour la région 5' non traduite ou UT de l'ARNm alors que les exons deux à six codent pour le reste du gène et la région 3'UT. En 1991, Jaiswal et *al.* ont séquencé la région en amont de la partie codante et ont identifié divers modulateurs de transcription *cis*-régulateurs. Un de ces modulateurs est l'élément de réponse aux électrophiles (EpRE anciennement nommé élément de réponse aux antioxydants ARE) qui module l'expression basale du gène et l'induit en présence de composés aromatiques planaires et d'antioxydants phénoliques. Parmi les autres modulateurs se trouvent la séquence promotrice (contenant une

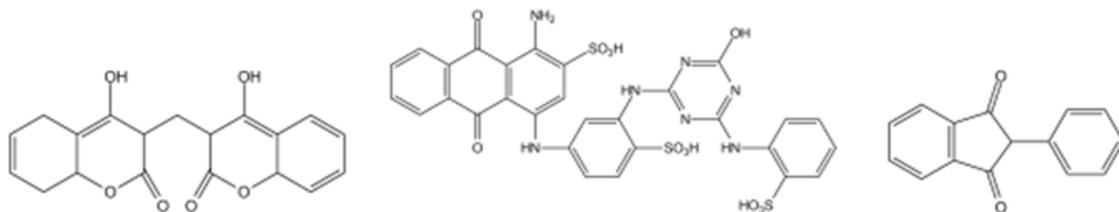
⁵ Un substrat enzymatique est une molécule qui, après s'être liée au site actif d'une enzyme, est transformée en un ou plusieurs produits.

CAT box et une TATA box), les protéines AP1 et AP2 (deux protéines permettant l'activation de la transcription en présence de divers *stimuli*), l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) et un site de liaison au NF-κB (protéine responsable du rétrocontrôle négatif de l'apoptose et impliquée dans la réponse au stress cellulaire) (Jaiswal A.K., 1991).

1.2. Particularités

La NAD(P)H:quinone reductase 1 ou QR1 présente différentes caractéristiques :

- sa réactivité vis-à-vis du NADH **7** ou du NAD(P)H **8** n'est pas spécifique et elle présente un large spectre de substrats accepteurs d'électrons. Elle catalyse la réduction de quinones **3**, quinones époxydes, quinone imines **4**, de certains composés aromatiques nitreux, de colorants azoïques **5** et de chrome hexavalent,



Dicoumarol 9

bleu cibacron 10

phénindone 11

- elle est fortement inhibée par le dicoumarol **9**, le bleu cibacron **10** et la phénindone **11**,
- elle catalyse des transferts « obligatoirement » à deux électrons (Cadenas E., 1995).

1.3. Mécanisme d'action

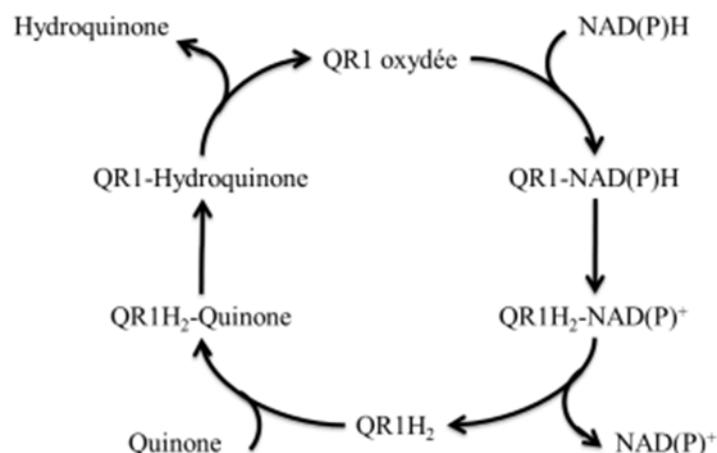


Figure 2. Mécanisme "ping pong" de réduction des quinones par la NAD(P)H:quinone réductase 1.

L'étude cristallographique de QR1 a révélé que l'enzyme agit *via* un mécanisme de « ping-pong » (Figure 2). Ainsi, la pyridine dinucléotide réduite NAD(P)H **8** se place au niveau des sites actifs de l'enzyme dont le cofacteur flavinique est à l'état oxydé FAD **1** (l'enzyme est alors sous la forme oxydée) pour le réduire à l'état FADH₂ (un hydrogène provenant du co-substrat et le second du solvant). Puis la pyridine dinucléotide oxydée NAD(P)⁺ est relarguée avant la fixation du substrat. Les sites de fixation du NAD(P)H et de la quinone se superposent de façon significative.

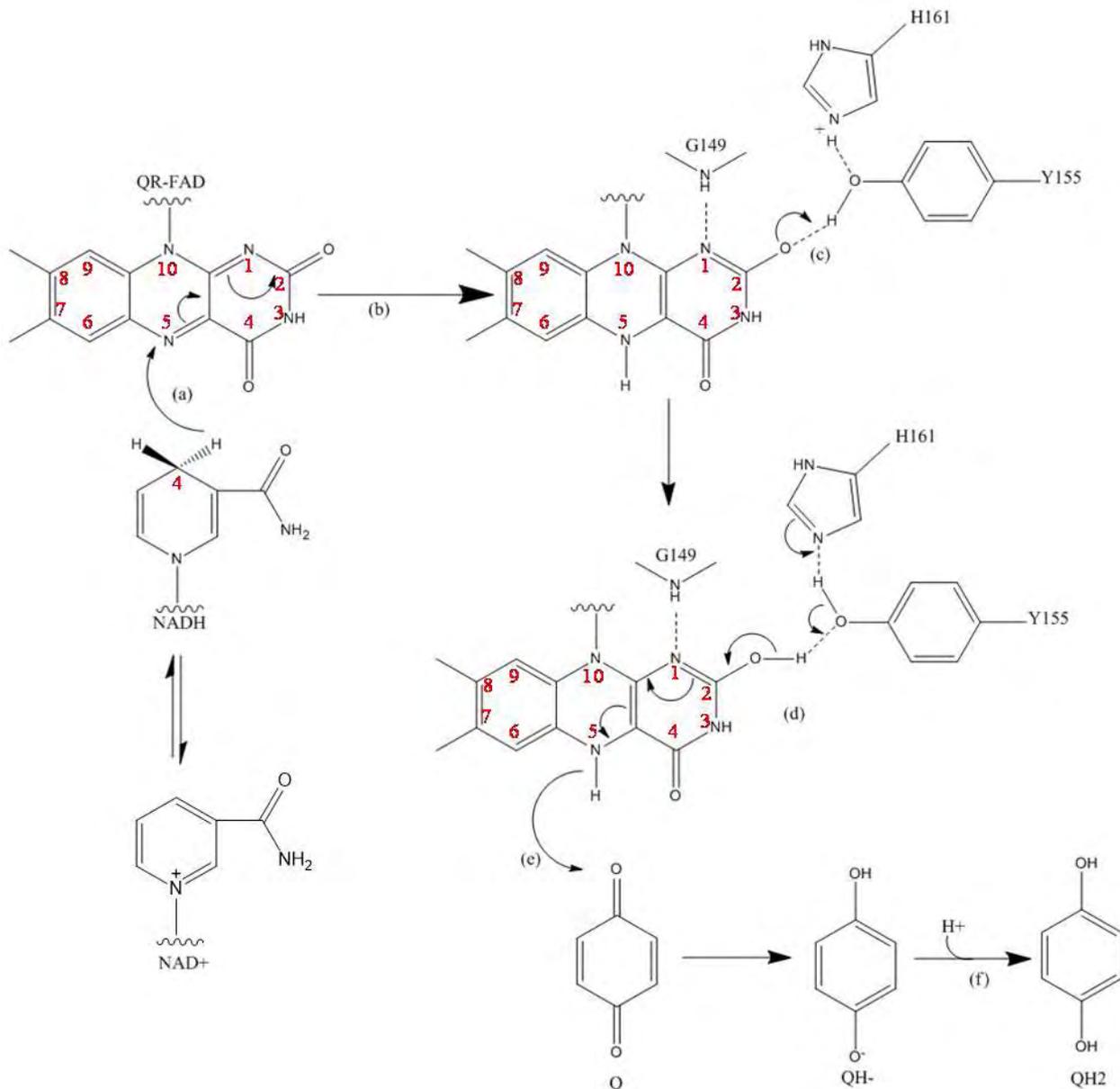


Figure 3. Mécanisme de la réduction obligatoire à deux électrons de la benzoquinone par QR1. La réaction finale est la suivante : $\text{NADH} + \text{Q} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2$ (d'après **Li R., 1995**).

Trois résidus de QR1 sont directement impliqués dans le transfert d'électrons : la glycine G149, la tyrosine Y155 et l'histidine H161. La Figure 3 schématise ce mécanisme réactionnel. Dans un premier temps (a), la proximité entre le C4 du nicotinamide et le N5 de l'isoalloxazine du FAD permettrait un premier transfert d'hydrogène vers le FAD. La charge négative ainsi développée serait délocalisée par tautomérisation (b) jusqu'à l'O2 du FAD, dont l'interaction hydrogène avec la chaîne latérale de Y155 favoriserait la protonation (c). L'apparition de cette charge sur le N1 du FAD s'avérant défavorable, cet atome établit une liaison hydrogène avec le NH principal de G149. Par ailleurs, la forme tyrosinate générée sur Y155 déprotonerait à son tour l'imidazolium H161 situé à proximité (d). Dans un second temps, le départ du co-substrat oxydé remplacé par la quinone, autoriserait un second transfert d'hydrogène, selon un relais de proton inverse à celui précédemment décrit et la reprotonation de H161 s'accompagnerait d'une délocalisation de la charge négative sur l'atome N5 du FAD. A nouveau, la faible distance séparant N5 de l'une des deux cétones du substrat, permettrait un second transfert d'hydrogène atypique sur l'oxygène (e), partiellement rendu électrophile par résonance ou sur le carbonyle, l'identité du site accepteur de H⁺ étant toujours controversée. L'hydroquinolate alors produite serait en mesure de déprotoner H161 situé à proximité de sa charge négative, pour être finalement relarguée sous forme d'hydroquinone (f). La reconstitution de l'imidazolium, quant à elle, serait assurée par un relais de liaisons hydrogène, connectant H161 au solvant.

Ce mécanisme, impliquant un transfert direct de deux électrons et d'hydrogène équilibré entre le NADH et le FAD puis le FADH₂ et la quinone, a été confirmé par des études de résonance paramagnétique électronique (RPE) qui n'ont pas permis de détecter des radicaux semiquinoniques lors du métabolisme de benzoquinones et de naphthoquinones par QR1 (**Iyanagi T., 1970**).

Il a également été démontré que l'inhibition de l'activité de QR1 par le dicoumarol **9** se produit suite à deux fortes interactions π - π entre un de ses cycles et le noyau isoalloxazine du FAD d'une part, et entre l'autre cycle et le groupement phénol de la tyrosine 128 d'autre part ce qui empêche la fixation du NAD(P)H au site actif de l'enzyme (**Chen S., 1999**).

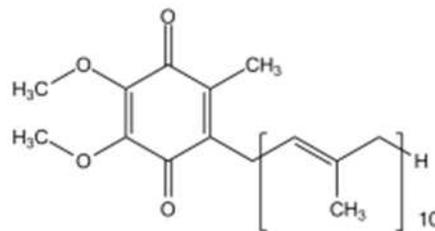
1.4. Détoxification des quinones

La détoxification des quinones par QR1 se fait d'une part par compétition avec d'autres enzymes, telles que les cytochromes P450 réductases métabolisant la réduction à un électron

de ces mêmes quinones favorisant la production de radicaux semiquinone et d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 4). D'autre part, la formation d'hydroquinone prévient les réactions directes entre les quinones et les groupements sulfhydryle intracellulaires ou l'inactivation d'enzymes à groupements thiol (comme la glutathion peroxydase) par addition nucléophile de Michaël (**Bianchet M.A., 2008**). Le rôle de QR1 dans la prévention de la mutagénèse et de la carcinogénèse a ainsi été mis en évidence (**Patrick B.A., 2012**).

1.5. Rôle de QR1 dans l'équilibre redox cellulaire

Des travaux ont démontré que cette enzyme pourrait jouer un rôle dans la protection des cellules contre le stress oxydant en réduisant des quinones endogènes dont la forme réduite aiderait à protéger les membranes cellulaires contre les dégâts oxydants. Ainsi, des expériences ont montré que la forme murine de QR1 peut catalyser la réduction d'analogues de l'ubiquinone **12** (coenzyme Q) en donnant la forme ubiquinol dans les liposomes (**Landi L., 1997**) et hépatocytes de rats (**Beyer R.E., 1996**). L'ubiquinol formé suite à cette réduction est un antioxydant efficace qui protège les phospholipides membranaires contre les attaques oxydantes, notamment la peroxydation des lipides.



Ubiquinone 12

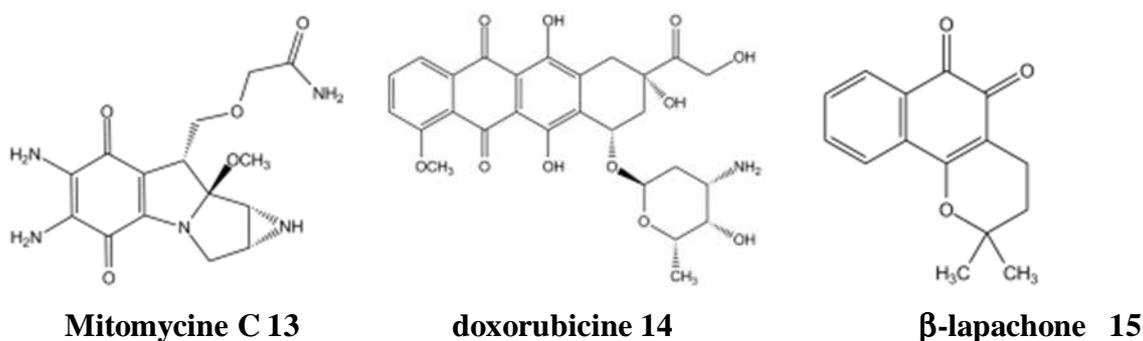
L'action préventive contre le stress oxydant de cette enzyme est également supportée par des études d'immunohistochimie sur des échantillons d'origine humaine qui ont montré que QR1 est exprimée dans de nombreux tissus nécessitant un taux élevé de protection antioxydante. Ces tissus incluent les cellules épithéliales pulmonaires (**Siegel D., 1998**), l'épithélium pigmenté de la rétine (**Schelonka L.P., 2000**), le nerf optique et les fibres nerveuses (**Siegel D., 2000**). Ces taux élevés de QR1 suggèrent que cette enzyme pourrait tenir un rôle principal dans les défenses contre l'oxydation dans ces cellules.

Des études biochimiques et immunologiques n'ont pas révélé un taux significatif d'expression de QR1 dans le foie humain (**Ross D., 1996 ; Schlager J.J., 1990**) ce qui suggère que chez l'homme, contrairement à d'autres espèces, QR1 ne joue pas un rôle majeur dans le métabolisme hépatique des xénobiotiques.

QR1 aurait alors un rôle protecteur directement au niveau cellulaire (et pour de nombreux types cellulaires) sans toutefois avoir d'action sur la métabolisation hépatique des quinones exogènes.

1.6. Bioactivation de molécules bioréductibles

Parallèlement à son activité de détoxification, QR1 a montré sa capacité à activer, *via* leur réduction, des prodrogues quinoniques alkylantes anti-tumorales telles que la mitomycine c **13**, les anthracyclines dont la doxorubicine **14** et la β -lapachone **15** (Siegel D., 2012).



La plasticité du site actif de QR1 permet à ces prodrogues, de structure différente des substrats classiques, de s'orienter de façon différente ou de modifier la forme du site actif afin de s'y loger (Bianchet M.A., 2008).

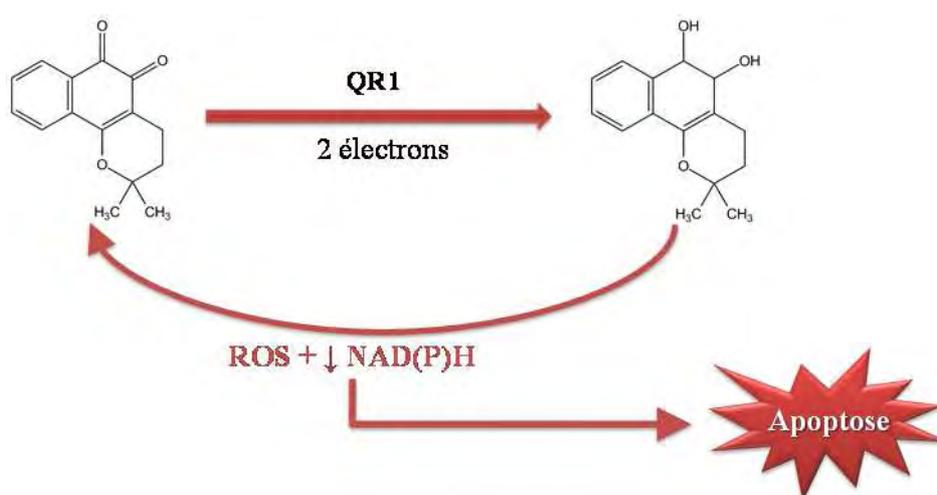


Figure 4. Bioactivation de la β -lapachone par QR1. Dans les cellules cancéreuses présentant des taux élevés de QR1 (cancers du sein, poumon, pancréas, colon et prostate), la réduction de la β -lapachone par QR1 produit la forme hydroquinone instable qui s'auto-oxyde et est responsable de la formation d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que d'une perte du

NAD(P)H responsables d'une augmentation de la perméabilité membranaire mitochondriale et du calcium intracellulaire respectivement, ayant pour conséquence l'apoptose des cellules ciblées (d'après **Pink J.J., 2000**).

Les cellules hypoxiques, ayant un milieu plus réducteur que les cellules normales, auraient une plus grande propension au métabolisme réductif. Certains types de tumeurs (poumons, foie, colon, sein, cerveau) présentent une élévation du taux de QR1 permettant de cibler cette enzyme pour l'activation de prodrogues anticancéreuses (**Ross D., 1996**).

L'activité à la fois de détoxification des quinones et d'activation de prodrogues anticancéreuses de QR1 est résumée sur la Figure 5.

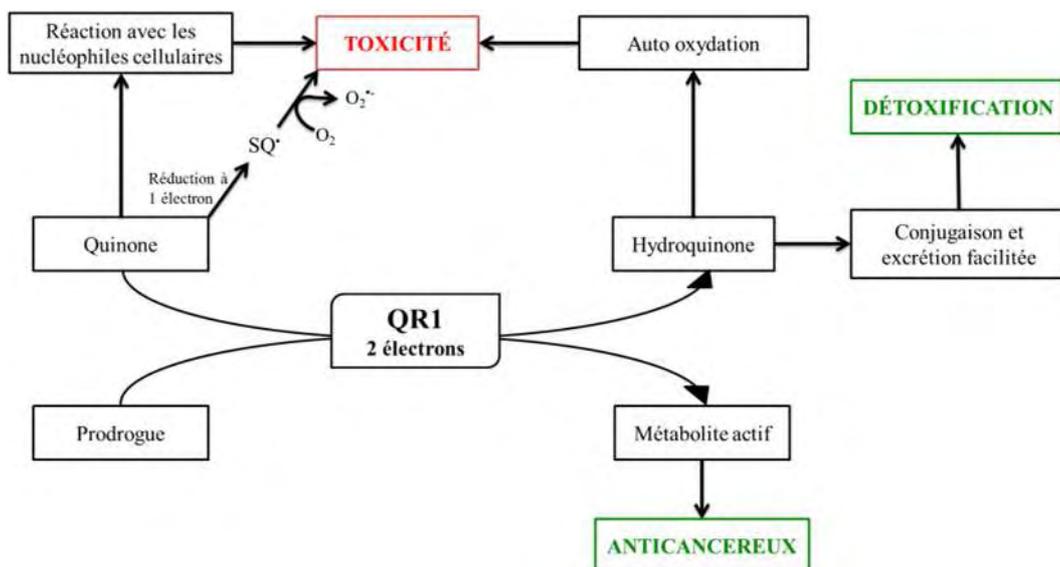


Figure 5. Conséquences de l'activité enzymatique de QR1 sur la survie cellulaire et l'activation de prodrogues anticancéreuses (d'après **Ross D., 2000 ; Bianchet M., 2008 ; Siegel D., 2012**).

2. La NRH:quinone réductase 2 (QR2)

En 1997 Talalay et son équipe révélèrent que la flavoprotéine purifiée à partir de reins bovins par Shutsung Liao et H.G. Williams-Asham (**Liao S., 1961**) dans les années 1960 était un homologue de QR1 et la renommèrent QR2 pour NRH:quinone réductase 2 (**Zhao Q., 1997**). QR2 est plus ou moins exprimée dans de nombreux tissus. Elle est fortement retrouvée au niveau des poumons, du foie, des muscles squelettiques et des reins (**Van der Hauwaert C., 2015**), de façon plus modérée dans le cœur et le cerveau et plus faiblement dans le placenta (**Jaiswal A.K., 1994**).

2.1. Structure génétique et protéique

L'ADNc de la forme humaine de QR2 et la protéine ont respectivement 54 et 49% d'homologie de séquence avec la forme humaine d'ADNc de QR1 et la protéine (**Jaiswal A.K., 1990**). Le gène codant pour la protéine QR2 se situe sur le chromosome 6p25 et est très polymorphique (**Jaiswal A.K., 1999**). Ce gène d'une longueur de 20 kb comporte sept exons interrompus par six introns. Les exons trois à six sont très conservés. L'analyse nucléotidique de la séquence du promoteur du gène de QR2 contient une TATA box imparfaite, deux copies de CAT box, quatre copies du motif Sp1, une copie d'élément de réponse aux électrophiles (EpRE) et trois copies d'éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE) (**Long II D.J., 2000**). L'expression du gène de QR2 est donc, comme QR1, induite en réponse à des xénobiotiques et à des antioxydants. En réponse à une stimulation par des antioxydants, des xénobiotiques, des ultra-violets et des radiations, le facteur nucléaire NF-E2-related (Nrf2) quitte le cytoplasme pour se fixer à l'EpRE nucléaire, permettant de réguler l'expression et de coordonner l'induction de toute une série de gènes encodant pour des protéines détoxifiantes ou chémopréventives dont QR1 et QR2 (**Jaiswal A.K., 2004 ; Wang W., 2006**).



Figure 6. Structure cristalline d'un monomère de QR2 en présence de FAD (en bleu et rouge) et de zinc (gris), source PDB, code 1QR2.

Tout comme QR1, QR2 se présente sous la forme d'une structure homodimérique mais ne contient que 231 acides aminés (25 956 Da) par monomère (Figure 6) alors que QR1 en contient 274. Ainsi, la protéine comporte quarante-trois acides aminés de moins que QR1 au niveau de la région C-terminale. La Figure 7 ci-dessous présente les séquences protéiques des formes humaines des protéines QR1 et QR2.

```

QR1 h  MVGRRALIVLAHSERTSFNYAMKEAAAAALKKKGWEVVESDLYAMNFNPI 50
QR2 h  MAGKKVLIVYAHQEPKSFNGSLKNVAVDELSRQGCTVTVSDLYAMNFEPR

QR1 h  ISRKDITGKLDKDPANFQYPAESVLAYKEGHLSPDIVAEQKKLEADLVIF 100
QR2 h  ATDKDITGTLNPEVFNYGVEHAEYKQRSLASDITDEQKKVREADLVIF

QR1 h  QFPLQWFGVPAILKGFERVFIFGEFAYTYAAMYDKGPFRSKKAVLSITTG 150
QR2 h  QFPLYWFSVPAILKGMMDRVLCCQGFDFDIPGFYDSGLLQGLALLSVTTG

QR1 h  GSGSMYSLQGIHGMNVILWPIQSGILHFPCGFQVLEPQLTYSIGHTPADA 200
QR2 h  GTAEMYTKEGVNGDSRYFLWPLQHGTLHFPCGFKVLAPQISFAPEIASEEE

QR1 h  RIQILEGWKKRLNIWDETPLYFAPSSLFDLNFQAGFLMKKEVQDEEKNNKFGLSVGHHLGKSIPTDNQIKARK 231 274
QR2 h  RKGMAAASQRLQTIWKEEPIPCTAHWHFCG

```

Figure 7. Séquences protéiques des formes humaines de QR1 et QR2. Les acides aminés marqués en rouge correspondent aux zones d'homologie entre QR2 et QR1. Les codes UniProt pour ces séquences sont P15559 pour QR1 et P16083 pour QR2.

L'acquisition des données cristallographiques de l'holoenzyme QR2, seule ou co-cristallisée en présence de différents ligands, met en évidence une structure homodimérique très imbriquée, impliquant plus de 264 contacts entre monomères inférieurs à quatre Å. Situés de part et d'autre de l'interface dimérique, deux sites actifs indépendants décrivent une cavité constituée de résidus issus de chaque monomère, assurant l'ancrage non covalent d'une molécule de groupement prosthétique FAD 1. A l'échelle monomérique, les 220 premiers résidus constituent le domaine catalytique comme chez QR1. La protéine contient des sites très conservés de modification co et post traductionnelle (glycosylation, myristoylation cryptique) et des sites de fixation de la protéine kinase C et de la caséine kinase II absents chez QR1 (Long II D.J., 2000).

Site de liaison au FAD

Le site de liaison au FAD est similaire chez QR2 et QR1.

Site de liaison au co-substrat

Ce site présente de nombreuses substitutions chez QR2. En effet, la coupure C-terminale de quarante-trois résidus chez QR2 affecte la liaison à la partie adénine dinucléotide phosphate

du NAD(P)H **8** ne permettant alors qu'une interaction avec les nicotinamides *N*-substitués de façon simple dont le *N*-ribosyl-dihydronicotinamide **16**.

Site catalytique de fixation à la quinone

La fixation de la quinone chez QR2 se produit de la même façon que chez QR1 (Figure 8). La quinone se place entre le noyau isoalloxazine du FAD et la chaîne latérale de la phénylalanine F178. D'autres résidus participent à cette liaison à la quinone de façon non spécifique (phénylalanine F106, tryptophane W105, phénylalanine F126, asparagine N161). Une des différences entre QR1 et QR2 est liée au remplacement des deux tyrosines Y126 et Y128 de QR1 par la phénylalanine F126 et l'isoleucine I128, rendant la cavité catalytique plus large et hydrophobe chez QR2.

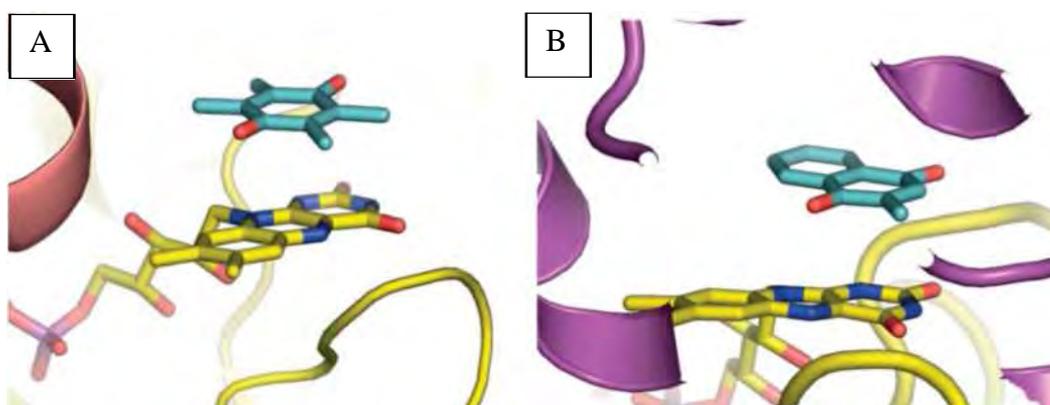


Figure 8. Fixation des substrats au niveau des sites actifs de QR1 et QR2. (A) Fixation de la duroquinone (en bleu) empilée sur le FAD (en jaune) de QR1. (B) Fixation de la ménadione à QR2 similaire à celle de QR1. Les mêmes chaînes des deux monomères contribuant à la fixation sont illustrées de couleur différente (**Bianchet M.A., 2008**).

Site de fixation au métal :

Contrairement à QR1, dont le domaine C-terminal forme une structure en épingle, les douze résidus C-terminaux de QR2 s'organisent en une boucle bien définie (Figure 9). Cette boucle peut assurer la coordination d'un atome de métal, probablement un zinc, en surface *via* les deux histidines H173 et H177 (N δ), la cystéine C222 (S γ) et la chaîne carbonyle de cette cystéine (géométrie de tétraèdre déformé) (**Foster C.E., 1999 et 2000 ; Antoine M., 2012**).

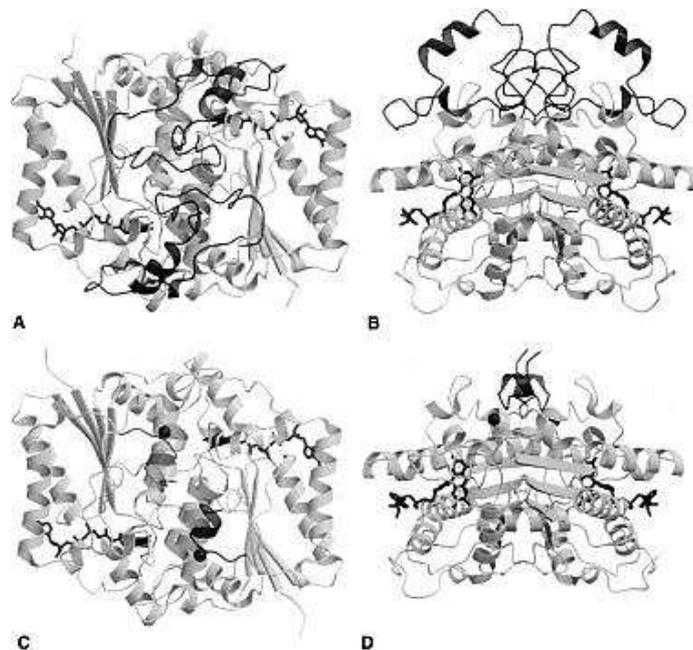
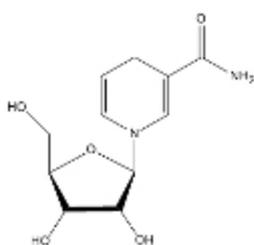


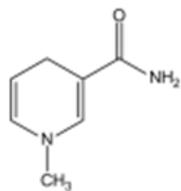
Figure 9. Comparaison des structures cristallographiques de QR1 murine (A et B) et QR2 humaine (C et D). Le domaine C-terminal de QR1 est bien visualisable en haut de la figure B en noir alors qu'il est réduit chez QR2 (D) et proche de l'atome métallique représenté par la sphère noire (Foster C.E., 2000).

2.2. Mécanisme d'action

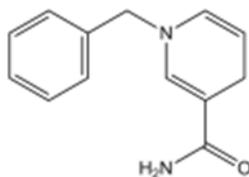
Le mécanisme catalytique en « ping-pong » de réduction des quinones, décrit précédemment pour QR1 au paragraphe 2.1.3., est applicable à QR2, le même site étant utilisé pour le substrat et le co-substrat. La différence provient de la non conservation de l'histidine H161 qui est remplacée par une asparagine interagissant avec une molécule d'eau et qui joue alors le même rôle de catalyseur acide/base vis-à-vis de la tyrosine Y155 et de l'hydroquinolate. Cependant, contrairement à QR1 (Liao S., 1961), QR2 utilise des dérivés nicotinamidiques non phosphorylés comme donneurs d'électrons dont le *N*-ribosyl-dihydronicotinamide (NRH, **16**) ($K_M = 28 \pm 2 \mu\text{M}$ et $k_{\text{cat}} = 2600 \pm 300 \text{ min}^{-1}$), le *N*-méthyl-nicotinamide (NMN, **17**) ou le co-substrat synthétique 1-benzyl-1,4-dihydro-nicotinamide (BNAH, **18**) pour la réduction des quinones en hydroquinones plutôt que le NAD(P)H **8** (K_M et k_{cat} respectivement de 252 mM et 156 min^{-1}), ceci signifie que l'activité catalytique de QR2 ne peut pas se mesurer en présence de NAD(P)H (Wu K., 1997).



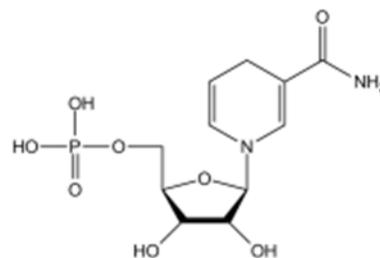
NRH 16



NMN 17

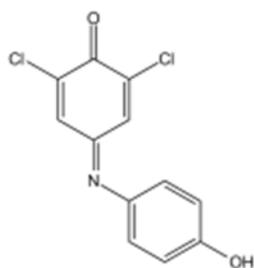


BNAH 18

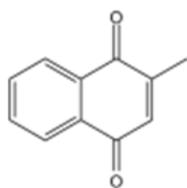


NMNH 19

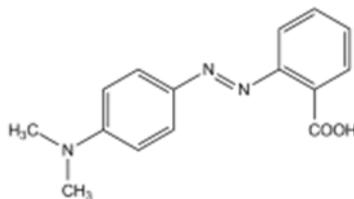
Le NRH **16** est un produit de la dégradation du nicotinamide mononucléotide réduit (NMNH, **19**) par des phosphatases ou du NAD alors que le NMNH proviendrait également de la dégradation du NAD par des hydrolases nicotinamidiques nucléotidiques et des ADP ribosyl transférase, ces deux co-substrats possédant une plus petite taille comparativement au NAD (Liao S., 1962 ; Baum C.L., 1982 ; Zhao Q., 1997).



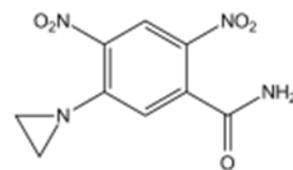
DCPIP 20



ménadione 21



rouge de méthyle 22



CB1954 23

QR2 peut réduire les substrats « classiques » de QR1 tels que dichlorophénol indolphénol (DCPIP, **20**) et la ménadione **21** mais de manière beaucoup moins efficace. Elle est cependant onze fois plus active sur l'acide diméthylamino-4-phénylazo-2-benzoïque ou rouge de méthyle **22** qui subit une réduction à quatre électrons (Wu K., 1997). Ceci souligne la capacité de QR2 à réaliser des réductions à deux et quatre électrons.

Par ailleurs, contrairement à QR1, QR2 est la seule nitroréductase décrite chez l'homme (Figure 10) et est capable de réduire le 5-(1-aziridiny)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954, une pro-drogue anticancéreuse, **23**). Cette action réductrice, qui est 3000 fois plus efficace (en terme de k_{cat}/K_M) chez QR2, semble être due à la tyrosine Y 104 présente chez la forme humaine de QR2 et la forme murine de QR1 mais remplacée par une glutamine dans la forme humaine de QR1 (Wu K., 1997 ; Chen S., 2000).

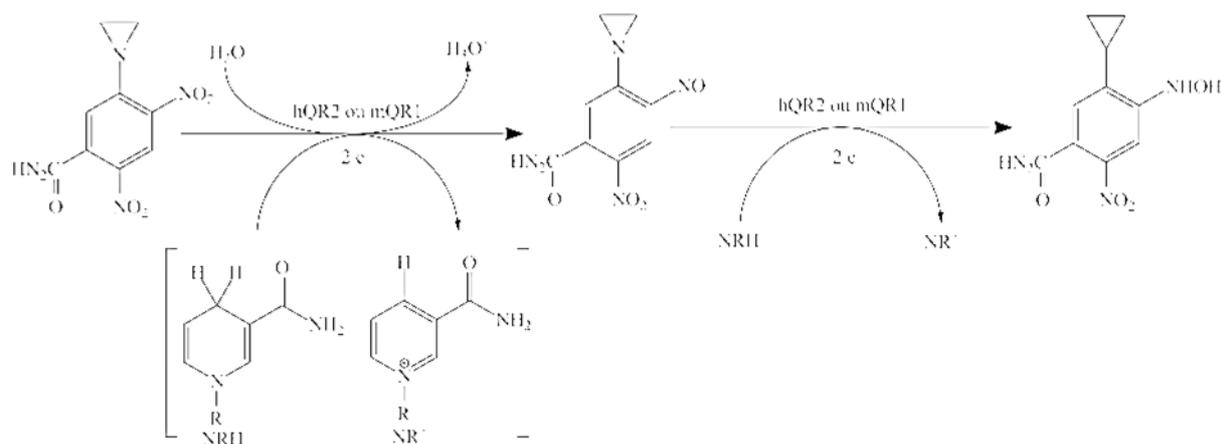
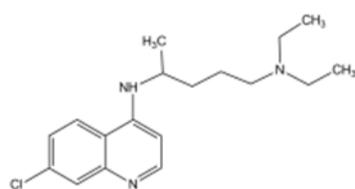


Figure 10. Mécanisme supposé de la réduction par deux fois deux électrons du groupement nitro en position 4 de la pro-drogue CB1954 par la forme humaine de QR2 (hQR2) ou la forme murine de QR1 (mQR1) en présence de deux molécules de co-substrat NRH (**AbuKhader M., 2005**).

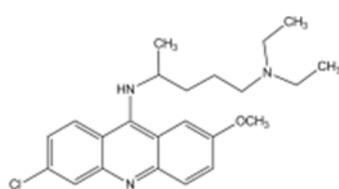
La présence d'un métal pourrait également participer, au niveau du site actif, au transfert électronique comme dans le cas des cytochromes (**Foster C.E., 1999**). Cependant, il a été démontré que l'ajout d'un chélateur tel que l'EDTA n'avait aucune incidence sur l'activité enzymatique de QR2 probablement car le zinc fait partie de la structure (il est profondément enfoncé dans la protéine et donc difficilement échangeable) (**Kwiek J.J., 2004**).

2.3. Modulateurs⁶ de l'activité de QR2

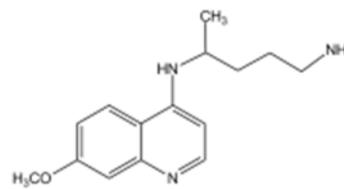
L'identification d'inhibiteurs efficaces de QR2, c'est-à-dire d'inhibiteurs dont la CI_{50} est atteinte à des concentrations non toxiques de l'ordre du nanomolaire, est essentielle à la compréhension du rôle de cette enzyme. Contrairement à QR1, QR2 est résistante à l'inhibition par le dicoumarol **9**, le bleu cibacron **10** et la phenindone **11** (**Chen S., 2000**). Ceci s'explique par le fait que la tyrosine en position 128, dont le phénol est indispensable à l'interaction entre le dicoumarol et l'enzyme via une liaison π - π , est remplacée chez QR2 par une isoleucine ne permettant pas ce type d'interaction (**Foster C.E., 2000**).



Chloroquine 24



quinacrine 25

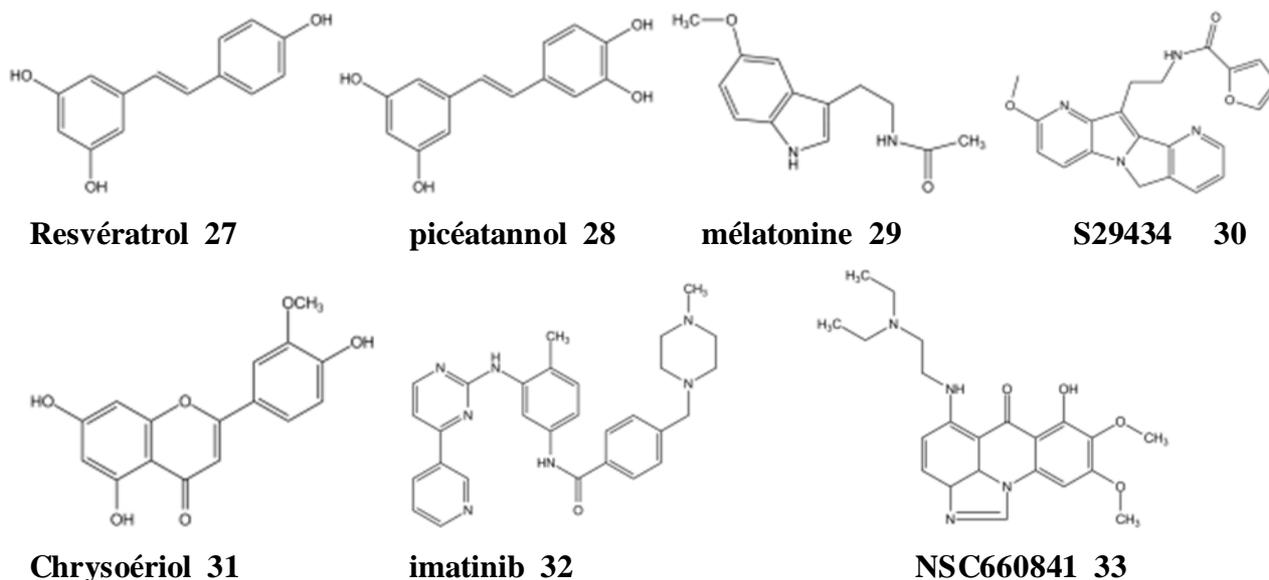


primaquine 26

Des essais enzymatiques, d'affinité et de cristallographie par rayons X ont mis en évidence l'effet inhibiteur de quinolines antimalariques (chloroquine **24**, quinacrine **25** et primaquine

⁶ Un modulateur enzymatique est une molécule capable d'inhiber ou d'activer l'activité d'une enzyme. Dans ce mémoire ne seront présentés que les inhibiteurs de QR2.

26) (Kwiek J.J, 2004), du resvératrol 27 (Buryanovskyy L., 2004) et de son métabolite le picéatannol 28 (Hsieh T.C., 2013), de la mélatonine 29 (Pegan S.D. ; 2011) et d'analogues synthétiques tels que le N-(2-(2-methoxy-6H-dipyrido(2,3-a-3,2-e)pyrrolizin-11-yl)ethyl)-2-furamide 30 (NMDPEF ou S29434) (Ferry G., 2010), de flavonoïdes (tels que le chrysoériol 31) (Boutin J.A., 2005), d'anti-cancéreux comme l'imatinib 32 (Winger J.A., 2009) et certaines imidazoacridin-6-ones (NSC660841, 33) (Nolan K.A., 2010) (Tableau 1).



Ces essais ont également démontré que la capacité d'inhibition de ces molécules est liée à l'état d'oxydation de l'enzyme mais également au couple substrat/co-substrat utilisé.

Tableau 1. Principaux inhibiteurs de QR2 décrits dans la littérature, type de compétition observée, conditions opératoires et CI_{50} obtenues

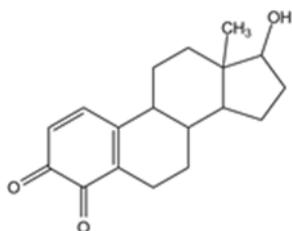
Inhibiteur	Compétition avec	Couple substrat / co-substrat	CI_{50} (μM)
Flavonoïdes 31 (Boutin J.A, 2005)	N.D	Ménadione / BNAH	0,30 - 28
Chloroquine 24 (Kwiek J.J., 2004)	substrat	Ménadione / NMN	1,1
Quinacrine 25 (Kwiek J.J., 2004)	substrat	Ménadione / NMN	0,2
Primaquine 26 (Kwiek J.J., 2004)	co-substrat	Ménadione / NMN	2
Resvératrol 27 (Ferry G., 2010)	co-substrat	Ménadione / BNAH	0,143
Mélatonine 29 (Pegan S.D., 2011)	co-substrat	Ménadione / NMeH	30,2
S29434 30 (Pegan S.D., 2011)	co-substrat	Ménadione / NMeH	0,0024
Imatinib 32 (Nolan K.A., 2012)	substrat	DCPIP / NRH	0,03
NSC660841 33 (Nolan K.A., 2010)	N.D	DCPIP / NRH	0,0006

2.4. Rôles de QR2

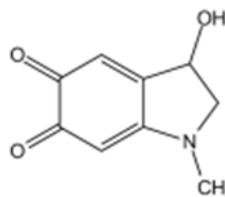
QR2 est présente de façon ubiquitaire et est exprimée au niveau des reins, des muscles, des poumons, du foie, du cœur et, de façon plus minime, dans le cerveau, le pancréas et les hématies où QR1 n'est pas exprimée (Long II D.J., 2000 ; Graves P.R., 2002). Alors que le rôle de détoxification des quinones par QR1 est décrit et déterminé, de nombreuses questions restent en suspens concernant le rôle de QR2 *in vivo*.

a) Réduction des quinones

D'un point de vue fonctionnel, la reconnaissance de l'ubiquinone **12** et de la phyloquinone (vitamine K1, **6**) comme substrat suppose que QR2 soit impliqué *in vivo* dans le contrôle du statut redox de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la coagulation sanguine. En effet, l'ubiquinone **12** est un relayeur crucial d'électrons au sein des crêtes mitochondriales, tantôt accepteur (complexes I et II) sous sa forme oxydée tantôt donneur (complexe III) sous sa forme réduite (Beyer R.E., 1996). La vitamine K1 est un co-facteur de l'enzyme γ -carboxylase assurant l'activation des facteurs de coagulation II, VII, IX, X par carboxylation de résidus glutamate clés (Kwiek J.J., 2004).



