



HAL
open science

Etude de la métabolisation intracellulaire de quinones, du stress oxydant généré et des processus de détoxification associés

Monivan Chhour

► **To cite this version:**

Monivan Chhour. Etude de la métabolisation intracellulaire de quinones, du stress oxydant généré et des processus de détoxification associés. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30004 . tel-02930321

HAL Id: tel-02930321

<https://theses.hal.science/tel-02930321>

Submitted on 4 Sep 2020

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

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



THÈSE

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 :

Monivan CHHOUR

le vendredi 24 janvier 2020

Titre :

Etude de la métabolisation intracellulaire de quinones, du stress oxydant
généralisé et des processus de détoxification associés

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :

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

Directeur/trice(s) de Thèse :

Pr. Karine REYBIER

Jury :

Dr. Jérôme SANTOLINI, Université Paris-Saclay	Rapporteur
Pr. Peter FALLER, Université de Strasbourg	Rapporteur
Dr. Grégory DURAND, Université d'Avignon	Examineur
Pr. Elisa BOUTET-ROBINET, Université Toulouse 3, Paul Sabatier	Examineur
Dr. Jean Albert BOUTIN, Institut de Recherches Servier, Croissy-sur-Seine	Invité
Dr. Gilles FERRY, Institut de Recherches Servier, Croissy-sur-Seine	Invité
Pr. Karine REYBIER, Université Toulouse 3, Paul Sabatier	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier infiniment madame la **Professeure Karine REYBIER**, responsable de l'équipe RedStress du laboratoire Pharmadev, Professeur de chimie analytique à l'Université Toulouse III, ma directrice de thèse, de m'avoir accepté au sein de son équipe. Vos visions et vos explications ont toujours été très claires et instructives. Je vous remercie également pour votre bienveillance, votre disponibilité et pour le temps que vous m'avez consacré pour que je puisse avancer dans ma thèse. Veuillez trouver ici la marque de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier monsieur le **Docteur Jérôme SANTOLINI**, chercheur-CEA, responsable de l'équipe Stress Oxydant et Détoxication de l'Institut de Biologie Intégrative de la cellule de l'Université Paris-Saclay et le **Professeur Peter FALLER**, Professeur à l'Université de Strasbourg et membre de l'Institut de Chimie de Strasbourg, d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse en tant que rapporteur. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres du jury. Veuillez trouver ici la marque de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier madame la **Professeure Elisa BOUTET-ROBINET**, Professeur de toxicologie à l'Université Toulouse III Paul Sabatier et membre du laboratoire TOXALIM, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier monsieur le **Docteur Grégory DURAND**, maître de conférences à l'Université d'Avignon et responsable du laboratoire UMR 5247 IBMM – Institut des biomolécules Max Mousseron, d'avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examineur. C'est également un honneur pour moi de vous compter parmi les membres du jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier monsieur le **Docteur Jean Albert BOUTIN**, directeur de la prospective de l'Institut de Recherches SERVIER pour m'avoir apporté une aide précieuse tout au long de ma thèse. Votre soutien scientifique et vos conseils ont permis d'éclairer mes travaux de recherche. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier monsieur le **Docteur Gilles FERRY**, chef de projet d'Institut de Recherches SERVIER pour ses conseils, son expérience précieuse et toutes les discussions fructueuses que nous avons eues lors de nos réunions du projet. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier monsieur le **Professeur Nicolas FABRE**, directeur du laboratoire, de m'avoir m'accueilli dans le laboratoire pendant ces trois ans de thèse.

Je tiens à remercier madame la **Professeure Françoise NEPVEU**, pour ses enseignements dispensés dans le cadre du master Mékong Pharma qui m'ont donné envie de poursuivre dans la voie de la recherche et pour son soutien, ses conseils, sa bienveillance et ses encouragements tout au long de ces années de thèse.

Je tiens à remercier monsieur le **Professeur Paul-Louis FABRE** pour son soutien, ses conseils, sa bienveillance et l'apprentissage de l'électrochimie.

Je tiens à remercier **Pierre PERIO** pour son humeur chaleureuse, sa disponibilité et son aide précieuse au quotidien pendant ces trois ans qui m'ont permis de réaliser ces travaux de thèse. J'ai toujours su trouver une oreille attentive et bienveillante.

Je tiens à remercier **Jan SUDOR** pour son soutien, ses conseils et l'apprentissage de l'électrophorèse capillaire.

Je tiens également à remercier **Hélène TERNET-FONTEBASSO** pour sa gentillesse et son aide pour la réalisation des mesures de réactions enzymatiques, réalisées la plupart du temps dans l'urgence.

Je tiens à remercier Mohamed HADDAD pour sa bienveillance inoubliable ainsi que Franck MARIE-SAINTE et Ingrid BAREILLE pour leur gestion administrative très efficace.

Je tiens à remercier mes collègues du laboratoire : Alexis VALENTIN, Valérie JULLIAN, Guillaume MARTI, Sandra BOURGEADE-DELMAS, Stéphane BERTANI, Geneviève BOURDY, Valérie CRISTOFOLI, Anne-Cécile LE LAMER, Marieke VANSTEELANDT, AUBOUY Agnès, Chiobouaphong PHAKEOVILAY, Justine CHERVIN, Manon TRINEL, Cynthia GIRADI, François CHASSAGNE, Ennaji NAJAH, Alix POINSON, Fatima BARAKAT, Asih TRIASTUTI, Mahamane HAIDARA, Mathias SIMPLICIEN, Marion VALETTE, Jade ROYO, Phimpha PABORIBOUNE, Elise CROSSAY, Simon DUTHEN, Ioannis TSAMESIDIS, Inès CASTRO, Romina TAPIA, Fabio FRANCISCO, Marcellin MESSI, Chinedu EGWU, CAMARA Aissata, Faustine GUILLE-PHOTIN, Lauryne MEUNIER, Philavanh SITBOUNLANG. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier l'Ecole Doctorale Science de la Matière, monsieur le Professeur Eric BENOIST et madame Soraya BERKOUK pour leur bienveillance et leur appui administratif. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance. Je remercie également l'association de doctorant D-Smart pour le temps passé ensemble y compris les moments de fête.

Je remercie tous mes enseignants de la faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences de la Santé du Cambodge, particulièrement monsieur Sothea KIM qui m'a donné l'envie d'être enseignant. Je remercie également la Fondation Pierre Fabre, particulièrement monsieur Jean CROS, madame Françoise NEPVEU, monsieur Hot BUN, madame Florence DELCHER et tous mes professeurs pendant le parcours de Master Mékong Pharma me donnant ainsi l'opportunité de poursuivre ce parcours et d'apprendre. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier l'AEPK (Amicale des Etudiants en pharmacie et des Pharmaciens Khmers) pour son soutien. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier François HENRIC pour sa gentillesse, ses conseils, son aide indispensable pour la vie quotidienne à Toulouse dès le premier jour en France.

Je tiens à remercier mes amis cambodgiens pour les bons moments que l'on a partagés ensemble en voyage et en soirée chez François.

Je remercie aussi Grégory CORDILLOT, Anna DURIS, Benoit BOLTE, Nicolas GONZALEZ, Laurence LACASTAIGNERATTE, Yoann MENON, Sébastien POLACK, Florent MAMAT, Gérard SEGURA, Martin STILLMATIC, Sylvain VERNET, Pascal et spécialement Fabrice CHOUQUET qui m'ont soutenu, et détendu lors de nos moments partagés.

Je remercie mes parents pour leurs conseils et leur soutien tout au long de mes études.

Je remercie mes grands-parents pour leur gentillesse. Je suis inspiré par votre bienveillance qui est incomparable.

Une pensée à ma grand-mère. Ton âme reste toujours dans mon cœur.

Enfin, je remercie chaleureusement ma femme et ma petite fille de m'avoir toujours soutenu et d'avoir accepté une si longue absence.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION GENERALE	11
CHAPITRE 1 – REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1. QUINONES	14
2. QUINONE-REDUCTASES	17
2.1. NAD(P)H : QUINONE-REDUCTASE 1 (QR1) (EC 1.6.5.2)	17
2.1.1. <i>Structure</i>	18
2.1.2. <i>Mécanisme d'action</i>	19
2.2. NRH : QUINONE-REDUCTASE 2 (QR2) (E.C.1.10.99.2)	20
2.2.1. <i>Structure</i>	21
2.2.2. <i>Mécanisme d'action</i>	22
3. QUINONE-REDUCTASES ET MALADIES NEURODEGENERATIVES.....	24
3.1. NEURODEGENERESCENCE ET STRESS OXYDANT	24
3.1.1. <i>Maladie d'Alzheimer</i>	24
3.1.2. <i>Maladie de Parkinson</i>	26
3.2. CATECHOLAMINES	27
3.2.1. <i>Toxicité de la dopamine</i>	28
3.2.2. <i>Toxicité de la noradrénaline</i>	34
3.3. QR2 ET NEURODEGENERESCENCE	35
4. DETECTION ET QUANTIFICATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ROS)	36
4.1. RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE.....	37
4.2. FLUORESCENCE	38
4.3. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE.....	39
4.4. COMPARAISON DES METHODES	41
CONCLUSION.....	42
CHAPITRE 2 – NOTIONS DE SPECIFICITE DE LA QUINONE-REDUCTASE 2	44
INTRODUCTION.....	45
1. CAS DES PARA-QUINONES	48
1.1. ACTIVITES ENZYMATIQUES DE QR2 VIS-A-VIS DES PARA-QUINONES	49
1.2. PRODUCTION DE RADICAUX ASSOCIES A LA REDUCTION DE LA QUINONE	51
2. CAS DES ORTHO-QUINONES.....	53
3. AUTRES SUBSTRATS.....	56
CONCLUSION.....	60

CHAPITRE 3 – DEREGULATION REDOX INDUITE PAR LA METABOLISATION DES QUINONES EN PRESENCE DE QR2	62
INTRODUCTION	63
1. ETUDE DE LA PRODUCTION DE ROS INDUITE PAR LA METABOLISATION DE PARA ET ORTHO-QUINONES PAR DES CELLULES K562	64
1.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES	64
1.2. METABOLISATION DE PARA-QUINONES	65
1.3. METABOLISATION D'ORTHO-QUINONES	69
2. ETUDE DE LA PRODUCTION DE ROS INDUITE PAR LA METABOLISATION DE PARA ET ORTHO-QUINONES PAR DES CELLULES SH-SY5Y	72
2.1. METABOLISATION DE LA MENADIONE	73
2.1.1. Analyse des spectres	73
2.1.2. Analyse quantitative	76
2.2. METABOLISATION DE L'ADRENOCROME	78
2.2.1. Analyse des spectres	78
3. NEURONES PRIMAIRES	81
3.1. Analyse des spectres	81
3.2. Analyse quantitative	82
CONCLUSION	85
CHAPITRE 4 – COOPERATION DE QR2 AVEC UNE ENZYME DE CONJUGAISON POUR LA DETOXIFICATION DE LA MENADIONE	87
INTRODUCTION	88
1. CHOIX DE LA NOUVELLE LIGNEE CELLULAIRE : SH-SY5Y-QR2-UGT1A6	90
2. EFFET DE LA PRESENCE D'UNE ENZYME DE CONJUGAISON SUR LA PRODUCTION DE ROS MESUREE PAR RPE	91
2.1. ANALYSE SUR CELLULES, SH-SY5Y	91
2.2. ESSAIS SUR HOMOGENAT CELLULAIRE	93
3. EFFET DE LA PRESENCE D'UNE ENZYME DE CONJUGAISON SUR LA PRODUCTION DE SUPEROXYDE MESUREE PAR LC-MS	95
3.1. PRINCIPE DE LA METHODE	95
3.2. RESULTATS DES ANALYSES LC-MS	95
4. DETECTION DU METABOLITE GLUCURONIDE	98
4.1. PRINCIPE	98
4.2. RESULTATS	98
5. EFFET SUR L'HOMEOSTASIE REDOX CELLULAIRE	105
5.1. PRINCIPE DU TEST	105
5.2. EFFET DE L'EXPRESSION DE QR2	107
5.3. EFFET DE LA CO-EXPRESSION DE QR2 ET UGT1A6	108
5.4. VIABILITE DES CELLULES	110
5.5. INDUCTION DES ENZYMES ANTIOXYDANTES	111
CONCLUSION	113

CONCLUSION GENERALE	114
PARTIE EXPERIMENTALE	117
1. MATERIEL	118
1.1. ORIGINE DES REACTIFS	118
1.2. SOUCHES CELLULAIRES	119
1.2.1. <i>Procédé de culture des lignées SH-SY5Y</i>	120
2. METHODES EXPERIMENTALES	120
2.1. EXPERIENCES SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES QUINONE REDUCTASES	120
2.2. EXPERIENCES PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE)	121
2.2.1. <i>Expériences sur enzyme purifiée</i>	121
2.2.2. <i>Expériences sur cellules</i>	122
2.3. MESURE DE LA PRODUCTION DE SUPEROXYDE DANS LES CELLULES PAR UHPLC-MS	123
2.3.1. <i>Synthèse du standard 2-hydroxyéthidium (2-OH-E+)</i>	124
2.3.2. <i>Traitement des cellules</i>	126
2.3.3. <i>Analyse UHPLC-MS</i>	126
3. EXPERIENCES PAR FLUORESCENCE AVEC LE THIAZOLE ORANGE (TO)	127
4. EXPERIENCES DE VIABILITE CELLULAIRE	127
BIBLIOGRAPHIE	129
LISTE DE FIGURES	143
LISTE DES TABLEAUX	147
LISTE DES SCHEMAS	147

Liste des abréviations

*CH₃ : radical méthyle
*NO : radical monoxyde d'azote
*OH : radical hydroxyle
2-OH-E⁺ : 2-hydroxyéthidium
3,5-DTBBQ : 3,5-di-*tert-butyl-o*-benzoquinone

A

APP : protéine précurseur du peptide amyloïde

B

B₀ : champ magnétique
BNAH : 1-benzyl-1,4-dihydronicotinamide

C

CBA : acide coumarine-boronique
CHO : cellules d'Ovaires de Hamster Chinois
CO₂ : dioxyde de carbone
COMT : catéchol-*O*-méthyletransférase
CoQ0 : coenzyme Q0
CoQ10 : coenzyme Q10
CoQ2 : coenzyme Q2

D

DAT : dopamine transporteur
dB : décibels
DCPIP dichlorophénol indophénol
DHE : dihydroéthidium , hydroéthidine
DMPO : 5,5-diméthyl-1-pyrroline *N*-oxide
DMSO : diméthylsulfoxyde
DTPA : acide diéthylènetriamine penta acétique

E

E⁺ : éthidium
EC : enzyme Commission numbers
EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique
ε : coefficient d'absorption molaire