Œstrogène *ortho*-quinone 34



adrénochrome 35

Différentes quinones ont été étudiées en tant que substrat de QR2, en majorité des *para*-quinones comme la ménadione **21** et les coenzymes Q0 et Q2 (Boutin J.A., 2005). Cependant, d'autres types de quinones, dont les *ortho*- ou catechol-quinones semblent pouvoir également être réduites par QR2, des études ayant identifié une activité de QR2 sur des œstrogènes *ortho*-quinones **34** (Gaikwad N.W., 2009), des *ortho* et *para*-quinone méthide (Kucera H.R., 2013) ainsi qu'avec l'adrénochrome **35** (Fu Y., 2008) et la dopamine quinone notamment au niveau de la rétine (Sampaio L. de F., 2014). L'activité catéchol quinone réductase de QR2 justifierait son intervention dans la régulation des produits d'oxydation de nombreux neurotransmetteurs. Ce comportement a déjà été fortement étudié et démontré pour QR1 (Graumann R., 2002 ; Baez S., 1995 ; Arrigada C., 2004). On note que l'étude de la réduction d'*ortho*-quinones par QR2 est peu rapportée dans la littérature. Cet aspect sera un point d'étude dans ce mémoire.

b) QR2 comme site de fixation de la mélatonine

La mélatonine **29** est une hormone synthétisée par la glande pinéale au niveau du système nerveux central. Cette hormone est responsable de la régulation du rythme circadien mais possède également une action antioxydante et agit en se fixant aux récepteurs membranaires de la mélatonine de type 1 (MT1) et de type 2 (MT2).

En 2000, l'équipe de Jean Boutin *et al.* est parvenue à purifier par chromatographie d'affinité et à caractériser par spectrométrie de masse un troisième site de fixation de la mélatonine MT3 dans des tissus de hamster. Ils ont également démontré chez le hamster que MT3 correspondait à l'homologue de la NRH:quinone réductase 2 (**Nosjean O., 2000**). QR2 peut lier la mélatonine sur deux de ses sites, parmi lesquels son site actif, alors que QR1 ne peut pas fixer la mélatonine. Ce site est donc fortement différent des autres récepteurs à la mélatonine MT1 et MT2 qui sont tous deux des récepteurs membranaires couplés à une protéine G, de plus forte affinité pour la mélatonine que MT3. Une autre étude a confirmé cette hypothèse en démontrant que des souris invalidées pour QR2 n'effectuent aucune fixation de la mélatonine de type MT3 (**Maillet F., 2004**). Il a été mis en évidence que la mélatonine était un bon ligand de QR2 (de l'ordre du nM) (**Boutin J.A., 2008**) mais n'exerçait qu'une faible activité inhibitrice (voir paragraphe 2.2.3).

c) Polymorphisme de QR2 et pathologies associées

Le polymorphisme génétique de QR2, touche le plus souvent 16 à 29 paires de bases au niveau de la région riche en guanine et cytosine (GC) du promoteur de QR2, entraînant des conséquences physiologiques variées dont de nombreux cancers et désordres neurologiques (**Harada S., 2001**). Contrairement à QR1, ces pathologies ne sont pas uniquement dues à une diminution de la production de QR2 mais parfois à une plus forte expression de l'enzyme si la délétion affecte le site promoteur Sp3 (Figure 11) ayant pour rôle de restreindre la transcription du gène de QR2 (**Wang W., 2004**).

La diminution de la production de QR2 ou la production d'enzyme inactive conduit généralement à des effets délétères parmi lesquels une augmentation de la sensibilité à des **cancers variés** (**Clairmont A., 1999**) dont les **leucémies** (**Krajinovic M., 2002**), le **cancer colorectal** (**Takagi S., 2002**), le **cancer hépatique** (**Strassburg A., 2002**) et le **cancer gastrique** (**Zhang J.H., 2003**), une plus grande **sensibilité à la toxicité de certains produits**

chimiques (Bergamaschi E., 2001 ; Smith M.T., 1999) et **de médicaments** (Fleming R.A., 2002).

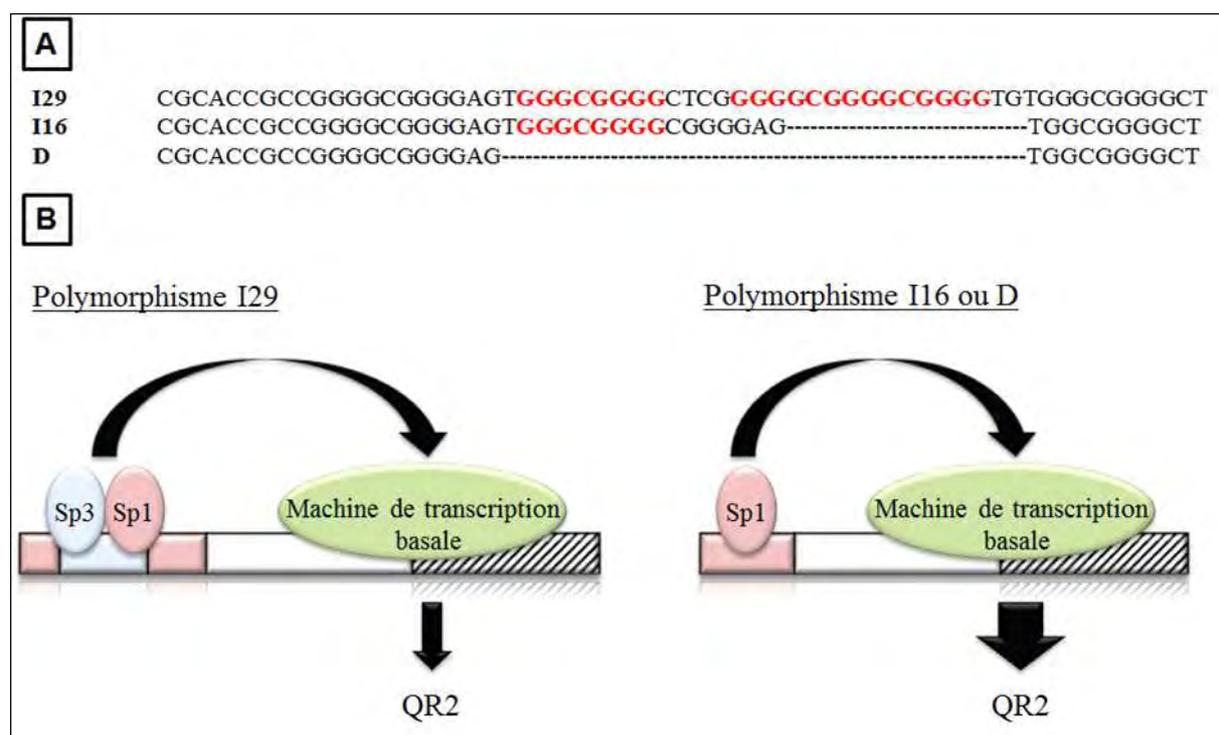


Figure 11. Polymorphisme des séquences du promoteur répresseur (Sp3) ou activateur (Sp1) de la transcription de QR2 et conséquences sur l'expression du gène. (A) séquence de la région promotrice et ses différents polymorphismes avec les zones de fixation du promoteur Sp3 (en rouge). (B) conséquence du polymorphisme et de la fixation des promoteurs sur l'expression, plus ou moins forte, de QR2 (d'après Wang W., 2008).

D'autre part, une plus forte expression de QR2 présente un effet protecteur vis-à-vis du **cancer mammaire**. Ceci peut s'expliquer par l'activité réductrice de l'enzyme sur les quinones œstrogéniques **31** ainsi que par la stabilisation du suppresseur de tumeur p53 (Yu K.D., 2009). Le facteur p53 est reconnu comme un élément clé du contrôle de la croissance cellulaire car il est responsable de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire en cas de stress et est fréquemment muté ou absent dans de nombreux types de cancers (Pietsch E.C., 2006 ; Sun Y., 2006). En interagissant directement avec ce facteur, QR2 jouerait un rôle de stabilisateur de p53 et empêcherait sa dégradation par le protéasome 20S suite à un stress causé par l'exposition à des radiations ou à certaines molécules à la fois *in vitro* et *in vivo* (Gong X., 2007 ; Iskander K., 2009). QR2 entrerait également en compétition avec le protéasome 20S en se fixant et protégeant le facteur de différenciation myéloïde, C/EBP α (CAAT/ enhancer binding protein) impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse, ayant pour conséquence une protection de ce dernier contre les radiations γ et les **pathologies myéloprolifératives** associées *in vivo* (Xu J., 2013).

Diverses études ont rapporté l'association entre les polymorphismes touchant, par insertion/délétion (I/D), les sites de fixation du répresseur transcriptionnel Sp3 et de l'activateur d'expression Sp1 de QR2 et des **troubles neurologiques** tels que la **maladie de Parkinson et la schizophrénie**. Ces études ont démontré que ces polymorphismes sont fréquemment retrouvés chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Cependant, les effets de ces polymorphismes sur la production de l'enzyme sont contradictoires, une première étude ayant montré une diminution de l'ARNm de QR2 chez les porteurs hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle D29 (**Harada S., 2001**) alors qu'une autre étude a montré une plus forte production de l'ARNm et de l'activité de QR2 sur des lignées cellulaires I16/I16 et D29. Cette étude a également révélé que des cellules catécholaminergiques surexprimant QR2 induisaient une plus forte production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (**Wang W., 2008**). Ces associations restent toutefois à confirmer car une autre étude réalisée aux Etats-Unis n'a pu démontrer un lien entre QR2 et la maladie de Parkinson (**Okada S., 2005**). Des études d'hybridation sur puce à ADN montrent une suractivation transcriptionnelle du gène QR2 dans l'hippocampe de rats présentant des troubles de la mémoire liés à l'âge ou induits par la scopolamine tandis que l'inactivation du gène par knock out (KO) ou un traitement par inhibiteur de QR2 (S29434 **30** et S26695) maintient les facultés cognitives (**Brouillette J., 2008 ; Benoit C.E., 2010**). Il semblerait également y avoir une surexpression de QR2 dans l'hippocampe de patients atteints de la **maladie d'Alzheimer** (**Hashimoto T., 2011**).

Tableau 2. Récapitulatif des pathologies associées au polymorphisme de QR2.

QR2 surexprimé	QR2 sous-exprimée
<ul style="list-style-type: none"> - Alzheimer (Hashimoto T., 2011) - Parkinson (Wang W., 2008) 	<ul style="list-style-type: none"> - Schizophrénie (Harada S., 2003) - Parkinson (Harada S., 2001)
<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la toxicité de la ménadione (Long II J.D., 2002) 	<ul style="list-style-type: none"> - Cancer mammaire (Yu K.D., 2009), hépatique (Strassburg A., 2002), cutané (Shen J., 2010), thyroïdien (Lee J., 2013). - Hémopathies malignes (Xu J., 2013 ; Iskander K., 2009)
	<ul style="list-style-type: none"> - Psychoses induites par la méthamphétamine (Ohgake S., 2005) - Syndrome de sevrage alcoolique (Okubo T., 2003) - Agranulocytose induite par la clozapine (Ostrouky P., 2003)

D'autres études portant sur la **schizophrénie** (Harada S., 2003), le **syndrome de sevrage alcoolique** (Okubo T., 2003), l'**agranulocytose** induite par la clozapine (Ostrousky P., 2003) et les **psychoses** liées à l'usage de méthamphétamine (Ohgake S., 2005) ont montré une diminution significative des taux d'ARNm de QR2 chez les personnes atteintes de ces pathologies. Les différentes pathologies associées à la surexpression ou sous expression de QR2 sont rapportées dans le Tableau 2.

d) Rôle de QR2 dans l'équilibre redox cellulaire

De nombreuses données mettent en évidence l'implication de QR2 dans l'équilibre redox cellulaire soit en fixant des antioxydants, soit par son rôle de détoxification des quinones.

En effet, la mélatonine **29** est reconnue pour sa capacité à activer des enzymes telles que la superoxyde dismutase, les peroxydases, à réduire l'action des lipoxygénases et de l'oxyde nitrique synthase, ainsi que pour sa capacité à favoriser la production de glutathion (Hardeland R., 2005). QR2 fixe la mélatonine et diminue donc la quantité de mélatonine libre ce qui soutient l'hypothèse d'une action indirectement pro-oxydante de cette enzyme (Nosjean O., 2000).

D'autre part, comme décrit précédemment pour QR1, QR2 entre en compétition avec les réductases à un électron, telles que les cytochrome P450 réductases, et participerait à la formation d'hydroquinones supposées être plus facilement excrétables et moins réactives que les quinones. Ainsi, l'inhibition de QR2 par les quinolines antipaludiques (quinacrine et chloroquine) diminuerait la capacité des hématies à réguler l'excès de stress oxydant qui se produit lors de leur colonisation par *Plasmodium* (Kwiek J.J., 2004).

Des études sur protéine isolée ont permis de déceler une production significative d'espèces radicalaires suite à la métabolisation de quinones par QR2 en condition aérobie en utilisant la résonance paramagnétique électronique. Les radicaux produits, majoritairement le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, d'une durée de vie relativement longue (10^{-4} à 10^{-5} secondes), et le radical hydroxyle HO^{\bullet} , plus réactif et plus toxique, d'une demi vie d'environ 10^{-9} secondes (Novo E., 2008), varient en fonction du couple co-substrat/substrat et de la présence ou non d'inhibiteurs/modulateurs. Ainsi, l'hydroquinone formée, si elle est instable, pourra s'auto ré-oxyder en présence d'oxygène moléculaire (Figure 12), formant alors une semiquinone et le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, puis le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'hydroxyle HO^{\bullet} par réaction de type Fenton (métal dépendante ou non) (Reybier K., 2011).

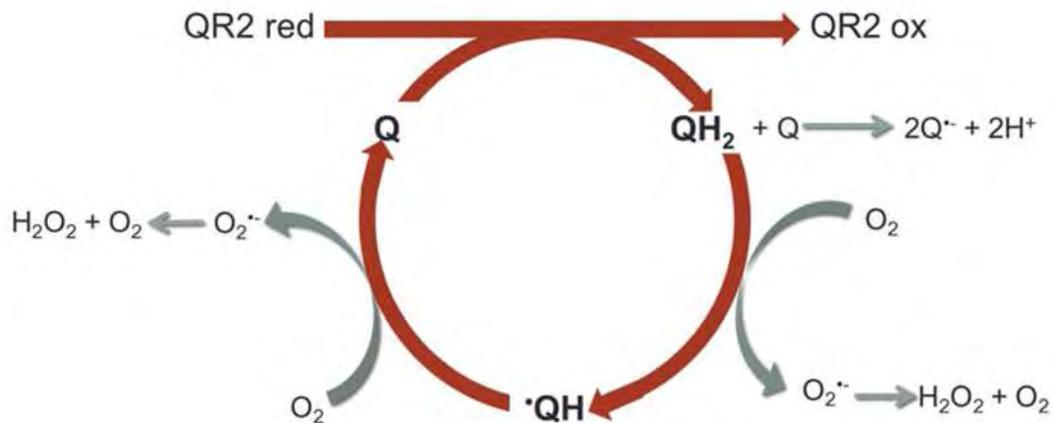


Figure 12. Cycle redox présumé de la métabolisation des quinones en hydroquinones par QR2.

Bien que ces différentes espèces réactives de l'oxygène soient impliqués dans de nombreux processus physiologiques (immunité, cycle cellulaire, apoptose) et de nombreuses autres voies de signalisation (Finkel T., 2011, Alfadda A.A., 2012), un déséquilibre dû à leur surproduction ou une élimination insuffisante par les mécanismes de défenses antioxydants des cellules (glutathion, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, thiorédoxine peroxydase et catalase) provoque des oxydations délétères sur les macromolécules cellulaires (Brieger K., 2012). Au niveau de l'ADN, le stress oxydant induit un grand nombre de lésions souvent mutagènes (oxydations des bases, création de sites abasiques et d'adduits intra-caténaires, cassures simples ou double brins) (Cadet J., 2002). Les lipides et principalement les acides gras polyinsaturés subissent une peroxydation en présence du radical hydroxyle (Niki E., 2005). Cette peroxydation des membranes a pour conséquence de provoquer l'apoptose suite à la libération de céramides, mais aussi de former des aldéhydes mutagènes dont le malone-dialdéhyde et le 4-hydroxynonéal (Kannan K., 2000, Esterbauer H., 1991). L'oxydation des groupements thiol ou des acides aminés peut conduire à l'inactivation et la dégradation de protéines ayant des conséquences sur l'activité de nombreuses enzymes et facteurs de croissance (Dunlop R.A., 2009). Finalement, ces multiples oxydations au niveau cellulaire dues au stress oxydant ont pour conséquences de multiples pathologies touchant de nombreux organes ou systèmes biologiques (Figure 13).

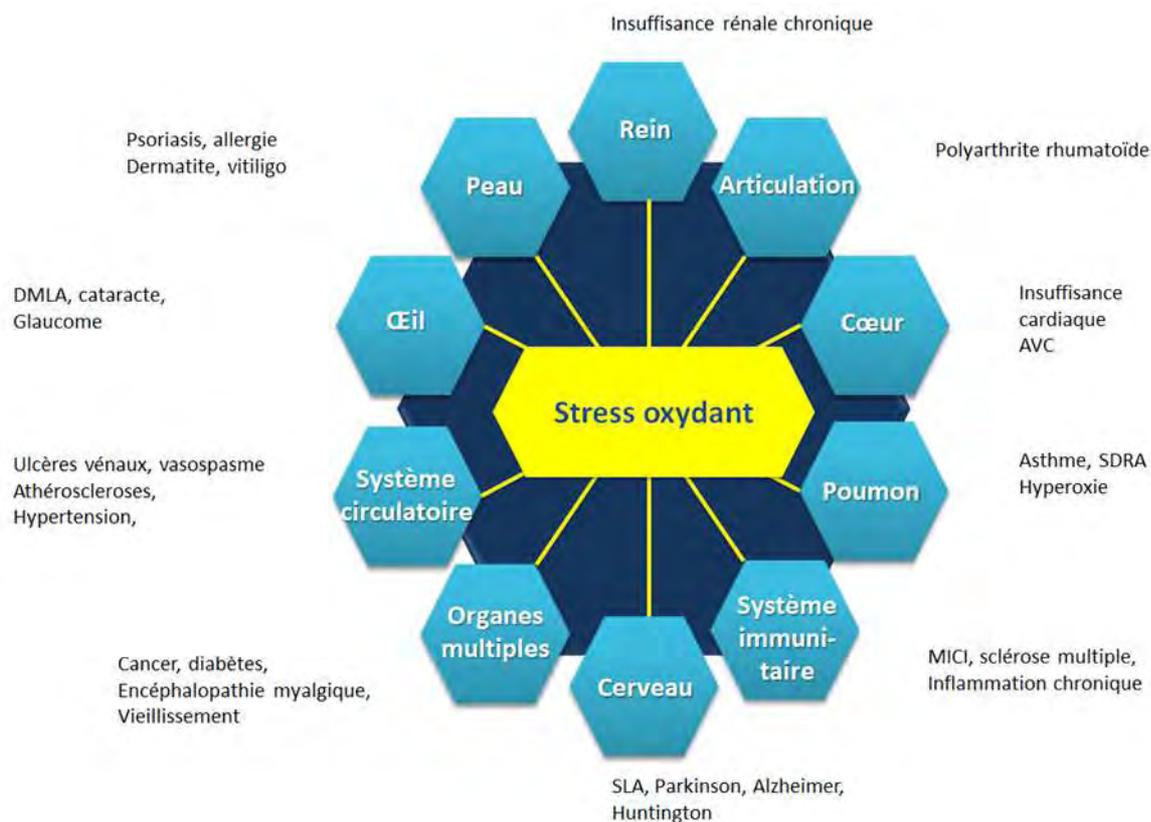


Figure 13. Pathologies associées au stress oxydant en fonction de l'organe ou du système biologique atteint (d'après Williams D.L., 2008 ; Finkel T., 2000 ; Sosa V., 2013 ; Kumagai S., 2003 ; Dhalla N.S., 2000 ; Bickers D.R., 2006 ; Uttara B., 2009 ; Barnham K.J., 2004 ; Mariani E., 2005 ; Maritim A.C., 2003 ; Brieger K., 2012).

QR2 est donc capable de réduire une large gamme de substrats ce qui augmente la probabilité de générer des hydroquinones peu stables pouvant subir une auto-oxydation et produire des espèces réactives de l'oxygène, augmentant ainsi le stress oxydant, conférant un rôle toxique au métabolisme des quinones par QR2 et non uniquement détoxifiant comme c'est le cas pour QR1. Ainsi, il a été observé *in vivo* que des souris dépourvues de QR2 sont moins vulnérables à la toxicité due au métabolisme de la ménadione **21**, comparativement aux modèles murins normaux exprimant normalement QR2 chez qui cette toxicité est même accrue par l'injection de co-substrat de QR2 (Long II D.J., 2002).

Ces résultats concernant les différentes actions de QR2 au niveau enzymatique ou cellulaire démontrent que la finalité de l'action de QR2 sur la détoxification des quinones au niveau non plus moléculaire mais d'un organisme vivant entier reste donc difficile à déterminer.

Les chapitres suivants ont donc pour objectif d'apporter des informations sur le métabolisme de différentes familles de substrats par QR2, à l'échelle moléculaire mais également cellulaire, ainsi que les conséquences de cette réduction sur l'homéostasie redox.

Pour cela, l'étude de la réduction de substrats par QR2 sera étudiée et comparée à la réductibilité chimique de ces substrats afin d'identifier les quinones présentant la meilleure affinité pour l'enzyme. L'identification et la quantification des espèces réactives de l'oxygène, produites après réoxydation des substrats, permettront de comparer l'impact de la structure chimique du substrat sur le rôle présumé de détoxification de QR2.

Chapitre 2

Étude des substrats, modulateurs et inhibiteurs de QR2

Étude des substrats, modulateurs et inhibiteurs de QR2

1. Activité enzymatique de QR2.....	32
1.1. Détermination de l'activité de QR2	33
1.2. Détermination du K_M de différents substrats de QR2.....	35
2. Potentiels redox des substrats	38
3. Etude de la production d'espèces réactives de l'oxygène liée à la métabolisation des substrats de QR2.....	45
3.1. <i>Para</i> -quinones substrats de QR1 et QR2.....	46
3.2. Pseudo-quinones substrats de QR2.....	50
3.3. <i>Ortho</i> -quinones substrats de QR1 et QR2	50
3.4. Polyphénols modulateurs de QR2.....	52
3.5. Comparaison de l'intensité de production totale d'espèces réactives de l'oxygène après métabolisation des différents substrats par QR2.	54

Introduction

Le rôle de la protéine QR2 ainsi que ses différences vis-à-vis de son homologue QR1 soulèvent de nombreuses questions. QR2 accepte une large gamme de substrats de structures variées et ses inhibiteurs sont différents de ceux de QR1 (chapitre 1). Des travaux précédents ont également démontré des variations dans la quantité et le type d'espèces oxygénées réactives produites suite à la métabolisation de différentes quinones par QR1 ou QR2 (**Reybier K., 2011**).

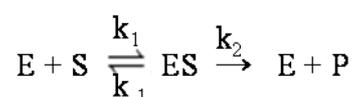
Dans le but de mieux comprendre le rôle de QR2, il est important d'étudier pourquoi cette enzyme accepte une plus large gamme de substrats que son homologue QR1, pour quels substrats QR2 présente le plus d'affinité et quelles sont les conséquences de la métabolisation des différents substrats vis-à-vis de la production des espèces réactives de l'oxygène.

Afin de répondre à ces questions, le chapitre suivant présente l'étude de l'activité enzymatique de QR2 en présence de différents substrats (*para*-quinones, *ortho*-quinones et pseudo-quinones) afin de comparer l'affinité de substrats de structures différentes pour l'enzyme. Les analyses par voltampérométrie cyclique de différents substrats, co-substrats, inhibiteurs et modulateurs de QR1 et QR2, permettent de comparer leur facilité à s'oxyder ou à se réduire (potentiels d'oxydo-réduction), ainsi que le nombre d'électrons mis en jeu. Finalement, l'étude par résonance paramagnétique électronique (RPE) de la protéine QR2 en présence de ces substrats ainsi que des inhibiteurs spécifiques, des co-substrats et des modulateurs apporte des informations sur la quantité et le type d'espèces réactives de l'oxygène produites suite à la métabolisation de ces différents composés.

1. Activité enzymatique de QR2

La détermination de l'activité spécifique et de la constante de Michaelis (K_M) de QR2 en fonction de ses différents substrats permet de déterminer l'affinité de cette enzyme pour ces différentes molécules ainsi que la vitesse à laquelle QR2 réalise leur métabolisation. Ces valeurs sont obtenues par suivi cinétique de la diminution de la fluorescence du BNAH **18** à 340 nm correspondant à sa réduction par QR2.

Selon le modèle de Michaelis-Menten, l'enzyme (E) s'associe à un substrat (S) en formant un complexe enzyme-substrat (ES) qui se dissocie pour générer un produit (P) :



k_1 , k_{-1} et k_2 correspondent aux constantes de vitesse pour les différentes réactions indiquées ci-dessus. Ce modèle permet de déterminer différents paramètres dont la vitesse initiale V_i , la vitesse initiale maximale V_{max} et la constante de Michaelis K_M .

La constante de Michaëlis K_M (en mol.L⁻¹) correspond à la constante de dissociation du complexe ES. Elle est définie par l'équation :

$$K_M = k_{-1} + \frac{k_2}{k_1}$$

La vitesse initiale maximale V_{max} est obtenue pour une concentration saturante en substrat et elle mesure la quantité de produit P formé par unité de temps dans les conditions où la réaction retour est négligée, elle est définie par l'équation suivante où $[E]_T$ correspond à la concentration totale d'enzyme :

$$V_{max} = k_2 \times [E]_T$$

Les deux équations précédentes permettent de définir la relation suivante :

$$V_i = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Où $[S]$ (en mol.L⁻¹) correspond à la concentration en substrat, V_i (en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) à la vitesse initiale (en absence de produit P) de la réaction enzymatique pour une concentration de substrat $[S]$ et V_{max} (en nmol/min/mg protéine) à la vitesse maximale de la réaction quand toute l'enzyme est sous forme de complexe ES, c'est à dire pour une concentration saturante en substrat (Figure 14).

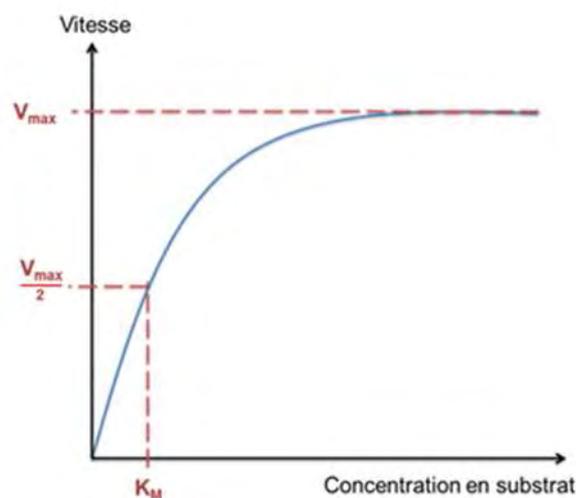


Figure 14. Courbe de Michaelis-Menten représentant la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat. A partir de cette courbe peuvent être déterminées la vitesse initiale maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_M).

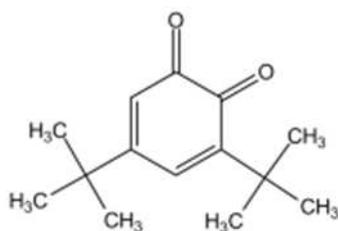
La détermination graphique des constantes cinétiques à partir de ce modèle de courbe étant imprécise (V_{max} correspondant à la vitesse pour une concentration infinie de substrat), les constantes V_{max} et K_M sont calculées en réalisant mathématiquement des régressions non linéaires permettant d'obtenir l'équation de chaque courbe. La constante de Michaelis traduit l'affinité du substrat pour l'enzyme. Plus K_M est grand, plus l'enzyme est sous forme dissociée et fixe peu de substrat donc plus l'affinité du substrat pour l'enzyme est faible.

1.1.Détermination de l'activité spécifique de QR2

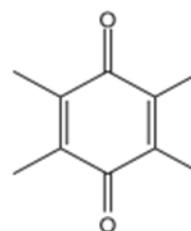
L'activité d'une enzyme étant définie en termes de vitesse de réaction, l'activité spécifique molaire correspond à l'activité catalytique par unité de protéine (ici en nM/min/nM de QR2). Elle est calculée par le rapport de la vitesse initiale V_i sur la concentration en enzyme, V_i étant calculé à partir de la pente de la réaction et correspond à :

$$V_i = k_2 \times [S]$$

Elle permet de déterminer le nombre de molécules de substrat transformées par une molécule d'enzyme par unité de temps. Plus cette activité est forte, plus le substrat sera métabolisé rapidement par QR2.

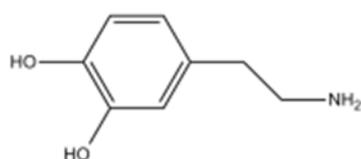


3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone 36

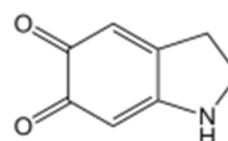


duroquinone 37

Les résultats obtenus pour différents substrats de QR1 et QR2 sont rapportés Figure 15. La ménadione **21**, le 3,5-diméthoxy-5-méthyl-p-benzoquinone ou coenzyme Q0 **40** et les *ortho*-quinones (en bleu et rouge respectivement) semblent être fortement métabolisés par QR2 et en particulier le 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone **36** qui atteint l'activité spécifique de $6779,24 \pm 238,89$ nM/min/nM de QR2. Aucune diminution de fluorescence du BNAH n'est cependant observée en présence de dopamine **38** alors que lorsque cette dernière est oxydée par du ferricyanure de potassium en excès pour former l'aminochrome **39**, une métabolisation par QR2 légèrement inférieure à celle obtenue pour le coenzyme Q0 est observée. En effet, la dopamine s'oxyde facilement en présence de fer III pour former dans un premier temps une dopamine-o-quinone qui se cyclise spontanément à pH physiologique en aminochrome (Segura-Aguilar., 2014). Cette différence s'explique par la présence dans l'aminochrome de deux fonctions cétones en *ortho* qui peuvent être réduites par QR2 alors que la dopamine présente des fonctions hydroxyles, fonctions réduites.



dopamine 38



aminochrome 39

Le CB1954 **23** (en vert, Figure 15) est métabolisé par QR2 ; l'activité spécifique déterminée pour cette molécule est deux fois inférieure à celle calculée pour la ménadione. La réduction des deux fonctions nitro par QR2, qui nécessite deux fois deux électrons contrairement aux quinones qui sont réduites directement par deux électrons, est plus lente à réaliser.

Le resvératrol **27** et son métabolite le picéatannol **28** n'induisent aucune réduction du BNAH sous leur forme réduite alors qu'après oxydation par le ferricyanure de potassium leur métabolisation atteint jusqu'à 50 à 60 % de la métabolisation de la ménadione. Cette activité de QR2 en présence de ces deux polyphénols semble indiquer que ces molécules, qui entrent

en compétition avec le co-substrat sous leur forme réduite (Ferry G., 2010), pourraient jouer un rôle de substrat sous leur forme oxydée.

Il est également intéressant d'observer que la duroquinone **37**, qui est un substrat de QR1 uniquement, ne provoque aucune réduction significative du BNAH par QR2 ce qui démontre la spécificité de cette analyse vis-à-vis de l'activité de QR2.

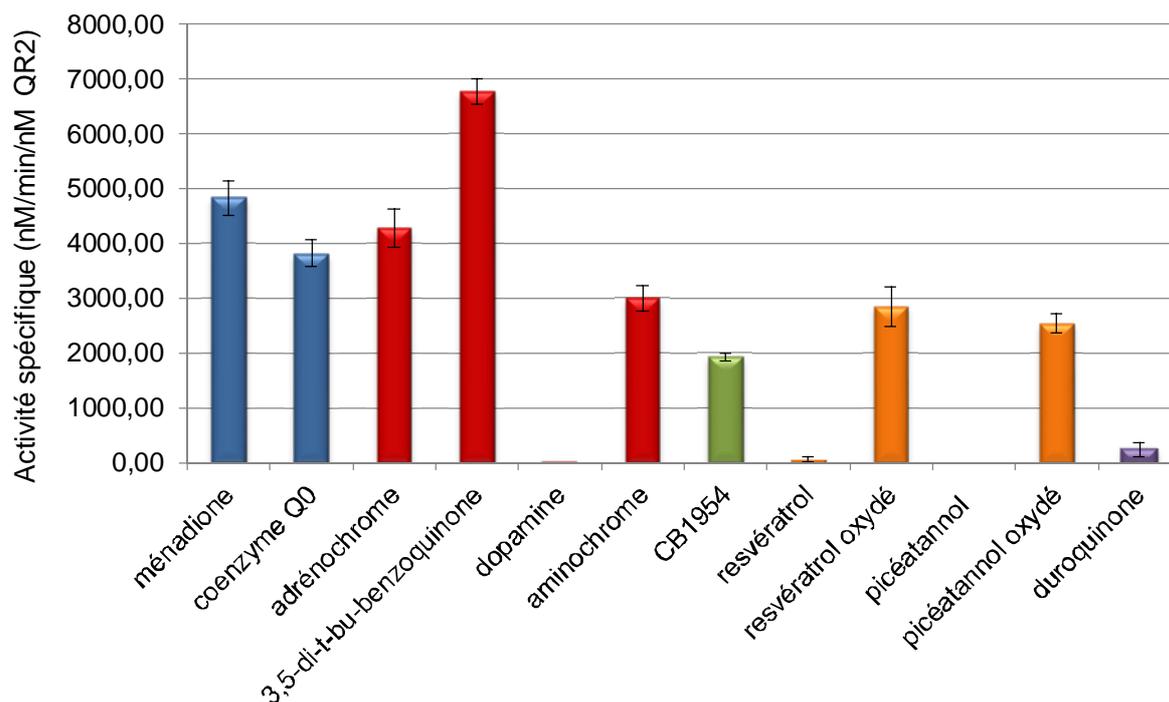


Figure 15. Activité spécifique molaire de QR2 en présence de différents substrats. Les *para*-quinones substrats de QR1 et QR2 sont représentés en bleu, les *ortho*-quinones substrat de QR2 en rouge, la pseudo-quinone CB1954 substrat de QR2 en vert, les flavonoïdes inhibiteurs de QR2 sous leur forme réduite et oxydée en orange et la duroquinone substrat de QR1 en violet. Les erreurs sont déterminées pour différents essais ($n > 4$).

1.2. Détermination de la constante de Michaëlis de différents substrats de QR2

La constante de Michaëlis est déterminée grâce à une gamme de concentration de substrat pour une concentration constante en QR2 et en BNAH. Le calcul du K_M et de la V_{max} se fait en réalisant une régression non linéaire comme décrit dans la première partie de ce chapitre. L'aminochrome, le resvératrol et le picéatannol sous leurs formes oxydées, sont obtenus en réalisant une oxydation de leur forme réduite (respectivement dopamine, resvératrol et picéatannol) par le ferricyanure de potassium en excès. L'aminochrome a été déterminé par spectrophotométrie UV-visible (voir page 111), cependant, l'oxydation totale du resvératrol et

du picéatannol est plus difficile à déterminer. Il est donc impossible de réaliser une gamme précise de dilutions de ces composés, c'est pourquoi ils ne sont pas présentés dans les calculs de K_M et V_{max} .

Tableau 3. Constantes cinétiques V_{max} et K_M obtenues pour différents substrats de QR2 et comparaison avec les K_M de la littérature. Le calcul d'erreur est obtenu pour différents essais ($n > 5$).

Substrat	V_{max} (en nmol/min/mg protéine)	K_M (en μM)	K_M (en μM) littérature
Ménadione	4264 ± 134	$10,3 \pm 1,4$	$11,3 \pm 0,2^a$ $6,7 \pm 1,7^b$
Coenzyme Q0	5371 ± 210	$16,2 \pm 2,7$	$36,1 \pm 0,8^a$ 136 ± 8^b
CB1954	344 ± 61	$53,9 \pm 1,4$	61 ± 5 (co-substrat : SUB10R) ^c
Adrénochrome	2226 ± 115	$18,9 \pm 2,7$	34 (co-substrat : SUB10R) ^d
3,5-di- <i>t</i> -bu- <i>o</i> -benzoquinone	4941 ± 186	$15,9 \pm 1,8$	N.D

^a Ferry G., 2010

^b Boutin J., 2005

^c Fu Y., 2005

^d Fu Y., 2008

Les valeurs de K_M obtenues (Tableau 3) sont assez proches de celles déterminées dans les mêmes conditions par Ferry G. et *al.* (utilisation de la fluorescence du BNAH comme co-substrat et marqueur de l'activité enzymatique) pour la ménadione (Ferry G., 2010). Le coenzyme Q0 présente ici un K_M plus faible que ceux déterminés dans la littérature dont les valeurs rapportées varient fortement malgré des conditions similaires (de 36 à 136 μM) (Ferry G., 2010 ; Boutin J., 2005). Pour le CB1954 et l'adrénochrome, malgré l'utilisation de BNAH et non de SUB10R ou 1-(carbamoyl)dihydronicotinamide comme co-substrat, les valeurs de K_M obtenues restent relativement proches de celles déterminées par l'équipe de Fu Y. (Fu Y., 2005 et 2008).

La figure 16 démontre que le coenzyme Q0 et le 3,5-di-*t*-butyl-*ortho*-benzoquinone présentent le même profil de cinétique enzymatique que la ménadione avec des V_{max} supérieures à 4000

nmol/min/mg protéine et des K_M respectifs de 16,2 et 15,9 μM (contre 10,3 μM pour la ménadione). Ces résultats indiquent que la métabolisation de ces trois produits par QR2 est rapide et que l'affinité de l'enzyme pour ces substrats est importante.

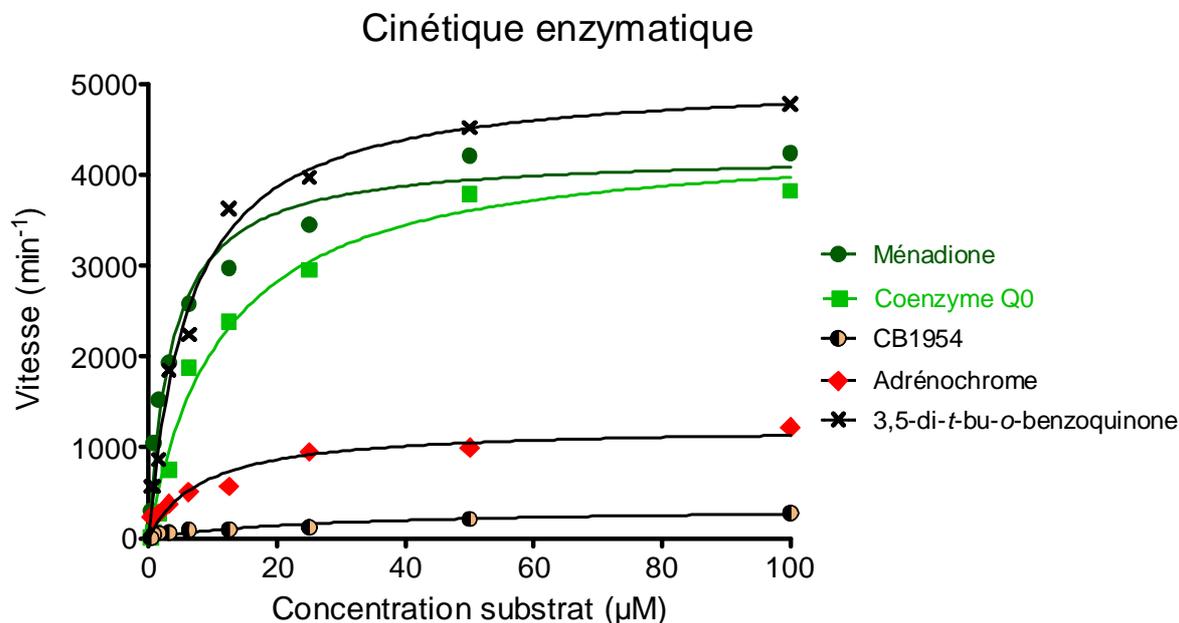


Figure 16. Représentation graphique de la cinétique enzymatique de QR2 en fonction de la concentration de différents substrats.

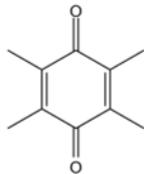
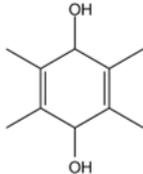
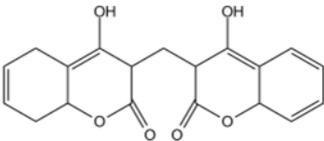
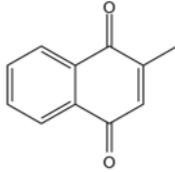
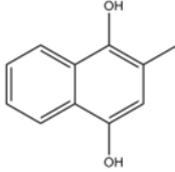
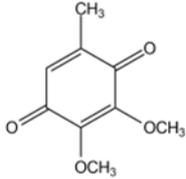
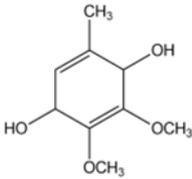
Un autre groupe de molécules se détache avec des V_{max} plus faibles. L'adrénochrome présente une V_{max} deux fois plus faible que celle de la ménadione mais un K_M (18,9 μM) relativement faible et proche de celui du coenzyme Q0 indiquant une bonne affinité de cette *ortho*-quinone pour l'enzyme. Des analyses cristallographiques ont mis en évidence que l'adrénochrome est capable de s'insérer dans le site actif de QR2 d'une façon similaire à la ménadione en formant une liaison hydrogène grâce à une de ses fonctions cétone via une molécule d'eau au groupement carbonyle de la glycine 174 de QR2 (Fu Y., 2008). Ce calcul d'affinité confirme que cette molécule peut subir un transfert d'électron et être facilement métabolisée par QR2.

Le CB1954 présente la plus faible affinité pour l'enzyme (cinq fois moins d'affinité que la ménadione) et la vitesse de métabolisation la plus basse ce qui est compréhensible compte tenu de la nécessité de réduire cette molécule par deux fois deux électrons contrairement aux autres molécules testées.

2. Potentiels redox des substrats

La voltammétrie cyclique permet de déterminer les potentiels redox moléculaires et le nombre d'électrons mis en jeu pour chaque réduction. QR1 et QR2 réduisent différents types de substrats quinoniques par deux électrons. L'étude des potentiels redox permet de les comparer et de déterminer des catégories en fonction du rôle de chaque molécule et de l'enzyme ciblée. Cette méthode a été appliquée aux différents substrats et inhibiteurs décrits pour les enzymes QR1 et QR2 et les résultats sont rapportés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Structures des formes oxydées et réduites et potentiels d'oxydation et de réduction de différents substrats, co-substrats, inhibiteurs et modulateurs de QR1 et QR2 (*forme oxydée disponible commercialement, †forme réduite disponible commercialement) obtenus sur électrode de platine dans l'ACN-TBAP (0,1 M) ou DMF-TBAP (0,1 M), vitesse de balayage 0,1 V/s.

Produit et masse molaire (g.mol ⁻¹)	Fonction	Structure forme oxydée	Structure forme réduite	Potentiel d'oxydation (V)	Potentiel de réduction (V)
Duroquinone* 164,2	Substrat QR1				- 0,74
Dicoumarol† 336,29	Inhibiteur QR1				- 0,43
Ménadione* 172,18	Substrat QR1 et QR2				- 0,80
Co enzyme Q0* 182,17	Substrat QR1 et QR2				- 0,65

CB1954* 252,18	Substrat QR2		<p>Première réduction</p> <p>Seconde réduction</p>		- 1
NADH† 709,4	Co-substrat QR1			0,53	
NRH† 256,3	Co-substrat QR2			0,76	
S29434† 374,4	Inhibiteur QR2				- 1,33
Resvératrol† 228,24	Inhibiteur QR2			1,34	- 1,35
Mélatonine† 232,28	Inhibiteur QR2			1,1 1,3	
Adrénochrome * 179,17	Substrat QR2			1,56	- 0,81
Aminochrome 189,64	Substrat QR2		<p>Dopamine†</p>	0,85 1,16	- 0,94 - 1,48
3,5-di- <i>tert</i> - butyl- <i>o</i> - benzoquinone* 220,31	Substrat QR2				- 0,95

Le nombre d'électrons échangés a été déterminé par comparaison avec les voltampérogrammes obtenus dans les mêmes conditions avec le ferrocène (en rouge, Figure 17). Ainsi, la hauteur calculée entre le pic de cathode Epc et le pic anodique Epa, ici 11,35 μA dans le cas du ferrocène correspond à une réduction par un électron. Les composés présentant cette même hauteur seront donc réduits par un électron alors que ceux réduits par deux électrons présenteront une hauteur deux fois plus importante.

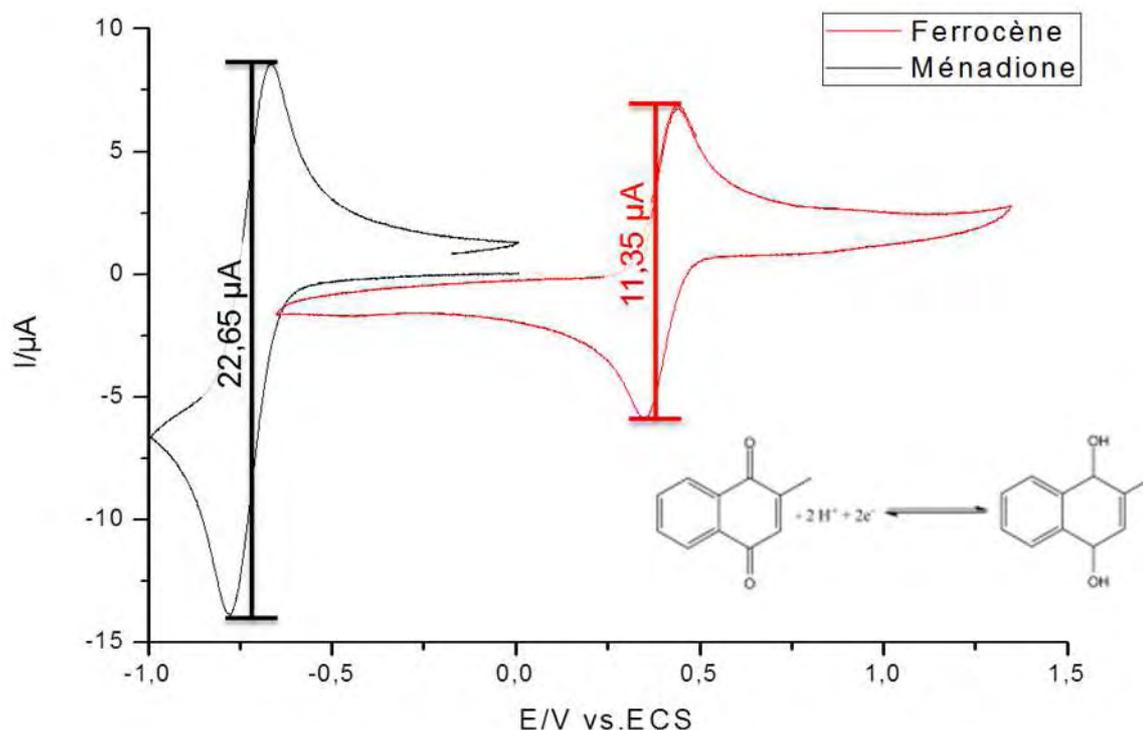
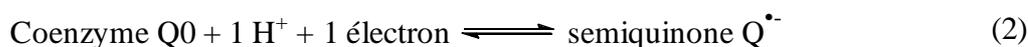


Figure 17. Voltammogrammes du ferrocène 1 mM (en rouge) et de la ménadione 1 mM (en noir) à l'électrode de platine dans l'ACN-TBAP (0,1 M), vitesse de balayage 0,1 V/s.

La réduction de la ménadione à - 0,80 V vs. ECS met en jeu deux électrons (équation 1) car la hauteur entre Epa et Epc est égale à deux fois la hauteur obtenue pour le ferrocène, alors que la réduction du coenzyme Q0 à - 0,65 vs. ECS met en jeu un seul électron (équation 2) dans la gamme de potentiel étudiée (Figures 17 et 18).



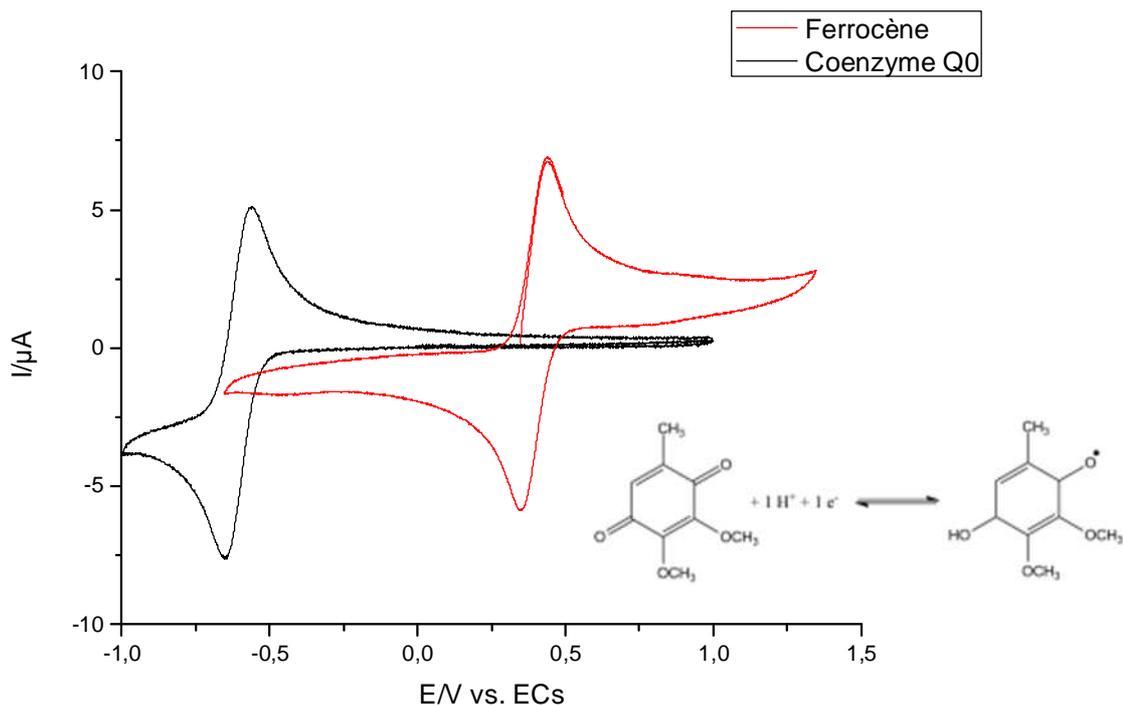
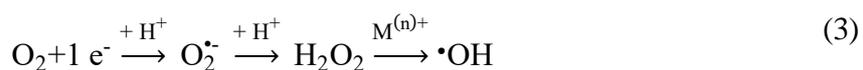


Figure 18. Voltammogrammes du ferrocène 1 mM (en rouge) et du coenzyme Q0 1 mM (en noir) à l'électrode de platine dans l'ACN-TBAP (0,1 M), vitesse de balayage 0,1 V/s.

Cette variation du nombre d'électrons échangés pourrait être à l'origine des différences observées au niveau des spectres RPE avec la ménadione comparativement au coenzyme après réduction par QR2 (Reyber K., 2011). Suite à la réduction de la ménadione par QR2, une production de radicaux hydroxyle est observée après réduction de l'oxygène (équation 3), alors que dans le cas des coenzymes les spectres sont moins intenses et plus complexes.



La réduction du coenzyme Q0 (CoQ0) par QR2 s'accompagne de la production du radical superoxyde et de radicaux semiquinoniques (réduction de la quinone à 1 électron). La production de radicaux superoxydes pourrait provenir de la réaction entre la semiquinone $\text{Q}^{\cdot-}$, formée suite à la réduction du coenzyme Q0 par l'enzyme, et l'oxygène selon l'équation 4 (Cadenas E., 1995).



Ce résultat soulève l'hypothèse de la capacité de QR2 à induire des réductions à un seul électron contrairement à QR1.

La réduction du CB1954 **23** (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide), qui est un substrat de QR2 et non de QR1, met en jeu 2 électrons alors que, d'un point de vue structural, cette molécule peut être réduite par 4 électrons au niveau des 2 fonctions nitro. Le voltammogramme obtenu pour la réduction de cette molécule (Figure 19) démontre que seulement deux électrons sont mis en jeu pour cette réduction ce qui confirme le mécanisme de réduction par deux fois deux électrons (équations 5 et 6) en présence de QR2 proposé par Majed AbuKhader et *al.* (AbuKhader M., 2005).

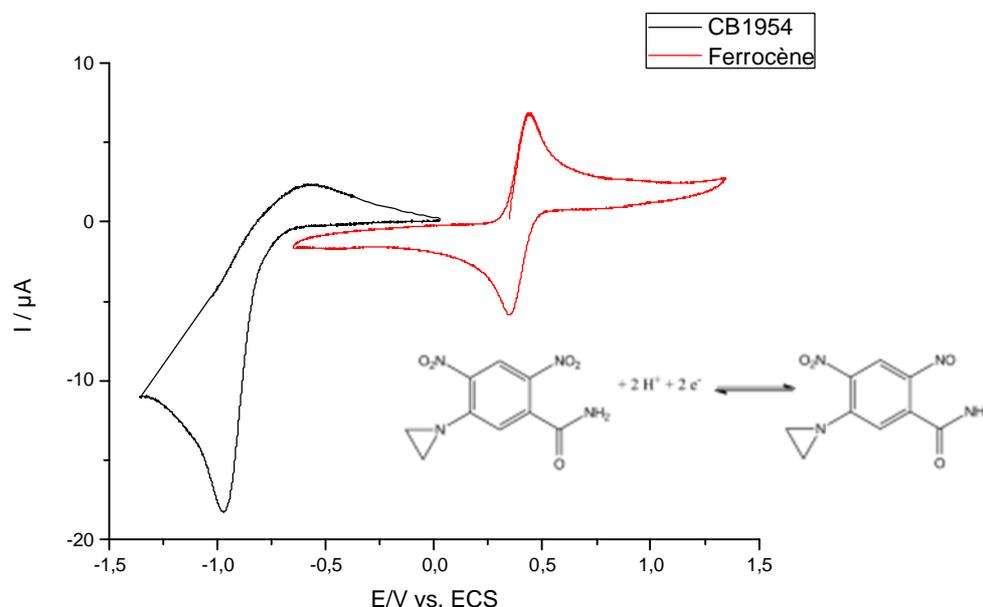
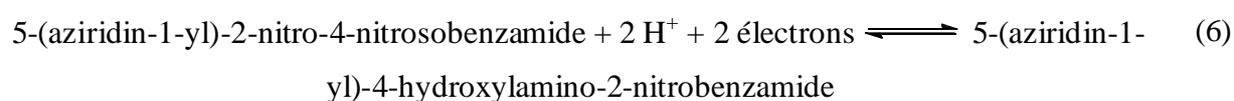
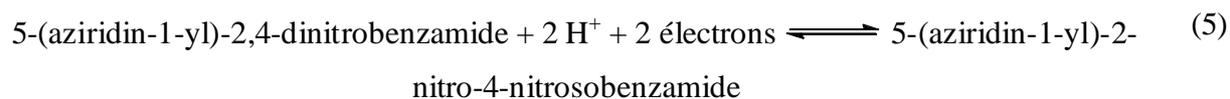


Figure 19. Voltammogrammes du ferrocène (en rouge) et du CB1954 (en noir) 1 mM à l'électrode de platine dans l'ACN-TBAP (0,1 M), vitesse de balayage 0,1 V/s.

En ce qui concerne les inhibiteurs des quinones réductases, le dicoumarol **9**, inhibiteur de QR1, se réduit très facilement à - 0,43 V vs. ECS alors que la réduction du S29434 **30**, inhibiteur de QR2 intervient à - 1,33 V vs. ECS. Ces deux inhibiteurs bloquent l'accès du site actif aux co-substrats mais n'interagissent pas de la même façon avec le site actif. Le dicoumarol interagit à la fois avec le FAD et la tyrosine 128 alors que le S29434 joue son rôle *via* une interaction avec le FAD et une occupation du site actif par sa structure hydrophobe

étendue (Pegan S., 2011). Les potentiels de réduction ne devraient donc pas réellement avoir de conséquences sur l'activité de ces molécules.

Cependant, le resvératrol, inhibiteur plus faible de QR2 avec une CI_{50} de $0,143 \mu\text{M}$ (Ferry G., 2010) présente une particularité comparativement à la mélatonine qui ne donne aucun potentiel de réduction. Comme démontré dans la partie précédente, cette molécule sous sa forme oxydée semble être un substrat de QR2 avec un potentiel de réduction de $-1,35 \text{ V}$ vs. ECS (Tableau 4).

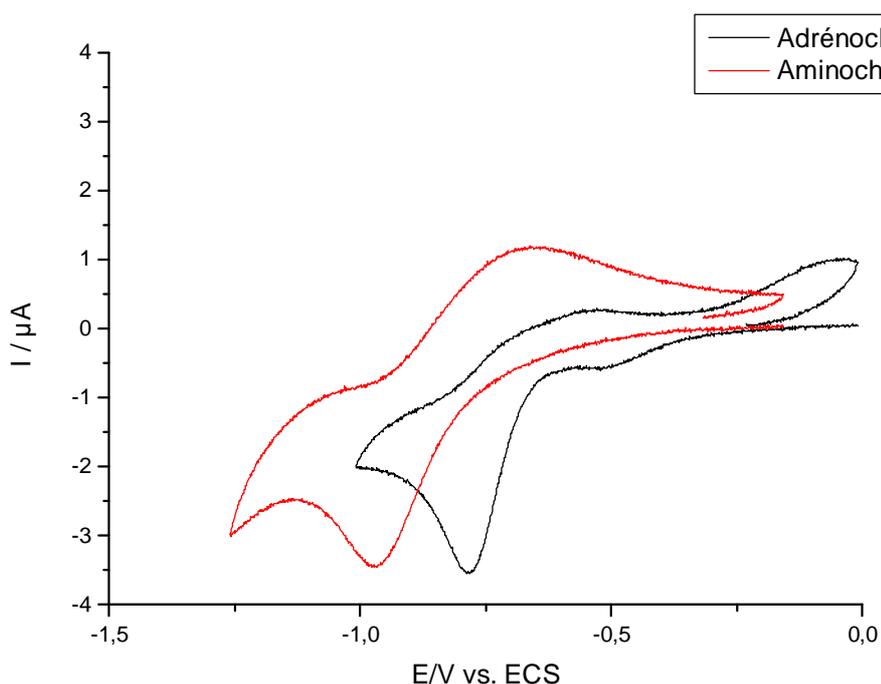


Figure 20. Voltammogrammes de l'adrénochrome 1 mM (en noir) et de l'aminochrome 1 mM (en rouge) à l'électrode de platine dans l'ACN-TBAP (0,1 M), vitesse de balayage 0,1 V/s.

Il est intéressant de remarquer que le CB1954 qui n'est pas métabolisé par QR1, nécessite un potentiel de -1 V vs. ECS pour être réduit. Les *ortho*-quinones présentent des potentiels de réduction très négatifs allant de $-0,80 \text{ V}$ à $-1,48 \text{ V}$ vs. ECS (Figure 20). Ces potentiels de réduction étant très négatifs, ces molécules seront donc plus difficiles à réduire que les autres quinones. Des études ont par ailleurs démontré qu'il existait un seuil de potentiel de réduction des quinones (notamment pour la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone dont le potentiel de réduction est de $-0,64 \text{ V}$ vs. ECS dans le DMSO) en dessous duquel QR1 et la NADPH-cytochrome P450 réductase n'étaient plus actives (Brunmark A., 1989 ; Bodini M.E., 1992). L'aminochrome et l'adrénochrome sont deux *ortho*-quinones qui peuvent être réduites par les

deux quinones réductases mais il a été démontré que cette réduction est beaucoup plus efficace lorsqu'elle est réalisée par QR2 (Fu Y., 2008). Les résultats développés dans cette partie semblent mettre en évidence que QR2 est capable de réaliser des réductions en dessous de ce seuil contrairement à QR1.

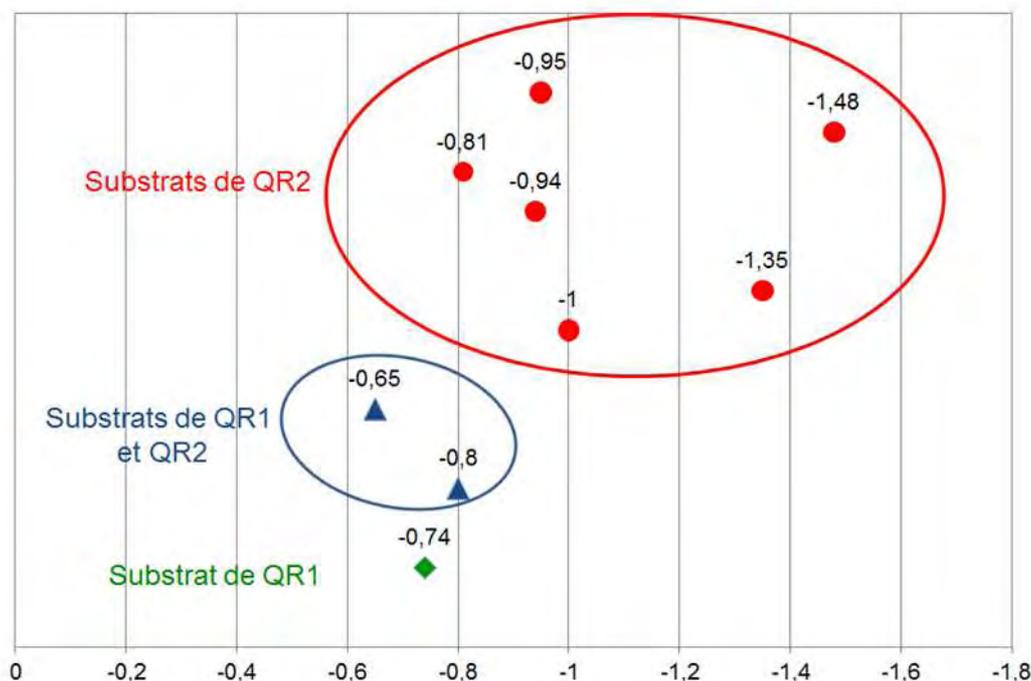


Figure 21. Zones des potentiels de réduction des différents substrats de QR1 et QR2 analysés par voltammétrie cyclique.

L'analyse par voltammétrie cyclique de treize substrats, co-substrats, inhibiteurs et modulateurs de QR1 et QR2 a permis de mettre en évidence, comme le souligne la Figure 21, la force réductrice de QR2 qui peut réduire des molécules présentant des potentiels de réduction beaucoup plus négatifs (inférieurs à - 1 V) que ne peut le faire QR1, qui ne peut pas réduire au-delà de - 0,88 V. Cette capacité de QR2 à réduire des substrats ayant des potentiels de réduction s'étendant de - 0,65 à -1,48 V pourrait expliquer le fait que cette enzyme puisse accepter de plus nombreux substrats que son homologue et apporter des indications sur les différences dans le fonctionnement redox de QR2 par rapport à QR1.

3. Étude de la production d'espèces réactives de l'oxygène liée à la métabolisation des substrats de QR2

Des travaux précédents, réalisés au sein de l'équipe, ont démontré que la métabolisation de quinones par la protéine purifiée QR2, en présence de son co-substrat, avait comme conséquence une production significative d'espèces radicalaires (Reyber K., 2011). Ces études ont utilisé la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE) combinée à l'utilisation du piègeur de radicaux 5,5'-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (DMPO). Le DMPO piège les radicaux oxygénés (de courte durée de vie et donc difficiles à observer directement) formés au cours de réactions chimiques, au niveau de sa fonction nitroène, pour former des adduits nitroxyde plus stables et donnant des spectres caractéristiques en RPE (Figure 22).

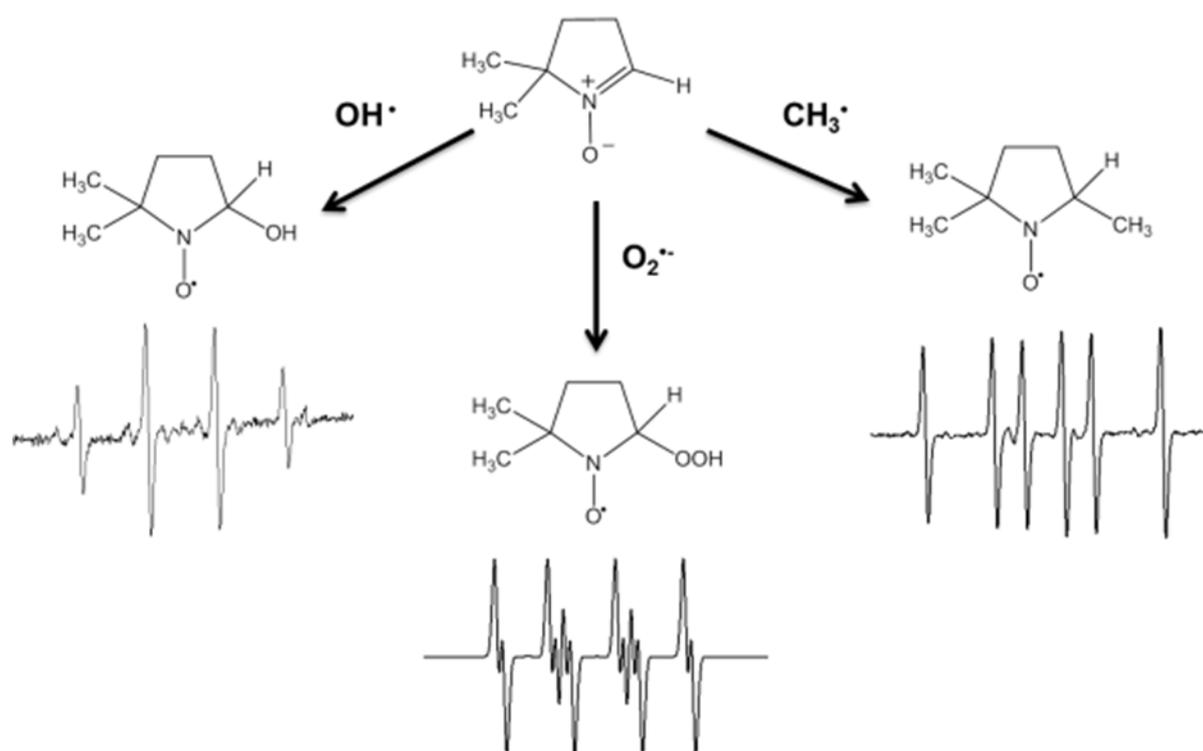


Figure 22. Structure du 5,5'-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (DMPO), adduits du DMPO formés en présence d'espèces radicalaires ([DMPO-OH][•], [DMPO-OOH][•], [DMPO-CH₃][•]) accompagnés de leurs spectres respectifs.

Les travaux ultérieurs ont permis de déceler, selon les différents couples substrat/co-substrat employés, la présence des radicaux hydroxyle HO[•], superoxyde O₂^{•-} et semiquinonique Q^{•-}⁷.

Les différentes expériences réalisées ont permis d'aboutir aux hypothèses (1) que

⁷ Les noms et symboles utilisés dans ce manuscrit pour représenter les différents radicaux suivent les recommandations éditées en 2005 de l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 2005)

l'hydroquinone réagirait avec la quinone pour former un radical semiquinonique, (2) mais aussi avec l'oxygène pour former le radical superoxyde et (3) qu'une réaction de type Fenton (avec le métal de l'enzyme par exemple) ou une réaction de réduction de l'oxygène à deux fois un électron produirait le radical hydroxyle (Figure 23).

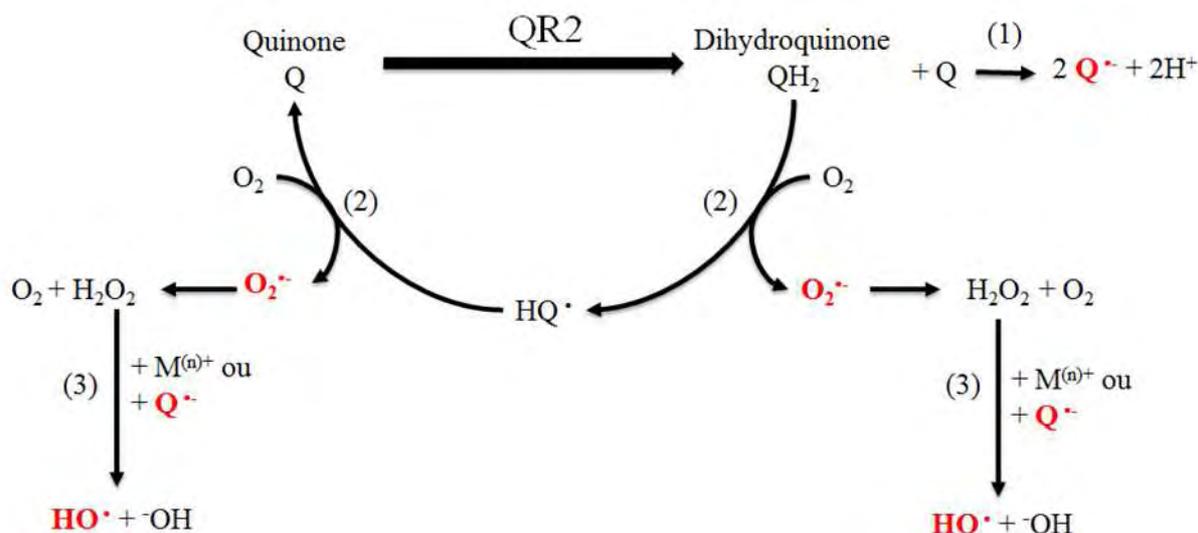


Figure 23. Hypothèse des conséquences de la métabolisation des quinones par la protéine pure QR2 sur la production d'espèces réactives de l'oxygène. Les radicaux détectés par Reybier K. *et al* sont indiqués en rouge (d'après **Reybier K., 2011**).

Ce travail se place dans la continuité de ces travaux antérieurs dans le but d'étudier et de comparer les conséquences de la métabolisation de différentes quinones ou d'autres molécules pouvant être utilisées comme substrat par QR2 sur la production d'espèces radicalaires.

3.1. *Para*-quinones substrats de QR1 et QR2

Les deux *para*-quinones étudiées, la ménadione **21** et le coenzyme Q0 **40**, sont deux substrats fortement réduits par QR2 avec des K_M respectifs de 10,28 et 16,24 μM. L'ajout de ménadione **21** en présence de co-substrat et de DMPO à QR2 induit la formation d'un sextuplet en RPE correspondant à un adduit [DMPO-CH₃][•] (a_N = 16,28 G, a_H = 23,25 G) de forte intensité (hauteur des pics ± 15 000) (Figure 24a) stable après 15 minutes à température ambiante. En présence de catalase, enzyme réagissant avec le peroxyde d'hydrogène (équation 1) et empêchant ainsi la formation du radical hydroxyle, le signal disparaît totalement (Figure 24b). Ce résultat démontre que l'adduit [DMPO-CH₃][•] provient en fait du piégeage du radical méthyle issu de la réaction entre le radical hydroxyle OH[•] et le

diméthylsulfoxyde $\text{CH}_3\text{-SO-CH}_3$ (équation 2) (Reybier K., 2011). L'ajout de l'inhibiteur de QR2 S29434 à $5\ \mu\text{M}$ supprime totalement l'apparition du signal (Figure 24c). L'absence de signal lorsque les différents réactifs sont analysés sans enzyme ou lorsque QR2 est inhibée par le S29434 démontre que la production du radical hydroxyle est due à la métabolisation de la ménadione par QR2 et donc à la production de ménadiol.

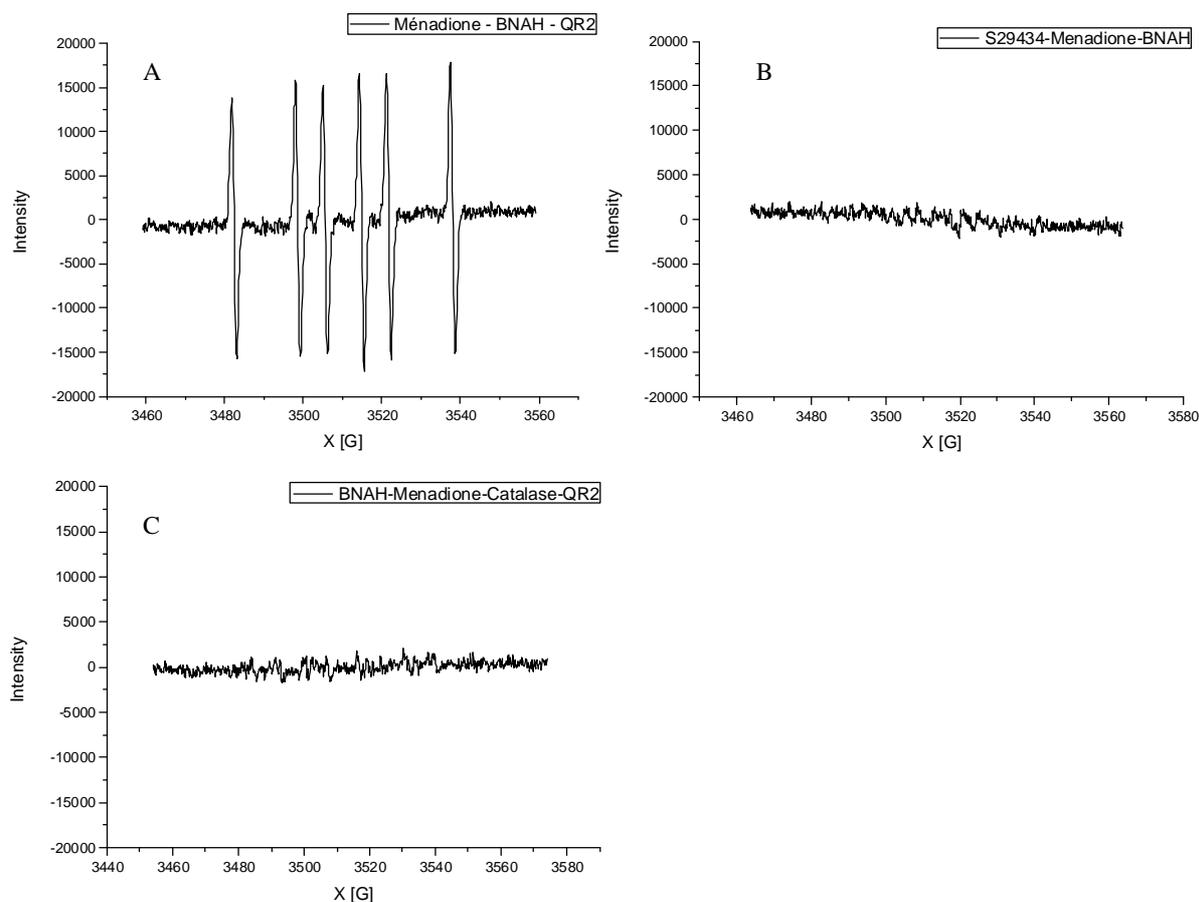
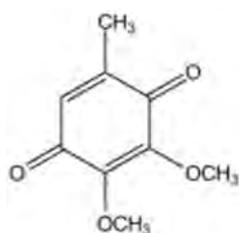
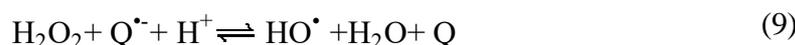
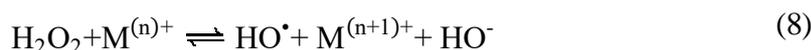


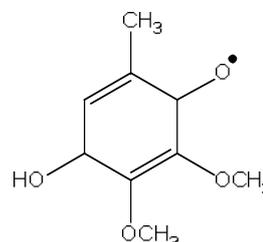
Figure 24. Spectres RPE obtenus après 15 minutes d'incubation à température ambiante en présence de DMPO (100 mM) dans un mélange contenant : (A) QR2 (20 $\mu\text{g/ml}$), BNAH (3 mM) et ménadione (125 μM) ; (B) QR2 (20 $\mu\text{g/mL}$), S29434 (3,4 μM), BNAH (3 mM) et ménadione (125 μM) ; (C) QR2 (20 $\mu\text{g/ mL}$), catalase (2 kU/mL), BNAH (3 mM), ménadione (125 μM). Ordre d'addition : DMPO, tampon tris- β -octyl, QR2, BNAH, ménadione. Gain : 2.10^5 .

Comme démontré précédemment et présenté Figure 23, la production du radical hydroxyle est due à une auto-oxydation de l'hydroquinone produite suite à la réduction de la quinone par QR2 (équations 3 et 4). Ainsi, l'hydroquinone peut céder un électron et un hydrogène à

l'oxygène moléculaire (équations 5 et 6), conduisant à la production du radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (équation 7). S'ensuit soit une réaction de Fenton produisant le radical hydroxyle (équation 8), soit une réaction indépendante de la présence de métaux entre le peroxyde d'hydrogène et la semiquinone (équation 9). Il a en effet été démontré que certains couples quinone/semiquinone pouvaient provoquer des réactions de Fenton organiques (Zhu B.Z., 1995 ; Koppenol W.H., 1985).



Coenzyme Q0 40



semiquinone coenzyme Q0 41

Le coenzyme Q0 40 en présence de l'enzyme QR2 purifiée donne un spectre RPE moins intense (intensité des pics $\pm 3\ 000$) et plus complexe (Figure 25 A) correspondant aux adduits $[DMPO-OOH]^{\bullet}$ ($a_N = 14,2\ G$, $a_H\beta = 11,34\ G$, $a_H^{\gamma} = 1,25\ G$) et $[DMPO-CH_3]^{\bullet}$ ($a_N = 16,28\ G$, $a_H = 23,25\ G$) comme démontré par simulation (Figure 25b). Ces différences, à la fois en termes d'intensité et de type de signal, peuvent être dues à une stabilité supérieure de la forme hydroquinone produite à partir du coenzyme Q0. Ainsi, l'auto-oxydation par l'oxygène moléculaire est plus difficile. L'addition de superoxyde dismutase, métalloprotéine capable de réaliser la dismutation du superoxyde selon l'équation 10, supprime l'adduit $[DMPO-OOH]^{\bullet}$ (Figure 24 C), alors que la catalase supprime presque entièrement le signal, à l'exception d'un

signal correspondant à la semiquinone **41** (Figure 25d). L'ajout de ces deux enzymes est nécessaire pour supprimer totalement le signal confirmant une formation de semiquinone suite à une réaction entre l'hydroquinone et le superoxyde (équation 11) (**Reyber K., 2011**). Cette semiquinone n'est observée que pour le coenzyme Q0, probablement en raison d'une meilleure stabilité de la forme semiquinonique.

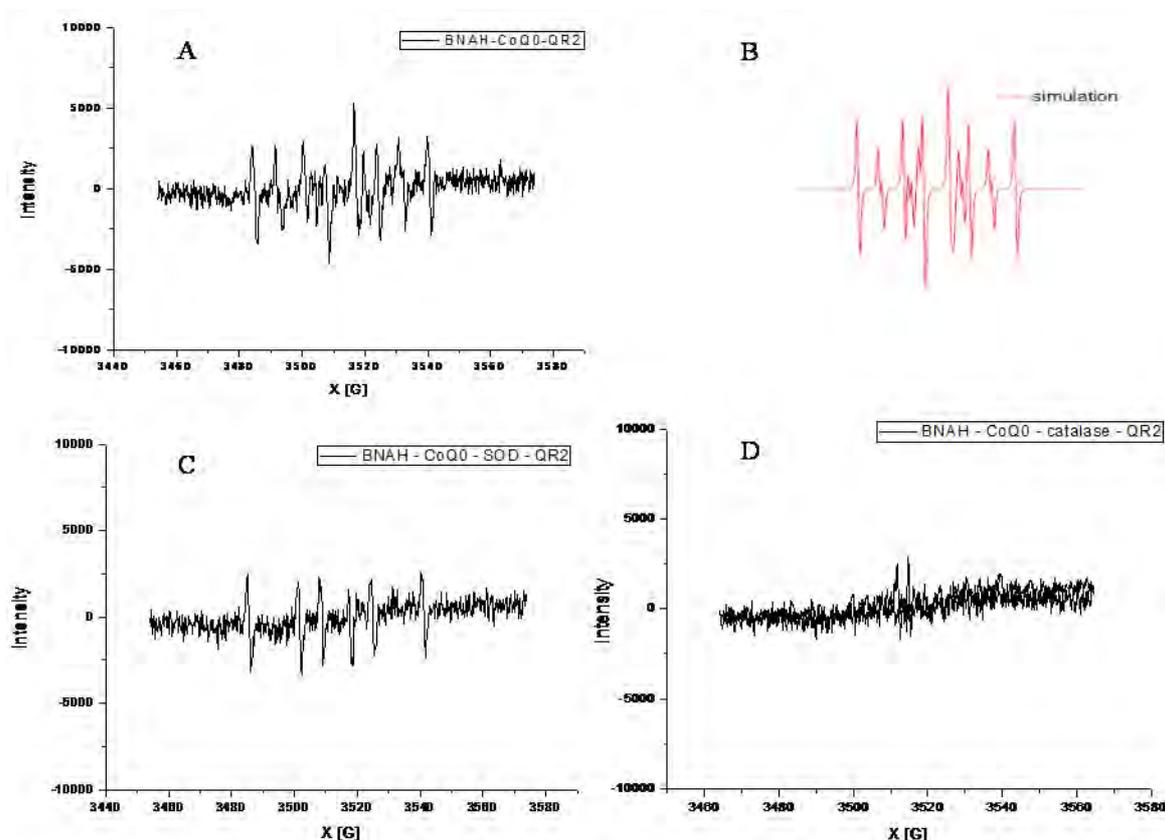
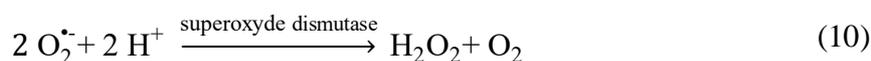


Figure 25. Spectres RPE et simulation associée obtenus après 15 minutes d'incubation à température ambiante en présence de DMPO (100 mM) dans un mélange contenant : (A) QR2 (20 µg/mL), BNAH (3 mM), coenzyme Q0 (CoQ0, 125 µM) et (B) simulation associée ; (C) QR2 (20 µg/mL), BNAH (3 mM), coenzyme Q0 (125 µM) et SOD (100 U/mL) ; (D) QR2 (20 µg/mL), BNAH (3 mM), coenzyme Q0 (125 µM) et catalase (2 kU/ mL). Ordre d'addition : DMPO, tampon tris-β-octyl, QR2, BNAH, coenzyme Q0. Gain : $2 \cdot 10^5$

3.2. Pseudo-quinones substrats de QR2

La pro-drogue anticancéreuse CB1954, un substrat spécifique de QR2 présentant un K_M deux à trois fois moins bon que les autres quinones étudiées, induit la production d'un spectre intense et différent de celui obtenu pour la ménadione, composé de huit raies dues à la superposition de deux signaux RPE (Figure 26). Comme dans le cas du coenzyme Q0, la simulation démontre que ce spectre provient à la fois de l'adduit radicalaire $[\text{DMPO-OOH}]^\bullet$ et de l'adduit $[\text{DMPO-CH}_3]^\bullet$, cependant l'adduit $[\text{DMPO-CH}_3]^\bullet$ est ici plus intense que l'adduit $[\text{DMPO-OOH}]^\bullet$. Ces différences peuvent être dues à la stabilité de ces adduits ou à des différences dans les conditions expérimentales

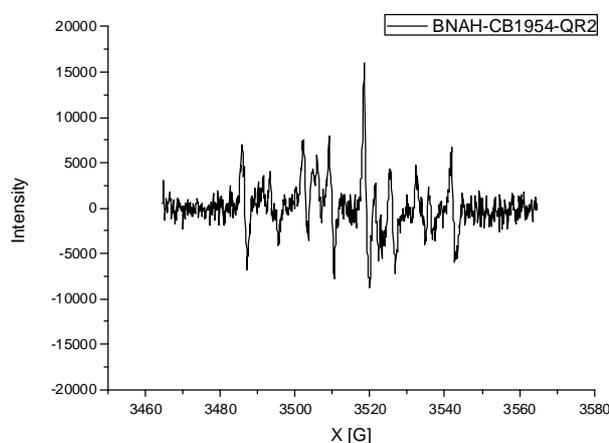
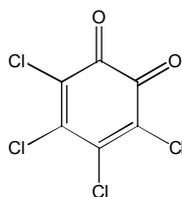


Figure 26. Spectre RPE obtenu après 15 minutes d'incubation à température ambiante en présence de DMPO (100 mM) dans un mélange contenant QR2 (20 $\mu\text{g/ml}$), BNAH (3 mM) et CB1954 (125 μM). Ordre d'addition : DMPO, tampon tris- β -octyl, QR2, BNAH, CB1954. Gain : $2 \cdot 10^5$.

3.3. *Ortho*-quinones substrats de QR1 et QR2

La métabolisation de l'adrénochrome **35** par QR2 est décrite dans la littérature comme bien supérieure par rapport à QR1 (Fu Y, 2008). L'étude de l'activité enzymatique de QR2 a montré que le K_M de l'adrénochrome (19 μM) est très légèrement moins bon que ceux obtenus pour les *para*-quinones. L'affinité de QR2 pour cette *ortho*-quinone est donc aussi importante que pour les *para*-quinones. Cette métabolisation donne un spectre RPE intense (intensité des pics $\pm 7\,500$, Figure 27a) présentant les adduits $[\text{DMPO-OOH}]^\bullet$ ($a_N = 14,2$ G, $a_{H_H}\beta = 11,34$ G, $a_{H_H}^\gamma = 1,25$ G) et $[\text{DMPO-CH}_3]^\bullet$ ($a_N = 16,28$ G, $a_{H_H} = 23,25$ G), comme dans le cas du coenzyme Q0 et provenant du piégeage des radicaux hydroxyles et superoxydes. Cette similarité entre les spectres RPE de l'adrénochrome et le coenzyme Q0 démontre qu'en plus de s'introduire dans le site actif de l'enzyme, cette molécule est bien réduite par QR2, ce

qui avait déjà été observé lors de l'étude du K_M dans la première partie de ce chapitre, et que la réoxydation de l'hydroquinone correspondante a pour conséquence la production des radicaux hydroxyles et superoxydes. Les autres *ortho*-quinones testées, l'aminochrome **39**, le 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone **36** ($K_M = 15,98 \mu\text{M}$) et la tétrachlorobenzoquinone **42**, donnent des sextuplets d'intensité plus faibles (Figure 27b, c et d) correspondant à l'adduit $[\text{DMPO-CH}_3]^*$. La dopamine commercialisée sous sa forme réduite et testée, ne donne aucun signal car aucune réduction par QR2 n'est possible.



tétrachlorobenzoquinone 42

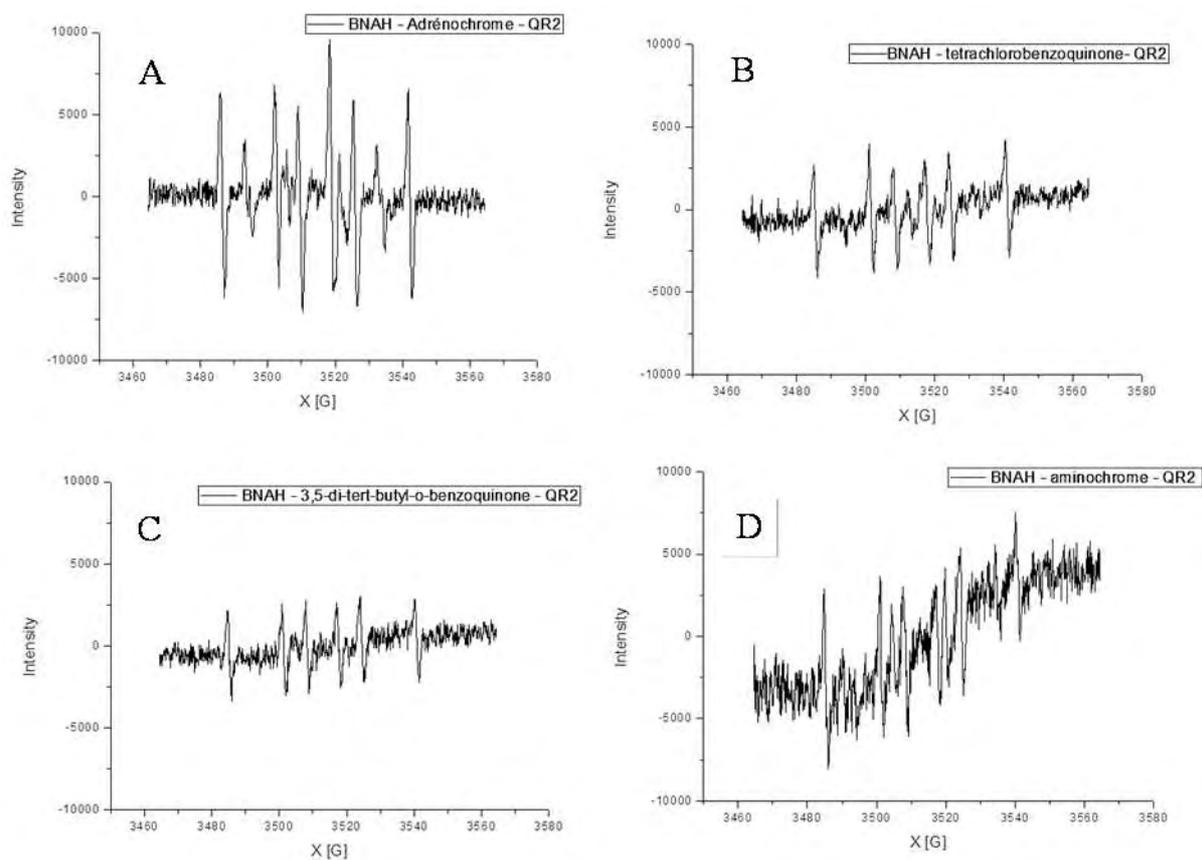


Figure 27. Spectres RPE obtenus après 15 minutes d'incubation à température ambiante en présence de DMPO (100 μM) dans un mélange contenant : (A) adrénochrome (125 μM), QR2 (20 $\mu\text{g/mL}$), BNAH (3 mM) ; (B) tétrachlorobenzoquinone (125 μM), QR2 (20 $\mu\text{g/mL}$), BNAH (3 mM) ; (C) 3,5-di-*tert*-butyl-*o*-benzoquinone (125 μM), QR2 (20 $\mu\text{g/mL}$), BNAH (3 mM) ; (D) aminochrome formé à partir de l'oxydation de la dopamine (125 μM) par du ferricyanure de potassium (600 μM). Ordre d'addition : DMPO, tampon tris- β -octyl, QR2, BNAH, substrat. Gain : $2 \cdot 10^5$.