F

FAD : flavine adénine dinucléotide
FMN flavine mononucléotide

G

g_e facteur de Landé
GlutR : glutathion réductase

H

H₂DCFDA : 2',7'-dichlorofluoresceine diacétate

HO-1 : hème oxygénase

K

KO : knock-out

L

LUCS : light-up cell system

M

MA : maladie d'Alzheimer

MP : maladie de Parkinson

MPP⁺ : 1-méthyl-4-phénylpyridinium

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,4-tétrahydropyridine

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium

N

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NDS : nitrosodisulfonate de sodium

NMH : *N*-méthyl-dihydronicotinamide

NQO1 : quinone-réductase 1

NQO2 : quinone-réductase 2

Nrf2 : nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

NRH : *N*-ribosyl-dihydronicotinamide

NT : non transduite

O

O₂^{•-} : radical superoxyde

ONOO⁻ : peroxydinitrite

P

PBN : *N-tert-butyl-α*-phénylnitronne

PS-1 : préséniline-1

PTP : pores de transition de perméabilité

Q

QR1 : quinone-réductase 1, DT-diaphorase, NQO1

QR2 : quinone-réductase 2, NQO2

R

ROS : espèces réactives de l'oxygène, terme anglais : reactive oxygen species

RPE : résonance paramagnétique électronique

S

S29434 : [2-(2-methoxy-5*H*-1,4*b*,9-triaza(indeno[2,1-*a*]inden-10-yl)éthyl)-2-furamide
SOD : superoxyde dismutase

T

TO : thiazole orange
 t_R : temps de rétention

U

UDPGA : uridine diphosphate glucuronique acide
UGT : UDP-glucuronosyltransférases

V

VMAT : les transporteurs vésiculaires des monoamines

W

WT : wild-type
 μ_B : magnéton de Bohr

Introduction Générale

Les quinones sont des composés organiques très réactifs donc facilement réductibles à un ou deux électrons. La métabolisation intracellulaire de ces quinones par des réductases à un électron telles que le cytochrome P450 ou d'autres flavoprotéines réductases génèrent des semiquinones instables à l'origine de la production de radicaux libres conduisant à un stress oxydant. Les quinone-réductases sont des enzymes qui catalysent la réduction des quinones à deux électrons pour former des hydroquinones évitant ainsi la formation de semiquinones toxiques. La forme hydroquinone est chimiquement moins réactive donc plus stable que la forme semiquinone. Pour cette raison les quinone-réductases sont considérées comme des enzymes de détoxification. Cependant des analyses antérieures ont montré que ce caractère détoxifiant était remis en cause pour certains types de quinone et dépendait aussi du type de cellules considéré (**Cassagnes *et al.*, 2015**).

Ainsi, afin de mieux comprendre le rôle de QR2, des analyses ont été réalisées en présence de différents types de cellules surexprimant QR2. En particulier, compte tenu du lien déjà établi entre QR2 et perte et acquisition de mémoire (**Benoit *et al.*, 2010**), d'une part, et de l'implication du stress oxydant dans les processus de neurodégénérescence (**Alam *et al.*, 1997 ; Sayre *et al.*, 2001**), d'autre part, nos études se sont orientées vers des cellules neuronales de type neurones primaires et lignées de neuroblastomes. Ainsi l'objectif de cette thèse est de mieux comprendre le rôle de QR2 en étudiant la métabolisation intracellulaire de quinones d'intérêt, le stress oxydant induit et les procès de détoxification associés.

Ce mémoire s'organise en quatre chapitres. Après une étude bibliographique dans le Chapitre 1 portant sur les quinones, les quinone-réductases et leurs rôles respectifs dans la neurodégénérescence, le Chapitre 2 présente une étude sur la spécificité de la quinone-réductase 2 vis-à-vis de différents substrats quinones ou pseudo-quinones par comparaison avec son homologue la quinone-réductase 1. Le Chapitre 3 est consacré à l'étude de la toxicité de 2 quinones (la ménadione et l'adrénochrome) sur des cellules neuronales en présence de quinone-réductases 2 *via* une étude du stress oxydant généré. Enfin dans le Chapitre 4, nous avons étudié sur ces mêmes cellules et par différentes méthodes originales d'analyse du stress oxydant, l'effet de la coopération de la quinone-réductase 2 avec une enzyme de conjugaison vis-à-vis de la toxicité de ces deux quinones.

Chapitre 1

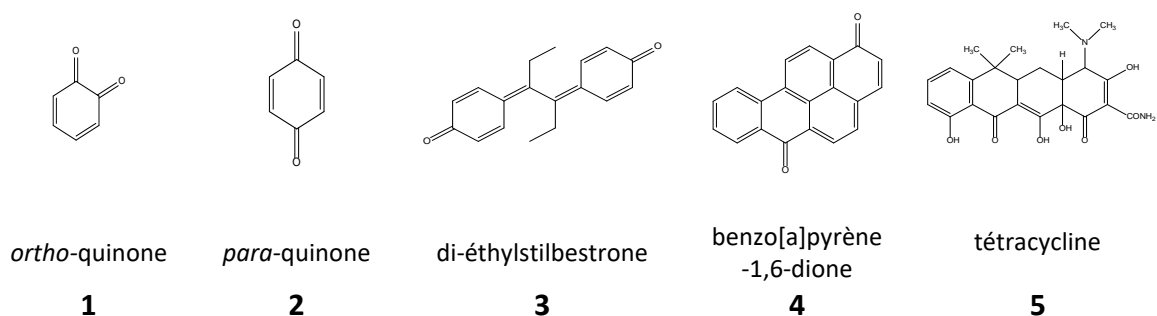
Revue bibliographique

Chapitre 1 – Revue bibliographique

1. QUINONES	14
2. QUINONE-REDUCTASES	17
2.1. NAD(P)H : QUINONE-REDUCTASE 1 (QR1) (EC 1.6.5.2)	17
2.1.1. <i>Structure</i>	18
2.1.2. <i>Mécanisme d'action</i>	19
2.2. NRH : QUINONE-REDUCTASE 2 (QR2) (E.C.1.10.99.2)	20
2.2.1. <i>Structure</i>	21
2.2.2. <i>Mécanisme d'action</i>	22
3. QUINONE-REDUCTASES ET MALADIES NEURODEGENERATIVES	24
3.1. NEURODEGENERESCENCE ET STRESS OXYDANT	24
3.1.1. <i>Maladie d'Alzheimer</i>	24
3.1.2. <i>Maladie de Parkinson</i>	26
3.2. CATECHOLAMINES	27
3.2.1. <i>Toxicité de la dopamine</i>	28
3.2.2. <i>Toxicité de la noradrénaline</i>	34
3.3. QR2 ET NEURODEGENERESCENCE	35
4. DETECTION ET QUANTIFICATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ROS)	36
4.1. RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE.....	37
4.2. FLUORESCENCE	38
4.3. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE.....	39
4.4. COMPARAISON DES METHODES	41
CONCLUSION	42

1. Quinones

Les quinones sont des composés ubiquitaires dans la nature et l'un des éléments indispensables dans les organismes vivants. Elles sont notamment mises en jeu dans la chaîne respiratoire cellulaire pour le transport d'électrons (**Monks et al., 1992**). Les quinones sont des composés organiques possédant un noyau benzénique disubstitué par des groupements carbonyles qui peuvent être en position *ortho*, pour former une *ortho*-quinone **1** ou en position *para*, pour former une *para*-quinone **2** (**Brown et al., 2017**). Il existe d'autres variétés de molécules que l'on appelle des pseudoquinones pour lesquelles le second groupement carbonyle est remplacé par d'autres substituants. Parmi ces pseudoquinones on peut citer le di-éthylstilbestrone **3**, ou des structures très condensées telles que le benzo[a]pyrène-1,6-dione **4** et la tétracycline **5** (**Monks et al., 1992**).



En raison de cette diversité structurale, certaines quinones sont plus réactives que d'autres. Par exemple, les *ortho*-quinones **1** sont plus facilement réductibles que les *para*-quinones **2**. Pour réduire une quinone en hydroquinone, la quinone a besoin de deux électrons et deux protons (Figure 1). La quinone n'est pas basique et se protone avec difficulté ($pK_a \sim 1$ pour la benzoquinone). La quinone protonée est plus oxydante que la quinone non-protonée (le potentiel redox est plus élevé). La forme réduite à un électron d'une quinone est appelée une semiquinone. La semiquinone est plus basique que la quinone, mais elle n'est pas assez basique pour se protoner à pH 7,4 (cf. $pK_a = 4$ pour QH^\bullet par rapport à 1 pour QH^+ , Figure 1). Ainsi, la plupart des semiquinones existent sous la forme d'anion radicalaire à pH physiologique. En raison de la charge répulsive, la semiquinone anion radicalaire est plus faiblement oxydante comparé à la quinone d'origine ($-1,17 \text{ V} < -0,58 \text{ V}$ Figure 1). D'autre part, la semiquinone radicalaire neutre est plus oxydante que sa forme anion radicalaire.

($-0,6 \text{ V} > -1,17 \text{ V}$). L'oxydation à un électron de l'hydroquinone est plus facile après déprotonation en mono-anion. La forme hydroquinone est moins facile à ré-oxyder donc plus stable que la semiquinone (Figure 1).

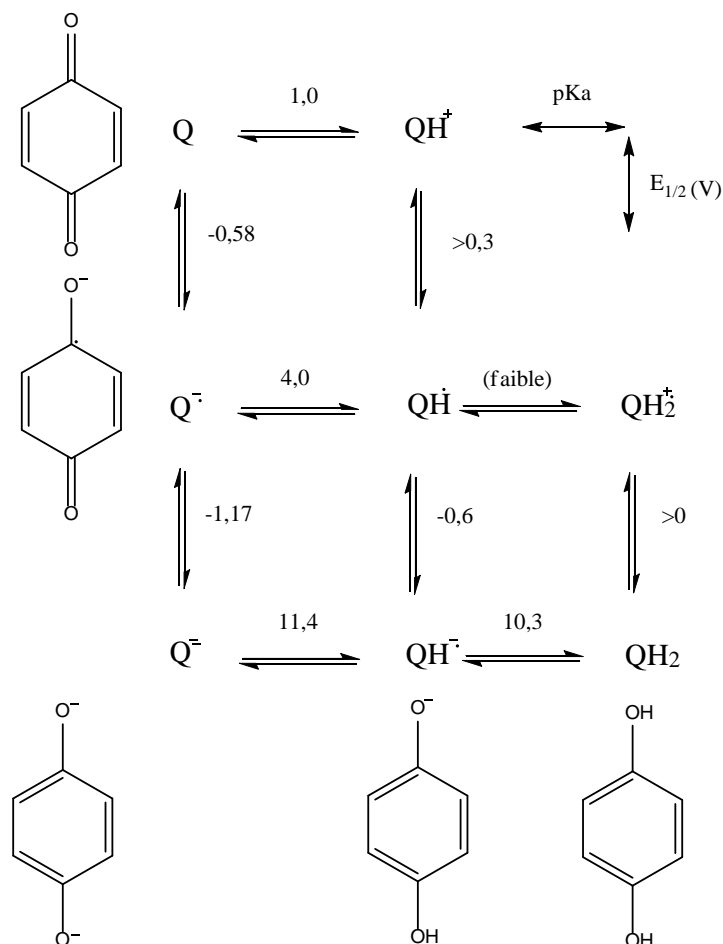


Figure 1 Comportement redox et acido-basique de la *p*-benzoquinone. Les chiffres verticaux correspondent aux potentiels redox et les chiffres horizontaux aux valeurs de pKa (Jeftić et Manning, 1970 ; Monks et al., 1992)

Le potentiel redox d'une quinone peut être influencé par la substitution sur le cycle. Typiquement, une substitution par un groupement électro-attractif (halogène, nitro ou groupement carbonyle) rend la quinone plus oxydante et sa forme hydroquinone moins facile à oxyder. Au contraire, une substitution électron-donneur (amino, hydroxy, méthoxy) rend la quinone moins oxydante et sa forme hydroquinone plus facile à ré-oxyder (Kalyanaraman et al., 1987). Les formes réduites partielles et totales (semiquinone et hydroquinone) sont des réducteurs majeurs, mais ces deux espèces ont une réactivité différente. Dans certains cas, le potentiel redox de la semiquinone est suffisamment faible pour qu'elle puisse transférer son

électron non apparié vers un oxydant tel que l'oxygène. S'il existe un mécanisme pour réduire la quinone en semiquinone (généralement catalysé par des enzymes), un cycle redox quinone/semiquinone se met en place. Ceci a pour conséquence de créer en présence d'oxygène un flux d'anions superoxydes, entraînant la formation d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) responsables de la peroxydation lipidique, de dommages à l'ADN, aux protéines et à d'autres molécules indispensables à la vie de la cellule. La réduction totale à deux électrons d'une quinone en hydroquinone peut être une étape essentielle pour détoxifier la quinone.

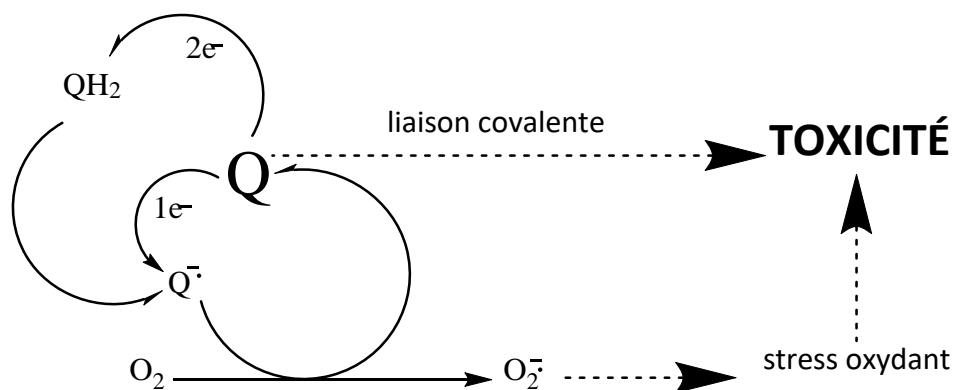


Figure 2. Voie de métabolisation d'une quinone (Monks et al., 1992)

Au niveau cellulaire, la quinone peut subir une réduction enzymatique à un ou deux électrons. La réduction à un électron est réalisée par des enzymes NADPH-cytochrome P450 réductase microsomales, NADH-cytochrome-B₅ réductase microsomales ou NADH-ubiquinone oxydoréductase aboutissant à la formation d'une semiquinone instable, alors que la réduction à deux électrons réalisée par des enzymes de type quinone-réductase conduit à la formation d'hydroquinones plus stable (Brunmark et Cadenas, 1989 ; Kappus et Sies, 1981 ; Monks et al., 1992 ; Powis et al., 1981 ; Wilson et al., 1986).