3.4. Polyphénols inhibiteurs de QR2

Le resvératrol et son métabolite le picéatannol sont deux polyphénols pouvant s'insérer dans le site actif de QR2 et dont l'activité inhibitrice (CI_{50} de 143 nM pour le resvératrol) sur l'enzyme a été démontrée (Buryanovskyy L., 2004 ; Ferry G., 2010 ; Hsieh T., 2013). Cependant, le resvératrol ne diminue que peu la production d'espèces radicalaires après métabolisation de la ménadione par QR2 comparativement au S29434 (Reybier K., 2011). Ces molécules ayant des structures proches de certains substrats de QR2, des essais ont été réalisés en les oxydant par du ferricyanure de potassium et en les testant en tant que substrat sous leur forme réduite et oxydée.

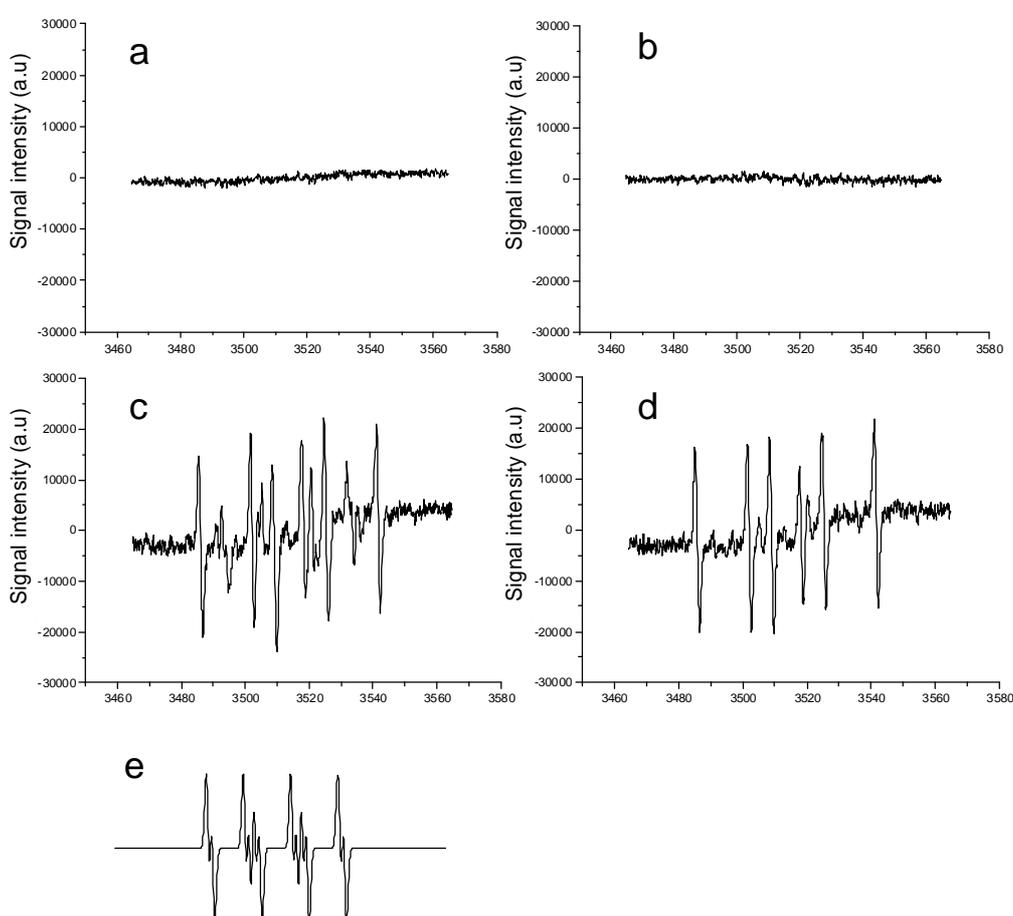


Figure 28. Spectres obtenus après 15 minutes d'incubation à température ambiante en présence de DMPO (100 mM) dans un mélange contenant : (A) resvératrol (125 μ M), QR2 (20 μ g/ml), BNAH (3 mM) ; (B) picéatannol (125 μ M), QR2 (20 μ g/ml), BNAH (3 mM) ; (C) resvératrol (125 μ M), ferricyanure de potassium (600 μ M), QR2 (10 μ g/mL), BNAH (3 mM) ; (D) picéatannol (125 μ M), ferricyanure de potassium (600 μ M), QR2 (10 μ g/mL), BNAH (3 mM) ; (E) simulation de l'adduit [DMPO-OOH]. Accumulations de 5 scans, gain : 2.10^5 . Ordre d'addition : DMPO, tampon tris- β -octyl, QR2, BNAH, substrat. Gain : 2.10^5 .

Aucun radical n'est observé lorsque le resvératrol et le picéatannol sous leur forme réduite sont utilisés en tant que substrats de QR2 (Figure 30a et b). De même le ferricyanure en présence de DMPO n'induit aucun signal. Cependant, lorsque ces molécules sont oxydées par un excès de ferricyanure de potassium, des signaux RPE de faible intensité correspondant aux adduits [DMPO-CH₃][•] et [DMPO-OOH][•] sont observés dans le cas du resvératrol (Figure 30c et simulation e). Dans le cas du picéatannol oxydé, uniquement l'adduit [DMPO-CH₃][•] est obtenu (Figure 30d). La présence de l'adduit [DMPO-OOH][•] et l'annulation du signal par ajout de SOD traduisent la formation du radical superoxyde. La présence de l'adduit [DMPO-OOH][•] dans le cas du resvératrol a déjà été identifiée dans la littérature et corrélée à une plus faible activité antioxydante (6600 fois) de cette molécule vis-à-vis du picéatannol (**Murias M., 2005**).

Ainsi, sous leur forme oxydée, ces polyphénols sont métabolisés par QR2 de la même manière que les substrats classiques, comme décrit dans la partie activité enzymatique de ce mémoire, et cette métabolisation a des répercussions sur la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

Il est également connu que ces polyphénols présentant une forte activité antioxydante dans les essais *in vitro*. *In vivo*, il a été démontré que de très faibles quantités de ces molécules étaient capables d'atteindre les cellules. Ces quantités étant toutefois suffisantes pour s'oxyder en électrophiles et réaliser des réactions d'addition de Michael sur une cystéine de Keap 1 (Figure 29), enclenchant la libération de Nrf 2 et par conséquent l'expression de QR2 et d'autres protéines impliquées dans la protection antioxydante et l'homéostasie nucléophile (**Forman H.J., 2014**). Il est possible que ces molécules contrôlent la production et l'activité de QR2 en étant capable d'induire une augmentation de QR2 dans la cellule lorsqu'elles sont oxydées et en inhibant QR2 une fois réduites par cette enzyme.

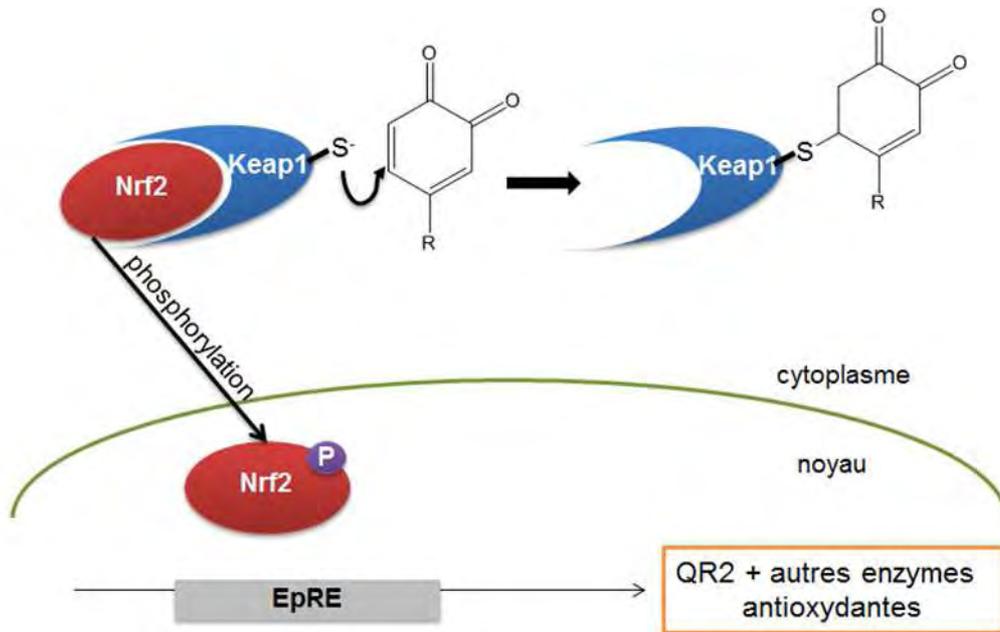


Figure 29. Activation de la production d'enzymes antioxydantes par les électrophiles. L'oxydation du polyphénol en quinone lui permet de réagir avec la cystéine de Keap 1 par addition de Michael. Ceci permet à Nrf 2 d'échapper à l'ubiquitination et de pouvoir aller jusqu'au noyau pour activer la transcription de gènes codant pour des enzymes antioxydantes via l'élément de réponse aux électrophiles (EpRE), d'après (**Forman H.J., 2014**).

3.5. Comparaison de l'intensité de production totale d'espèces réactives de l'oxygène après métabolisation des différents substrats par QR2.

La quantification de la production générale de radicaux libres oxygénés dans le cas de chaque substrat métabolisé par QR2 est réalisée par double intégration de chaque pic obtenu en RPE. Cette méthode permet d'obtenir l'aire sous la courbe et de comparer ainsi l'intensité de différents signaux (Figure 30).

Cette évaluation permet de mettre en évidence deux substrats dont la métabolisation par QR2 induit une production de radical hydroxyle et/ou superoxyde deux à trois fois plus importante qu'avec les autres substrats : la ménadione et l'adrénochrome. Pour ces deux produits, l'analyse des spectres RPE a démontré la formation d'adduits $[\text{DMPO-CH}_3]^*$ et $[\text{DMPO-OOH}]^*$ provenant du piégeage des radicaux hydroxyle ou superoxyde par le DMPO.

L'analyse de l'activité enzymatique de QR2 en présence de ces deux produits a montré qu'ils sont fortement réduits par QR2 avec des K_M de 10 et 19 (pour la ménadione et l'adrénochrome respectivement) et leurs potentiel de réduction sont relativement proches (-

0,70 à - 0,80 V). Les forts signaux obtenus peuvent également s'expliquer par une plus faible stabilité de la forme réduite de ces substrats.

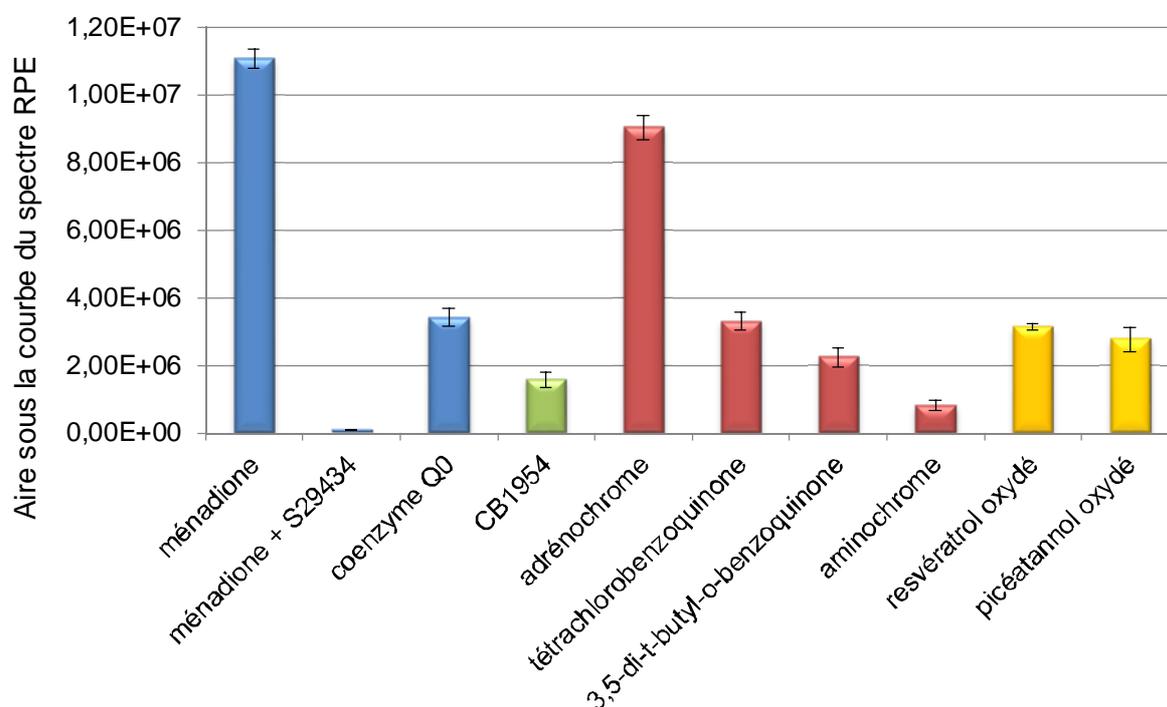


Figure 30. Comparaison de la production d'espèces réactives de l'oxygène après métabolisation de différents substrats de QR2. L'aire sous la courbe pour chaque spectre est calculée par la somme de la double intégration de chaque pic. Les résultats rapportés ici ainsi que les écart-types correspondent à la moyenne de plusieurs essais ($n \geq 5$). Les substrats de QR1 et QR2 sont représentés en bleu, la pseudo-quinone CB1954 substrat de QR2 en vert, les *ortho*-quinones substrat de QR2 en rouge, les flavonoïdes inhibiteurs de QR2 sous leur forme oxydée en jaune.

Conclusion

L'analyse des propriétés physico-chimiques et biochimiques des différents substrats de QR1 et QR2, qu'ils soient quinoniques (*ortho* ou *para*-quinones) ou qu'ils s'en éloignent (pseudo-quinones et pro-drogues anticancéreuses par exemple), donne des informations sur leur réduction par ces enzymes.

Le suivi de l'activité enzymatique de QR2 en présence de différents substrats a permis d'identifier et de classer ces substrats selon leur affinité pour l'enzyme⁸. Les *ortho*-quinones ont été identifiées comme étant de bons substrats de QR2. Ceci révèle que QR2 est capable d'accepter une grande variété de substrats dont certains ont des structures relativement éloignées des quinones. Ces analyses ont également démontré que des molécules décrites comme étant des inhibiteurs de l'activité de QR2 à l'état réduit, notamment le resvératrol, jouent un rôle de substrat à l'état oxydé.

La voltammétrie cyclique a mis en évidence le fait que les substrats réduits par QR2 présentent des potentiels de réduction majoritairement plus négatifs que les substrats réduits par QR1. Ceci pourrait expliquer les différences qu'il existe en termes de spécificité de substrat entre ces deux enzymes alors que leurs sites actifs sont relativement proches structurellement. Ainsi QR2 ayant une capacité de réduction bien supérieure à QR1 lui permettrait ainsi d'accepter de plus nombreux substrats réductibles à des potentiels beaucoup plus négatifs.

L'analyse par résonance paramagnétique électronique des substrats en présence QR2 a permis de mettre en évidence la production de radicaux avec la majorité des composés testés. Différentes espèces réactives de l'oxygène (radicaux superoxyde et hydroxyle principalement) ont ainsi pu être mises en évidence et leur production secondaire à la métabolisation des substrats par QR2 a été déterminée par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de QR2. Ces résultats soulèvent l'hypothèse d'une réoxydation accrue de ces substrats réduits en milieu aqueux.

Cependant, ces essais sur la forme enzymatique purifiée de QR2 reflètent difficilement les conséquences du métabolisme de QR2 et des quinones dans un milieu physiologique plus

⁸ Le paracétamol, dont QR2 a été récemment décrit comme étant la cible secondaire (Miettinen T.P., 2014), ne présente aucune affinité pour l'enzyme au cours des essais réalisés.

complexe. En effet, la cellule contient toute une machinerie permettant de réguler l'homéostasie redox ainsi que d'autres réductases et différents systèmes d'élimination des xénobiotiques (**Go Y.M., 2008**).

Afin de comprendre la finalité de l'activité de QR2, il est donc indispensable de l'étudier dans le milieu cellulaire.

Chapitre 3

Détermination des activités de QR1 et QR2

Détermination des activités de QR1 et QR2

1. Réduction des substrats par des lignées cellulaires surexprimant ou non QR1 et QR2....	62
1.1. Cellules CHO-k1-NT	63
1.2. Cellules CHO-k1-QR1	64
1.3. Cellules CHO-k1-QR2.....	65
1.4. Effet des inhibiteurs et modulateurs sur la réduction des substrats pour les CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2.....	67
2. Production des espèces réactives de l'oxygène par des lignées cellulaires surexprimant ou non QR1 et QR2	71
2.1. Métabolisation des <i>para</i> -quinones par les lignées cellulaires CHO-k1-NT, CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2.....	71
2.2. Métabolisation des <i>ortho</i> -quinones par les lignées cellulaires CHO-k1-NT, CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2.....	76
3. Production des espèces réactives de l'oxygène par une lignée cellulaire surexprimant naturellement QR2.....	79
4. Visualisation et localisation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par des lignées cellulaires surexprimant ou non QR1 et QR2	83

Introduction

L'analyse de l'activité réductrice de la protéine purifiée QR2 est classiquement réalisée par des méthodes enzymologiques suivant notamment la diminution de fluorescence du co-substrat BNAH ou de certains substrats par des méthodes spectrophotométriques comme décrit dans le chapitre précédent.

Cependant, il est beaucoup plus difficile de déterminer la réelle capacité de réduction d'une enzyme dans le système complexe qu'est la cellule. En effet, dans un milieu cellulaire, les substrats doivent d'abord pouvoir traverser la membrane plasmique pour ensuite arriver à se fixer au niveau du site actif de l'enzyme. Au cours de ce trajet, d'autres systèmes peuvent piéger les substrats ou des réactions redox peuvent s'opérer, modifiant le substrat et finalement la capacité de l'enzyme à le reconnaître. Des quinones peuvent également être produites *in cellulo* par l'action d'autres enzymes comme la tyrosine hydroxylase formant des catécholamines à partir d'acides aminés comme la tyrosine, et de la tyrosinase capable de les oxyder pour former des dopaquinones (Figure 31) (Levitt M., 1965 ; Sanchez-Ferrer A., 1995). Afin de comprendre l'intérêt de QR2 dans son état physiologique, il est donc important de développer des techniques et méthodes permettant de suivre son activité au sein de cellules.

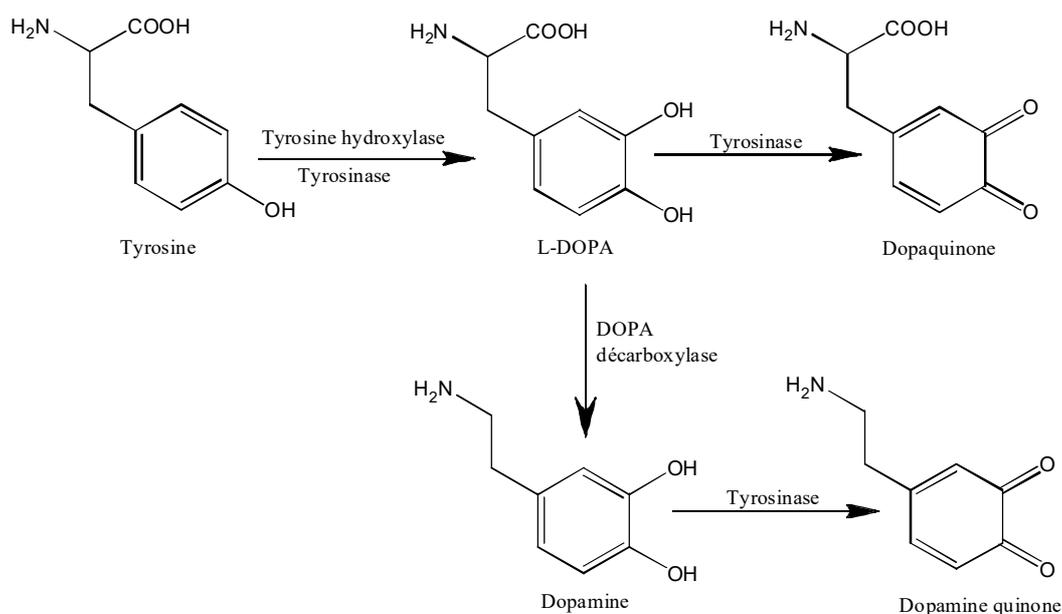


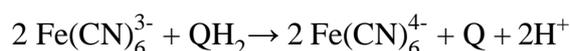
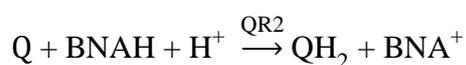
Figure 31. Synthèse des catéchol quinones à partir de la tyrosine par les enzymes tyrosine hydroxylase et tyrosinase.

C'est pourquoi l'objectif des travaux présentés dans ce chapitre a été, **dans une première partie**, de mettre en place une méthode permettant de suivre la réduction des substrats de QR2 au sein d'un système cellulaire intact et non de cellules lysées comme cela est souvent réalisé. Pour cela, une méthode indirecte utilisant la spectrophotométrie UV-visible, déjà utilisée pour l'étude de l'activité de QR1 sur des cellules endothéliales, a été adaptée pour l'étude de l'activité de QR2 sur des lignées d'ovaire de hamster chinois (CHO) génétiquement modifiées surexprimant QR1 (CHO-k1-QR1) ou QR2 (CHO-k1-QR2) et comparées à des cellules non modifiées (CHO-k1-NT) (**Merker M.P., 2006**). Cette méthode permet donc de déterminer l'activité de QR2 dans un système cellulaire intact mais également d'évaluer la capacité de réduction de QR2 en fonction des différents substrats testés, de comparer cette activité réductrice à QR1 et finalement d'étudier l'effet d'inhibiteurs et de modulateurs de QR1 et QR2 sur cette réduction des substrats.

Dans une deuxième partie, l'étude a porté sur la production d'espèces réactives de l'oxygène, au sein de ces cellules, suite à la réduction des substrats par les quinones réductases. La ménadione a été utilisée pour son rôle de substrat de QR2 et sa capacité, fortement décrite, à générer le radical superoxyde *in cellulo* et *in vivo* (**Rosen G.M., 1984 ; Fink B., 2004 ; Rogers L.J., 2014 ; Broniowska K.A., 2015**). Ainsi, comme décrit dans le chapitre précédent, il est indispensable d'évaluer cette production sur un milieu cellulaire plus complexe que l'enzyme purifiée. La spectroscopie RPE et la microscopie confocale de fluorescence ont été employées afin d'identifier la présence de radicaux oxygénés grâce à l'utilisation de sondes (DMPO et carboxy-H₂DCFDA). Il s'agit ici de comprendre les liens entre la structure chimique des quinones et les radicaux générés.

1. Réduction des substrats par des lignées cellulaires surexprimant ou non QR1 et QR2

L'activité enzymatique redox de QR2 *in cellulo* vis-à-vis de différents substrats (ménadione **21**, adrénochrome **35**, 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone **36**, aminochrome **39**, coenzyme Q0 **40**, dopachrome **43**) en présence ou non de deux modulateurs (resvératrol **27** et mélatonine **29**) ou d'inhibiteurs (S29434 **30** et dicoumarol **9**) est déterminée de façon indirecte par suivi de la réduction du ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$. Cet ion complexe ne peut traverser la membrane cellulaire et sera réduit en présence d'hydroquinone formée après la réduction intracellulaire de la quinone substrat de QR2 selon la Figure 32 et les réactions proposées par Merker *et al.* (Merker M.P., 2006 ; Reybier K., 2011) :



Le potentiel de réduction du Fe^{3+} (E^0_{red} vs. ECS = 0,146 V) étant supérieur aux potentiels de réduction des différentes quinones testées, potentiels négatifs de - 0,65 V à - 1V vs. ECS, la réaction se fera dans le sens d'une réduction du Fe^{3+} .

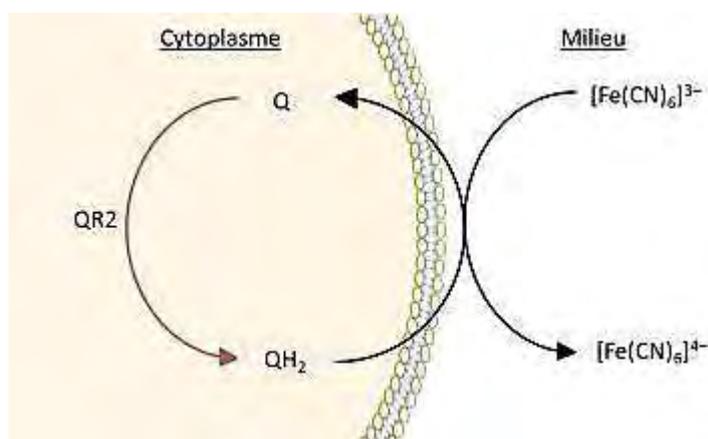


Figure 32. Cycle redox présumé entre la quinone substrat de QR2 et le ferricyanure. La quinone pénètre à l'intérieur du cytoplasme où elle est réduite par QR2. La forme réduite QH_2 externalisée réduit le ferricyanure Fe(III) en ferrocyanure Fe(II) dans le milieu extracellulaire. Schéma réalisé grâce aux illustrations de Servier Medical Art (www.servier.fr).

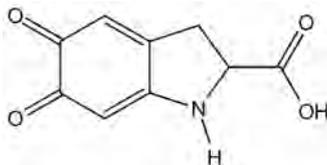
La réduction du ferricyanure de potassium est étudiée en effectuant un suivi cinétique de l'absorbance du ferricyanure de potassium à 421 nm. Ainsi, dans cet essai, une diminution de

l'absorbance du Fe^{3+} signifie que la quinone a été réduite sous forme hydroquinone QH_2 et excrétée dans le milieu extracellulaire pour réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} .

Les résultats sont exprimés en taux de réduction du ferricyanure de potassium (en pourcentage) correspondant à l'absorbance du ferricyanure de potassium pour un substrat donné à 60 minutes sur l'absorbance initiale du ferricyanure de potassium moins la diminution de l'absorbance observée sans substrat selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Taux de réduction} = \left[\left(1 - \frac{A_{t=60}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{substrat})}{A_{t=0}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{Substrat})} \right) - \left(1 - \frac{A_{t=60}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)}{A_{t=0}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)} \right) \right] \times 100$$

Où $A_{t=60}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{substrat})$ correspond à l'absorbance obtenue à 60 minutes en présence de ferricyanure et de substrat, $A_{t=0}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{substrat})$ correspond à l'absorbance initiale en présence de ferricyanure et de substrat, $A_{t=60}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ correspond à l'absorbance obtenue à 60 minutes en présence de ferricyanure uniquement et $A_{t=0}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ correspond à l'absorbance initiale en présence de ferricyanure.



dopachrome 43

1.1. Cellules CHO-k1-NT

Le suivi de la réduction du ferricyanure de potassium est appliqué dans le cas de cellules ne surexprimant ni QR1 ni QR2 traitées par différents substrats de QR1 et QR2. Les résultats montrent que pour l'ensemble des substrats et co-substrats testés, le taux de réduction du ferricyanure de potassium, 60 minutes après le dépôt du mélange de ferricyanure de potassium et de substrat ou co-substrat, est proche de 0 %. Il n'y a donc aucune diminution significative de l'absorbance du ferricyanure de potassium quel que soit le substrat utilisé ou en présence des co-substrats spécifiques de QR1 (NAD(P)H), de QR2 (NRH). Les mêmes résultats sont obtenus en présence de substrat seul ou en présence de substrat et du NAD(P)H.

Ces résultats démontrent que les CHO-k1-NT, en présence de ces substrats et co-substrats, n'induisent pas de réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Il peut donc en être déduit qu'il ne se produit pas de réduction notable à deux électrons de ces différents substrats au sein de la cellule.

De plus, l'absence de réduction du Fe^{3+} permet également de contrôler que les différentes molécules utilisées n'induisent pas de réduction du ferricyanure de potassium au cours de l'analyse.

1.2. Cellules CHO-k1-QR1

Les cellules CHO-k1-QR1 surexpriment l'enzyme QR1 capable de réduire certaines quinones par deux électrons. Les résultats apportent différentes informations. A l'exception du CB1954, une réduction du ferricyanure de potassium, pouvant aller de 10,45 à 37,6 %, est observée à 60 minutes pour tous les substrats en présence de NAD(P)H. Il se produit donc une réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} due à la présence de QR1 dans ces cellules et donc à la métabolisation des substrats par cette enzyme. Aucune diminution de l'absorbance du ferricyanure de potassium n'est observée lorsque les co-substrats sont testés seuls.

L'utilisation des substrats sans le co-substrat NAD(P)H dans ces cellules surexprimant QR1 provoque une légère réduction du ferricyanure (de 4,9 % pour le coenzyme Q0 et 7,4 % pour la ménadione). La Figure 33 présente la cinétique de réduction du ferricyanure de potassium en présence ou non du co-substrat NAD(P)H. On remarque que sans co-substrat, une légère diminution de l'absorbance est observée pour les deux substrats mais cette diminution atteint rapidement un plateau alors qu'elle est continue lorsque le co-substrat est ajouté aux cellules. Ceci peut s'expliquer par la présence de réserves de ce co-substrat dans les cellules. Ces valeurs sont cependant deux à trois fois plus faibles que lorsque le NAD(P)H est rajouté aux cellules.

Les résultats montrent également que les *para*-quinones (ménadione, duroquinone et coenzyme Q0) induisent une plus forte réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , jusqu'à 37,6 %, que les *ortho*-quinones, jusqu'à 27,5 %. Il est alors envisageable que la réduction des *ortho*-quinones en dihydro *ortho*-quinones ou catéchols soit plus difficile à accomplir au sein de ces cellules surexprimant QR1 que la réduction par deux électrons des *para*-quinones.

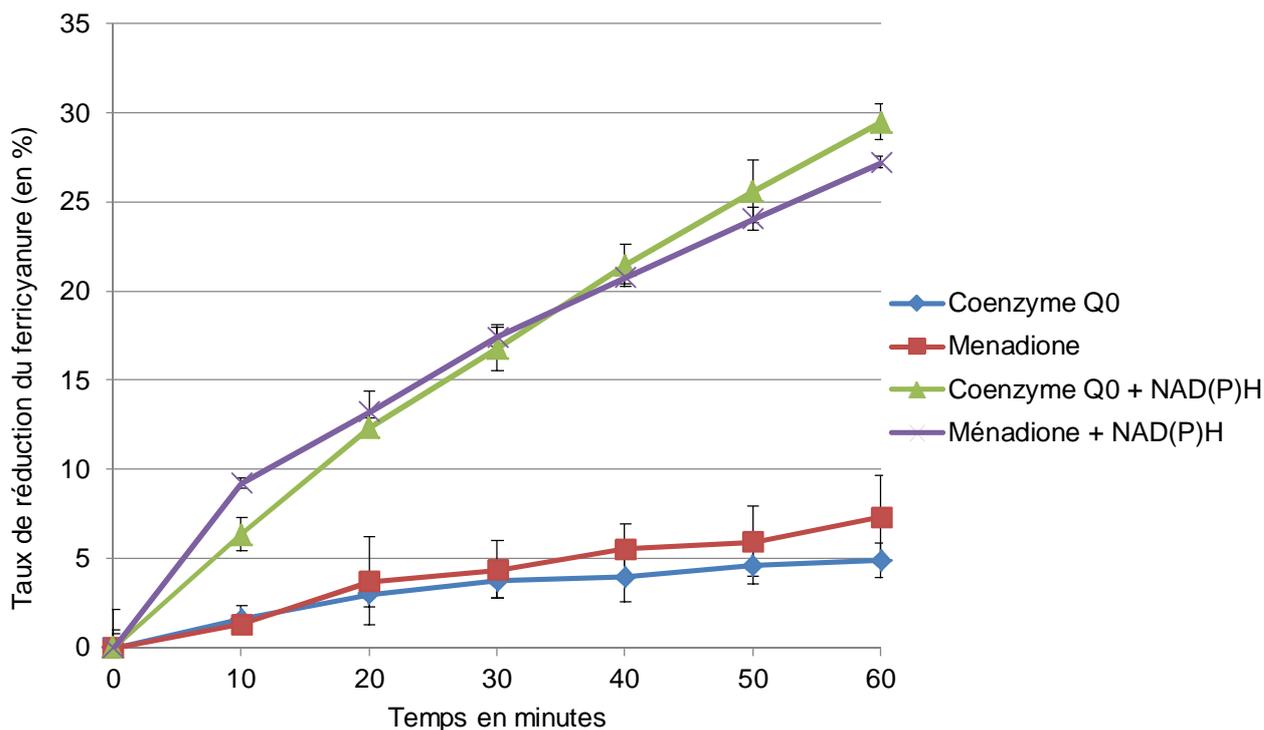


Figure 33. Comparaison de la cinétique de réduction du ferricyanure de potassium dans le cas de cellules CHO-k1-QR1 traitées par le coenzyme Q0 et la ménadione en présence ou non du co-substrat NAD(P)H

1.3. Cellules CHO-k1-QR2

Les cellules CHO-k1-QR2 sont transfectées pour surexprimer QR2 qui, comme observé dans le chapitre précédent, est capable d'accepter une plus grande variété de substrats dont certains ont une structure plus éloignée des quinones. Le taux de réduction du ferricyanure en présence de cellules surexprimant QR2 pour les différents substrats (Figure 34) apporte différentes informations. Tout d'abord, aucune réduction du ferricyanure de potassium n'est observée pour les co-substrats seuls alors qu'une réduction pouvant aller de 25 % pour l'adrénochrome à 37,6 % pour l'aminochrome, est observée pour tous les substrats testés en présence de NRH. La réduction du ferricyanure de potassium pour ces différents substrats est donc plus intense pour les cellules surexprimant QR2 par rapport aux cellules surexprimant QR1. Sans NRH, aucune diminution significative de l'absorbance du ferricyanure de potassium n'est observée quel que soit le substrat (taux de réduction inférieur à un pourcent). Cette différence entre les cellules surexprimant QR2 et celles surexprimant QR1 est liée à la présence d'un stock de NAD(P)H dans les cellules alors que le NRH provient par exemple de la dégradation du NADH au niveau intestinal (Lewis C.A., 2014 ; Baum C.L., 1982).

La duroquinone n'induit qu'une infime réduction (4 %) du Fe^{3+} en Fe^{2+} avec les cellules CHO-k1-QR2 contrairement aux CHO-k1-QR1 (38 %). Ceci peut s'expliquer par le fait que cette molécule présente une plus forte affinité pour QR1 que pour QR2 (Audi S.H., 2003 ; Faig M., 2000).

Les *ortho*-quinones induisent une réduction du Fe^{3+} (38 % à 25 %) proche de celle obtenue pour les *para*-quinones (35 % à 26 % à l'exception de la duroquinone) pour les cellules surexprimant QR2. L'écart entre ces deux familles de molécules est donc moindre pour les CHO-k1-QR2 que pour les CHO-k1-QR1. De plus, le CB1954 induit une réduction de 15 % du Fe^{3+} pour les CHO-k1-QR2 alors qu'elle est de dix fois plus faible (1,23 %) pour les CHO-k1-QR1. Ceci peut s'expliquer par le fait que la forme humaine de QR2 est jusqu'à 3000 fois plus efficace à réduire CB1954 que la forme humaine de QR1 (AbuKhader M., 1997 ; Wu K., 1997) .

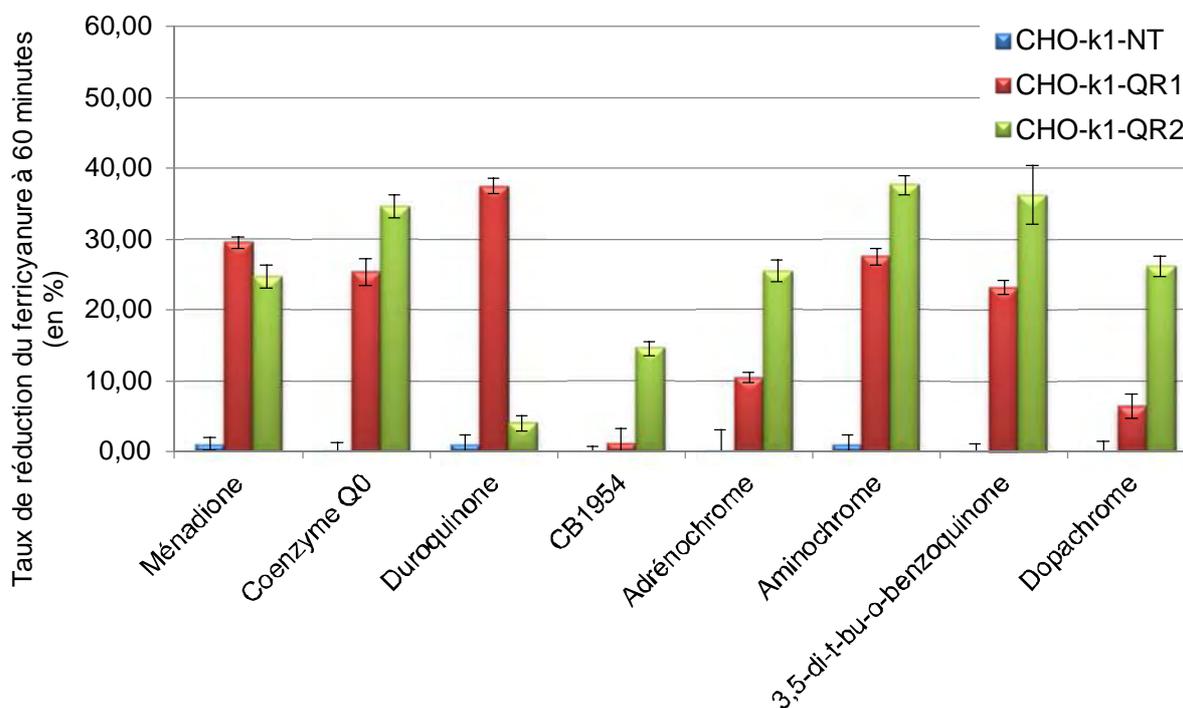


Figure 34. Comparaison du taux de réduction du ferricyanure de potassium pour les trois types cellulaires (cellules natives en bleu, surexprimant QR1 en rouge et surexprimant QR2 en vert) selon les différents substrats testés à 50 μ M.

1.4. Effet des inhibiteurs et modulateurs sur la réduction des substrats pour les CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2

Dans le but de comparer l'effet des différents inhibiteurs (S29434 et dicoumarol) et modulateurs (resvératrol et mélatonine) sur l'activité de QR1 et de QR2, la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} a été suivie en présence de coenzyme Q0 ou de ménadione, et de co-substrat après des traitements de 8 heures et 24 heures par les inhibiteurs ou modulateurs.

1.4.1. Effet des inhibiteurs spécifiques de QR1 et QR2 sur la réduction des substrats pour les CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2

Afin d'étudier l'effet des inhibiteurs, les trois lignées cellulaires d'ovaire de hamster chinois ont été traitées par 10 et 20 μM de dicoumarol et S29434 pendant huit heures avant l'essai de réduction du ferricyanure de potassium en présence des substrats ménadione et coenzyme Q0 et de co-substrat NRH pour les CHO-k1-QR2 ou NAD(P)H pour les CHO-k1-QR1.

Ces inhibiteurs ont également été testés sur la souche cellulaire CHO-k1-NT et comme décrit précédemment pour les substrats et co-substrats, aucune réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} n'a pu être observée pour ces cellules, l'effet des inhibiteurs n'est donc pas observable dans ce cas.

La Figure 35 représente les résultats obtenus pour la réduction du ferricyanure de potassium liée à la réduction enzymatique du substrat (ici le coenzyme Q0 et la ménadione) après huit heures d'inhibition de l'activité quinone réductase par l'inhibiteur spécifique de QR1, le dicoumarol, et l'inhibiteur spécifique de QR2, le S29434. Ces résultats sont comparés avec la diminution de l'absorbance du ferricyanure sans inhibiteur.

Sur la Figure 35, il est facilement remarquable que le dicoumarol à sa plus forte concentration (20 μM) inhibe totalement la réduction du ferricyanure de potassium, quel que soit le substrat, pour la lignée cellulaire surexprimant QR1. Une inhibition plus faible est également présente à 10 μM , démontrant une relation effet-concentration. Aucune différence significative n'est cependant observée en présence de S29434 aux deux concentrations utilisées comparativement aux contrôles testés sans inhibiteurs.

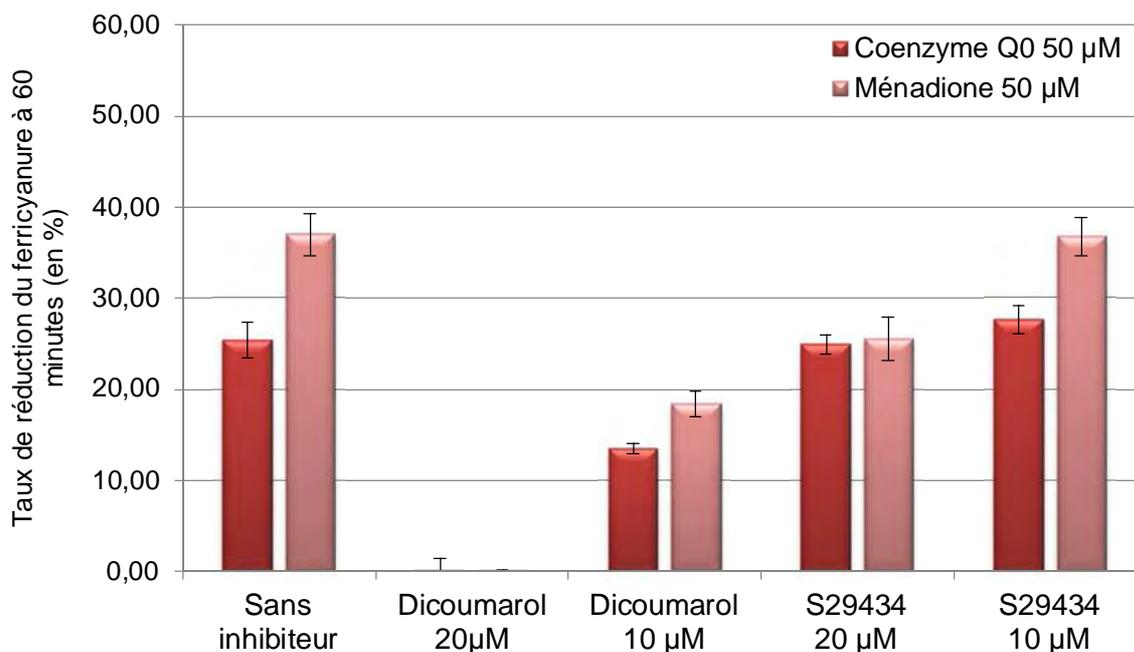


Figure 35. Inhibition de la réduction du Fe^{3+} par l'inhibiteur spécifique de QR1 (dicoumarol) et de QR2 (S29434) à 20 et 10 μM déposés pendant huit heures sur les CHO-k1-QR1 lavées et traitées 60 minutes par le coenzyme Q0 100 μM (en rouge) ou la ménadione 100 μM (en rose) et comparaison avec la réduction du Fe^{3+} obtenue sans traitement par les inhibiteurs pour les CHO-k1-QR1.