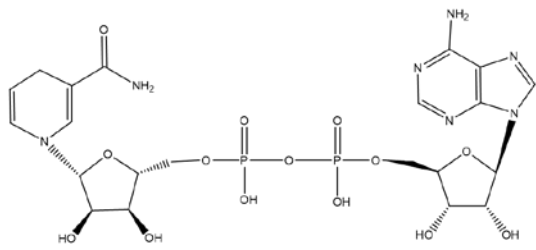
2. Quinone-réductases

Les quinone-réductases sont des oxydoréductases flavine dépendantes. Elles sont ubiquitaires dans le cytoplasme, mais elles n'existent pas dans les mitochondries ni le nucléoplasme (**The Human Protein Atlas, 2019a**). Elles catalysent la métabolisation de phase 1 d'une quinone en utilisant comme cofacteur la flavine adénine dinucléotide (FAD) pour les mammifères et certaines bactéries, ou la flavine mononucléotide (FMN) pour les plantes, les champignons et certaines bactéries. Ces enzymes réduisent la quinone avec 2 électrons pour produire une hydroquinone plus stable est donc potentiellement moins toxique que la semiquinone formée par réduction à 1 électron.

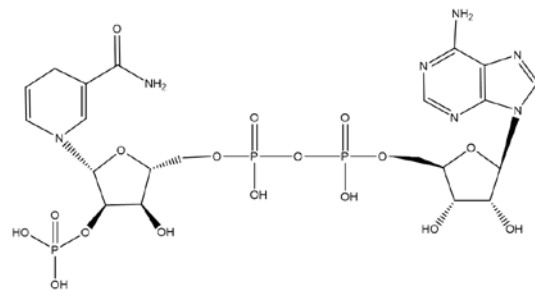
En fait, il existe deux enzymes de type quinone-réductase, la quinone-réductase 1 (QR1) et la quinone-réductase 2 (QR2). Les deux enzymes sont quasiment identiques au niveau structural et au niveau de leur mécanisme de réduction des quinones.

2.1. NAD(P)H : quinone-réductase 1 (QR1) (EC 1.6.5.2)

Cette première quinone-réductase a été découverte en 1958 par l'équipe d'Ernster dans la fraction soluble de microsomes de foie de rat. Elle est très réactive et capable d'oxyder les formes réduites du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH **6**) et du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH **7**). Ernster l'a nommée DPNH(NADH) et TPNH(NADPH) diaphorase (DT-diaphorase) et a décrit son fonctionnement cinétique, ses activateurs, ses inhibiteurs et l'a comparée à d'autres protéines utilisant le NADH ou NADPH comme cosubstrat (**Ernster et Navazio, 1958**). Iyanagi a démontré la capacité de cette enzyme à catalyser la réduction à deux électrons de la **p-benzoquinone** et de la **2-méthyl-1,4-naphtoquinone** (**Iyanagi et Yamazaki, 1970**). Au cours du temps cette enzyme a été nommée quinone-réductase 1 (QR1) puis plus récemment, NAD(P)H ;Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1). La quinone-réductase 1 est inhibée fortement et spécifiquement par le dicoumarol. Le bleu cibacron et la phénidone sont également connus comme inhibiteurs de QR1 (**Brunmark et Cadenas, 1989**).



Nicotinamide adénine dinucléotide
(NADH) 6



Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
(NADPH) 7

2.1.1. Structure

La quinone-réductase 1 est une enzyme codée par un gène localisé sur le chromosome 16 (région 16q22). Elle se présente sous forme d'un homodimère de 274 acides aminés. Chaque monomère a deux domaines séparés : un domaine catalytique avec sous unité α / β (220 premiers résidus d'acide aminés) et un domaine C terminal (à partir du 220^{ème} acide aminé jusqu'au C terminal) pour former un site de liaison avec la partie adénosine du NAD. Le domaine catalytique est séparé en 3 régions. Une région se lie par liaison hydrogène au FAD, la seconde à la partie adénine ribose de NADH et la dernière soit avec l'accepteur de proton (la quinone) soit avec le donneur de proton (NADH) (Akeson et Ehrenberg, 1972 ; Faig *et al.*, 2000 ; Jaiswal *et al.*, 1999).

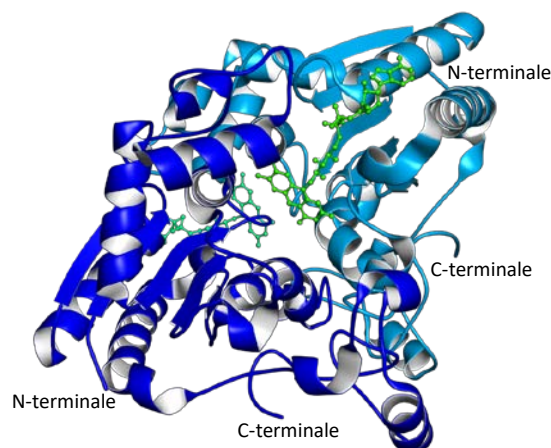


Figure 3. Structure de l'enzyme QR1 humaine en présence de ses deux cofacteurs FAD (Faig *et al.*, 2000)

2.1.2. Mécanisme d'action

Le FAD est un groupement prosthétique de l'enzyme. Son noyau isoalloxazine s'oriente pour faciliter le transfert direct d'un hydrure. Ainsi, il est proposé que la réduction à deux électrons par cette enzyme passe par deux étapes successives. La première étape consiste en un transfert d'hydrure du cosubstrat vers le FAD. D'abord, le NADH se fixe au niveau de site actif de l'enzyme afin de transférer un hydrure au FAD. Un proton de Tyr-155 de l'enzyme QR1 est transféré au FADH^- pour le stabiliser. La présence de l'His-161 permet la Tyr-155 s'est stabilisée. La deuxième étape concerne un transfert l'hydrure de FADH_2 vers un substrat. Le NAD^+ est évacué du site actif pour laisser la place à la quinone. Ensuite le FADH_2 transfère son hydrure vers la quinone pour terminer la réaction. Le chevauchement du site de l'accepteur d'hydrure et du site donneur d'hydrure sur le FAD correspond à un mécanisme dit en « ping-pong » de QR1 (Figure 4).

Ce mécanisme, permettant un transfert direct de deux électrons et deux hydrogènes entre le NADH et le FAD puis le FADH_2 et la quinone, a été confirmé par des analyses de résonance paramagnétique électronique qui ont permis de détecter les radicaux semiquinoniques après incubation de benzoquinones et de naphthoquinones avec la quinone-réductase 1 (**Iyanagi et Yamazaki, 1970**).