Aucune réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} n'est observée lorsque les cellules CHO-k1-QR2 sont traitées pendant huit heures par 20 μM de S29434, l'inhibition est alors totale (Figure 36). Cependant, à 10 μM , une réduction de Fe^{3+} est observée pour les deux substrats : 9,9 % pour le coenzyme Q0 et 8,2 % pour la ménadione, ce qui correspond à des inhibitions respectives de 72 % et de 67 % vis-à-vis des résultats obtenus sans inhibiteur. Il y a donc bien une relation entre la concentration du S29434 et l'inhibition de la réduction du Fe^{3+} .

De fortes concentrations de S29434 sont nécessaires (20 μM) pour obtenir une inhibition de la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} comparativement à la CI_{50} (0,7 nM à 80 nM) de ce produit sur la forme purifiée de QR2 (Ferry G., 2010). Ceci peut être lié à faible solubilité du produit qui recristallise facilement en milieu aqueux et dont la pénétration cellulaire peut être fortement perturbée.

Aucune différence n'est observée entre les cellules prétraitées par le dicoumarol à 20 ou 10 μM et les cellules non traitées par des inhibiteurs. Il n'y a donc pas d'effet inhibiteur de cette molécule sur la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et donc sur la réduction de quinone en hydroquinone au sein de ces cellules surexprimant QR2.

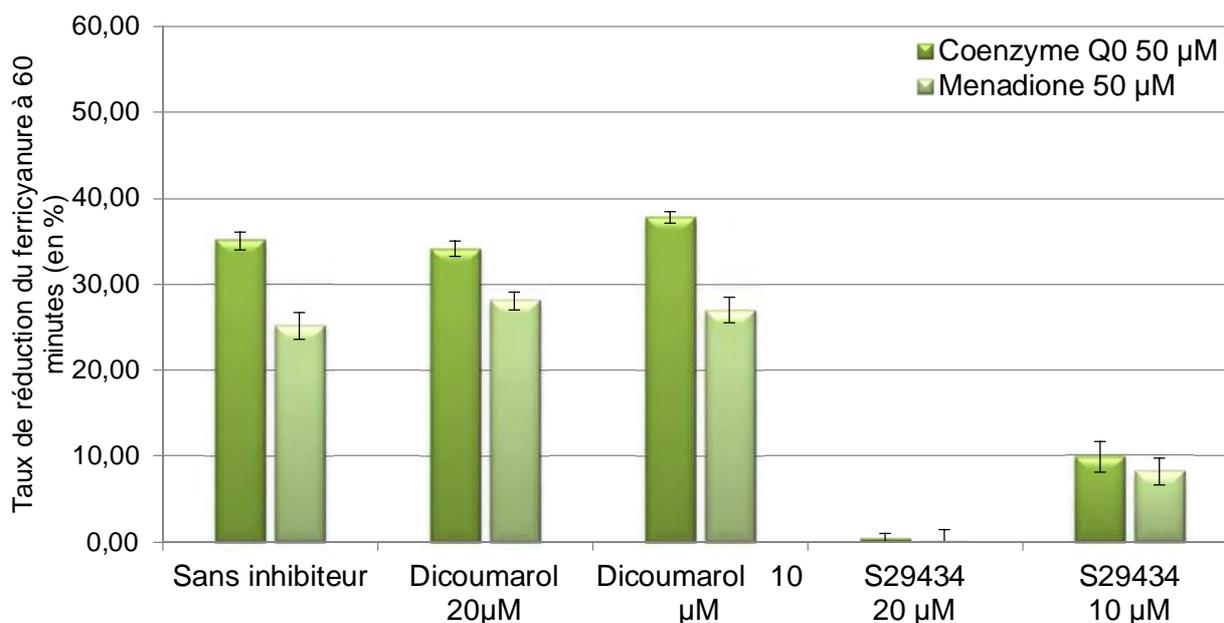


Figure 36. Inhibition de la réduction du Fe^{3+} par l'inhibiteur spécifique de QR1 (dicoumarol) et de QR2 (S29434) à 20 et 10 μM , 60 minutes après l'ajout de coenzyme Q0 100 μM (en vert foncé) et de ménadione 100 μM (en vert clair) sur les cellules CHO-k1-QR2 et comparaison avec la réduction du Fe^{3+} obtenue sans traitement par les inhibiteurs pour les CHO-k1-QR2.

L'absence de réduction du ferricyanure de potassium en présence de différents substrats pour les CHO-k1-NT ainsi que l'effet ciblé des inhibiteurs spécifiques de QR1 et QR2 pour chaque lignée cellulaire pour la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} démontre que la réduction des différents substrats présentée précédemment sur les CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2 est liée à l'activité enzymatique des deux quinones réductases.

1.4.2. Effet des modulateurs de QR2 sur la réduction du coenzyme Q0 pour les CHO-k1-QR2

L'étude des modulateurs de QR2 a été réalisée en déposant 1, 10 ou 50 μM de mélatonine et de resvératrol sur les cellules CHO-k1-NT et sur les cellules CHO-k1-QR2 pendant 24 heures avant l'essai de réduction du ferricyanure de potassium en présence de coenzyme Q0 et de NRH.

Comme décrit précédemment pour les inhibiteurs ou les substrats, aucune réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} n'a pu être observée pour les cellules CHO-k1-NT, l'effet des modulateurs n'est donc pas observable pour les cellules ne surexprimant aucune quinone réductase.

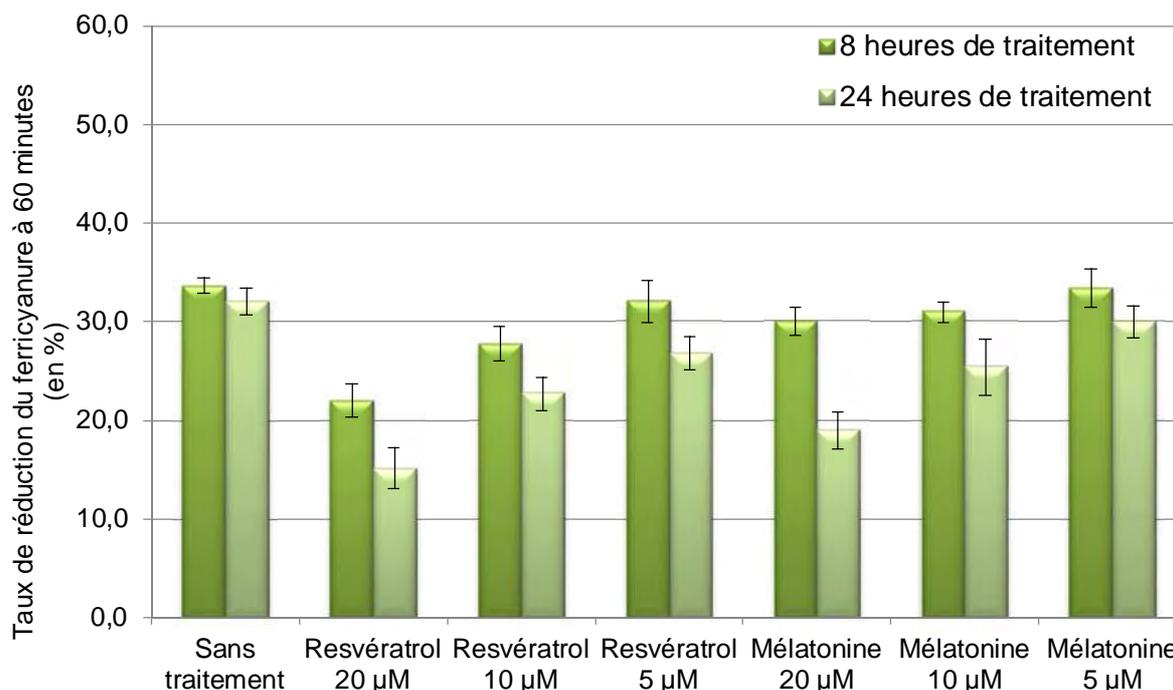


Figure 37. Effet des modulateurs de QR2, resvératrol et mélatonine, aux concentrations 20, 10 et 5 μM sur le taux de réduction du Fe^{3+} 60 minutes après l'ajout du coenzyme Q0 100 μM après 8 heures de traitement (en vert foncé) et 24 heures de traitement (en vert clair) et comparaison avec le ratio de réduction du Fe^{3+} en présence de coenzyme Q0 obtenus pour les CHO-k1-QR2.

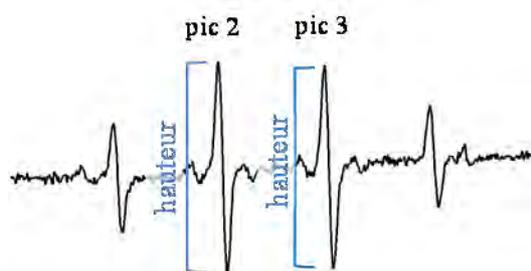
Comparativement aux résultats obtenus avec le S29434 sur les cellules CHO-k1-QR2, le resvératrol et la mélatonine ne réduisent que faiblement la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} (Figure 37). L'inhibition de cette réduction est maximale après 24 heures de traitement par 20 μM de resvératrol (53 % d'inhibition) ou de mélatonine (40 % d'inhibition). Cette inhibition diminue de moitié à 10 μM pendant 24 heures et devient nulle à 5 μM .

Cette plus faible activité inhibitrice du resvératrol et de la mélatonine sur les cellules surexprimant QR2 est comparable aux résultats de la littérature qui ont démontré que le S29434 inhibait l'activité métabolique de la protéine QR2 20 et 6000 fois plus que le resvératrol et la mélatonine respectivement (Ferry G., 2010).

2. Production des espèces réactives de l'oxygène par des lignées cellulaires surexprimant ou non QR1 et QR2

Comme décrit dans le chapitre 2, la résonance paramagnétique électronique combinée à l'utilisation d'un piègeur de radicaux permet de déterminer et quantifier les radicaux produits lors du cycle de réduction / réoxydation des quinones après leur réduction par QR1 et QR2 *in cellulo*. L'intensité du signal RPE augmente proportionnellement à la quantité de QH₂ oxydée en Q, c'est-à-dire avec sa plus grande réoxydabilité. Cette intensité dépend de la concentration de QH₂ dans la cellule, de sa stabilité et/ou de son élimination de la cellule mais également de la contribution de réductases autres que QR1 et QR2.

Le 5,5-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (DMPO) a été utilisé comme piègeur de radicaux en raison de sa faible toxicité cellulaire (CI₅₀ = 138,34 ± 2,22 mM) et de sa capacité à traverser la membrane (Haseloff R.F., 1997 ; Hawkins C.L., 2014). Contrairement aux essais sur enzyme cités dans le chapitre précédent, la concentration utilisée pour les essais cellulaire a été réduite de moitié (50 mM) afin de conserver un bon signal tout en réduisant le risque de toxicité cellulaire. Différents substrats ont été testés : le coenzyme Q0 **40**, la ménadione **21**, l'adrénochrome **35**, l'aminochrome **39**, le dopachrome **43**, le 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone **36** en présence de différents inhibiteurs et modulateurs (dicoumarol **9**, S29434 **30**, resvératrol **27** et mélatonine **29**). Les résultats sont exprimés en hauteur du signal de l'adduit [DMPO-OH]^{*}, obtenue après détermination de la valeur maximale (au-dessus de la ligne de base) et minimale (en dessous de la ligne de base) du second et troisième pic pour chaque spectre RPE et moyenne de ces deux pics.



2.1. Métabolisation des *para*-quinones par les lignées cellulaires CHO-k1-NT, CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2

Avant chaque analyse, il a été vérifié qu'aucun des composés ou leur combinaison ne pouvait générer des radicaux libres en l'absence de cellules. Il a également été vérifié que la NAD(P)H oxydase n'intervenait pas dans la production de radicaux libres en incubant les

différentes lignées avec deux inhibiteurs de cette enzyme, l'acétovanillone et l'oxyde de phénylarsine.

Les spectres RPE obtenus en présence de ménadione sont présentés dans la Figure 38. Pour les trois lignées cellulaires, les spectres consistent en un quadruplet 1:2:2:1 caractérisé par la constante de couplage hyperfin $a_H \sim a_N = 14,8$ G caractéristique de l'adduit de spin [DMPO-OH]^{*} (Figure 38 a-c).

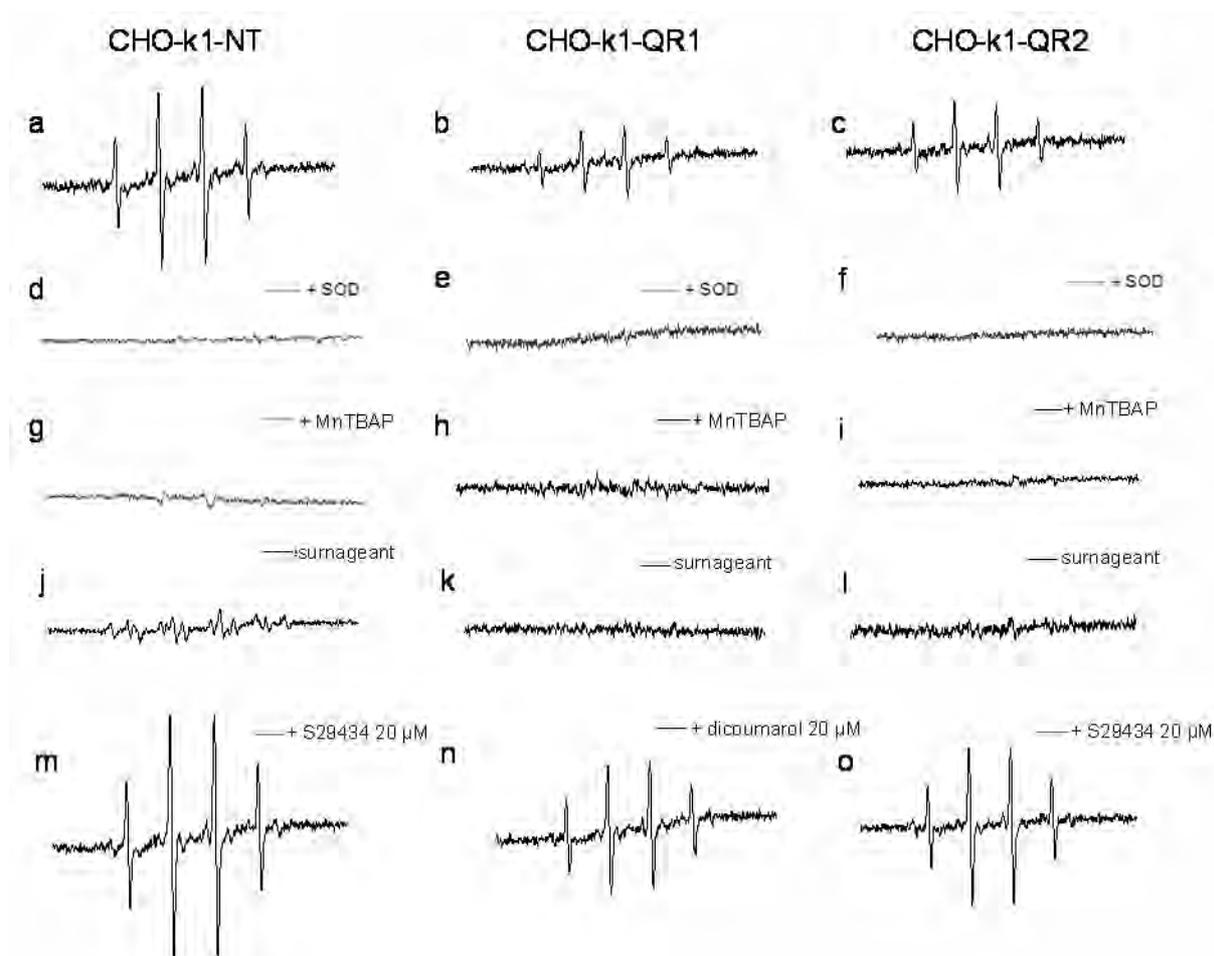


Figure 38. Spectres RPE obtenus dans un mélange contenant (dans l'ordre d'addition) la suspension cellulaire ($5 \cdot 10^6$ cellules), le DMPO (50 mM) les co-substrats (BNAH ou NAD(P)H selon le type cellulaire 100 μ M) et la ménadione (100 μ M). (a): cellules CHO-k1-NT et ménadione ; (b): système complet avec NAD(P)H comme co-substrat sur les cellules CHO-k1-QR1; (c): système complet avec BNAH comme co-substrat sur cellules CHO-k1-QR2; (d) : ajout of SOD (150 unités/mL) à (a) ; (e) : ajout de SOD (150 unités/mL) à (b) ; (f) : ajout de SOD (150 unités/mL) à (c) ; (g) : incubation 30 minutes avec MnTBAP (100 μ M) avant (a) ; (h): incubation 30 minutes avec MnTBAP (100 μ M) avant (b) ; (i) : incubation 30 minutes avec MnTBAP (100 μ M) avant (c) ; (j), (k) et (l) analyse du surnageant de (a), (b) et (c) respectivement ; (m): 30 min d'incubation avec S29434 20 μ M avant (a); (n): 30 min d'incubation avec dicoumarol 20 μ M avant (b); (o) : 30 min d'incubation avec S29434 20 μ M avant (c). Tous les spectres sont représentés à la même échelle. Gamme d'intensité $\pm 50,000$. Gain : $2 \cdot 10^5$.

L'ajout de SOD ou de manganèse (III) tétrakis (4-acide benzoïque) chlorure de porphyrine (MnTBAP, piègeur de superoxyde capable de pénétrer dans le milieu intracellulaire) au mélange réactionnel supprime totalement le signal pour les trois lignées cellulaires (Figure 38 d-i), ce qui indique que les spectres RPE obtenus avec la ménadione proviennent du piégeage du radical superoxyde formant l'adduit de spin [DMPO-OOH][•], adduit qui se décompose rapidement en l'adduit [DMPO-OH][•] suite à l'action de différents facteurs tels que la lumière, les métaux de transition ou la glutathion peroxydase (**Shi H., 2005**).

Il est important de noter que les essais précédents sur les formes humaines purifiées de QR1 et QR2 avaient démontré la présence du radical hydroxyle uniquement. Cette différence entre les radicaux obtenus au niveau enzymatique ou cellulaire pourrait provenir d'une meilleure stabilité de l'intermédiaire superoxyde dans le cytoplasme ou dans le milieu extracellulaire, retardant la disproportionation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène (**Rosen G.M., 1984**).

L'analyse du surnageant après ajout de tous les réactifs aux cellules et centrifugation, 30 secondes à 14500 tours/minute, ne donne qu'un faible signal correspondant à l'adduit [DMPO-OOH][•] et disparaissant rapidement (Figure 38 j à l).

Afin de vérifier si les adduits [DMPO-OH][•] observés sont produits à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules, d'autres expériences ont été menées en présence d'un complexe de lanthane [La(DTPA)] et de gadolinium complexé par l'acide diéthylène triamine penta acétique [Gd(DTPA)]. Le complexe du lanthane DTPA est utilisé dans ces essais comme contrôle car sa structure est proche du complexe du gadolinium DTPA mais il est diamagnétique alors que le gadolinium est paramagnétique. Le complexe [Gd(DTPA)] ne pénètre pas dans les cellules et étant paramagnétique il produit un élargissement des raies adduits extracellulaires (**Ranguenovela K., 2012**). Ainsi, si le signal RPE est extracellulaire, il doit présenter des raies larges voire disparaître alors que s'il est intracellulaire il doit rester stable. Sur la Figure 39, il est facilement observable que le complexe [La(DTPA)] ne modifie pas les signaux RPE obtenus en présence de ménadione pour les trois types cellulaires alors que le complexe [Gd(DTPA)] annule totalement ces signaux. Ceci signifie donc que les adduits [DMPO-OH][•] observés à la Figure 38 sont formés dans l'espace extracellulaire, ce qui sous-entend que la réoxydation des hydroquinones se fait après leur sortie de la cellule.

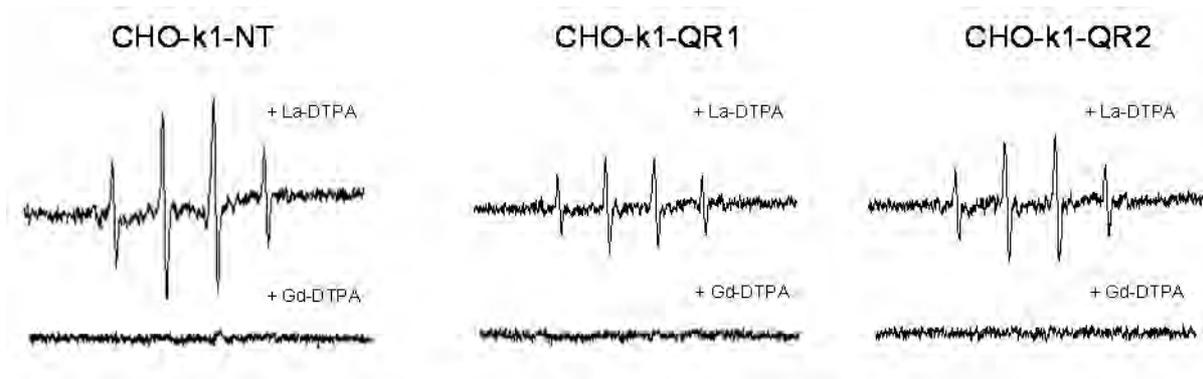


Figure 39. Effets des complexes [La(DTPA)] et [Gd(DTPA)] sur les spectres RPE des adduits [DMPO-OH] : Les spectres sont obtenus à température ambiante en présence de DMPO (50 mM) dans un mélange contenant (dans l'ordre d'addition) la suspension cellulaire ($5 \cdot 10^6$ cellules), le DMPO (50 mM) les co-substrats (BNAH ou NAD(P)H selon le type cellulaire 100 μ M), la ménadione (100 μ M) et le [La(DTPA)] ou [Gd(DTPA)] (20 μ M).

Les signaux RPE enregistrés pour les cellules surexprimant QR1 et QR2 sont deux fois moins intenses que ceux enregistrés sur les cellules natives CHO-k1-NT (Figure 37 b et c et Figure 39). L'ajout d'inhibiteurs spécifiques, respectivement le dicoumarol pour QR1 et le S29434 pour QR2, restaurent partiellement le signal obtenu en l'absence de quinone réductases (cellules CHO-k1-NT). L'ajout de dicoumarol double presque l'intensité du signal sur les CHO-k1-QR1 (Figure 37 n et 39) alors que le S29434 sur les CHO-k1-QR2 induit un signal équivalent à celui obtenu en présence de ménadione sur les CHO-k1-NT (Figure 38 o et 40). Les différents résultats obtenus sont résumés sur la Figure 40, qui compare les hauteurs de pics pour chaque condition décrite précédemment.

Les quantités plus faibles de radical superoxyde détectées en présence de ménadione et de QR1 et QR2 comparativement aux cellules non transfectées peuvent s'expliquer par le caractère détoxifiant des quinones réductases. Les quinones sont des molécules hautement réactives qui subissent très rapidement des réductions soit par un soit par deux électrons. Les enzymes métaboliques de la famille des cytochrome P450 réductases ou d'autres flavoprotéines catalysent la réduction par un électron des quinones produisant des semiquinones instables qui subissent un cycle redox en présence d'oxygène, provoquant la formation d'espèces oxygénées radicalaires hautement réactives. La ménadione est fortement réduite par les cytochrome P450 réductases (**Brunmark A., 1989**). Les quinones réductases catalysent une réduction par deux électrons des quinones pour former des hydroquinones qui pourront par la suite être excrétées de la cellule après conjugaison de la fonction hydroxyle avec un acide glucuronique ou un sulfate. Ces réactions empêchent l'auto-oxydation des

quinones et hydroquinones et protègent le milieu cellulaire contre la formation de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène. Le ménadiol, forme dihydroquinone de la ménadione, subit une glucuronocouplage par l'UDP-glucuronosyltransférase au sein des cellules (Nishiyama T., 2008).

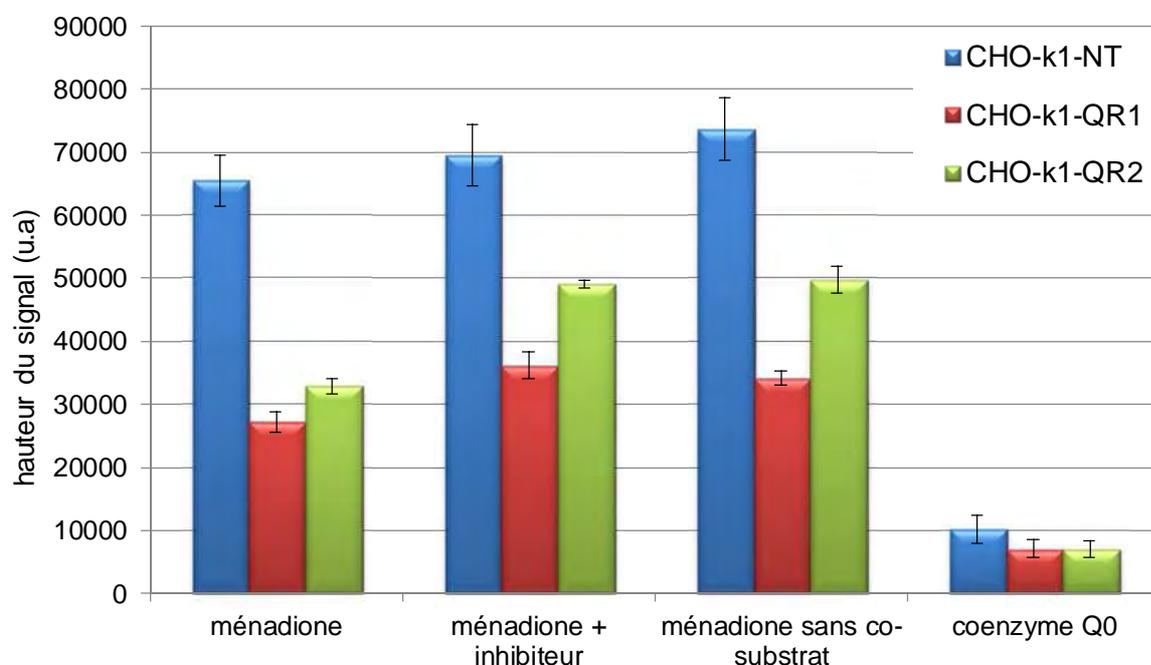


Figure 40. Comparaison de la production de radical superoxyde (en hauteur du signal) entre les différentes lignées cellulaires en présence de ménadione, avec ou sans inhibiteur et de coenzyme Q0 (n > 6). Les cellules sont traitées soit par 100 μ M de ménadione ou 100 μ M de coenzyme Q0 et 100 μ M de BNAH ou de NAD(P)H avec ou sans pré-incubation pendant 30 minutes avec 20 μ M de S29434 pour les cellules CHO-k1-NT et CHO-k1-QR2 ou 20 μ M de dicoumarol pour les CHO-k1-QR1.

En l'absence de surexpression de quinone réductase comme c'est le cas pour les CHO-k1-NT, la réduction des quinones se fait majoritairement par les réductases à un électron ce qui a pour conséquence une production supérieure d'espèces radicalaires.

Pour les cellules CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2, une partie des quinones sont réduites par deux électrons pour former des hydroquinones moins sujettes à l'auto-oxydation et plus facilement excrétables.

Dans le cas du coenzyme Q0, la hauteur des spectres RPE (Figure 40) est quatre à six fois plus faible que pour la ménadione dans les mêmes conditions. Cette différence peut venir du fait que les hydroquinones ou semiquinones issues du coenzyme Q0 sont plus stables, rendant plus difficile le transfert d'électron vers l'oxygène, comme observé précédemment sur

enzyme purifiée et démontré dans le chapitre 2 (Reyber K., 2011). Dans le cas des cellules ne surexprimant pas les quinones réductases (Figure 41 a), la production des adduits [DMPO-OH][•], [DMPO-CH₃][•] (formé par réaction avec le DMSO selon l'équation 2, p. 47) et du radical semiquinone donne un signal présentant de nombreuses raies. Avec les cellules surexprimant QR1 ou QR2, le signal correspondant aux radicaux oxygénés disparaît pour révéler un faible triplet ($a_H^6 = 2,36 \text{ G}^{3H}$, $a_H^5 = 1,99 \text{ G}^{1H}$, $g = 2,0046$), caractéristique de la forme radicalaire semiquinonique (Figure 41 simulation). Ce radical semiquinonique pourrait provenir de la réduction du coenzyme Q0 par des réductases à un électron ou de la réoxydation de l'hydroquinone obtenue après métabolisation par QR1 et QR2, formant un radical plus stable que dans le cas de la ménadione et donc détectable par RPE.

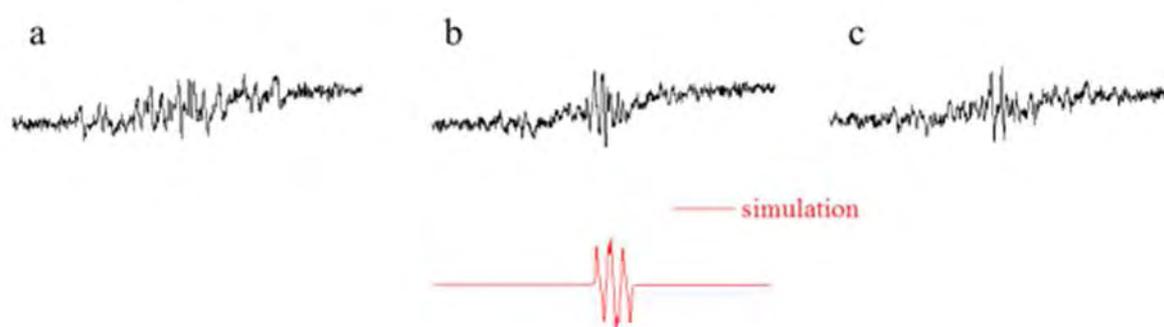


Figure 41. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) dans un mélange contenant (dans l'ordre d'addition) les cellules en suspension, le co-substrat (BNAH ou NAD(P)H 100 μM) et le coenzyme Q0 (100 μM). (a): système complet sur cellules CHO-k1-NT; (b): système complet avec le co-substrat NAD(P)H sur cellules CHO-k1-QR1; (c): système complet avec le substrat BNAH sur cellules CHO-k1-QR2. Même échelle pour chaque spectre. Gamme d'intensité $\pm 10,000$. Gain: 2.10^5 .

2.2. Métabolisation des *ortho*-quinones par les lignées cellulaires CHO-k1-NT, CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2

Les caractéristiques des signaux RPE obtenus pour les *ortho*-quinones, adrénochrome **35**, aminochrome **39**, dopachrome **43** et 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone **36**, sont du même type que celles obtenues pour la ménadione avec des intensités plus faibles. Les spectres RPE consistent en des quadruplets 1:2:2:1, caractéristiques des adduits [DMPO-OH][•], et sont annulés en présence de superoxyde dismutase (Figure 42). Il s'agit donc de nouveau du radical superoxyde. Cependant, les différentes quinones réductases induisent des plus fortes variations d'intensité de signal comparativement aux *para*-quinones. Ainsi, l'intensité des signaux et par conséquent la quantité de radical superoxyde, produite suite à la métabolisation

des *ortho*-quinones telles que l'adrénochrome, l'aminochrome, le dopachrome ou le 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone dans les cellules surexprimant QR1 et QR2, augmente considérablement par rapport aux cellules non transfectées (Figure 43).

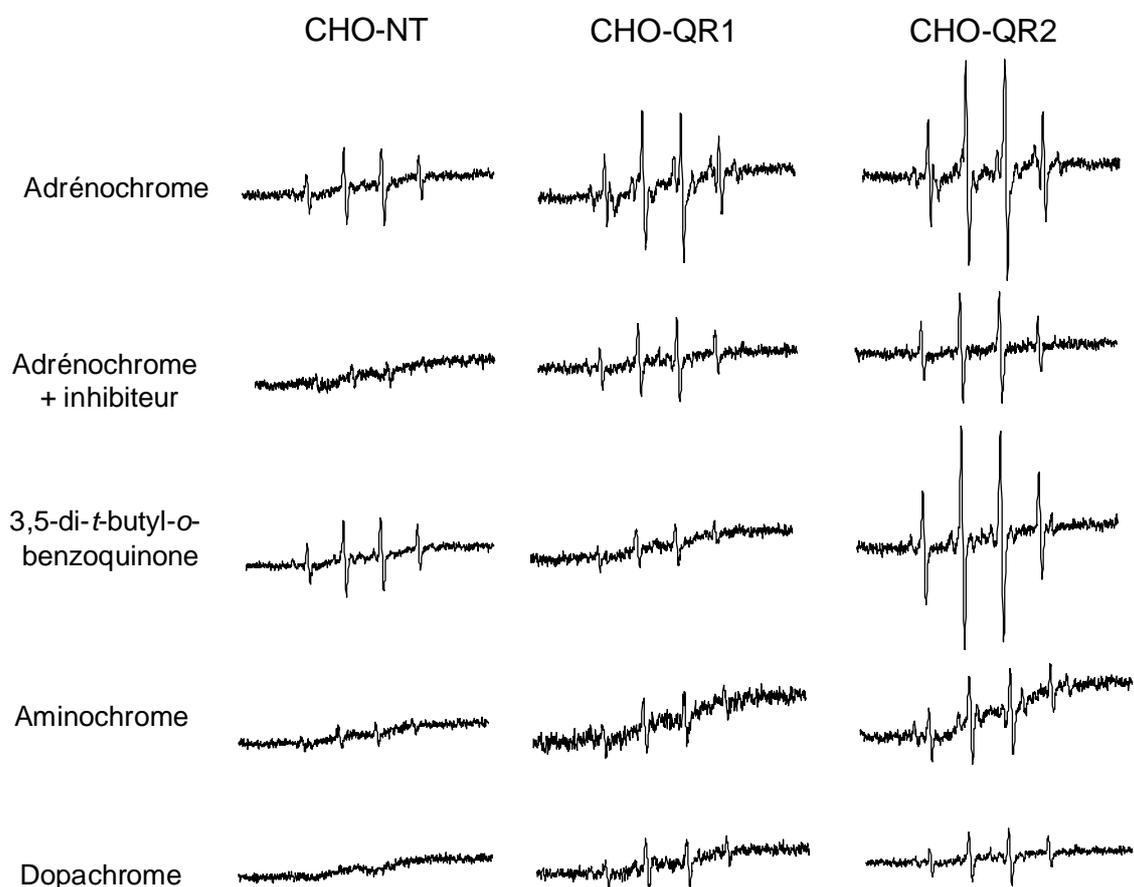


Figure 42. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) dans un mélange contenant (dans l'ordre d'addition) les cellules en suspension (CHO-NT, CHO-QR1 ou CHO-QR2), le co-substrat (BNAH ou NAD(P)H 100 μ M), l'inhibiteur S29434 20 μ M pour les CHO-NT et CHO-QR2 ou le dicoumarol 20 μ M pour les CHO-QR1 (quand indiqué) et les substrats (100 μ M). Même échelle pour chaque spectre. Gamme d'intensité $\pm 50,000$. Gain: $2 \cdot 10^5$.

Cette augmentation de la hauteur du signal varie selon l'*ortho*-quinone testée. Ainsi, avec l'adrénochrome, le signal augmente 3,5 et 2,3 fois comparativement au signal obtenu sans quinone réductase (CHO-k1-NT) pour les CHO-k1-QR2 et les CHO-k1-QR1 respectivement alors qu'il n'augmente que 1,6 et 1,3 fois pour le dopachrome et jusqu'à six fois pour les CHO-k1-QR2 traitées par la 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone. Sur les quatre *ortho*-quinones testées, trois présentent une production de radical superoxyde supérieure lorsqu'elles sont métabolisées par QR2 comparativement à QR1 (Figure 43). Il a en effet déjà été

démontré dans la littérature (Fu Y., 2008) et dans le chapitre 2 sur l'étude de l'activité de métabolisation de l'adrénochrome par QR2 que cette dernière est plus efficace et spécifique pour ce substrat que QR1.

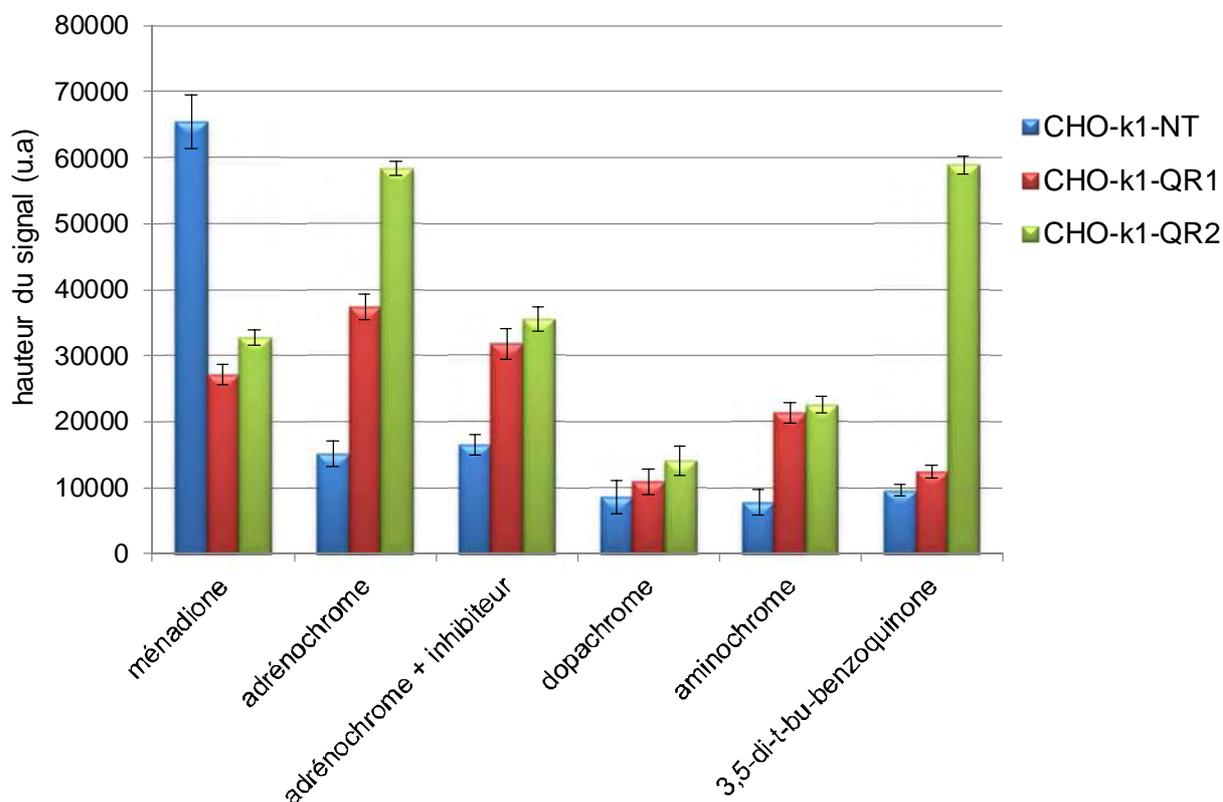


Figure 43. Comparaison de la production du radical superoxyde (en hauteur de signal) entre les trois lignées cellulaires (CHO-k1-NT en bleu, CHO-k1-QR1 en rouge, CHO-k1-QR2 en vert) après deux minutes d'incubation avec 100 μ M de ménadione ou d'*ortho*-quinones (adrénochrome, aminochrome, dopachrome et 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone) et 100 μ M de co-substrat (BNAH pour CHO-k1-QR2 et NAD(P)H pour CHO-k1-QR1) avec ou sans pré-incubation pendant 30 minutes avec 20 μ M de S29434 pour les cellules CHO-k1-NT et CHO-k1-QR2 ou 20 μ M de dicoumarol pour les CHO-k1-QR1 ($n > 4$).

Comparativement aux cellules traitées par la ménadione, le signal n'augmente que faiblement dans le cas des CHO-k1-QR1 et l'inhibition par le dicoumarol de QR1 n'a que peu d'effet sur la production de superoxyde en présence d'adrénochrome alors que l'inhibition de QR2 par le S29434 dans le cas des CHO-k1-QR2 qui réduit le signal de 40 %. Ceci confirme le rôle majoritaire du métabolisme de l'adrénochrome par QR2 dans la production du radical superoxyde au sein des cellules CHO.

3. Production des espèces réactives de l'oxygène par une lignée cellulaire surexprimant naturellement QR2

La lignée cellulaire K562 est la première lignée humaine immortalisée de leucémie myéloïde. Cette lignée est porteuse du gène de fusion BCR-ABL traduit en tyrosine kinase dont l'activité, responsable de la prolifération cellulaire, est inhibée par l'imatinib **32**, également connu pour être un puissant inhibiteur compétitif ($CI_{50} = 80 \text{ nM}$) de QR2 mais pas de QR1 (Winger J., 2009).

Des analyses par Western-Blot ont démontré que QR2 est exprimée et fonctionnelle dans ces cellules alors que l'activité de QR1 y est dix fois moins importante et que l'annulation de l'expression de QR2 par siRNA réduit la prolifération de ces cellules (Nolan K., 2012 ; Buryanovskyy L., 2004). Il est donc intéressant d'étudier les conséquences de la métabolisation des différents substrats quinoniques de QR2 sur cette lignée humaine afin de les comparer à ceux obtenus sur les lignées animales génétiquement modifiées de CHO.

Comme il est décrit dans la partie 2 de ce chapitre, les essais sont réalisés en utilisant le DMPO comme piègeur de radicaux dans les mêmes conditions que pour les CHO (température ambiante, lecture directe après ajout du substrat, ...). Il a également été vérifié qu'aucun des composés ou leur combinaison ne pouvaient générer des radicaux libres en l'absence de cellules.

Lorsque les cellules K562 sont traitées par un substrat et co-substrat, les spectres RPE obtenus en présence de la *para*-quinone ménadione et de l'*ortho*-quinone adrénochrome sont identiques à ceux présentés précédemment pour les cellules CHO malgré une intensité plus importante (Figure 44). Les signaux consistent en un quadruplet 1:2:2:1 caractérisé par la constante de couplage hyperfin $a_H = a_N = 14.8 \text{ G}$ caractéristique de l'adduit de spin [DMPO-OH] \cdot .

Comme dans le cas des CHO, l'ajout de superoxyde dismutase supprime totalement le signal indiquant que les signaux obtenus avec la ménadione et l'adrénochrome proviennent du piégeage du radical superoxyde formant l'adduit de spin [DMPO-OOH] \cdot qui se décompose rapidement en l'adduit [DMPO-OH] \cdot dans le milieu cellulaire.

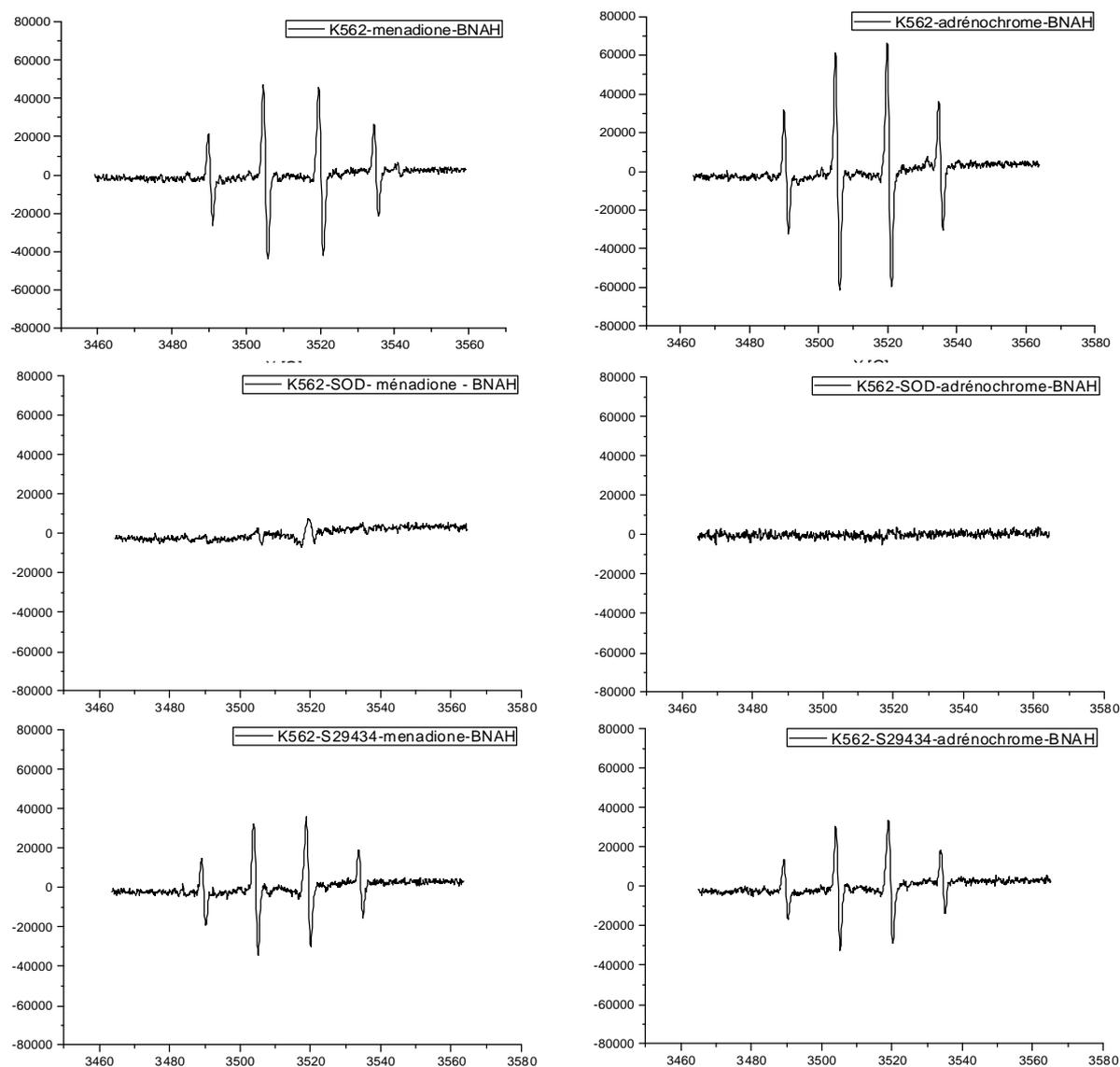


Figure 44. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) dans un mélange contenant les cellules K562 en suspension, le co-substrat (BNAH 100 μ M), la SOD 150 U/mL (quand indiqué) l'inhibiteur S29434 20 μ M (quand indiqué) et les substrats (ménadione et adrénochrome 100 μ M). Même échelle pour chaque spectre. Gamme d'intensité \pm 80,000. Gain: $2 \cdot 10^5$. Ordre d'addition : cellules, inhibiteur (quand indiqué), SOD (quand indiqué), BNAH, substrat.