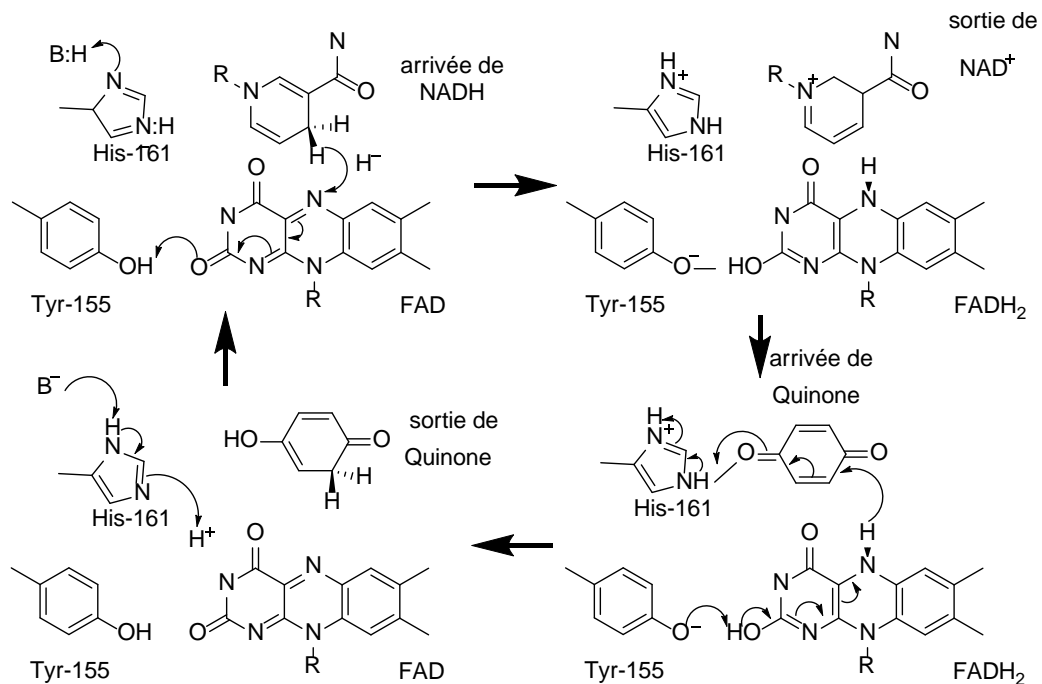
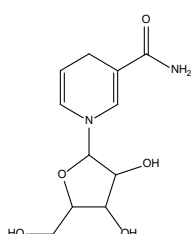


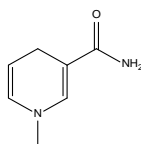
Figure 4. Mécanisme de réduction à deux électrons d'une quinone par QR1 (**Bianchet et al., 2004**)

2.2. NRH : quinone-réductase 2 (QR2) (E.C.1.10.99.2)

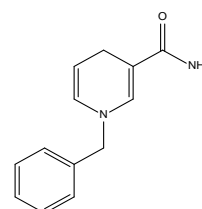
Au début des années 1960, Liao et Williams-Ashman ont purifié une flavoprotéine cytosolique dépendante de la FAD. Cette flavoprotéine catalyse l'oxydation des *N*-ribosyle-(**8**), *N*-alkyle-(**9**), et *N*-benzyle-(**10**) dihydronicotinamides réduits par la ménadione et d'autres quinones.



N-ribosyl-dihydronicotinamide
(NRH) **8**



N-méthyl-dihydronicotinamide
(NMH) **9**



N-benzyl-dihydronicotinamide
(BNAH) **10**

Par contre, l'oxydation du NADH, NADPH et NMNH (la forme réduite de mono-nucléotide nicotinamide) n'est observée pour aucun substrat. Malgré les travaux de l'équipe de Liao (**Liao et Williams-Ashman, 1961**), cette enzyme a été oubliée pendant trente ans jusqu'en 1997, où l'équipe de Talalay (**Zhao et al., 1997**) a démontré que cette flavoprotéine était un homologue de QR1 qu'il a renommé QR2 pour NRH:quinone-réductase 2. Chez l'homme, cette quinone-réductase est présente dans de nombreux organes. Elle est retrouvée au niveau du foie, du cœur, des globules rouges, du placenta, des reins, des muscles, des poumons et du cerveau. Elle est codée par un gène situé sur le chromosome 6 (région 6p25) (**Jaiswal, 1994 ; Van der Hauwaert et al., 2014**). Les deux enzymes QR1 et QR2 portent le même numéro EC (1.6.99.2) (**EC 1.6.99.2**). Cela engendre une confusion entre les deux enzymes. Ce numéro EC pour QR2 a été changé récemment pour EC 1.10.5.1 (**EC 1.10.5.1**) et en EC 1.6.5.2 pour QR1 (**EC 1.6.5.2**). Certains inhibiteurs de QR1, tels que le dicoumarol, le bleu cibacron, et la phénidone, n'inhibent pas QR2. Des molécules connues comme inhibiteurs de QR2 sont la chloroquine, la quinacrine, la primaquine, le resvératrol, la mélatonine et le S29434. Parmi ceux là, Boutin *et al.* ont décrit le S29434 comme étant l'inhibiteur de QR2 le plus puissant (Tableau 1). Il inhibe la protéine à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. (**Boutin et al., 2019 ; Ferry et al., 2010 ; Kwiek et al., 2004 ; Pegan et al., 2011**).

Tableau 1. Liste des principaux inhibiteurs de QR2 et leur concentration inhibitrice à 50% dans la littérature

Inhibiteur	Cl ₅₀ (μM)	Références
S29434	0,005	(Boutin <i>et al.</i>, 2019)
Resvératrol	0,143	(Ferry <i>et al.</i>, 2010)
Quinacrine	0,2	(Kwiek <i>et al.</i>, 2004)
Chloroquine	1,1	(Kwiek <i>et al.</i>, 2004)
Primaquine	2	(Kwiek <i>et al.</i>, 2004)
Mélatonine	30	(Pegan <i>et al.</i>, 2011)

2.2.1. Structure

La quinone-réductase 2 (QR2) se présente sous la forme d'une structure homodimérique comme la quinone-réductase 1 (Figure 5). Par rapport à QR1 qui contient 274 acides aminés, la QR2 ne possède que 231 résidus d'acides aminés par monomère. Elle possède ainsi 43 acides aminés de moins que QR1, notamment au niveau de la région C-terminale. Cette coupure au niveau C-terminal affecte la liaison de QR2 au NADH. Cette modification structurale a pour conséquence que seule une interaction avec les nicotinamides *N*-substitués comme le *N*-ribosyl-dihydronicotinamide est possible. De plus, la région C-terminale de QR2 s'arrange en une boucle qui peut assurer la coordination d'un atome de zinc *via* les histidines (H173, H177) et la cystéine (C222).

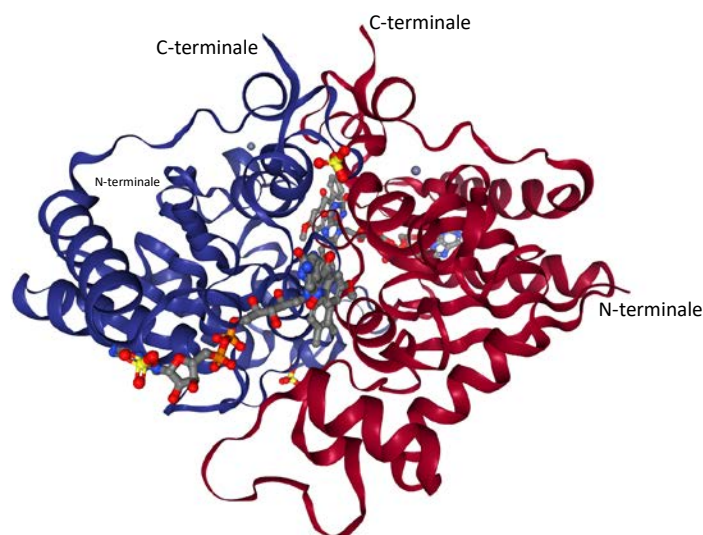


Figure 5. Structure cristalline d'un monomère de QR2 en présence de deux FAD et deux atomes zinc (Cassagnes *et al.*, 2017)

Au niveau du site catalytique, un remplacement des deux tyrosines (Y126, Y128) de QR1 par la phénylalanine F126 et l'isoleucine I128 rend la cavité catalytique plus large et plus hydrophobe pour QR2. Ces changements doivent être responsables des différences observées dans la spécificité du substrat et des inhibiteurs entre les deux enzymes (**Antoine *et al.*, 2012 ; Bianchet *et al.*, 2008 ; Foster *et al.*, 1999, 2000**).