Le coenzyme Q0 **40** donne un quadruplet très intense, traduisant une formation accrue et une accumulation de ce radical dans ces cellules ainsi qu'un faible adduit [DMPO-OH] * (Figure 45). La simulation donne pour ce quadruplet 1:3:3:1 les constantes de couplage $a_H^6 = 2,90$ G 3H et $g = 2,0048$ (Figures 45 et 46). Il semble donc que dans ces cellules la réoxydation de l'hydroquinone soit plus importante et le radical semiquinone obtenu très stable.

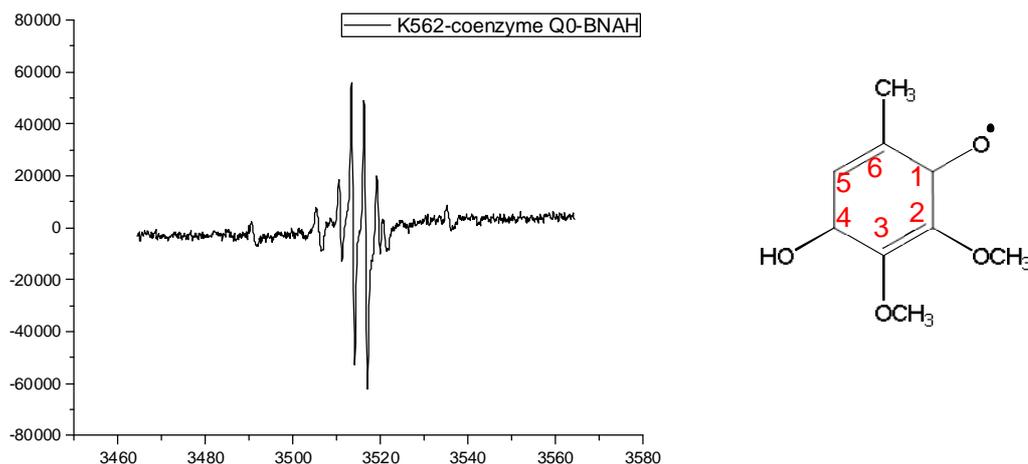


Figure 45. Spectre RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) dans un mélange contenant les cellules K562 en suspension, le co-substrat (BNAH 100 μM) et le coenzyme Q0 100 μM et structure du radical semiquinonique. Gamme d'intensité $\pm 80,000$. Gain: 2.10^5 . Ordre d'addition : cellules, DMPO, BNAH, coenzyme Q0.

Comparativement au signal du radical semiquinone obtenu en présence de QR2 ou de cellules CHO-k1-QR1 et CHO-k1-QR2 (constantes de couplage : $a_{\text{H}^6} = 2,36 \text{ G}^{3\text{H}}$, $a_{\text{H}^5} = 1,99 \text{ G}^{1\text{H}}$, $g = 2,0046$), le signal RPE obtenu est beaucoup plus intense et seul le couplage entre l'électron célibataire et les trois hydrogènes du groupement méthyle en position 6 est observé. La constante de couplage déterminée entre l'électron célibataire et les hydrogènes est également plus élevée que les constantes rapportées dans la littérature (Tableau 5).

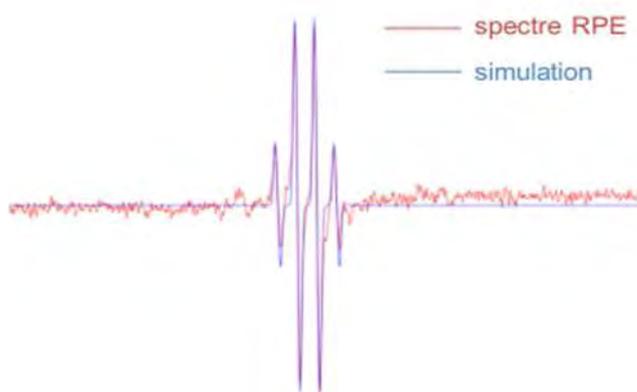
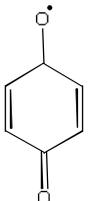
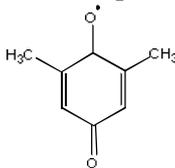
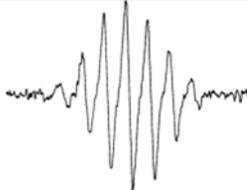


Figure 46. Superposition du spectre RPE obtenu en présence de cellules K562 en suspension, de co-substrat et de coenzyme Q0 100 μM (en rouge) et de la simulation correspondante (en bleu).

Les signaux obtenus avec les cellules leucémiques K562 dans le cas de la ménadione et de l'adrénochrome sont respectivement 2,4 et 1,7 fois plus intenses comparativement à ceux obtenus dans les mêmes conditions pour les cellules CHO-k1-QR2 (Figure 47).

Tableau 5. Constantes de couplage hyperfin déterminées par simulation dans la littérature.

Semiquinone	Spectre	Constante de couplage hyperfin
2,3-dimethoxy-5-méthyl- <i>para</i> -benzoquinone (CoQ0)	 (Poderoso J.J., 1999)	$a_H^6 = 2,14 \text{ G}^{3H}$, $a_H^5 = 1,72 \text{ G}^{1H}$ (Poderoso J.J., 1999) $a_H^6 = 2,43 \text{ G}^{3H}$, $a_H^5 = 1,92 \text{ G}^{1H}$ (Guo Q., 2002)
<i>para</i> -benzosemiquinone 	 (Molčanov K., 2006)	$a_H^2 = a_H^3 = a_H^5 = a_H^6 = 2,36 \text{ G}$ (Pedersen J., 2002)
2,6-diméthyl- <i>para</i> -benzosemiquinone 	 (Fischer V., 1985)	$a_H^2 = a_H^6 = 2,14 \text{ G}^{3H}$; $a_H^3 = a_H^5 = 1,88 \text{ G}$ (Pedersen J., 2002)

L'incubation des cellules avec l'inhibiteur de QR2 S29434 pendant 30 minutes a pour effet d'inhiber partiellement la production de radical superoxyde, quel que soit le substrat testé. Cependant, cette inhibition est plus marquée dans le cas de l'adrénochrome (46 % d'inhibition du signal contre 20 % d'inhibition dans le cas de la ménadione). L'effet de l'inhibiteur de QR2 sur les K562 est donc différent dans le cas de la ménadione que sur les cellules CHO-QR2 pour lesquelles une augmentation du signal était observée. Une des hypothèses qui peut être avancée est une moins forte présence de réductases à un électron dans cette lignée leucémique humaine, une autre possibilité pourrait être une plus faible glucuroconjugaison du ménadiol par des UGT-glucuronosyle transférases dans les K562 et ainsi une excrétion diminuée de l'hydroquinone pouvant être plus sujette à la réoxydation.

L'équipe de Buryanovskyy a par ailleurs démontré que les cellules K562, dont l'activité de QR2 est annulée soit par siRNA soit par un inhibiteur tel que le resvératrol, présentent une résistance supérieure à la toxicité de la ménadione, ce qui est en accord avec les résultats obtenus (Buryanovskyy L., 2004). Ainsi, comme observé dans la Figure 47, l'inhibition de QR2 par le S29434 diminue la production de radical superoxyde et donc la toxicité cellulaire

en présence de ménadione. Dans ces cellules, contrairement aux lignées CHO précédemment étudiées, QR2 serait alors partiellement responsable de la toxicité induite par la ménadione.

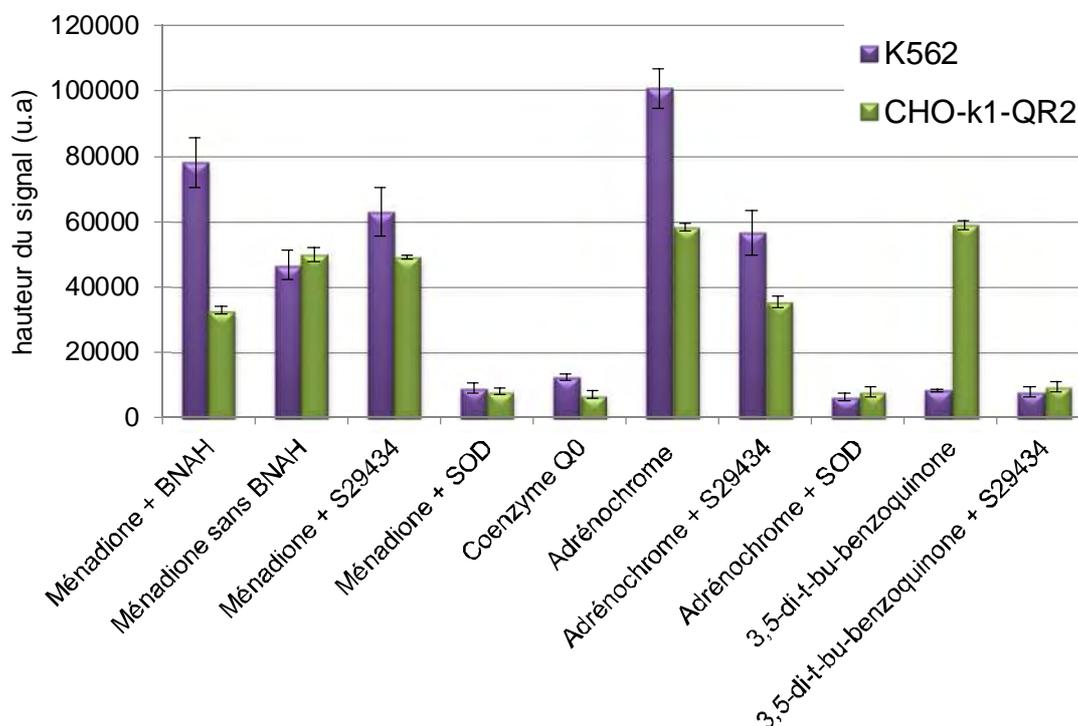


Figure 47. Comparaison de la production du radical superoxyde (en hauteur de signal) entre les lignées cellulaires K562 (en violet) et CHO-k1-QR2 (en vert) après deux minutes d'incubation avec 100 μ M de *para*-quinone (ménadione et coenzyme Q0) ou d'*ortho*-quinones (adrénochrome et 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone) et 100 μ M de BNAH avec ou sans pré-incubation pendant 30 minutes avec 20 μ M de S29434 ($n \geq 4$).

Une des principales différences observées entre les cellules CHO-k1-QR2 et les cellules K562 est l'absence de production de radicaux lorsque les K562 sont traitées par la 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone. Alors que dans les CHO surexprimant QR2, cette *ortho*-quinone était responsable de la plus intense production de radical superoxyde, aucun signal n'a pu être observé dans les mêmes conditions sur la lignée K562. Il est alors possible que cette *ortho*-quinone ne puisse pas pénétrer dans le cytoplasme ou soit métabolisée par d'autres enzymes avant de pouvoir interagir avec QR2.

4. Visualisation et localisation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par des lignées cellulaires surexprimant ou non QR1 et QR2

Le diacétate de 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (carboxy-H₂DCFDA) est une sonde fluorescente qui pénètre facilement dans les cellules et qui n'émet pas de fluorescence à l'état réduit. Ce n'est qu'après avoir pénétré dans la cellule, dans laquelle elle est désacétylée

par des estérases cellulaires améliorant sa rétention dans la cellule, et oxydée par des espèces réactives de l'oxygène en dichlorofluorescéine, qu'elle devient fluorescente après excitation à 495 nm (Figure 48).

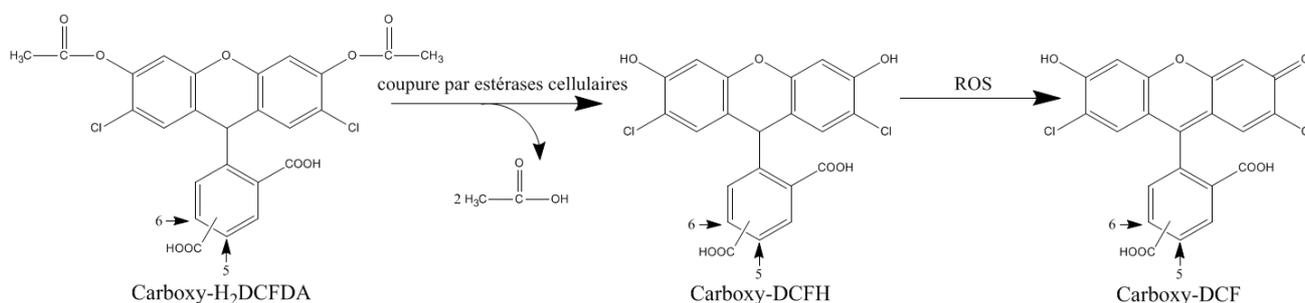


Figure 48. Structure du diacétate de 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine et étapes permettant la détection du stress oxydant intracellulaire : après pénétration dans la cellule, les estérases hydrolysent les groupements acétates puis la molécule peut s'oxyder en présence d'espèces réactives de l'oxygène pour former du carboxy-dichlorofluorescéine hautement fluorescent.

L'utilisation de la fluorescéine et de ses dérivés est fortement remise en cause car une oxydation non spécifique de ces sondes est possible par différents oxydants tels que les ions métalliques, les réactions catalysées par la peroxydase et la décomposition du peroxy-nitrite catalysée par les protons ou dioxyde de carbone. Un éditorial récent du journal « Free Radical Biology and Medicine » recommande donc que l'utilisation de cette sonde doit se faire avec de nombreuses précautions, en réalisant différents contrôles par des inhibiteurs notamment, et ne doit pas être employée seule pour démontrer la présence d'espèces réactives de l'oxygène (**Forman H.J., 2015**).

Dans le cas présent, les résultats obtenus grâce à l'analyse de la fluorescence du carboxy-dichlorofluorescéine confirment les données de la résonance paramagnétique électronique. Aucune fluorescence n'est observée pour les essais contrôles, en l'absence de traitement ou après traitement par les co-substrats BNAH et NAD(P)H (Figure 49, A-D-G). Une fluorescence cytoplasmique est observée pour les cellules non transfectées traitées par la ménadione (CHO-k1-NT, Figure 48 B), contrairement aux cellules surexprimant QR1 ou QR2 présentant une plus faible fluorescence (Figure 49, E-H). L'inhibition de QR1 par le dicoumarol et de QR2 par le S29434 induit une augmentation de la fluorescence après traitement par la ménadione dans les cellules transfectées (Figure 49, F - I). Il semble donc, comme décrit dans le chapitre 2 partie 2, que QR1 et QR2 jouent un rôle de protection cellulaire en réduisant la ménadione par deux électrons s'opposant à une réduction de ce

substrat par des réductases à un électron et responsables de la production d'espèces réactives de l'oxygène.

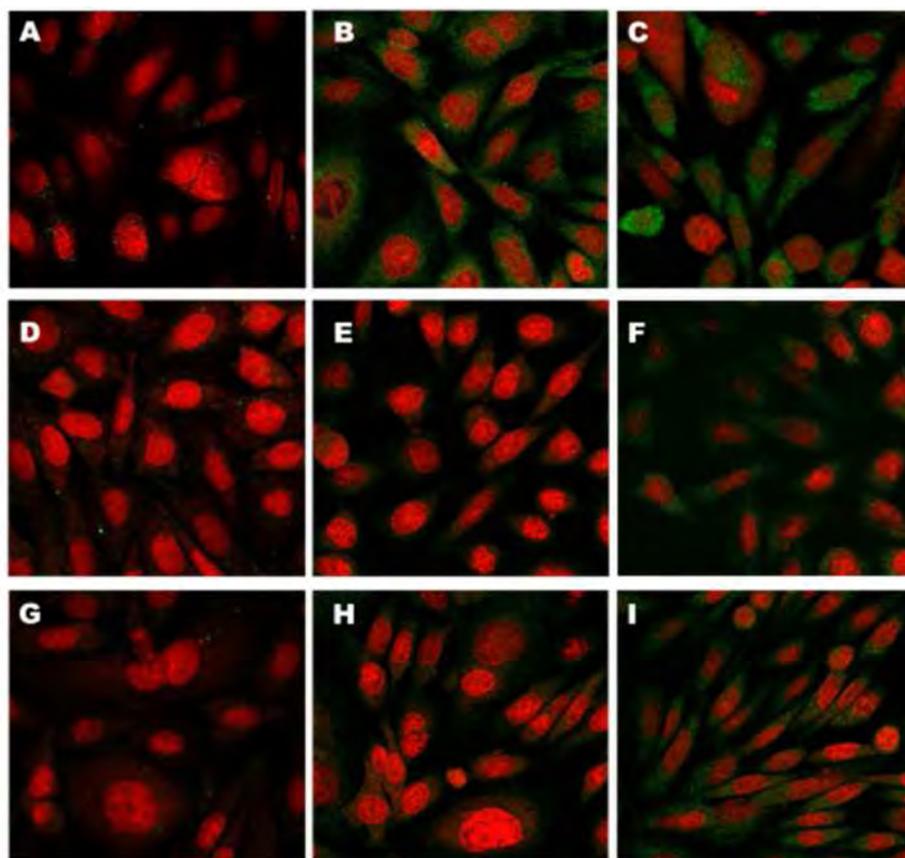


Figure 49. Images de microscopie confocale de fluorescence pour les **CHO-k1-NT** (A à C), **CHO-k1-QR1** (D à F) et **CHO-k1-QR2** (G à I). **A** : CHO-k1-NT sans traitement par substrat ou co-substrat ; **B** : traitement par la ménadione (100 μ M) de A ; **C** : prétraitement par S29434 (20 μ M) de B ; **D** : CHO-k1-QR1 et NAD(P)H (100 μ M) ; **E** : traitement par la ménadione (100 μ M) de D ; **F** : prétraitement par dicoumarol (20 μ M) de E ; **G** : CHO-k1-QR2 et BNAH (100 μ M) ; **H** : traitement par la ménadione (100 μ M) de G ; **I** : prétraitement par dicoumarol (20 μ M) de H. Les cellules sont traitées pendant 24 heures par les inhibiteurs (20 μ M) avant lavage et ajout du substrat et coloration par le carboxy-H₂DCFDA (fluorescence verte) et le DAPI (en rouge), fixation et montage.

Comme observé précédemment en résonance paramagnétique électronique, des résultats opposés sont obtenus dans le cas des *ortho*-quinones (adrénochrome et surtout 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone). Aucune fluorescence n'est observée pour les lignées CHO-k1-NT ou CHO-k1-QR1 traitées par l'adrénochrome (avec ou sans S29434) ou la 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone (Figure 50, A à C). La plus forte fluorescence due au traitement par les *ortho*-quinones est observée dans le cas des cellules CHO-k1-QR2 (Figure 50, G et I), cette fluorescence est d'ailleurs plus localisée que celle observée précédemment avec la ménadione. Le prétraitement de ces cellules pendant 24 heures par l'inhibiteur de QR2

S29434 annule totalement la fluorescence due à la métabolisation de l'adrénochrome (Figure 50 H).

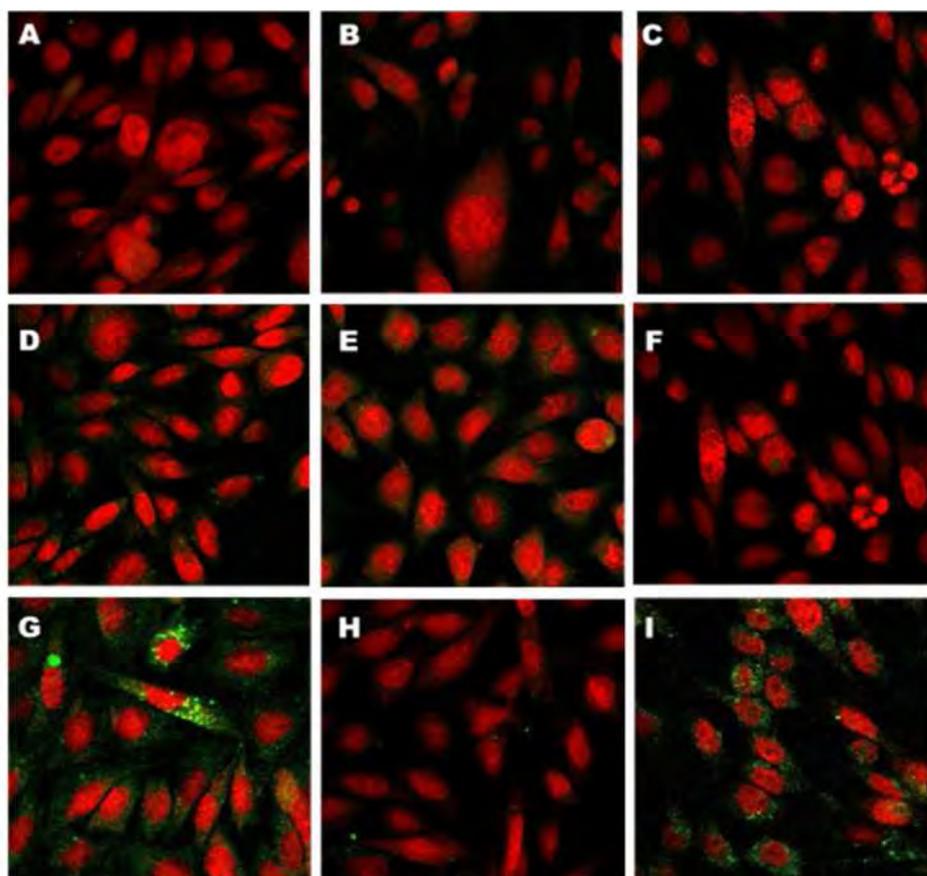


Figure 50. Images de microscopie confocale de fluorescence pour les **CHO-k1-NT** (A à C), **CHO-k1-QR1** (D à F) et **CHO-k1-QR2** (G à I). **A** : CHO-k1-NT traitées par adrénochrome (100 μ M) ; **B** : prétraitement par S29434 (20 μ M) de A ; **C** : CHO-k1-NT traitées par 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone (100 μ M) ; **D** : CHO-k1-QR1 traitées par adrénochrome (100 μ M) ; **E** : prétraitement par dicoumarol (20 μ M) de D ; **F** : CHO-k1-QR1 traitées par 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone (100 μ M) ; **G** : CHO-k1-QR2 traitées par adrénochrome (100 μ M) ; **H** : prétraitement par S29434 (20 μ M) de G ; **I** : CHO-k1-QR2 traitées par 3,5-di-*tert*-butyl-*ortho*-benzoquinone (100 μ M). Les cellules sont traitées pendant 24 heures par les inhibiteurs (20 μ M) avant lavage et ajout du substrat et coloration par le carboxy-H₂DCFDA (fluorescence verte) et le DAPI (en rouge), fixation et montage.

L'état sain des cellules indique également que la production des espèces réactives de l'oxygène n'est pas due à un état de souffrance cellulaire, l'aspect des CHO étant fibroblastique et les cellules bien étalées. De plus les images permettent d'identifier la localisation cytoplasmique de la fluorescence et donc de la production des espèces réactives de l'oxygène, ce qui est conforme avec l'activité enzymatique cytoplasmique de QR2.

Conclusion

L'utilisation de méthodes physico-chimiques appropriées au suivi du cycle redox de QR2 dans le milieu cellulaire est indispensable pour la compréhension du mécanisme de fonctionnement de cette enzyme dans un contexte physiologique.

Le travail présenté dans ce chapitre a permis de développer une technique non invasive, facile et rapide d'utilisation, permettant de suivre de façon indirecte la production et le passage dans le milieu extracellulaire des hydroquinones QH₂, représentatives de l'activité de réduction à deux électrons de différents substrats par QR2.

Les contrôles effectués sur les cellules les CHO-k1-NT, exprimant QR1 et QR2 à un niveau basal, et l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de QR2, le S29434, ont permis de mettre en évidence que la réduction du ferricyanure de potassium en ferrocyanure de potassium chez les CHO-k1-QR2 pour les différents substrats était uniquement due à l'activité intracellulaire de QR2.

Dans ces cellules CHO surexprimant QR2, la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ atteint jusqu'à 50 % et différentes gammes de valeurs ont été obtenues en fonction de la structure chimique des quinones testées, la réduction étant plus forte pour : pseudo quinone > *para*-quinone > *ortho*-quinone. Cependant, dans le cas des cellules surexprimant QR1, les *para*-quinones induisent une réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ supérieure aux *ortho*-quinones. Cette différence d'affinité pour les *ortho*-quinones pourrait s'expliquer par la présence uniquement chez QR2 d'une liaison hydrogène entre ces substrats et le groupement carbonyle de la glycine 174 qui permet de maintenir le substrat dans une position optimale permettant le transfert d'un hydrure provenant du FAD réduit (Fu Y., 2008).

Il y a donc de grandes différences dans la production de radicaux en fonction du type de quinones métabolisées mais également en fonction du type de réductases présentes dans les cellules.

La réduction des quinones à l'intérieur des quatre lignées cellulaires (CHO-k1-NT, CHO-k1-QR1, CHO-k1-QR2 et K562) peut se faire par les quinones réductases mais aussi par les réductases à un électron. Ainsi, dans le cas de cellules n'exprimant QR1 et QR2 qu'à un niveau basal, les quinones ne sont pas réduites par deux électrons, comme démontré dans le

chapitre précédent, mais induisent une forte production de radicaux qui pourrait s'expliquer par l'action de réductases à un électron, telles que la cytochrome P450 réductase, dans le cas de la ménadione.

Une compétition entre ces réductases à un électron et les quinones réductases s'opère dans le cas des *ortho*-quinones, provoquant une production de radicaux plus intense lorsque les enzymes sont surexprimées et plus particulièrement QR2. En effet, une action similaire de QR1 a été observée dans le cas de neuroblastomes surexprimant l'enzyme et exposés à l'aminochrome (**Wang W., 2008**). La meilleure stabilité des formes hydroquinone ou catéchol de ces *ortho*-quinones pourrait également expliquer cette augmentation du stress oxydant. Il est ainsi possible que les *ortho*-semiquinones formées suite à la réoxydation des catéchols puissent former des complexes métalliques grâce à la proximité des groupements OH, les rendant ainsi moins sujettes à l'excrétion et plus sensibles au cycle redox (**Kalyanaraman B., 1985**).

D'autre part, les réactions de conjugaison post réduction, telles que la glucuronoconjugaison par l'UDP-glucuronosyl transférase (UGT) et la sulfoconjugaison par la sulfotransférase (SULT) permettant l'excrétion de ces hydroquinones et réduisant le risque d'auto-oxydation de ces molécules, jouent également un rôle dans la production de radicaux. Il a en effet été révélé que l'action de QR1 seule ne suffisait pas à détoxifier la ménadione en l'absence des UGT1A6 et 1A10 (**Nishiyama T., 2010**). Ainsi, ces enzymes de conjugaison sont peu voire non exprimées dans les cellules CHO et en particulier la sulfotransférase SULT1A3 réalisant spécifiquement la sulfoconjugaison des catéchols produites suite à la réduction des *ortho*-quinones (**Taskinen J., 2003 ; Hammonds S., 2012**).

L'étude de la production de radicaux consécutive à la réduction des mêmes *para* et *ortho*-quinones par les cellules K562 exprimant fortement QR2 de façon naturelle a ainsi démontré que l'intensité des radicaux produits pouvait varier en fonction du type de lignée cellulaire utilisées.

Ces résultats apportent de nombreuses informations sur l'impact du métabolisme des quinones par QR2 sur l'environnement redox cellulaire. Cependant, la complexité des réactions se produisant à l'intérieur des cellules (conjugaison post réduction, autres réductases, stabilité des quinones et de leur forme réduite) rend difficile la transposition des conclusions obtenues à l'échelle physio-pathologique. En effet, ces résultats *in cellulo* sur cellules CHO-QR2 s'opposent à ceux décrits dans le cas de souris normales et QR2 *-/-* traitées par la ménadione, alors que les résultats obtenus sur les K562 vont dans le même sens (**Long**

D.J. II., 2002). Ainsi, sur modèle animal, la présence de QR2 est responsable d'une toxicité accrue de la ménadione, notamment en présence du co-substrat NRH, et d'une augmentation des transaminases hépatiques dans le sérum des souris. Ces différences de résultats entre les essais sur cellules et *in vivo* montrent la limite de certains modèles cellulaires. De nouveaux essais sur cellules CHO ou K562 donc l'expression de QR2 serait annulée pourraient permettre d'obtenir plus d'informations sur le lien entre l'expression de QR2 et la toxicité de la ménadione au niveau cellulaire.

Chapitre 4

Analyse de la production du superoxyde *in cellulo*

Analyse de la production de superoxyde *in cellulo*

1. Principe de la quantification *in cellulo* du radical superoxyde..... 93
2. Mesure préliminaire de l'oxydation du dihydroéthidium 94
3. Identification et quantification des dérivés de l'oxydation du dihydroéthidium..... 96

Introduction

Le chapitre précédent a démontré que la métabolisation cellulaire des *ortho*-quinones par QR2 était responsable d'une production importante de radical superoxyde. Ce stress oxydant induit par l'activité de QR2 pourrait être un facteur déterminant de l'implication de cette enzyme dans diverses pathologies neurodégénératives décrites dans le chapitre bibliographique. Ainsi, la surexpression de QR2 dans le cerveau pourrait provoquer une augmentation de la production radicalaire consécutive à la métabolisation des catéchol quinones et favoriser la susceptibilité à la maladie de Parkinson comme proposé par W. Wang (**Wang W., 2008**). Parallèlement, les résultats décrits dans le chapitre 3 ont montré des conséquences différentes après traitement par la ménadione. Ainsi, selon le type de cellules étudiées, la présence de QR2 est capable de réduire la formation de radical superoxyde due à la métabolisation de la ménadione.

Il est important de souligner que les méthodologies développées au chapitre 3 permettent de quantifier la production du radical superoxyde par la cellule, mais de façon indirecte et dans le milieu extracellulaire. Une nouvelle méthode, basée sur des analyses par LC-MS, a été développée par l'équipe de Balaraman Kalyanaraman depuis une dizaine d'années (**Zhao H., 2005 ; Kalyanaraman B., 2012**) et est proposée depuis quelques années comme la technique de choix pour l'identification et la quantification du radical superoxyde dans la cellule. Cette méthode est actuellement recommandée par le journal « Free Radicals in Biology and Medicine » spécialiste du domaine. Nous avons ainsi mis en œuvre cette méthodologie sur nos modèles cellulaires et les résultats font l'objet de ce chapitre 4.

Cette méthode repose sur l'utilisation de la sonde dihydroéthidium (DHE) produisant une fluorescence rouge consécutive à son oxydation par le superoxyde uniquement en 2-hydroxyéthidium (2-OH-E⁺) (**Zhao H., 2005**). Cependant, il est possible que cette oxydation s'accompagne de la production d'autres produits dont l'éthidium (E⁺) qui fluoresce à des longueurs d'ondes proches du 2-hydroxyéthidium ce qui nécessite une analyse plus poussée des produits de l'oxydation du dihydroéthidium, par spectrométrie de masse notamment.

1. Principe de la quantification *in cellulo* du radical superoxyde

Le dihydroéthidium DHE est une sonde fluorescente capable de pénétrer dans la cellule et est utilisée depuis de nombreuses années pour quantifier le stress oxydant cellulaire et notamment la formation du radical superoxyde (**Bindokas V.P., 1996 ; Carter W.O., 1994 ; Shah M.H., 2015**). Cette sonde fluorescente a comme avantage de ne pas être affectée par les réducteurs comme le glutathion ni par les cycles rédox artificiels. Elle est donc considérée comme plus fiable que la fluorescéine par exemple (**Fernandes D., 2007**). Il a ainsi été démontré que l'oxydation par deux électrons du dihydroéthidium par le superoxyde formait un produit spécifique, le 2-hydroxyéthidium 2-OH-E^+ (Figure 51) alors qu'en présence du radical hydroxyle, du peroxyde d'azote (ONOO^\cdot), de peroxydes et de réactifs de type Fenton d'autres produits d'oxydation sont formés dont l'éthidium E^+ (**Zhao H., 2003 ; Zielonka J., 2010**). Le mécanisme proposé d'oxydation par le superoxyde du dihydroéthidium implique la formation d'un radical de type triaryl dû à la perte d'un hydrogène tertiaire ou d'un hydrogène d'un des groupements amine aromatique pouvant réagir avec un autre superoxyde suivi d'une élimination d'eau et d'un réarrangement pour former le 2-hydroxyéthidium (2-OH-E^+) (Figure 51) (**Zhao H., 2003**).

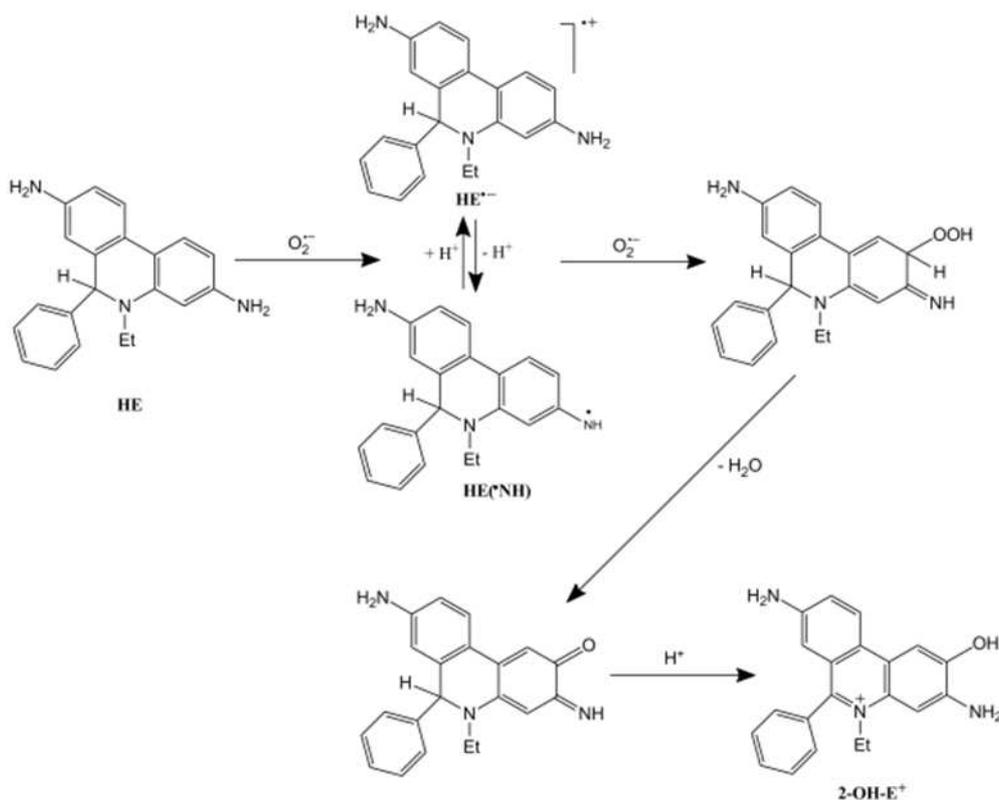


Figure 51. Oxydation du dihydroéthidium par le radical superoxyde et formation du 2-hydroxyéthidium selon le mécanisme proposé par l'équipe de Kalyanaraman (**Zielonka J., 2010**).

Cependant, dans les systèmes biologiques, l'oxydation du DHE est souvent accompagnée de la formation d'E⁺ qui est même majoritaire (**Zielonka J., 2008**). Ce composé est également retrouvé dans les formes commerciales de DHE et peut être une conséquence de l'oxydation photochimique du DHE. De plus, les paramètres de fluorescence de ces deux produits sont relativement proches et une lecture seule d'intensité de fluorescence n'est pas suffisante pour identifier chaque produit. Il est donc nécessaire de pouvoir séparer ces deux produits (2-OH-E⁺ et E⁺) lors des analyses par UHPLC afin de déterminer spécifiquement la formation de superoxyde dans les cellules grâce à une détection plus fiable que la fluorescence comme la spectrométrie de masse.

L'analyse par LC-MS étant une méthode lourde et nécessitant une préparation longue des échantillons, une première lecture de fluorescence des cellules en présence de dihydroéthidium par spectroscopie de fluorescence est d'abord réalisée. Cette méthode préliminaire à haut débit permet dans un premier temps de pouvoir sélectionner les échantillons générant les intensités de fluorescence les plus élevées nécessaires à la mise au point de la méthode LC-MS et de mettre en parallèle les résultats entre cette méthode rapide que nous maîtrisons avec la méthode LC-MS à éprouver. L'analyse LC-MS des différents échantillons permettra dans un deuxième temps de quantifier spécifiquement le superoxyde (**Zielonka J., 2012**).

2. Mesure préliminaire de l'oxydation du dihydroéthidium

L'oxydation du dihydroéthidium produit une fluorescence rouge qui est d'autant plus intense que les produits d'oxydation sont liés à l'ADN nucléaire. Ainsi, les produits formés E⁺ et 2-OH-E⁺ chargés positivement peuvent s'intercaler dans l'ADN, ce qui réduit le transfert de proton et l'extinction de fluorescence et les maintient piégés dans les cellules (**Zielonka J., 2010**). Malgré son manque de spécificité, l'analyse par fluorescence de la formation de ces produits d'oxydation permet de réaliser des études préliminaires sur les échantillons testés. Ainsi, cette méthode simple, rapide et peu coûteuse permet de mettre en évidence des échantillons qui pourront être analysés plus spécifiquement par UHPLC-MS (**Zielonka J., 2012**).

Les essais réalisés sur les trois lignées cellulaires CHO ainsi que sur les K562 ont démontré une augmentation de la fluorescence du dihydroéthidium après 90 minutes d'incubation en présence des différentes quinones par rapport au contrôle (Figure 52). Ainsi, les plus fortes augmentations de fluorescence à $\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 595 \text{ nm}$ sont observées

principalement pour les cellules K562 quel que soit le substrat. Comparativement au contrôle, aucune fluorescence n'est induite par l'ajout d'adrénochrome et une très faible augmentation est observée en présence de ménadione sur les cellules CHO-k1-NT et CHO-k1-QR1 et aucune fluorescence supérieure au contrôle n'est observée pour les CHO-k1-QR2.

Ces résultats divergent avec la forte production de radical superoxyde décrite précédemment lors des essais de RPE pour les cellules non transfectées traitées par la ménadione. De plus, une plus forte fluorescence, par rapport au contrôle, est également obtenue pour les cellules CHO-k1-NT traitées par le coenzyme Q0 alors qu'aucun signal RPE correspondant au radical superoxyde n'était observé dans les mêmes conditions. L'ajout de l'inhibiteur S29434 à 20 μM réduit la fluorescence de 25 % pour la ménadione et le coenzyme Q0 et de 32 % pour l'adrénochrome chez les cellules K562 et n'a aucun effet sur les autres cellules.

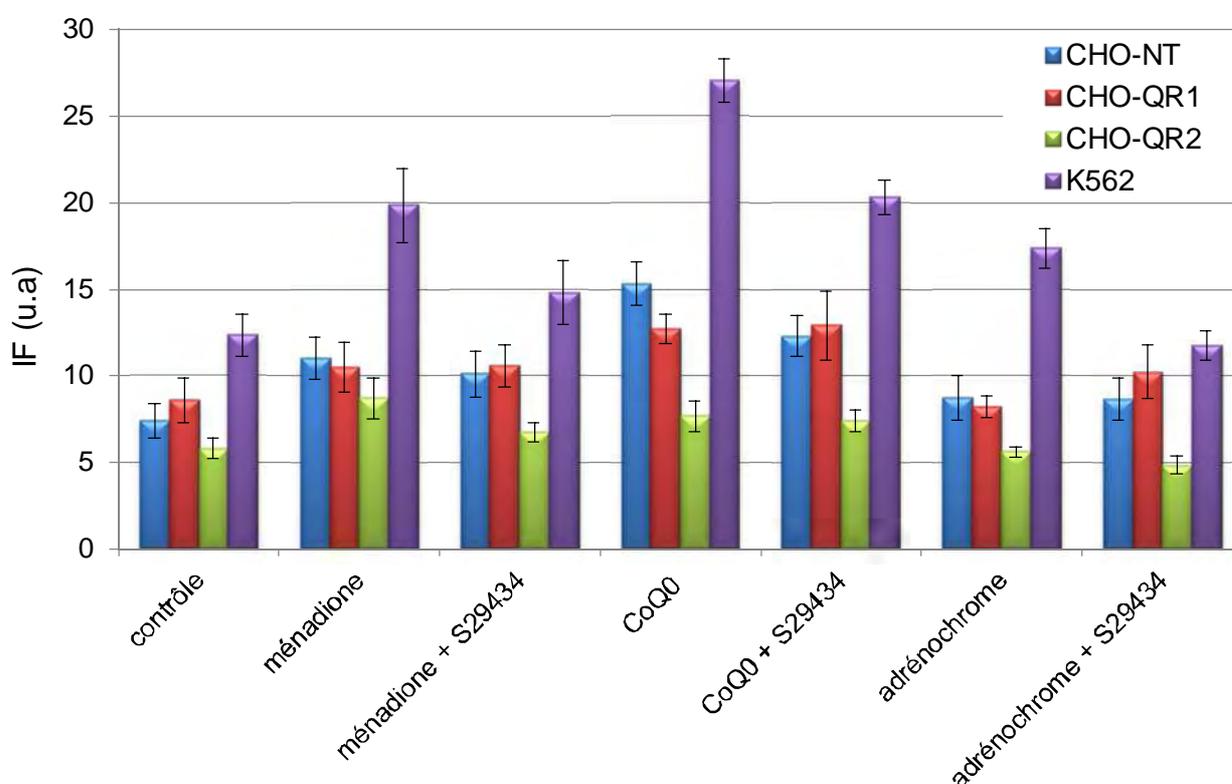


Figure 52. Comparaison des intensités de fluorescence (IF) du dihydroéthidium à 595 nm obtenues pour chaque lignée cellulaire après 90 minutes d'incubation ($n = 3$). Les quatre lignées cellulaires sont traitées par 25 μM de dihydroéthidium (contrôle) et 100 μM de substrat (ménadione, coenzyme Q0 ou adrénochrome), 100 μM de co-substrat (NAD(P)H pour les CHO-k1-QR1 ou BNAH pour les CHO-k1-QR2 et K562) et 20 μM d'inhibiteur S29434 quand indiqué.

Il est à noter que les longueurs d'ondes utilisées pour cet essai ne sont pas spécifiques du 2-OH-E⁺, seul produit caractérisant la formation de radical superoxyde dans les cellules, mais correspondent également à l'oxydation non spécifique du DHE en E⁺ (Zhao H., 2005). Ceci confirme qu'il est nécessaire de réaliser des analyses complémentaires afin d'identifier et de

quantifier avec précision les produits d'oxydation observés au cours des essais de spectrophotométrie de fluorescence.

3. Identification et quantification des dérivés de l'oxydation du dihydroéthidium

La méthode de spectrophotométrie de fluorescence, décrite dans la partie précédente, a permis de mettre en évidence une augmentation de la fluorescence du dihydroéthidium suite au traitement des cellules par différents substrats. Cependant, comme discuté plus haut, cette fluorescence n'est pas spécifique d'une production de superoxyde. La quantification du 2-OH-E⁺ est indispensable pour discriminer le superoxyde d'autres mécanismes d'oxydation du dihydroéthidium. Ainsi, les cellules sont traitées de la même manière que pour les essais de fluorescence durant 30 minutes, puis elles sont lavées, lysées et le surnageant analysé par UHPLC-MS.