La Figure 6 ci-dessous présente les séquences protéiques des formes humaines des protéines QR1 et QR2.

QR1 h MVGRRALIVLAHSERTSFNYAMKEAAAAALKKKGWEVVESDLYAMNFNPI⁵⁰
 QR2 h MAGKKVLIVYAHQEPKSFNGSLKNVAVDELRSRQCTVTVSDLYAMNFEP

QR1 h ISRKDITGKLDKDPANFQYPAESVLAYKEGHLSPDIVAEQKKLEAADLVIF¹⁰⁰
 QR2 h ATDKDITGTLNPEVFNYGVETHEAYKQRSLASDITDEQKKVREADLVIF

QR1 h QFPLQWFGVPAILKGFERVFIFGFAYTYAAMYDKGPFRSKKAVLSITTG¹⁵⁰
 QR2 h QFPLYWFSVPAILKGMMDRVLCQGFADFIPGFYDSGLLQGLALLSVTTG

QR1 h GSGSMYSLQGIHGMNVIWLPISGILHFCGFQVLEPQLTYSIGHTPAD²⁰⁰
 QR2 h GTAEMYTKEGVNGDSRYFLWPLQHGTLLHFCGFKVLQPQISFAPEIASEEE

QR1 h RIQILEGWKKRLLENIWDETPLYFAPSSLFDLNFQAGFLMKKEVQDEEKNKKFGLSVGHHLGKSIPTDNQUKARK²⁷⁴
 QR2 h RKGMAAWSQRLQTIWKEEPIPTAHWHFCG²³¹

Figure 6. 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 (**Long et Jaiswal, 2000**)

2.2.2. Mécanisme d'action

La quinone-réductase 2 catalyse la réduction à deux électrons des quinones comme le fait la quinone-réductase 1. Le mécanisme d'action décrit précédemment pour QR1 au paragraphe 2.1.2 est donc applicable à QR2. Cependant, du fait de sa structure (coupure de la région C-terminale), contrairement à la quinone-réductase 1, la quinone-réductase 2 utilise des dérivés nicotinamidiques non phosphorylés comme donneurs d'électrons dont le *N*-méthyl-nicotinamide (NMN), le *N*-ribosyl-dihydronicotinamide (NRH) ou le cosubstrat synthétique 1-benzyl-1,4-dihydro-nicotinamide (BNAH) pour catalyser la réduction à deux électrons des quinones en hydroquinones. Le NRH, un cosubstrat naturel de QR2, est probablement un

produit de la dégradation du NAD donc sa taille est plus petite par rapport au NAD (**Baum et al., 1982 ; Liao et Williams-Ashman, 1961 ; Zhao et al., 1997**). En ce qui concerne la réduction, la quinone-réductase 2 peut réduire les substrats « classiques » de la quinone-réductase 1 comme le dichlorophénol indophénol (DCPIP) et la ménadione mais de manière beaucoup moins efficace. Cependant, la quinone-réductase 2 est onze fois plus active vis-à-vis de l'acide diméthylamino-4-phénylazo-2-benzoïque (ou rouge de méthyle) qui subit une réduction à quatre électrons (**Wu et al., 1997**). Ainsi QR2 est capable de réduire des molécules à deux ou à quatre électrons. De plus, la quinone-réductase 2 catalyse la réduction des groupements nitro d'un composé cytotoxique CB1954, [5-(1-aziridinyl)-2,4-dinitrobenzamide], une pro-drogue anticancéreuse (Figure 7). Cette nitro-réduction est 3000 fois plus efficace avec la quinone-réductase 2 qu'avec la quinone-réductase 1. Cette différence pourrait être due, à l'absence de la tyrosine Y104 dans QR1, remplacée par la glutamine Q104 pour QR2 (**Chen et al., 2000 ; Wu et al., 1997**).

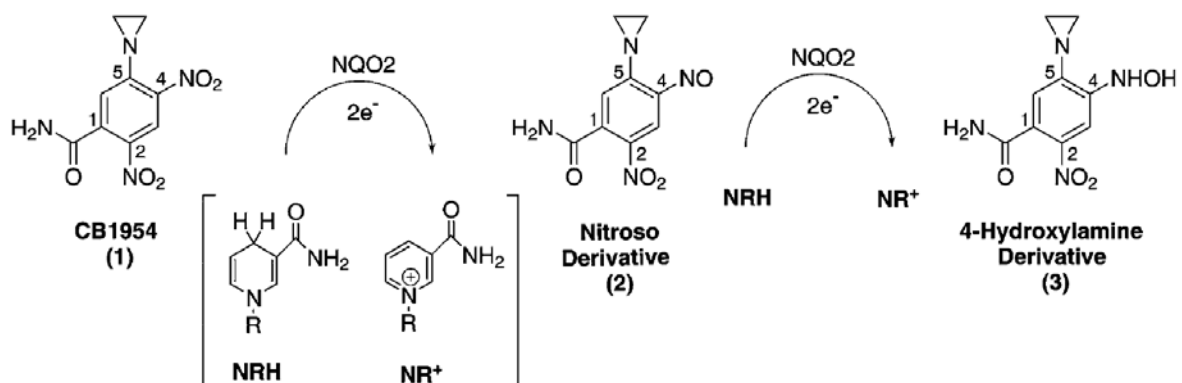


Figure 7. Mécanisme supposé de la réduction par deux fois deux électrons du groupement nitro de CB1954 par la quinone-réductase 2 en présence de deux molécules de cosubstrat NRH (**AbuKhader et al., 2005**)

La présence de deux atomes de zinc pourrait également participer au transfert électronique comme dans le cas des cytochromes (**Foster et al., 1999**). Pourtant, il a été démontré que l'incubation avec un chélateur du zinc, tel que l'EDTA, n'a aucun effet sur l'activité enzymatique. Ceci provient probablement du fait que les atomes de zinc font partie de la structure de l'enzyme ; ils sont profondément enfoncés dans la protéine et donc difficilement atteignables par le complexant (**Kwiek et al., 2004**).

3. Quinone-réductases et maladies neurodégénératives

3.1. Neurodégénérescence et stress oxydant

La neurodégénérescence, y compris la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, est caractérisée par la perte progressive de neurones (**Alzheimer's Association Report, 2016 ; Barnham et al., 2004 ; Cenini et al., 2019 ; Gandhi et Abramov, 2012**). L'étiologie et la pathogenèse de ces maladies neurodégénératives n'ont pas encore été entièrement élucidées mais l'augmentation du stress oxydant a été suggérée comme l'une des causes communes potentielles à la neurodégénérescence. (**Alam et al., 1997 ; Andersen, 2004 ; Lewén et al., 2000 ; Sayre et al., 2001**).

3.1.1. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA), l'une des maladies neurodégénératives les plus courantes, se caractérise par une perte neuronale progressive et l'accumulation de protéines, y compris des enchevêtrements neurofibrillaires (*protéine tau*) et des plaques amyloïdes formées de peptides amyloïdes A β (**Mattson, 2004**). Il a été suggéré que le déséquilibre redox et les dommages neuronaux associés jouent un rôle critique dans l'initiation et la progression de la maladie d'Alzheimer (**Wang et al., 2014**).