Le premier chromatogramme représenté à la Figure 53 (K562 + DHE) montre que le dihydroéthidium présente le temps de rétention le plus faible (7,2 min. environ) et est suivi, quatre minutes plus tard, par l'éthidine et le 2-hydroxyéthidium à 12,13 et 12,51 min. respectivement. L'utilisation de la recherche de masse (m/z) pour les chromatogrammes obtenus montre que le 2-OH-E⁺ (m/z = 330) est fortement minoritaire par rapport au E⁺ (m/z = 314) pour toutes les conditions testées. De plus, l'intensité des pics de DHE est très faible voire nulle, malgré une concentration initiale de 25 µM, une forte coloration rouge des culots cellulaires après traitement par le DHE et une production mineure des deux produits d'oxydation.

Cependant, lorsque les cellules sont traitées par un substrat et/ou l'inhibiteur S29434, ces produits sont fortement retrouvés sous leur forme originelle ou conjuguée au glutathion au sein des cellules. Ainsi, la ménadione **21** et le coenzyme Q0 **40**, de masses respectives 172 et 182, forment des adduits avec le glutathion. Ceci a pu être déterminé car pour ces produits des rapports m/z de 478 et 488 sont obtenus et correspondent à la somme de la masse du glutathion, soit 306 et de ces substrats. En effet, au sein des cellules, des réactions d'addition de Michael entre le glutathion, très abondant, et les substrats électrophiles tels que les quinones sont métabolisées par les glutathion-S-transférases (Figure 54) (**Forman H.J., 2009**).

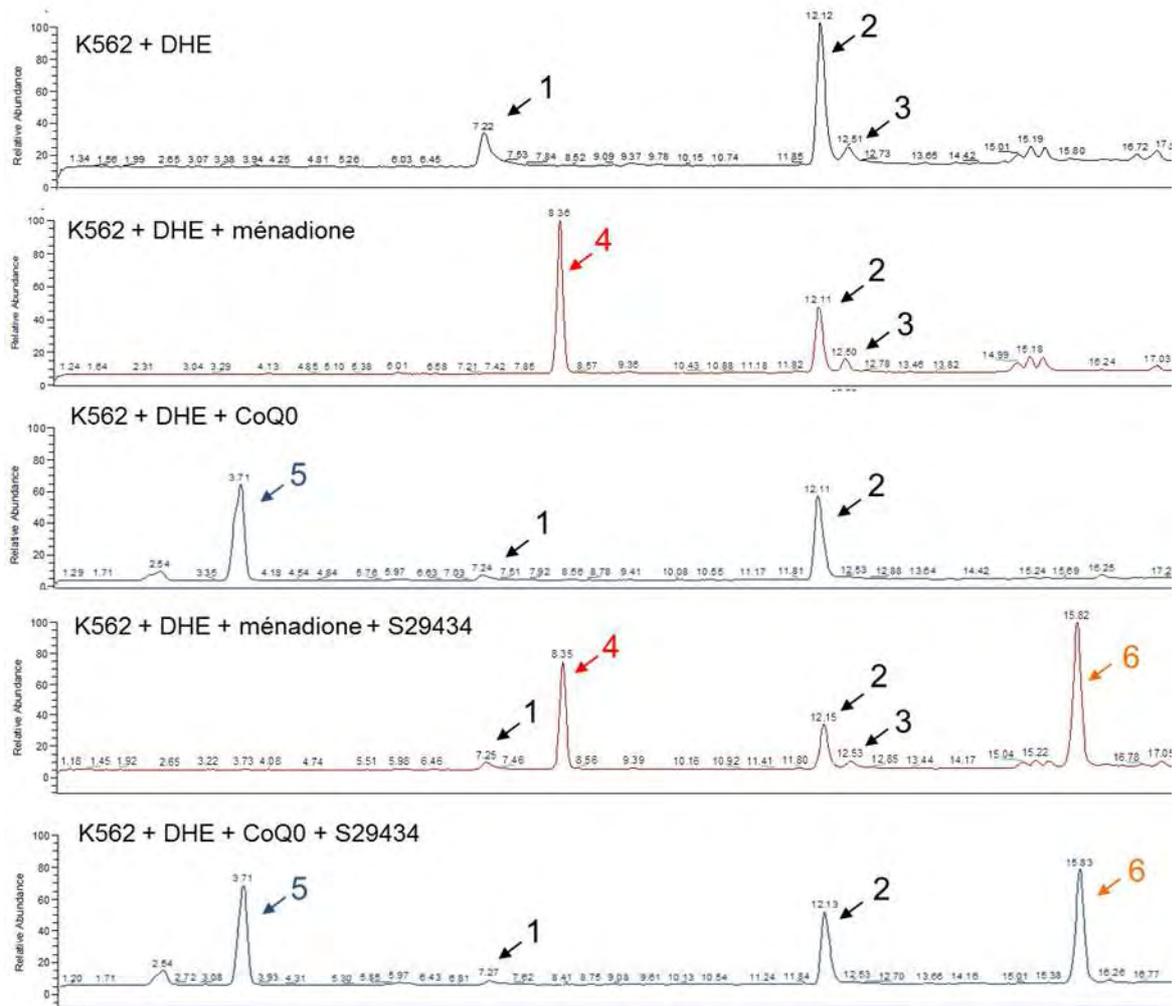


Figure 53. Chromatogramme UHPLC-MS de cellules K562 incubées 30 min. avec le dihydroéthidium, différents substrats à 100 μM et le S29434 à 20 μM . Valeurs de m/z des différents pics observés et molécule correspondante : 1) 316 = dihydroéthidium ; 2) 313 = éthidine E^+ ; 3) 330 = 2-hydroxyéthidium 2-OH- E^+ ; 4) 478 = ménadione-glutathion ; 5) 488 = coenzyme Q0-glutathion ; 6) 374 = S29434.

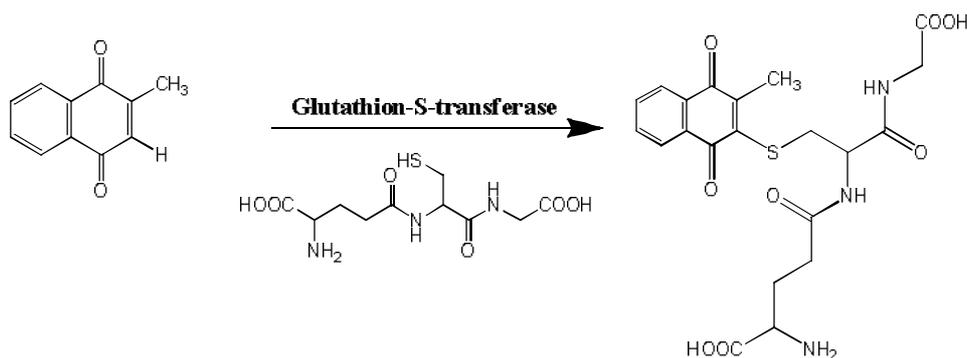


Figure 54. Addition de Michael entre la ménadione et le glutathion métabolisée par la glutathion-S-transférase.

L'identification des substrats et du S29434 dans les cellules, révèle que la méthode adoptée pour incuber, extraire et préparer les échantillons pour l'analyse LC-MS préserve bien les molécules présentes dans le milieu intracellulaire. Les très faibles intensités de pics obtenues pour le dihydroéthidium et ses produits d'oxydation ne coïncident pas avec les résultats

obtenus dans les différentes publications utilisant cette méthodologie. Dans notre cas, nous obtenons une très faible concentration de ces différents produits.

Suite au passage de chaque lysat cellulaire, les aires sous les pics des produits d'oxydation du dihydroéthidium sont déterminées et comparées à une gamme étalon établie préalablement à partir des solutions stock de 2-OH-E⁺ et E⁺ préparées par synthèse.

Le Tableau 6 rapporte les différentes valeurs de concentration des deux produits d'oxydation majoritaires du dihydroéthidium, le 2-hydroxyéthidium 2-OH-E⁺ et l'éthidium E⁺, pour les différentes lignées testées et pour différents traitements des cellules.

Tableau 6. Quantification par UHPLC-MS des produits d'oxydation du dihydroéthidium pour différentes lignées cellulaires incubées 30 minutes en présence de dihydroéthidium (25 µM), coenzyme Q0, ménadione ou adrénochrome (100 µM), le NAD(P)H (CHO-QR1) ou le BNAH (CHO-QR2 et K562) à 100 µM, avec ou sans traitement concomitant par 20 µM de S29434.

Traitement	Lignées	Concentration ^a 2-OH-E ⁺ (µM)	Concentration ^a E ⁺ (µM)
DHE	CHO-NT	< 10 nM	1,43 ± 0,36
	CHO-QR1	< 10 nM	1,86 ± 0,27
	CHO-QR2	< 10 nM	< 1 µM
	K562	0,11 ± 0,01	9,38 ± 2,24
Ménadione + DHE	CHO-NT	< 10 nM	1,86 ± 0,23
	CHO-QR1	< 10 nM	1,41 ± 0,22
	CHO-QR2	< 10 nM	< 1 µM
	K562	0,13 ± 0,02	9,69 ± 1,22
Coenzyme Q0 + DHE	CHO-NT	< 10 nM	6,49 ± 1,57
	CHO-QR1	< 10 nM	6,60 ± 2,56
	CHO-QR2	< 10 nM	< 1 µM
	K562	0,03 ± 0,002	> 20 µM
Adrénochrome + DHE	CHO-NT	< 10 nM	2,16 ± 0,45
	CHO-QR1	< 10 nM	2,87 ± 1,03
	CHO-QR2	< 10 nM	< 1 µM
	K562	0,03 ± 0,003	11,65 ± 0,57
Ménadione + DHE + S29434	CHO-NT	< 10 nM	1,58 ± 0,11
	CHO-QR1	< 10 nM	1,66 ± 0,88
	CHO-QR2	< 10 nM	< 1 µM
	K562	0,10 ± 0,01	6,41 ± 3,02
Coenzyme Q0 + DHE + S29434	CHO-NT	< 10 nM	6,55 ± 2,45
	CHO-QR1	< 10 nM	6,12 ± 0,76
	CHO-QR2	< 10 nM	1,73
	K562	0,03 ± 0,001	> 10 µM
Adrénochrome + DHE + S29434	CHO-NT	< 10 nM	2,41 ± 0,85
	CHO-QR1	< 10 nM	3,51 ± 1,03
	CHO-QR2	< 10 nM	< 1 µM
	K562	0,01 ± 0,001	< 1 µM

^a Les concentrations en 2-OH-E⁺ et E⁺ sont obtenues grâce à des gammes étalons analysées par UHPLC-MS (se référer au paragraphe 2.7.1 de la partie expérimentale p. 121). Les essais sont réalisés pour 1x10⁶ cellules dans un volume final de 100 µL. Les échantillons des gammes étalons sont établis dans un volume total de 100 µL.

Une concentration en E^+ de $9,69 \mu\text{M}$ dans l'échantillon correspond à $0,969$ nmoles dans $100 \mu\text{L}$ soit $0,969$ fmoles par cellule.

L'analyse des résultats présentés dans le Tableau 6 et sur la Figure 53 aboutit aux remarques suivantes :

- 1) Dans les systèmes étudiés, aucune production de $2\text{-OH-}E^+$ ne peut être quantifiée car les valeurs de concentrations obtenues à partir des aires sous les pics sont inférieures à celles de la gamme d'étalonnage préparée, soit inférieures à 10 nM sauf dans le cas des cellules K562 pour lesquelles des concentrations allant de 10 à 130 nM sont observées en présence ou en l'absence de traitement par un substrat.
- 2) Une production de E^+ est observée pour quasiment toutes les cellules y compris en l'absence de traitement par un substrat. Le traitement par la ménadione donne des valeurs de E^+ comparables aux cellules non traitées par un substrat et une légère augmentation est observée avec l'adrénochrome. Il est alors probable qu'une oxydation photochimique, par d'autres espèces radicalaires ou par le cytochrome c, du DHE se produise au cours de l'incubation des cellules (Zielonka J., 2010). Cependant, le CoQ0 est responsable de la plus forte production de E^+ , avec une oxydation quasi totale du DHE en E^+ (la concentration en E^+ dépassant $20 \mu\text{M}$), ce qui explique la plus forte augmentation de fluorescence observée lors des expériences par spectroscopie de fluorescence pour ce substrat.
- 3) Les concentrations obtenues pour E^+ varient fortement en fonction des lignées étudiées. Les plus fortes concentrations sont obtenues pour les cellules K562, présentant la plus forte augmentation de fluorescence du dihydroéthidium, et équivalent à presque dix fois les concentrations obtenues dans les autres lignées. Comme observé précédemment par spectroscopie, l'ajout de $20 \mu\text{M}$ de S29434 réduit la production de E^+ de 34% dans le cas de la ménadione et de moitié dans le cas du coenzyme Q0. Il peut alors être envisagé que d'autres systèmes redox au sein de ces cellules cancéreuses interagissent de façon non spécifique avec le dihydroéthidium.

Conclusion

La quantification de la production radicalaire ainsi que la détermination précise des espèces réactives de l'oxygène produites au sein des cellules doivent faire face à de nombreuses problématiques. Les sondes luminescentes, qu'elles soient fluorescentes ou phosphorescentes, sont fortement utilisées depuis longtemps mais manquent de spécificité car elles ne détectent, en général, qu'un changement dans le statut redox de la cellule (**Kalyanaraman B., 2012 ; Winterbourn C.C., 2014**). Les travaux présentés dans ce chapitre décrivent l'utilisation d'une méthode considérée comme étant la plus appropriée pour déterminer et quantifier la production du radical superoxyde au sein des cellules (**Zielonka J., 2012**). Cette méthode est décrite comme permettant de visualiser par une lecture simple s'il se produit une oxydation du dihydroéthidium et d'analyser par la suite le contenu intracellulaire pour déterminer la production du radical superoxyde.

Les manipulations préliminaires en fluorescence dont les résultats sont difficiles à interpréter ont permis de sélectionner les échantillons pour lesquels il se produit les phénomènes d'oxydation les plus forts. Cependant, malgré une oxydation de la sonde observée en fluorescence, quasiment aucune production de 2-OH-E⁺ n'a été observée en UHPLC-MS, l'augmentation de fluorescence observée étant alors due à la production de E⁺.

Ces essais n'ont pas permis de quantifier la production intracellulaire du radical superoxyde. Le fait que seules des traces de production du superoxyde soient détectées par LC-MS au sein des cellules peut s'expliquer : a) soit par une dégradation trop importante et rapide du dihydroéthidium en éthidine ; b) soit par une excrétion extracellulaire très rapide et une réoxydation à l'extérieur des cellules des hydroquinones et ainsi une production uniquement extracellulaire du radical superoxyde, comme décrit dans le chapitre précédent pour les analyses RPE ; c) soit par une compétition pour le superoxyde entre la superoxyde dismutase et le dihydroéthidium (la constante de réaction du dihydroéthidium avec le superoxyde $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ étant mille fois plus faible que celle de la SOD avec ce radical $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (**Goldstein S., 2006 ; Zielonka J., 2006**).

Plusieurs essais d'amélioration de la méthode HPLC, mais également du mode d'extraction, et d'autres mises au points ont été réalisés mais n'ont pas réussi à améliorer la quantification du 2-OH-E⁺. Malgré de nombreux réajustements du protocole, cette méthode nous a paru décevante bien que proposée par l'équipe de Balanaraman Kalyanamaran. Il est possible que

certaines détails importants du protocole ne soient pas suffisamment décrits dans les parties expérimentales des publications décrivant ces méthodes. Finalement, bien que recommandée et utilisée dans de nombreuses publications, cette méthode est dans l'ensemble insatisfaisante et il est très difficile d'en apprécier l'exactitude.

Conclusion et perspectives

L'étude de la NRH:quinone réductase 2 (QR2), réalisée lors de ce travail, a eu pour objectif de mieux comprendre le rôle de cette enzyme, de la comparer à son homologue, la NA(D)P:H quinone réductase 1 (QR1) et d'étudier l'impact de son activité sur le stress oxydant au niveau enzymatique et cellulaire.

Le premier chapitre s'intéresse aux mécanismes d'action, rôles et différences entre QR1 et QR2. Le rôle exact de la NRH:quinone réductase 2 reste plus obscur que celui de la NA(D)P:H quinone réductase 1. Le polymorphisme de QR2 semble impliqué dans de nombreuses pathologies à la fois cancéreuses et neurodégénératives. Il est ainsi important de mieux comprendre l'impact de l'activité métabolique de QR2 sur le statut redox des cellules qui l'expriment.

Dans le second chapitre, les propriétés d'oxydo-réduction des différents substrats des quinones réductases ont été étudiées, ainsi que l'affinité de QR2 pour diverses familles de substrats. Ceci a permis de mettre en évidence une meilleure capacité de réduction de QR2 vis-à-vis de son homologue ainsi qu'une meilleure affinité des *ortho*-quinones pour cette enzyme.

Dans le troisième chapitre, nous avons analysé la métabolisation de *para* et d'*ortho*-quinones par différentes lignées cellulaires, surexprimant ou non QR1 et QR2, ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène consécutive à la réduction de ces quinones. Les résultats obtenus ont montré qu'il était possible de suivre de façon indirecte la réduction de ces quinones par QR2 au sein de cellules et que la réduction des *ortho*-quinones était équivalente à celle des *para*-quinones. Grâce à la résonance paramagnétique électronique, nous avons observé une production extracellulaire de radical superoxyde due à la réoxydation des hydroquinones à l'extérieur des cellules. Nous avons ainsi déterminé que, selon la structure chimique de la quinone étudiée, QR2 pouvait, soit jouer un rôle détoxifiant dans le cas de *para*-quinones comme la ménadione, soit augmenter la production radicalaire dans le cas des *ortho*-quinones. L'utilisation de cette méthode sur différentes lignées exprimant fortement QR2, d'origine animale ou humaine, a permis de mettre en évidence l'importance du modèle cellulaire utilisé et des mécanismes de conjugaison post-réduction sur l'intensité de la production du radical superoxyde.

Afin d'analyser la production de radical superoxyde à l'intérieur des cellules, nous avons étudié l'oxydation d'une sonde fluorescente, le dihydroéthidium, par deux méthodes développées dans le chapitre IV. Le dihydroéthidium oxydé produit une fluorescence rouge suivie par spectroscopie de fluorescence puis les différents produits d'oxydation obtenus ont

été séparés et quantifiés par UHPLC-MS. Cette méthode n'a pas permis de mettre en évidence la production de radical superoxyde à l'intérieur des quatre lignées cellulaires testées car une oxydation non spécifique de la sonde a été observée.

En conclusion, ce mémoire apporte de nouvelles connaissances sur le rôle de QR2 au niveau cellulaire, notamment sur la capacité de QR2 à réduire des *ortho*-quinones induisant une forte production de radical superoxyde. La majorité des *ortho*-quinones (ou catéchol-quinones) étudiées dans ce manuscrit sont présentes au niveau neuronal et cette production radicalaire accrue en présence de QR2 pourrait lier la surexpression de cette enzyme et la neurodégénérescence neuronale observée chez des patients atteints des maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

D'un point de vue analytique, les différentes méthodes choisies au départ étaient appropriées à l'analyse du mécanisme redox de QR2 ainsi qu'à l'étude de la production radicalaire. La résonance paramagnétique électronique s'est affirmée comme étant une méthode robuste permettant d'identifier de façon précise les radicaux produits par les cellules sans les lyser avec une préparation simple des échantillons. La spectroscopie UV-visible est une méthode rapide, peu coûteuse et simple d'utilisation qui permet de suivre les mécanismes redox qui se produisent au sein des cellules. Les sondes fluorescentes restent problématiques dans l'information non spécifique qu'elles apportent même en utilisant des méthodes analytiques plus poussées comme l'UHPLC-MS.

Ces résultats encouragent la poursuite des recherches en étudiant notamment la production de radical superoxyde au sein de lignées neuronales cancéreuses, modifiées ou non pour surexprimer QR2, ou de primocultures neuronales exprimant ou non QR2 ce qui permettrait d'étudier les relations entre l'activité de QR2 et la toxicité neuronale de certaines quinones.

Partie expérimentale

Ce travail a bénéficié de l'expertise des chercheurs de l'Institut de Recherche Servier en enzymologie et pharmacologie notamment en ce qui concerne les quinones réductases. La production de la forme humaine pure des enzymes QR1 et QR2, et de cellules génétiquement modifiées surexprimant QR1 ou QR2 ainsi que la synthèse d'outils moléculaires nécessaires à l'étude de QR2 ont été apportés par l'IdRS. Plusieurs expériences ont été réalisées au sein de la division Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire l'Institut de Recherche Servier dirigée par Jean Boutin (Croissy-sur-Seine, France).

1. Matériel

Origine des réactifs.

Les fournisseurs des réactifs et produits utilisés dans ce travail sont indiqués ci-dessous.

- Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) : flavine adénine dinucléotide ou FAD (ref : F6625), ferrocène (ref : 46260), ferricyanure de potassium (ref : 20 801-9), DMEM (ref : D6434), sérum de veau fœtal (ref : F4135), DPBS (ref : D8662), glycérol (ref : G5516), DAPI (ref : D8417), mowiol (ref : 81381), paraformaldéhyde (ref : P6148), tétrabutylammonium perchlorate ou TBAP (ref : 86893), coenzyme Q0 (ref : D9150), 5-(1-aziridinyl)-2,4-dinitrobenzamide ou CB1954 (ref : C2235), ménadione (ref : M5625), duroquinone (ref : D223204), adrénochrome (ref : A5752), dopamine HCl (ref : H8502), resvératrol (ref : R5010), mélatonine (ref : M5250), dicoumarol (ref : M1390), catalase (ref : C400), superoxyde dismutase (ref : S5389), hydrochlorure de trishydroxyméthylaminométhane (tris-HCl, ref : T3253), β -octyl-D-glucopyranoside (ref : O8001), tyrosinase (ref : T3824), acétovanillone (ref : W508454), oxyde de phénylarsine (ref : P3075), dihydroéthidium DHE (ref : 37291), nitrosodisulfonate de potassium NDS (ref : 220930), phosphate de potassium dibasique anhydre (ref : 795496), phosphate de potassium monobasique anhydre (ref : P0662), éthanol absolu pour HPLC (ref : 34852), acide diéthylènetriaminepentaacétique DTPA (ref : D6518), sel d'acide diéthylènetriaminepentaacétique gadolinium (III) dihydrogène hydraté (ref : 381667), chlorure de lanthane heptahydrate (ref : 262072), méthanol (ref : 34860), NAD(P)H (ref : N1630) et NADH (ref : N1630) .
- Interchim (Montluçon, France) : 3,5-di-tert-butyl-ortho-benzoquinone (ref : 58554) et L-3-(3,4-dihydroxyphényl)alanine ou lévodopa (ref : 56711).
- Life Technologies (Saint Aubin, France) : diacétate de 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (ref : C400).

- TCI (Zwijndrecht, Belgique) : BNAH (ref : B1156).
- ThermoFisher (Illkirch, France) : diméthylsulfoxyde DMSO (ref : D/4125/PB17), acétonitrile ACN (ref : A/0627/17).
- Dojindo (Kumamoto, Japon) : DMPO (ref : D048-10).
- VWR BDH Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) : *N,N*-diméthylformamide (ref : 23466.298), manganèse (III) tétrakis (4-acide benzoïque) chlorure de porphyrine ou MnTBAP (ref : 475870-25).
- IdRS (Croissy-sur-Seine, France) : *N*-[2-(2-methoxy-6H-dipyrido[2,3-a:3,2-e]pyrrolizin-11-yl)ethyl]-2-furamide (S29434, lot L03EFS156A), NRH (IRS-SAN-lot 1), hQR2 purifiée produite en Sf9 (lot 998-QR2-04p), hQR1 produite en E.Coli.

Les unités de centrifugation Amicon Ultra 4 mL avec membrane Ultracel de 10 kDa (ref : UFC801008) sont fournies par Merck Millipore (Fontenay-sous-Bois, France). Les chambres de culture Labtek II Nunc 8 puits sont fournies par ThermoFisher (Illkirch, France). Les cartouches de filtration SPE Discovery DSV-18LT 1g/6mL, 11% de carbone, taille des particules 50 μ M, taille des pores 70 Å, sont fournies par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

1.1. Préparation de l'enzyme purifiée

L'enzyme purifiée QR2 est produite par Protenia SA (Ifrane, Maroc). L'enzyme est obtenue après amplification par PCR du plasmide pcDNA3.1(+)/hQR2 cloné dans un vecteur pFastBac1 (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis). Les cellules DH10Bac sont transformées par pFastBac/hQR2 pour générer le bacmid Bac-hQR2. Les cellules Sf9 sont transfectées avec le bacmid Bac-hQR2. Les cellules sont ensuite récoltées après 3 jours et les culots lysés. Après centrifugation (18 000 tr/min, 15 min, 4 °C), le surnageant est passé sur colonne XK50/20 Fast Flow DAE. Les fractions contenant l'enzyme (détectées par SDS-PAGE) sont alors rassemblées et concentrées. Les solutions concentrées à 5-6 mg/mL dans un tampon Tris HCl, beta octyl, sont ensuite stockées à -80 °C. QR2 est quantifiée par mesure de l'absorbance à 280 nm avec un coefficient d'absorption molaire de 44 620 $M^{-1}.cm^{-1}$.

1.2. Souches cellulaires utilisées

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées en flasque par la société Vectalys (Ramonville, France) dans des incubateurs à 37 °C et 5 % de de CO₂. Les différentes lignées utilisées sont résumées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Récapitulatif des différentes lignées cellulaires étudiées, taux d'expression de QR2, origine de la lignée, milieu de culture requis et détails concernant la lignée.

Lignée cellulaire	Expression de QR2	Origine du tissu / espèce	Milieu requis	Détails
CHO-k1-NT	Faible	Ovaire d'hamster <i>Cricetulus griseus</i>	Ham F12 10 % SVF	ATCC CCL-61
CHO-k1-QR1	Faible	Ovaire d'hamster <i>Cricetulus griseus</i>	Ham F12 10 % SVF	Transfectées pour QR1. Don du professeur David Ross (Denver, Etats-Unis) à l'IdRS
CHO-k1-QR1	Elevée	Ovaire d'hamster <i>Cricetulus griseus</i>	Ham F12 10 % SVF	Transfectées pour QR2 (Nosjean O., 2000). Don de l'IdRS.
K562	Moyenne	Moëlle osseuse leucémique, <i>Homo sapiens</i>	RPMI 10 % SVF, L-glutamine	ATCC CCL-243

2. Méthodes

2.1. Activité enzymatique et calcul de V_{max} et K_M

La mesure de l'activité enzymatique de QR2 est réalisée en suivant la diminution de la fluorescence du BNAH suite à sa réduction par QR2. Cette méthode permet de suivre indirectement la réduction des substrats et a été précédemment décrite par Mailliet *et al.* (Mailliet F., 2005).

2.1.1. Préparation des solutions

Le tampon de réaction tris β -octyl de QR2 est préparé en diluant du tris-HCl et du β -octyl-D-glucopyranoside dans l'eau distillée à 50 mM et 1 mM respectivement. Le pH est ensuite ajusté à 8,5 avant ajout du FAD (500 nM).

Une solution stock de BNAH est préparée à 20 mM dans le DMSO pur puis diluée à 2 mM dans le tampon. Une gamme est ensuite réalisée à 1,5 ; 1 et 0,5 mM dans le tampon. La ménadione et les autres substrats testés sont également dilués à 20 mM puis à 2 mM dans le DMSO pur. Pour la détermination de V_{\max} et du K_M , des dilutions en série au demi sont réalisées (2 ; 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 ; 0,03125 ; 0,015625 ; 0,00781 mM).

Des dilutions au $1/500^{\text{ème}}$ puis au $1/33^{\text{ème}}$ sont réalisées à partir de la solution stock d'enzyme à 428 $\mu\text{g/mL}$ pour obtenir une solution de travail à la concentration de 10 nM.

2.1.2. Distribution sur plaque 96 puits

Une plaque noire à fond transparent et plat 96 puits Greiner Bio-One (Courtaboeuf, France) est remplie pour obtenir les concentrations de 100 μM pour le BNAH et les substrats et de 0,5 nM pour l'enzyme. Les concentrations finales de la gamme de BNAH sont de 100, 75, 50, 25 et 0 μM et les concentrations finales des dilutions de substrat sont 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 ; 3,125 ; 1,5625 ; 0,78125 ; 0,390625 μM . Chaque substrat est également contrôlé seul et en présence de BNAH afin de déterminer la pente de la ligne de base.

2.1.3. Mesure de fluorescence

La fluorescence du BNAH est mesurée par un lecteur de plaques Xenius® de Safas (Monaco), toutes les minutes pendant 120 minutes aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du BNAH (excitation : 340 nm / émission : 440 nm). Avant chaque lecture la plaque est agitée orbitalement.

2.1.4. Analyse des données cinétiques

La gamme de BNAH permet d'établir une courbe d'étalonnage dont la pente correspond à la vitesse de la réaction. La pente de chaque substrat + co-substrat correspond à la ligne de base et est soustraite à la pente de chaque substrat + co-substrat + QR2 pour obtenir une vitesse en

UF/min. Cette vitesse est divisée par la pente du BNAH pour obtenir une activité ($\mu\text{M}/\text{min}$) puis divisée par la concentration en QR2 pour déterminer l'activité spécifique ($\text{nM}/\text{min}/\text{nM}$ de QR2). Ces différentes données sont ensuite entrées dans le logiciel Prism® de GraphPad (La Jolla, Etats-Unis) pour réaliser une régression non linéaire selon le modèle de Michaelis-Menten et déterminer V_{max} , K_M .

2.2. Méthode voltammétrie cyclique

Les mesures de voltammétrie cyclique ont été réalisées à 25 °C dans l'acétonitrile distillé avec 0,1 M de tétrabutylammonium perchlorate (TBAP) pour le CB1954, le coenzyme Q0, la mélatonine, la ménadione, le resvératrol, le S29434 et dans le diméthylformamide (DMF) distillé avec 0,1 M de TBAP pour l'adrénochrome, le dicoumarol, la dopamine, le NRH et le NADH. Des solutions de ferrocène à 1 mM dans l'acétonitrile et TBAP 0,1 M et le DMF et TBAP 0,1 M sont également préparées et analysées.

Les mesures ont été développées en utilisant un Voltalab 80 PGZ 402 Radiometer Analytical (Villeurbanne, France) et un système classique à trois électrodes :

- électrode de référence au calomel saturé,
- électrode de travail en disque de platine de diamètre interne 1,6 mm,
- électrode auxiliaire en fil de platine.

Les voltampérogrammes ont été enregistrés pour des concentrations de substrats, inhibiteurs et modulateurs de 1 mM après 15 minutes de désoxygénation par bullage d'argon avec un balayage de potentiel de 2 V à -1,5 V en fonction des essais et des molécules testées.

2.3. Expériences de résonance paramagnétique électronique sur enzyme purifiée et sur cellules

2.3.1. Préparation des solutions

La solution stock de DMPO (1 M) est préparée dans l'eau désoxygénée et conservée à - 20 °C jusqu'à utilisation.

Pour les expériences sur enzyme :

Le tampon de réaction tris β -octyl de QR1 et QR2 est préparé en diluant du tris-HCl et du β -octyl-D-glucopyranoside dans l'eau distillée à 50 mM et 1 mM respectivement. Le pH est ensuite ajusté à 8,5.

Les solutions stock de substrats sont préparées à 1 mM dans un mélange DMSO / tampon tris β -octyl (V/V 1/9 mL). Les solutions stock de co-substrat sont préparées à 20 mM dans du tampon tris β -octyl. Les solutions mères d'inhibiteurs et modulateurs sont préparées à 12 mM dans du DMSO puis diluées au centième dans du tampon tris β -octyl pour obtenir une concentration de travail de 0,12 mM.

Pour les expériences sur cellules :

Les solutions stock de substrats, co-substrat sont préparées à 1 mM dans un mélange DMSO/DPBS à 10 % de DMSO. Les solutions mères d'inhibiteurs (S29434, dicoumarol, acétovanillone et oxyde de phénylarsine) et de MnTBAP sont préparées à 1 mM dans du DMSO. La catalase est préparée à 11 kU/mL et la SOD à 2,5 kU/mL dans du PBS. La solution de complexe [La(DTPA)] est préparée en diluant du lanthane et du DTPA dans de l'eau distillée aux concentrations respectives de 100 et 200 mM. Le [Gd(DTPA)] est préparé à 100 mM dans de l'eau distillée.

L'aminochrome est préparé en oxydant 0,5 mM de dopamine HCl par 1,2 mM de ferricyanure de potassium dans du PBS. L'analyse UV visible de cette réaction montre que dès l'ajout de la dopamine au fer, l'absorbance du Fe^{3+} à 421 nm et de la dopamine à 280 nm disparaissent totalement au profit de l'apparition d'un produit orange absorbant à 475 nm issu de la cyclisation de la dopamine, l'aminochrome ($\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Le calcul de la concentration de l'aminochrome dans ces conditions donne une concentration de 350 μM .

Le dopachrome est préparé grâce à la réaction de la tyrosinase à 100 U/mL sur la lévodopa à 0,5 mM dans du PBS. La solution est ensuite filtrée sur Amicon Ultra 4 mL à 7500 g pendant 10 minutes. L'analyse UV visible du filtrat montre la formation d'un produit rouge absorbant à 305 et 475 nm, le dopachrome (ϵ respectivement de 9300 et 3500 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Le calcul de la concentration en dopachrome dans ces conditions donne une concentration de 125 μM .

2.3.2. Traitement des cellules par les inhibiteurs

Les cellules sont laissées à incuber pendant 30 minutes avec l'inhibiteur S29434 spécifique de QR2 ou le dicoumarol inhibiteur de QR1 à 20 μM , dans un agitateur oscillant avec incubation à 37 °C avant de réaliser les analyses RPE. Afin de vérifier que l'action de la NAD(P)H oxydase ne provoque pas la formation d'espèces réactives de l'oxygène, deux de ses inhibiteurs, l'acétovanillone et l'oxyde de phénylarsine (100 μM), sont incubés avec les cellules pendant une heure à 37 °C avant analyse.

2.3.3. Préparation des solutions d'analyse d'enzyme purifiée

Tableau 8. Conditions de préparation des solutions d'analyse d'enzyme purifiée pour étude par RPE.

Produit et ordre d'introduction	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Concentration solution mère	Volume prélevé	Volume final essai	Concentration finale dans l'essai
QR2 998-QR2-04p	25952	428 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20 μL	400 μL	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Tampon tris β -octyl			qsp 400 μL	400 μL	
BNAH	214,26	20 mM	60 μL	400 μL	3 mM
DMPO	113,2	1 M	50 μL	400 μL	125 mM
Inhibiteur		0,2 mM	10 μL	400 μL	5 μM
Substrat		1 mM	50 μL	400 μL	125 μM

Les analyses sont effectuées par RPE sur cellule plate à température ambiante 15 minutes après l'ajout du substrat. Les conditions expérimentales sont optimisées de telle sorte que les consommations de QR2, des réactifs et de l'inhibiteur soient minimales.

2.3.4. Préparation des solutions d'analyse des cellules

Pour tous les essais (CHO-k1-NT, CHO-k1-QR1, CHO-k1-QR2 ou K562), $5\cdot 10^6$ cellules sont traitées selon les conditions décrites dans le Tableau 9 par du DMPO (50 mM), les substrats (coenzyme Q0, ménadione, adrénochrome, aminochrome, dopachrome, 3,5-di-*tert*-butyl-*o*-benzoquinone 100 μM), et les co-substrats (BNAH or NAD(P)H 100 μM). Le mélange est ensuite transféré dans une cellule plate en quartz et analysé directement. Les essais sont

réalisés en triplicat. Le pourcentage maximal de DMSO dans ces conditions est de 5 %. La concentration en DMPO (50 mM) a été déterminée afin de garder le signal le plus intense et précis pour une concentration réduite afin de ne pas impacter la viabilité cellulaire.

Tableau 9. Conditions de préparation des solutions d'analyse de culots cellulaires pour étude par RPE.

Produit et ordre d'introduction	Concentration solution mère	Volume prélevé	Volume final essai	Concentration finale dans l'essai
Cellules CHO-k1-NT, CHO-k1-QR1, CHO-k1-QR2 ou K62	5.10 ⁶ cellules	300 µL	500 µL	5.10 ⁶ cellules
DPBS		Qsp 500 µL	500 µL	
Inhibiteur	1 mM	10 µL	500 µL	20 µM
DMPO	1 M	25 µL	500 µL	50 mM
Co-substrat	1 mM	50 µL	500 µL	100 µM
Substrat	1 mM	50 µL	500 µL	100 µM

2.3.5. Condition d'enregistrement des spectres RPE

Les spectres RPE sont enregistrés à température ambiante à l'aide d'un spectromètre RPE Bruker EMX-8/2,7 (9,86 GHz) équipé d'une cavité haute sensibilité (4119/HS 0205) et d'un gaussmètre (Wissembourg, France). Une cellule plate (FZKI160-5 X 0,3 mm, Magnettech, Berlin, Allemagne) est utilisée pour l'analyse. Les données sont traitées par les logiciels WINEPR et SIMFONIA (Bruker, Wissembourg, France). L'analyse RPE est faite en utilisant les paramètres suivants : champs magnétique : 3460 – 3480 G ; balayage : 100 G ; temps de balayage 83,89 s ; constante de temps : 81,92 ms ; nombre de scans : 1 ; modulation d'amplitude : 1 G ; modulation de fréquence : 100 kHz ; puissance micro-onde : 20 mW ; atténuation : 10 dB ; gain 2.10⁵.

2.3.6. Analyse des données RPE sur cellules

Après obtention des spectres, la hauteur totale (au-dessus et en dessous de la ligne de base) des deux plus grands pics du quadruplet 1:2:2:1 (pic 2 et pic 3), correspondant à l'adduit

[DMPO-OH]^{*}, est déterminée et la moyenne des deux pics calculée (Figure 55). Cette valeur est moyennée sur le triplicat pour chaque condition et l'écart type est calculé.

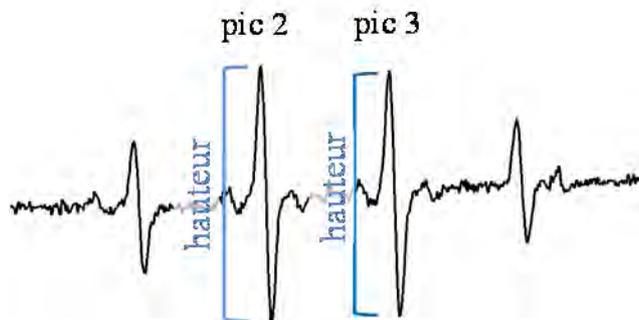


Figure 55. Méthode de détermination de la hauteur du signal RPE pour les adduits [DMPO-OH]^{*}.

2.4. Méthode spectrophotométrie UV-visible (sonde redox Fe²⁺/Fe³⁺)

2.4.1. Ensemencement des cellules

Les cellules CHO-k1, CHO-k1-QR1 CHO-k1-QR2 sont récupérées sous forme de culots de 4.10⁶ cellules dans 1 mL de PBS. Chaque culot est dilué dans 9 mL de milieu DMEM 10% SVF et les cellules sont réparties sur des plaques 96 puits (une plaque par population cellulaire) à raison de 100 µL par puits soit 4.10⁴ cellules par puits au final. Les cellules sont laissées à adhérer et à confluer pendant 24 heures.

2.4.2. Traitement par les inhibiteurs et modulateurs

L'inhibiteur S29434 spécifique de QR2, le dicoumarol inhibiteur de QR1, ainsi que deux inhibiteurs plus faibles de QR2, la mélatonine et le resvératrol, sont dilués dans du DMSO pour obtenir une concentration de 1 mM. Ces solutions sont ensuite diluées au 1/25^{ème} dans du DMEM 10%SVF pour le dicoumarol et le S29434 puis des dilutions au demi sont réalisées en série afin d'obtenir les concentrations 40 µM, 20 µM et 10 µM.

Le milieu des cellules est totalement retiré et les cellules sont ensuite traitées en déposant 100, 80 ou 50 µL de chaque dilution et 100, 120 ou 150 µL de milieu sur les cellules afin d'obtenir des concentrations finales sur les cellules de 20, 10 et 5 µM.

2.4.3. Traitement par les réactifs

Différentes solutions sont préparées dans du PBS :

- une solution de contrôle contenant uniquement du ferricyanure de potassium à 1,2 mM afin de quantifier la réduction du Fe^{3+} uniquement due aux cellules et au tampon,
- une solution de contrôle de ferricyanure de potassium à 1,2 mM et de co-substrat à 500 μM (NRH pour les CHO-k1-QR2 ou NAD(P)H pour les CHO-k1-QR1),
- les différentes solutions de réactifs contenant du ferricyanure de potassium à 1,2 mM, le co-substrat à 0,5 mM et les différents substrats (coenzyme Q0, CB1954, ménadione, duroquinone, adrénochrome, dopamine, 3,5-di-tert-butyl-*o*-benzoquinone, dopachrome, X80) à 0,5 mM ou respectivement à 350 et 125 μM pour l'aminochrome et le dopachrome.

L'ensemble de ces différentes solutions est réparti sur trois plaques afin d'obtenir les concentrations finales de 50 μM pour les substrats et co-substrats et 600 μM pour le ferricyanure de potassium. Chaque condition est réalisée en triplicat.

2.4.4. Mesure UV-visible

L'absorbance du ferricyanure de potassium est mesurée, par un lecteur de plaques à monochromateur Eon® de BioTek (Colmar, France), toutes les 10 minutes jusqu'à 60 min à la longueur d'onde d'absorbance du ferricyanure de potassium, 421 nm ($\epsilon = 1.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La première colonne de chaque plaque contenant uniquement du PBS sans cellules est utilisée comme blanc de l'appareil. Avant chaque lecture la plaque est agitée orbitalement à 37 °C pendant cinq minutes.

2.4.5. Analyse des données cinétiques

L'absorbance obtenue pour chaque triplicat à chaque temps (10, 20, 30, 40, 50 et 60 min) est moyennée et rapportée à l'absorbance de départ, $t = 0$ min. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'absorbance du ferricyanure de potassium pour un substrat donné à 60 minutes sur l'absorbance initiale du ferricyanure de potassium moins la diminution de l'absorbance observée sans substrat selon l'équation ci-dessous:

$$\text{Taux de réduction} = \left[\left(1 - \frac{A_{t=60}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{substrat})}{A_{t=0}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{Substrat})} \right) - \left(1 - \frac{A_{t=60}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)}{A_{t=0}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)} \right) \right] \times 100$$

Où $A_{t=60}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{substrat})$ correspond à l'absorbance obtenue à 60 minutes en présence de ferricyanure et de substrat, $A_{t=60}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ correspond à l'absorbance obtenue à 60 minutes en présence de ferricyanure uniquement et $A_{t=0}(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{substrat})$ correspond à l'absorbance initiale en présence de ferricyanure et de substrat.

Chaque analyse ayant été répétée au moins trois fois à différents moments, les écarts types des pourcentages de réduction du ferricyanure de potassium ont pu être déterminés.

2.5. Méthode microscopie confocale de fluorescence

2.5.1. Préparation du mowiol et du paraformaldéhyde 4 % dans le PBS pour la fixation des cellules

Mowiol : 9,6 mg de mowiol sont ajoutés à 24 g de glycérol dans un bécher de 100 mL et agités une heure à température ambiante puis 24 mL d'eau distillée sont ajoutés et l'agitation est prolongée de cinq heures. 48 mL de tampon Tris 0,2 M pH 8,5 sont ajoutés et le mélange est placé au bain marie à 50 °C sous agitation pendant une heure avant de le centrifuger 15 minutes à 4 000 tr/min à 20 °C. La préparation est ensuite répartie en aliquots de 10 mL conservés à -20 °C.

Paraformaldéhyde à 4 % dans le PBS : 90 mL d'eau milli-Q sont chauffés à 60 °C. 100 µL de NaOH 2 M sont ajoutés à l'eau chauffée ainsi que 4 g de paraformaldéhyde. L'agitation est laissée (sous hotte avec aspiration) jusqu'à éclaircissement de la solution. 10 mL de PBS concentré 10 fois sont ajoutés à la solution qui est alors laissée à refroidir à température ambiante avant ajustement du pH à 7,4. La solution est ensuite filtrée avec un filtre seringue à 0,2 µm et répartie en aliquots de 10 mL conservés à -20 °C.

2.5.2. Ensemencement des cellules

Les cellules CHO-k1-NT, CHO-k1-QR2 et CHO-k1-QR1 sont récupérées auprès de Vectalys (Ramonville, France) sous forme d'un culot de 1.10^6 cellules dans 1 mL de PBS.

Chaque culot est dilué dans 9 mL de milieu DMEM 10% SVF, les cellules sont réparties dans les chambres de culture Labtek II Nunc (une lame par type cellulaire) à raison de 200 μ L par puits soit 2.10^4 cellules par puits au final et le volume est ajusté à 400 μ L par du milieu DMEM 10 % SVF. Les cellules sont laissées à adhérer et confluer durant une nuit.

2.5.3. Traitement par les inhibiteurs

Des solutions mères de dicoumarol et de S29434 sont préparées à 1,5 mg/mL dans du DMSO. Ces solutions sont ensuite diluées au $1/200^{\text{ème}}$ dans du milieu DMEM 10% SVF pour obtenir une concentration de 20 μ M. Le milieu est totalement retiré de chaque puits et 300 μ L des solutions d'inhibiteurs sont déposées dans les puits à traiter. Pour les cellules non traitées par les inhibiteurs, le milieu est renouvelé.

2.5.4. Traitement par les substrats et co-substrats

Les solutions mères de substrats et co-substrats sont préparées à 2 mg/mL de DMSO puis diluées dans du DMEM 10% SVF pour obtenir une concentration de 100 μ M. Après 24 heures de traitement par les inhibiteurs, les cellules sont lavées par du milieu puis traitées par les solutions de substrat et co-substrat à 100 μ M pendant 20 minutes.

2.5.5. Traitement par les sondes fluorescentes et fixation des cellules

Le carboxy- H_2 DCFDA est préparé à 5 mM dans le DMSO avant d'être dilué au $1/200^{\text{ème}}$ dans du milieu DMEM 10% SVF pour obtenir une concentration de 25 μ M. Le DAPI est préparé à 1 mg/mL dans du DMF puis dilué au $1/100^{\text{ème}}$ dans du PBS pour obtenir une concentration de 10 μ g/mL.

Les puits sont vidés et les cellules traitées par la solution de carboxy- H_2 DCFDA à 25 μ M dans du PBS pendant 30 minutes à l'incubateur à 37 °C.

Après deux rinçages au PBS, le PFA 4 % est déposé pendant 10 minutes à température ambiante. Le DAPI à 10 μ g/mL est ensuite déposé pendant une heure et demi à température ambiante après trois lavages par du PBS. Le séparateur de chambre est alors retiré après aspiration de tout le milieu et une goutte de mowiol est ajoutée pour le montage de la lamelle.

2.5.6. Microscopie confocale de fluorescence

La microscopie est réalisée au Centre de Biologie du Développement, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse sur un microscope confocale inversé Zeiss 710 Big utilisant les lasers à 458 nm pour la visualisation du DAPI et à 488 nm pour la visualisation du carboxy-H₂DFCDA.

2.6. Mesure de la fluorescence du dihydroéthidium sur cellules

La mesure de l'oxydation du dihydroéthidium au sein des cellules est réalisée en suivant l'augmentation de la fluorescence rouge correspondant au 2-hydroxyéthidium et à l'éthidine.

2.6.1. Préparation des solutions

La solution stock de dihydroéthidium, de substrat et de co-substrat à 10 mM est préparée en diluant du DHE dans du DMSO. La solution de travail est ensuite préparée en réalisant une dilution pour obtenir la concentration 200 µM pour le DHE et 100 µM pour les substrats et co-substrats.

2.6.2. Préparation et traitement des cellules

Les culots de $5 \cdot 10^6$ cellules dans un mL de PBS sont séparés en culots de $2 \cdot 10^5$ cellules. Le DPBS est retiré par aspiration et les cellules sont traitées ou non par le substrat à 100 µM pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées et traitées par 20 µM de DHE.

2.6.3. Mesure de fluorescence

Les cellules sont déposées sur plaque noire à fond transparent plat 96 puits Greiner Bio-One (Courtaboeuf, France) à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits et la lecture réalisée sur un lecteur de plaques Xenius® de Safas (Monaco) à $\lambda_{exc} = 485$ nm et $\lambda_{ém} = 595$ nm pendant 0,5 secondes toutes les 90 secondes sur un temps total de 90 minutes.

2.7. Mesure de la production du 2-hydroxyéthidium dans les cellules par UHPLC-MS

L'analyse de la formation du 2-hydroxyéthidium après traitement par DHE et lyse des cellules est réalisée par HPLC-MS selon un protocole défini par Jacek Zielonka (**Zielonka J., 2008 ; Zielonka J., 2012**).

2.7.1. Préparation des solutions

Le tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 est préparé en diluant du phosphate monobasique et du phosphate dibasique aux concentrations respectives de 0,11 M et 0,39 M dans de l'eau. Le pH est ensuite ajusté à 7,4 avant filtration sur filtre membrane 0,45 μM . À partir de ce tampon sont préparés les tampons phosphate 0,1 M DTPA 200 μM et phosphate 50 mM DTPA 100 μM par dilution et ajout de DTPA.

Le tampon phosphate 1 M pH 2,6 est préparé en mélangeant de l'acide phosphorique et du phosphate monobasique aux concentrations respectives de 0,3 M et 0,7 M. Le pH est ensuite ajusté à 2,6 avant filtration sur filtre membrane 0,45 μM .

La solution stock de dihydroéthidium est préparée à 20 mM dans du DMSO désoxygéné à l'argon et la concentration est vérifiée par spectrophotométrie aux absorbances 265 et 345 nm ($\epsilon_{265\text{nm}} = 1,8 \times 10^4$ et $\epsilon_{345\text{nm}} = 9,75 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Le 2-hydroxyéthidium (2-OH-E⁺) est synthétisé en mélangeant du NDS dans du tampon phosphate pH 7,4 50 mM à 100 μM de DTPA au dihydroéthidium 20 mM (concentrations finales respectives de 0,2 mM et 0,1 mM) sous agitation légère pendant deux heures. Le mélange est ensuite analysé par UHPLC-MS et purifié sur cartouche SPE C18. La fraction de 2-OH-E⁺ est éluée par un mélange eau/méthanol (20/80) et la fraction contenant le E⁺ par du méthanol pur. Ces fractions sont ensuite analysées par HPLC-MS, évaporées sous reflux et lyophilisées. Les solutions stock des standards de 2-OH-E⁺ et E⁺ permettant la réalisation d'une gamme d'étalonnage sont préparées en ajoutant du HCl 0,1 M au solide suivi d'une dilution au 1/100^{ème} dans de l'eau. La concentration de ces solution stock est déterminée par la lecture de l'absorbance à 470 nm du 2-OH-E⁺ ($\epsilon_{470\text{nm}} = 1,2 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et à 480 nm du E⁺ ($\epsilon_{480\text{nm}} = 5,8 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Les courbes d'étalonnages sont obtenues en préparant

des dilutions à 1 ; 0,5 ; 0,1 et 0,01 μM pour le 2-OH- E^+ et 20 ; 10 ; 5 et 1 μM pour le E^+ , pour un volume final de 100 μL , et en déterminant par UHPLC-MS les aires sous les pics.

Les différents substrats testés sont préparés à 100 μM dans le DPBS. Le S29434 est préparé à 2 mM dans le DMSO.

2.7.2. Traitement des cellules

Les cellules sont séparées en culots de 1×10^6 cellules répartis sur plaque 6 puits. Elles sont ensuite traitées par le S29434 à 20 μM pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite lavées par du DPBS puis traitées par les substrats à 100 μM et le dihydroéthidium à 25 μM pendant 30 minutes avant lavage par du DPBS glacé. Les cellules sont regroupées dans des eppendorf, culottées et le surnageant retiré. Elles sont ensuite extraites par de l'acétonitrile, passées aux ultrasons pendant dix secondes et centrifugées avant évaporation du surnageant sous flux d'argon. Le résidu est ensuite suspendu dans du DPBS avant centrifugation et prélèvement du surnageant pour l'analyse dans un vial pour HPLC. Les échantillons sont conservés à 4 °C et à l'abri de la lumière dans le passeur du système UHPLC.

2.7.3. Méthode UHPLC-MS

Pour la séparation et la détection de HE, 2-OH- E^+ et E^+ , un système UHPLC avec un détecteur par spectrométrie de masse (MS), une source d'ionisation par électrospray et un analyseur par trappe ionique (LCQ DECA XP Max, ThermoFisher, Courtaboeuf, France) est utilisé. 5 μL de chaque d'échantillon est injecté dans le système UHPLC (Dionex Ultimate 3000, ThermoFisher, Courtaboeuf, France) équipé d'une colonne Kinetex C18 (Phenomenex, Le Pecq, France), 100 x 2,1 mm, 2,6 μM équilibrée avec 10 % d'ACN dans l'eau chaque phase contenant 0,1% d'acide formique. La méthode UHPLC utilise un gradient d'éluion avec une phase mobile composée d'eau et 0,1% d'acide formique et une fraction croissante d'ACN et 0,1% d'acide formique allant de 10 à 30% sur 20 minutes. Les échantillons sont élués à un débit de 0,5 mL.min⁻¹. Le système est piloté par le logiciel LCQ Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) permettant également de quantifier les composés.

Bibliographie

AbuKhader M., Heap J., De Matteis C., Kellam B., Doughty S.W., Minton N., Paoli M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (24), 7714-7719. Binding of the anticancer prodrug CB1954 to the activating enzyme NQO2 revealed by the crystal structure of their complex.

Alfadda A.A., Sallam R.M. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 936486. Reactive oxygen species in health and disease.

Antoine M., Marcheteau E., Delagrangé P., Ferry G., Boutin J.A. *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *312*, 87-96. Characterization of cofactors, substrates and inhibitor binding to flavoenzyme quinone reductase 2 by automated supramolecular nano-electrospray ionization mass spectrometry.

Arriagada C., Paris I., Sanchez de las Matas M.J., Martinez-Alvarado P., Cardenas S., Castañeda P., Graumann R., Perez-Pastene C., Olea-Azar C., Couve E., Herrero M.T., Caviedes P., Segura-Aguilar J. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *16* (2), 468-477. On the neurotoxicity mechanism of leucoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation.

Audi S.H., Bongard R.D., Dawson C.A., Siegel D., Roerig D.L., Merker M.P. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2003**, *285* (5), 1116-1131. Duroquinone reduction during passage through the pulmonary circulation.

Auten R.L., Davis J. M. *Pediatr. Res.* **2009**, *66* (2), 121-127. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details.

Baez S., Segura-Aguilar J. *Biochem. Mol. Med.* **1995**, *56* (1), 37-44. Effects of superoxide dismutase and catalase during reduction of adrenochrome by DT-diaphorase and NADPH-cytochrome P450 reductase.

Barnham K.J., Masters C.L., Bush A.I. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (3), 205-214. Neurodegenerative diseases and oxidative stress.

Baum C.L., Selhub J., Rosenberg I.H. *Biochem. J.* **1982**, *204* (1), 203-207. The hydrolysis of nicotinamide adenine nucleotide by brush border membranes of rat intestine.

Benoit C.E., Rowe W.B., Menard C., Sarret P., Quirion R. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32* (1), 43-52. Genomic and proteomic strategies to identify novel targets potentially involved in learning and memory.

Benoit C.E., Bastianetto S., Brouillette J., Tse Y., Boutin J.A., Delagrangé P., Wong T., Sarret P., Quirion R. *J. Neurosci.* **2010**, *30* (38), 12690-12700. Loss of Quinone Reductase 2 Function Selectively Facilitates Learning Behaviors.

Bergamaschi E., De Palma G., Mozzoni P., Vanni S., Vettori M.V., Broeckart F., Bernard A., Murri A. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, *163* (6), 1426-1431. Polymorphism of quinone-metabolizing enzymes and susceptibility to ozone-induced acute effects.

Beyer R.E., Segura-Aguilar J., Di Bernardo S., Cavazzoni M., Fato R., Fiorentini D., Galli M.C., Setti M., Landi L., Lenaz G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (6), 2528-2532. The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems.

Bianchet M.A., Erdemli S.B., Amzel L.M. *Vitamins & Hormones.* **2008**, *78*, 63-84. Structure, function, and mechanism of cytosolic quinone reductases.

Bianchet M.A., Faig M., Amzel L.M. *Methods in Enzymology.* **2004**, *382*, 144-174. Structure and Mechanism of NAD[P]H:Quinone Acceptor Oxidoreductases (NQO).

Bickers D.R., Athar M. *J. Invest Dermatol.* **2006**, *126* (12), 2565-2575. Oxidative stress in the pathogenesis of skin diseases.

Bindokas V.P., Jordán J., Lee C.C., Miller R.J. *J. Neurosci.* **1996**, *16* (4), 1324-1336. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine.

Bodini M.E., Bravo P.E., Arancibia M. V. *Polyhedron.* **1992**, *13* (3), 497-503. Voltammetric and spectroscopic study of the iron(II) complexes with the semiquinone of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) in aprotic medium.

Boutin J.A., Chatelain-Egger F., Vella F., Delagrangé P., Ferry G. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *151* (3), 213-228. Quinone reductase 2 substrate specificity and inhibition pharmacology.

Boutin J.A., Saunier C., Guenin S.P., Berger S., Moulharat N., Gohier A., Delagrangé P., Cogé F., Ferry G. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *447* (1), 12-19. Studies of the melatonin binding site location onto quinone reductase 2 by directed mutagenesis.

Brieger K., Schiavone S., Miller J., Krause K. *Swiss Med. Wkly.* **2012**, *142*:w13659. Reactive oxygen species: from health to disease.

Broniowska K.A., Oleson B.J., McGraw J., Naatz A., Mathews C.E., Corbett J.A. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (12), 7952-7960. How the location of superoxide generation influences the β -cell response to nitric oxide.

Brunmark A., Cadenas E. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *7* (4), 435-477. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications.

Buonocore G., Perrone S., Tataranno M. L. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* **2010**, *15* (4), 186-190. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species.

Buryanovskyy L., Fu Y., Boyd M., Ma Y., Hsieh T., Wu J.M., Zhang Z. *Biochemistry*. **2004**, *43* (36), 11417-11426. Crystal Structure of Quinone Reductase 2 in Complex with Resveratrol.

Cadenas E. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49* (2), 127-140. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism.

Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S. *Biol. Chem.* **2002**, *383* (6), 933-943. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases.

Calamini B., Santarsiero B.D., Boutin J.A., Mesecar A.D. *Biochem. J.* **2008**, *413* (1), 81-91. Kinetic, thermodynamic and X-ray structural insights into the interaction of melatonin and analogues with quinone reductase 2.

Carter W.O., Narayanan P.K., Robinson J.P. *J. Leukoc. Biol.* **1994**, *55* (2), 253-258. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells.

Chen S., Wu K., Knox R. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29* (3-4), 276-284. Structure-function studies of DT-diaphorase (NQO1) and NRH:quinone oxidoreductase (NQO2).

Chen S., Wu K., Zhang D., Sherman M., Knox R., Yang C.S. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56* (2), 272-278. Molecular characterization of binding of substrates and inhibitors of DT-diaphorase: combined approach involving site-directed mutagenesis, inhibitor-binding analysis, and computer modeling.

Clairmont A., Sies H., Ramachandran S., Lear J.T., Smith A.G., Bowers B., Jones P.W., Fryer A.A., Strange R.C. *Carcinogenesis*. **1999**, *20* (7), 1235-1240. Association of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO2) null with numbers of basal cell carcinomas: use of a multivariate model to rank the relative importance of this polymorphism and those at other relevant loci.

Conner E.M., Grisham M. B. *Nutrition*. **1996**, *12* (4), 274-277. Inflammation, free radicals, and antioxidants.

Dhakshinamoorthy S., Long II D.J., Jaiswal A.K. *Curr. Top. Cell. Regul.* **2000**, *36*, 201-216. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens.

Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan R. *J. Hypertens.* **2000**, *18* (6), 655-673. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases.

Dinkova-Kostova A.T., Talalay P. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 29 (3-4), 231-240. Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen.

Dröge W. *Physiol. Rev.* **2002**, 82 (1), 47-95. Free radicals in the physiological control of cells functions.

Dunlop R.A., Brunk U.T., Rodgers K.J. *IUBMB Life.* **2009**, 61 (5), 522-527. Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation.

Ernster L., Navazio F. *Acta Chem. Scand.* **1958**, 12 (3), 595-602. Soluble Diaphorase in Animal Tissues.

Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, 11 (1), 81-128. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.

Faig M., Bianchet M.A., Talalay P., Chen S., Winski S., Ross D., Amzel L.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97 (7), 3177-3182. Structures of recombinant human and mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductases: species comparison and structural changes with substrate binding and release.

Fernandes D.C., Wosniak J, Pescatore L.A., Bertoline M.A., Liberman M., Laurindo F.R.M., Santos C.X.C. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2006**, 292 (1), C413-C422. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems.

Ferry G., Hecht S., Berger S., Moulharat N., Coge F., Guillaumet G., Leclerc V., Yous S., Delagrangé P., Boutin J.A. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, 186 (2), 103-109. Old and new inhibitors of quinone reductase 2.

Fischer V., West P.R., Nelson S.D., Harvison P.J., Mason R.P. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260 (21), 11446-11450. Formation of 4-aminophenoxy free radical from the acetaminophen metabolite *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine.

Finkel T. *J. Cell Biol.* **2011**, 194 (1), 7-15. Signal transduction by reactive oxygen species.

Finkel T., Holbrook N.J. *Nature.* **2000**, 408 (6809), 239-247. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.

Fleming R.A., Drees J., Loggie B W., Russell G.B., Geisinger K.R., Morris R.T., Sachs D., McQuellon R.P. *Pharmacogenetics.* **2002**, 12 (1), 31-37. Clinical significance of a NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 polymorphism in patients with disseminated peritoneal cancer receiving intraperitoneal hyperthermic chemotherapy with mitomycin C.

Forman H.J., Augusto O., Brigelius-Flohe R., Dennery P.A., Kalyanaraman B., Ischiropoulos H., Mann G.E., Radi R., Roberts II L.J., Vina J., Davies K.J.A. *Free Rad. Biol. Med.* **2015**, 78, 233-235. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology.

Forman H.J., Davies K.J.A., Ursini F. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, 66, 24-35. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo.

Forman H.J., Zhang H., Rinna A. *Mol. Aspects. Med.* **2009**, 30 (1-2), 1-12. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis.

Foster C.E., Bianchet M.A., Talalay P., Amzel L.M. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 29 (3-4), 241-245. Structures of mammalian cytosolic quinone reductases.

Foster C.E., Bianchet M.A., Talalay P., Zhao Q., Amzel L.M. *Biochemistry.* **1999**, 38 (31), 9881-9886. Crystal structure of human quinone reductase type 2, a metalloflavoprotein.

Fu Y., Buryanovskyy L., Zhang Z. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 336 (1), 332-338. Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with cancer prodrug CB1954.

Fu Y., Buryanovskyy L., Zhang Z. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (35), 23829-23835. Quinone reductase 2 is a catechol quinone reductase.

Gaiwad N.W., Yang L., Rogan E.G., Cavaliere E.L. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, 46 (2), 253-262. Evidence for NQO2-mediated reduction of the carcinogenic estrogen ortho-quinones.

Go Y.M., Jones D.P. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, 1780 (11), 1273-1290. Redox compartmentalization in eukaryotic cells.

Goldstein S., Szejnberg L., Fridovich I., Czapski G. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, 41 (6), 937-941. Kinetic properties of Cu,Zn-superoxide dismutase as a function of metal content-order restored.

Gong X., Kole L., Iskander K., Jaiswal A.K. *Cancer Res.* **2007**, 67 (11), 5380-5388. NRH:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor p53 against 20S proteasomal degradation leading to stabilization and activation of p53.

Graumann R., Paris I., Martinez-Alvarado P., Rumanque P., Perez-Pastene C., Cardenas S.P., Marin P., Diaz-Grez F., Caviedes R., Caviedes P., Segura-Aguilar J. *Pol. J. Pharmacol.* **2002**, 54 (6), 573-579. Oxidation of dopamine to aminochrome as a mechanism for

neurodegeneration of dopaminergic systems in Parkinson's disease. Possible neuroprotective role of DT-diaphorase.

Graves P.R., Kwiek J.J., Fadden P., Ray R., Hardeman K., Coley A.M., Foley M., Haystead T.A.J. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62* (6), 1364-1372. Discovery of novel targets of quinolone drugs in the human purine binding proteome.

Guo Q., Corbett J.T., Yue C., Fann Y.C., Qian S.Y., Tomer K.B., Mason R.P. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (8), 6104-6110. Electron spin resonance investigation of semiquinone radicals formed from the reaction of ubiquinone 0 with human oxyhemoglobin.

Halliwell B., Gutteridge J.M. *Hum. Toxicol.* **1988**, *7* (1), 7-13. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease.

Harada S., Fujii C., Hayashi A., Ohkoshi N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *288* (4), 887-892. An association between idiopathic Parkinson's disease and polymorphisms of phase II detoxification enzymes: glutathione S-transferase M1 and quinone oxidoreductase 1 and 2.

Harada S., Tachikawa H., Kawanishi Y. *Psychiatr. Genet.* **2003**, *13* (4), 205-209. A possible association between an insertion/deletion polymorphism of the NQO2 gene and schizophrenia.

Hardeland R. *Endocrine.* **2005**, *27* (2), 119-130. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance.

Haseloff R.F., Mertsch K., Rohde E., Baeger I., Grigor'ev A. Blasig I.E. *FEBS lett.* **1997**, *418* (1-2), 73-75. Cytotoxicity of spin trapping compounds.

Hashimoto T., Nakai M. *Neurosci. Lett.* **2011**, *502* (1), 10-12. Increased hippocampal quinone reductase 2 in Alzheimer's disease.

Hawkins C.L., Davies M.J. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1840* (2), 708-721. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology.

Heyno E. *Université Paris Sud - Paris XI.* **2009**. Enzymes impliqués dans la production des formes réactives de l'oxygène dans les membranes plasmiques, les mitochondries et les chloroplastes.

Hsieh T.C., Bennet D.J., Lee Y.S., Wu E., Wu J.M. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (33), 4195-4202. In silico and biochemical analyses identify quinone reductase 2 as a target of piceatannol.

Inoue M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I., Utsumi K. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10* (23), 2495-2505. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life.

Iskander K., Barrios R.J., Jaiswal A.K. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (5), 1534-1542. NRH:quinone oxidoreductase 2-deficient mice are highly susceptible to radiation-induced B-cell lymphomas.

IUPAC. Connely N.G., Damhus T., Hartshorn R.M., Hutton A.T. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Angleterre. **2005**. Nomenclature of Inorganic Chemistry IUPAC recommendations 2005. ISBN : 0-85404-438-8.

Iyanagi T., Yamazaki I. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1970**, *216* (2), 282-294. One-electron-transfer reactions in biochemical systems V. Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DT-diaphorase).

Jaiswal A.K. *Biochemistry.* **1991**, *30* (44), 10647-10653. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin.

Jaiswal A.K. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (20), 14502-14508. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 2. Gene structure, activity, and tissue-specific expression.

Jaiswal A.K. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36* (10), 1199-1207. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression.

Jaiswal A.K., Bell D.W., Venugopal R., Testa J.R. *Pharmacogenetics.* **1999**, *9* (3), 413-418. Localization of human NQO1 gene to chromosome 16q22 and NQO2-6p25 and associated polymorphisms.

Jaiswal A.K., Burnett P., Adesnik M., McBride O.W. *Biochemistry.* **1990**, *29* (7), 1899-1906. Nucleotide and deduced amino acid sequence of a human cDNA (NQO2) corresponding to a second member of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene family. Extensive polymorphism at the NQO2 gene locus on chromosome 6.

Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J.A., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Roberts II L.J., Ischiropoulos H. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52* (1), 1-6. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations.

Kannan K., Holcombe R.F., Jain S.K., Alvarez-Hernandez X., Chervenak R., Wolf R.E., Glass J. *Mol. Cell. Biochem.* **2000**, *205* (1-2), 53-66. Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line.

Kerr M.E., Bender C.M., Monti E.J. *Heart Lung J. Crit. Care.* **1996**, *25* (3), 200-209. An introduction to oxygen free radicals.

Koppenol W.H., Butler J. *Adv. Free Radic. Biol. Med.* **1958**, *1* (1), 91-131. Energetics of interconversion reactions of oxyradicals.

Krajinovic M., Sinnett H., Richer C., Labuda D., Sinnett D. *Int. J. Cancer.* **2002**, *97* (2), 230-236. Role of NQO2, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia.

Kucera H.R., Livingstone M., Moscoso C.G., Gaikwad N.W. *Free Radic. Res.* **2013**, *47* (12), 1016-1026. Evidence for NQO1 and NQO2 catalyzed reduction of ortho- and para-quinone methides.

Kumagai S., Jikimoto T., Saegusa J. *Rinsho Byori.* 2003, *51* (2), 126-132. Pathological roles of oxidative stress in autoimmune diseases.

Kwiek J.J., Haystead T.A.J., Rudolph J. *Biochemistry.* **2004**, *43* (15), 4538-4547. Kinetic mechanism of quinone oxidoreductase 2 and its inhibition by the antimalarial quinolines.

Landi L., Fiorentini D., Galli M.C., Segura-Aguilar J., Beyer R.E. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22* (1-2), 329-335. DT-Diaphorase maintains the reduced state of ubiquinones in lipid vesicles thereby promoting their antioxidant function.

Last J.A., Sun W.M., Witschi H. *Environ. Health Perspect.* **1994**, *102* (10), 179-184. Ozone, NO and NO₂: oxidant air pollutants and more.

Lee J., Kim K.S., Lee M.H., Kim Y.S., Lee M.H., Lee S.E., Kim Y.K., Ryu M.J., Kim S.J., Choi M.J., Jo Y.S. *Yonsei Med. J.* **2013**, *54* (5), 1158-1167. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and NRH:quinone oxidoreductase 2 polymorphisms in papillary thyroid microcarcinoma: correlation with phenotype.

Levitt M., Spector S., Sjoerdsma A., Udenfriend S.J. *Pharmacol. Exp. Ther.* **1965**, *148*, 1-7. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart.

Lewis C.A., Parker S.J., Fiske B.P., McCloskey D., Gui D.Y., Green C.R., Vokes N.I., Feist A.M., Vander Heiden M., Metallo C.M. *Mol. Cell.* **2014**, *55* (2), 253-263. Tracing compartmentalized NADPH metabolism in the cytosol and mitochondrial of mammalian cells.

Liao S., Dulaney J.T., Williams-Ashman H.G. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 2981-2987. Purification and properties of a flavoprotein catalyzing the oxidation of reduced ribosyl nicotinamide.

Liao S., Williams-Ashman H.G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, *4* (3), 208-213. Enzymatic oxidation of some non-phosphorylated derivatives of dihydronicotinamide.

Li R., Bianchet M.A., Talalay P., Amzel L.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92* (19), 8846-8850. The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction.

Long II D.J., Iskander K., Gaikwad A., Arin M., Roop D.R., Knox R., Barrios R., Jaiswal A.K. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (48), 46131-46139. Disruption of dihydronicotinamide riboside:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) leads to myeloid hyperplasia of bone marrow and decreased sensitivity to menadione toxicity.

Long II D.J., Jaiswal A.K. *Gene.* **2000**, 252 (1-2), 107-117. Mouse NRH:quinone oxidoreductase (NQO2): cloning of cDNA gene and tissue specific expression.

Long II D.J., Jaiswal A.K. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, 129 (1-2), 99-112. NRH:quinone oxidoreductase2 (NQO2).

Mailliet F., Ferry G., Vella F., Berger S., Cogé F., Chomarar P., Mallet C., Guénin S-P., Guillaumet G., Viaud-Massuard M-C., Yous S., Delagrang P., Boutin J.A. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 71 (1-2), 74-88. Characterization of the melatoninerpic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme.

Mailliet F., Ferry G., Vella F., Thiam K., Delagrang P., Boutin J.A. *FEBS Lett.* **2004**, 578 (1-2), 116-120. Organs from mice deleted for NRH:quinone oxidoreductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT3.

Mariani E., Polidori M.C., Cherubini A., Mecocci P. *J. Chromatogr. B.* **2005**, 827 (1), 65-75. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases.

Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2003**, 17 (1), 24-38. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review.

Marla S.S., Lee J., Groves J.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94 (26), 14243-14248. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes.

Meneghini R. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, 23 (5), 783-792. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage.

Merker M.P., Audi S.H., Bongard R.D., Lindemer B.J., Krenz G.S. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2006**, 290 (3), 607-619. Influence of pulmonary arterial endothelial cells on quinone redox status: effect of hyperoxia-induced NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1.

Miettinen T.P., Björklund M. *Mol. Pharma.* **2014**, 11 (12), 4395-4404. NQO2 is a reactive oxygen species generating off-target for acetaminophen.

Molčanov K., Kojić-Prodić B., Roboz M. *Acta Crystallogr. B.* **2006**, B62, 1051-1060. Structural characterization of p-benzosemiquinone radical in a solid state: the radical stabilization by a low-barrier hydrogen bond.

Murias M., Jäger W., Handler N., Erker T., Horvath Z., Szekeres T., Nohl H., Gille L. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69* (6), 903-912. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship.

Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338* (1), 668-676. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects.

Nishiyama T., Izawa T., Usami M., Ohnuma T., Ogura K., Hiratsuka A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *394* (3), 459-463. Cooperation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and UDP-glucuronosyltransferases reduces menadione cytotoxicity in HEK293 cells.

Nishiyama T., Ohnuma T., Inoue Y., Kishi T., Ogura K., Hiratsuka A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *371* (2), 247-250. UDP-glucuronosyltransferases 1A6 and 1A10 catalyze reduced menadione glucuronidation.

Nolan K.A., Dunstan M.S., Caraher M.C., Scott K.A., Leys D., Stratford I.J. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11* (1), 194-203. In silico screening reveals structurally diverse, nanomolar inhibitors of NQO2 that are functionally active in cells and can modulate NFκB signaling.

Nolan K.A., Humphries M.P., Bryce R.A., Stratford I.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (9), 2832-2836. Imidazoacridin-6-ones as novel inhibitors of the quinone oxidoreductase NQO2.

Nosjean O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin J.M., Lefoulon F., Fauchere J. L., Delagrance P., Canet E., Boutin J.A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (40), 31311-31317. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2.

Novo E., Parola M. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* **2012**, *5* (Suppl1), S4. The role of redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis.

Ohgake S., Hashimoto K., Shimizu E., Koizumi H., Okamura N., Koike K., Matsuzawa D., Sekine Y., Inada T., Ozaki N., Iwata N., Harano M., Komiyama T., Yamada M., Sora I., Ujike H., Shirayama Y., Iyo M. *Addict. Biol.* **2005**, *10* (2), 145-148. Functional polymorphisms of the NQO2 gene is associated with methamphetamine psychosis.

Okada S., Farin F.M., Stapleton P., Viernes H., Quigley S.D., Powers K.M., Smith-Weller T., Franklin G.M., Longstreth W.T., Swanson P.D., Checkoway H. *Neurosci. Lett.* **2005**, *375* (3), 178-180. No association between Parkinson's disease and polymorphisms of the quinone oxidoreductase (NQO1, NQO2) genes.

Okubo T., Harada S., Higuchi S., Matsushita S. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2003**, *27* (8), 68S-71S. Association analyses between polymorphism of the phase II detoxification enzymes (GSTM1, NQO1, NQO2) and alcohol withdrawal symptoms.

Ostrousky P., Meged S., Loewenthal R., Valevski A., Weizman A., Carp H., Gazit E. *Tissue Antigens*. **2003**, 62 (6), 483-491. NQO2 gene is associated with clozapine-induced agranulocytosis.

Patrick B.A., Das A., Jaiswal A.K. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, 53 (10), 1886-1893. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protects bladder epithelium against painful bladder syndrome in mice.

Pedersen J.A. *Spectroc. Acta A.* **2002**, 58 (6), 1257-1270. On the application of electron paramagnetic resonance in the study of naturally occurring quinones and quinols.

Pegan S.D., Sturdy M., Ferry G., Delagrangre P., Boutin J.A., Mesecar A.D. *Protein Sci.* **2011**, 20 (7), 1182-1195. X-ray structural studies of quinone reductase 2 nanomolar range inhibitors.

Pietsch E.C., Humbey O., Murphy M.E. *Oncogene*. **2006**, 25 (11), 2502-2517. Polymorphisms in the p53 pathway.

Pink J.J., Planchon Sarah M., Tagliarino C., Varnes M.E., Siegel D., Boothman D.A. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (8), 5416-5424. NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of b-lapachone toxicity.

Poderoso J.J., Carreras M.C., Schöpfer F., Lisdero C.L., Riobó N.A., Boveris A.D., Boveris A., Cadenas E. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26 (7-8), 925-935. The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance.

Ranguenovela K., Rice A.B., Khajo A., Triquigneaux M., Garantziotis S., Magliozzo R.S., Mason R.P. *Free Rad. Biol. Med.* **2012**, 52 (8), 1264-1271. Formation of reactive sulfite-derived free radicals by the activation of human neutrophils : an ESR study.

Reybier K., Perio P., Ferry G., Bouajila J., Delagrangre P., Boutin J.A., Nepveu F. *Free Radic. Res.* **2011**, 45 (10), 1184-1195. Insights into the Redox Cycle of Human Quinone Reductase 2.

Reybier K., Nguyen T.H.Y., Ibrahim H., Perio P., Montrose A., Fabre P-L., Nepveu F. *Bioelectrochemistry*. **2012**, 88, 57-64. Electrochemical behavior of indolone-*N*-oxides: relationship to structure and antiplasmodial activity.

Rogers L.J., Lake A.J., White K., Hardy M., White E. *Bioscience Horizons*. **2014**, 7, (hzt012). Effects of superoxide donor menadione in adult Rat myocardium are associated with increased diastolic intracellular calcium.

Ross D., Beall H.D. *Br. J. Cancer. Suppl.* **1996**, 27, 1-8. Enzymology of bioreductive drug activation.

Ross D., Kepa J.K., Winski S.L., Beall H.D., Anwar A., Siegel D. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *129* (1-2), 77-97. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms.

Sampaio L. de F.S., Mesquita F.P., de Sousa P.R.M., Silva J.L., Alves C.N. F. P. Mesquita, P. R. M. de Sousa, J. L. Silva, and C. N. Alves. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2014**, *38*, 119-126. The melatonin analog 5-MCA-NAT increases endogenous dopamine levels by binding NRH:quinone reductase enzyme in the developing chick retina.

Sánchez-Ferrer A., Rodriguez-López J.N., Garcia-Cánovas F., Garcia-Carmona F. *Biochim. Biophys Acta.* **1995**, *1247*(1):1-11. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism.

Schelonka L.P., Siegel D., Wilson M.W., Meininger A., Ross D. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41* (7), 1617-1622. Immunohistochemical localization of NQO1 in epithelial dysplasia and neoplasia and in donor eyes.

Schlager J.J., Powis G. *Int. J. Cancer.* **1990**, *45* (3), 403-409. Cytosolic NAD(P)H:(quinone-acceptor) oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol.

Segura-Aguilar J., Paris I., Muñoz P., Ferrari E., Zecca L., Zucca F.A. *J. Neurochem.* **2014**, *129* (6), 898-915. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease.

Shah M.H., Liu G.S., Thompson E.W., Disting D.J., Peshavariya H.M. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, *150* (3), 523-534. Differential effects of superoxide dismutase and superoxide dismutase/catalase mimetics on human breast cancer cells.

Shen J., Barrios R.J., Jaiswal A.K. *Cancer Res.* **2010**, *70* (3), 1006-1014. Inactivation of the quinone oxidoreductases NQO1 and NQO2 strongly elevates the incidence and multiplicity of chemically induced skin tumors.

Shi H., Timmins G., Monske M., Burdick A., Kalyanaraman B., Liu Y., Clément J.L., Burchiel S., Liu K. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *437* (1), 59-68. Evaluation of spin trapping agents and trapping conditions for detection of cell-generated reactive oxygen species.

Siegel D., Franklin W.A. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4* (9), 2065-2070. Immunohistochemical detection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in human lung and lung tumors.

Siegel D., Ross D. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29* (3-4), 246-253. Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues.

Siegel D., Yan C., Ross D. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83* (8), 1033-1040. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones.

Smith M.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96* (14), 7624-7626. Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer.

Sosa V., Moliné T., Somoza T., Paciucci R., Kondoh H., LLeonart M.E. *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12* (1), 376-390. Oxidative stress and cancer: an overview.

Strassburg A., Strassburg C.P., Manns M.P., Tukey R.H. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61* (2), 320-325. Differential gene expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and NRH:quinone oxidoreductase in human hepatocellular and biliary tissue.

Sun Y. *Mol. Carcinog.* **2006**, *45* (6), 409-415. P53 and its downstream proteins as molecular targets of cancer.

Takagi S., Kinouchi Y., Hiwatashi N., Hirai M., Suzuki S., Takahashi S., Negoro K., Obana N., Shimosegawa T. *Anticancer Res.* **2002**, *22* (5), 2749-2752. Correlative polymorphism of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) with telomere shortening in colorectal cancer.

Uttara B., Singh A.V., Mahajan R. *Curr. Neuropharmacol.* **2009**, *7* (1), 64-74. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options.

Van der Hauwaert C., Savary G., Buob D., Leroy X., Aubert S., Flamand V., Hennino M.F., Perrais M., Lo-Guidice J.M., Broly F., Cauffiez C., Glowacki F. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *279* (3), 409-418. Expression profiles of genes involved in xenobiotic metabolism and disposition in human renal tissues and renal cell models.

Wallin R., Hutson S. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257* (4), 1583-1586. Vitamin K-dependent carboxylation. Evidence that at least two microsomal dehydrogenases reduce vitamin K1 to support carboxylation.

Wang W., Jaiswal A.K. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37* (8), 1231-1243. Sp3 repression of polymorphic human NRH:quinone oxidoreductase 2 gene promoter.

Wang W., Jaiswal A.K. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40* (7), 1119-1130. Nuclear factor Nrf2 and antioxidant response element regulate NRH:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) gene expression and antioxidant induction.

Wang W., Le W.D., Pan T., Stringer J.L., Jaiswal A.K. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **2008**, *63* (2), 127-134. Association of NRH:quinone oxidoreductase 2 gene promoter polymorphism with higher gene expression and increased susceptibility to Parkinson's disease.

Ward J.F. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, *66* (5), 427-432. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences.

Williams D.L. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **2008**, 38 (1), 179-192. Oxidative stress and the eye.

Winger J. A., Hantschel O., Superti-Furga G., Kuriyan J. *BMC Struct. Biol.* **2009**, 9, 7-19. The structure of the leukemia drug imatinib bound to human quinone reductase 2 (NQO2).

Winterbourn C.C. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, 1840 (2), 730-738. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species.

Wu K., Knox R., Sun X.Z., Joseph P., Jaiswal A.K., Zhang D., Deng P.S., Chen S. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 347 (2), 221–228. Catalytic properties of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-2 (NQO2), a dihydronicotinamide riboside dependent oxidoreductase.

Xu J., Patrick B.A., Jaiswal A.K. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288 (48), 34799-34808. NRH: quinone oxidoreductase 2 (NQO2) protein competes with the 20 S proteasome to stabilize transcription factor CCAAT enhancer-binding protein α (C/EBP α), leading to protection against γ radiation-induced myeloproliferative disease.

Yu K.D., Di G.H., Yuan W.T., Fan L., Wu J., Hu Z., Shen Z.Z., Zheng Y., Huang W., Shao Z.M. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, 18 (13), 2502-2517. Functional polymorphisms, altered gene expression and genetic association link NRH:quinone oxidoreductase 2 to breast cancer with wild-type p53.

Zhang J.H., Li Y., Wang R., Geddert H., Guo W., Wen D.G., Chen Z.F., Wei L.Z., Kuang G., He M., Zhang L.W. Wu M.L, Wang S.J. *World J. Gastroenterol.* **2003**, 9 (7), 1390-1393. NQO1 C609T polymorphism associated with esophageal cancer and gastric cardiac carcinoma in North China.

Zhao H., Joseph J., Fales H.M., Sokoloski E.A., Levine R.L., Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005**, 102 (16), 5727-5732. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence.

Zhao H., Kalivendi Z., Zhang H., Joseph J., Nithipatikom K., Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, 34 (11), 1359-1368. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide.

Zhao Q., Yang X.L., Holtzclaw W.D., Talalay P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94 (5), 1669-1674. Unexpected genetic and structural relationships of a long-forgotten flavoenzyme to NAD(P)H:quinone reductase (DT-diaphorase).

Zhu B.Z., Kalyanaraman B., Jiang G.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**, 104 (45), 17575-17578. Molecular mechanism for metal-independent production of hydroxyl radicals by hydrogen peroxide and halogenated quinones.

Zielonka J., Kalyanaraman B. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 48 (8), 983-1001. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of superoxide formation: another inconvenient truth.

Zielonka J., Sarna T., Roberts J.E., Wishart J., Kalyanaraman B. *Arch. Biochem. Biophys.* 2006, 456 (1), 39-47. Pulse radiolysis and steady-state analyses of the reaction between hydroethidine and superoxide and other oxidants.

Zielonka J., Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B. *Nature protocols.* 2008, 3 (1), 8-21. Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems : a unique marker product of superoxide and hydroethidine.

Zielonka J., Zielonka M., Sikora A., Adamus J., Joseph J., Hardy M., Ouari O., Dranka B.P., Kalyanaraman B. *J. Biol. Chem.* 2012, 287 (5), 2984-2995. Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems.

TITLE: Quinone/quinone reductase 2 redox cycle and consequences on the production of reactive oxygen species in the cellular context.

ABSTRACT

Quinone reductase 2 or QR2 is an enzyme that, like its counterpart QR1, plays a role in detoxification of the highly reactive quinones by reducing them into hydroquinones. On one hand, it has been observed at the cellular and tissue level that the activity of this flavoprotein could have deleterious effects by triggering an overproduction of reactive oxygen species (ROS). On the other hand, overexpression or under expression of QR2 has been observed in some neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. In this context, this work focused on the study of reactive oxygen species produced during the quinone / QR2 redox cycle and their variations depending on the nature of the quinone, on both purified protein and cell models, in comparison to QR1. The redox properties of the substrates, co-substrates and inhibitors of QR2 studied by electrochemistry allowed to classify them according to their capacity to be reduced. The enzymatic activity of the protein, either purified or intracellular, was followed by various methodologies (electron paramagnetic resonance, UV-visible and fluorescence spectroscopy, U(H)PLC-MS, confocal fluorescence microscopy). Production of superoxide radical is observed in the presence of cell lines overexpressing or not QR1 and QR2. Quinones are reduced enzymatically to form hydroquinones *via* the activity of quinone reductase (QR1 and QR2) and semiquinone *via* the activity of one electron reductases (e.g. CytP540 reductase). Reoxidation of these products is responsible for a greater or lesser production of the superoxide radical, according to the initial structure of the quinone and the affinity for different reductases. Menadione causes a higher production of cellular superoxide in the absence of QR1 and QR2. These analyzes have also shown that, like its counterpart QR1, QR2 is capable of reducing *ortho*-quinones including catecholquinones (aminochrome, dopachrome, adrenochrome) known for their neuronal toxicity.

Keywords: Quinone reductase 2, oxidative stress, EPR, electrochemistry, *ortho* and *para*-quinones, redox probe

AUTEUR : Laure-Estelle CASSAGNES

TITRE : Cycle redox quinone/quinone réductase 2 et conséquences sur la production d'espèces oxygénées réactives dans le contexte cellulaire.

DIRECTEUR DE THÈSE : Professeur Françoise Nepveu

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Faculté de Pharmacie, Université Toulouse III Paul Sabatier, le lundi 28 septembre 2015.

RÉSUMÉ

La quinone réductase 2 ou QR2 est une enzyme qui, comme son homologue QR1, joue un rôle de détoxification des quinones, molécules fortement réactives, en les réduisant en hydroquinones. Cependant, il a été observé au niveau cellulaire et tissulaire que l'activité de cette flavoprotéine pouvait avoir des effets délétères en déclenchant une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). D'autre part, on observe une surexpression ou une sous expression de QR2 dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, ce travail a porté sur l'étude des espèces oxygénées réactives produites lors du cycle redox quinone / QR2 et leurs variations en fonction de la nature de la quinone, sur protéine purifiée et sur modèles cellulaires comparativement à QR1. Les propriétés d'oxydo-réduction des substrats, co-substrats et inhibiteurs de QR2 étudiées par électrochimie ont permis de les classer en fonction de leur capacité à être réduits. L'activité enzymatique de la protéine, qu'elle soit purifiée ou intracellulaire, a été suivie par différentes méthodologies (résonance paramagnétique électronique, spectroscopie UV-visible et de fluorescence, U(H)PLC-MS, microscopie confocale de fluorescence). La production du radical superoxyde est observée en présence de lignées cellulaires surexprimant ou non QR1 et QR2. Les quinones sont réduites enzymatiquement pour donner des hydroquinones *via* l'activité des quinones réductases (QR1 et QR2) et des semiquinones *via* l'activité de réductases à un électron (CytP540 réductase par exemple). La réoxydation de ces produits est responsable d'une production plus ou moins forte de radicaux superoxydes selon la structure initiale de la quinone et l'affinité pour les différentes réductases. La ménadione provoque une production cellulaire de superoxyde plus importante en l'absence de QR1 et QR2. Ces analyses ont également démontré que, comme son homologue QR1, QR2 est capable de réduire les *ortho*-quinones dont certaines catécholquinones (aminochrome, dopachrome, adrénochrome) reconnues pour leur toxicité neuronale.

MOTS-CLÉS : Quinone réductase 2, stress oxydant, RPE, électrochimie, *ortho* et *para*-quinones, sonde redox

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Chimie, Biologie, Santé

Laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement (PHARMA-DEV), UMR 152, IRD, Université Paul Sabatier, 35 chemin des Maraîchers, 31400 Toulouse