La formation excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer peut induire un dysfonctionnement mitochondrial, mais l'origine de l'augmentation de la production de ROS et les mécanismes exacts de la perturbation de l'équilibre redox restent encore insaisissables (**Zhao et Zhao, 2013**).

L'accumulation du peptide A β semble augmenter le stress oxydant même au stade précoce de la maladie d'Alzheimer (**Radi et al., 2014**). En effet, des études ont mis en évidence chez des patients atteints de MA, une augmentation des concentrations en sous-produits de la peroxydation lipidique (4-hydroxynonéal, malondialdéhyde), de l'oxydation des protéines (carbonyle) et de l'oxydation de l'ADN et ARN (8-hydroxydésoxyguanosine et 8-hydroxyguanosine). De même une diminution des concentrations de molécules antioxydantes (acide urique, vitamines C et E) ou d'enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase,

etc.) a été observée chez des patients atteints de MA (**Wang et al., 2014 ; Zhao et Zhao, 2013**). En outre, des études réalisées sur des modèles murins transgéniques de la maladie d'Alzheimer exprimant la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) et la préséniline-1 (PS-1) ont montré des niveaux accrus de H₂O₂ et de peroxydation des protéines et des lipides (**Matsuoka et al., 2001 ; Zhao et Zhao, 2013**). De même il a été démontré la capacité des peptides amyloïdes en présence de cuivre en conditions réductrices à catalyser la production du radical primaire superoxyde (**Reybier et al., 2016**).

Les peptides A β s'accumulent principalement dans les régions extracellulaires, mais on trouve également des agrégats dans différentes zones intracellulaires, dont le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries. Ceci pourrait être à l'origine du dysfonctionnement respiratoire mitochondriale et de la réduction du métabolisme énergétique observés (**Gandhi et Abramov, 2012 ; Picone et al., 2014**). Cette diminution est associée à une réduction de l'expression neuronale des gènes qui codent pour des sous-unités de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons (**Wang et al., 2014**). D'autre part, les activités des enzymes clés du métabolisme du glucose, y compris le complexe cétooglutarate déshydrogénase, le complexe pyruvate déshydrogénase et la cytochrome oxydase, sont également réduites chez les patients atteints de MA. Cette diminution est corrélée significativement avec la sévérité clinique de la maladie et la présence de plaques amyloïdes (**Bubber et al., 2005**).

D'autre part, le dysfonctionnement mitochondrial induit par A β contribue également à l'altération de l'homéostasie calcique, ce qui entraîne une augmentation de la surcharge en calcium et une diminution de sa recapture (**Ito et al., 1994**). L'accumulation de calcium mitochondrial entraîne également la production accrue de ROS et l'ouverture de pores de transition de perméabilité (PTP). L'ouverture des PTP peut être responsable de la translocation des molécules pro-apoptotiques des mitochondries vers le cytosol qui conduit à l'apoptose des neurones. L'augmentation du calcium intracellulaire peut être mesurée indirectement en évaluant l'activité des protéine kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes et de la calpaïne. Il est intéressant de noter que l'activité accrue de ces enzymes a été observée au stade précoce de la maladie d'Alzheimer (**Gandhi et Abramov, 2012 ; Wang et al., 2014**).

D'autre part, il est de plus en plus évident qu'il existe un lien entre la maladie d'Alzheimer, le stress oxydant et la protéine tau. Il a été rapporté que des cellules surexprimant la protéine tau étaient davantage vulnérables au stress oxydant. Cela pourrait être dû à l'épuisement des peroxysomes (**Stamer et al., 2002**) qui ont pour rôle de détoxifier la cellule en dégradant certaines molécules toxiques. De plus, une production accrue de ROS, résultant de l'activité réduite de la NADH-ubiquinone oxydoréductase (chaîne respiratoire) et d'un dysfonctionnement mitochondrial a été rapporté pour des modèles murins transgéniques surexprimant la protéine tau (P301S et P301L) (**David et al., 2005 ; Halverson et al., 2005 ; Yoshiyama et al., 2007**).

3.1.2. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une perte neuronale sélective des neurones dopaminergiques (DA) dans la substance noire (*substantia nigra*) et une diminution des niveaux de dopamine dans la voie nigrostriatale dans le cerveau (**Blesa et al., 2015 ; Moon et Paek, 2015**). Bien que le mécanisme exact ne soit toujours pas clair, le niveau de dopamine et le stress oxydant sous-jacent sont considérés comme les principaux mécanismes physiopathologiques (**Blesa et al., 2015 ; Schapira, 2008**). Des études antérieures ont prouvé que la diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire chez les patients atteints de la maladie de Parkinson pouvait contribuer à la production d'un excès de ROS conduisant à l'apoptose des neurones (**Franco-Iborra et al., 2016**). Une déficience du complexe mitochondrial I dans la zone frontale du cortex, dans les fibroblastes et dans les plaquettes sanguines a également été constatée chez des patients atteints de la MP (**Blesa et al., 2015**). De plus, le lien entre le dysfonctionnement mitochondrial et la maladie de Parkinson est soutenu par le principe d'inhibition du complexe I. Les inhibiteurs du complexe I, comme la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,4-tétrahydropyridine (MPTP) et son métabolite, le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺), peuvent avoir des effets cytotoxiques sur les neurones dopaminergiques. En effet, ces molécules sont utilisées pour provoquer un phénotype parkinsonien et entraîner une dégénérescence de la substance noire et une augmentation de l' α -synucléine cytoplasmique (**Lin et Beal, 2006**). Il a également été rapporté que des mutations génétiques des protéines, y compris la α -synucléine, la parkine, la

phosphatase PTEN et la kinase PINK, étaient liées aux formes familiales de la maladie de Parkinson. La mutation de ces gènes est connue pour affecter la fonction mitochondriale et augmenter le stress oxydant (**Blesa et al., 2015**). Des mutations ponctuelles ou des délétions dans l'ADN mitochondrial codant pour la sous-unité du complexe I ont été signalées chez des patients présentant une maladie de Parkinson (**Bandmann et al., 1997 ; Swerdlow et al., 1996**).

Des anomalies concernant des molécules antioxydantes ont également été rapportées même au stade précoce de la MP (**Hauser et Hastings, 2013**). Des taux de GSH inférieurs à la normale ont été mesurés dans des neurones dopaminergiques de malades bien que ce résultat ne soit pas spécifique de la MP (**Sian et al., 1994**). De plus, des taux élevés de fer ont été observés dans les neurones dopaminergiques de la substance noire de malades atteints de MP (**Dexter et al., 1989 ; Oakley et al., 2007**). Cela pourrait résulter d'un dysfonctionnement du transport du fer vers les mitochondries. Ainsi, l'interaction des ions ferriques avec H₂O₂ pourrait expliquer, *via* la réaction de Fenton, la production de radicaux hydroxyles (\bullet OH) hautement toxiques (**Hauser et Hastings, 2013**) à l'origine des dommages oxydants.

3.2. Catécholamines

Plusieurs évidences accumulées au cours des dernières années suggèrent que, l'une des principales causes des lésions cérébrales chez les patients atteints de maladies neurodégénératives est le métabolisme des catécholamines. C'est à l'origine de cascades complexes conduisant à un stress oxydant chronique vis-à-vis duquel les défenses antioxydantes sont dépassées. Bien que les conséquences de ce métabolisme néfaste n'aient pas été entièrement élucidées, l'oxydation de la dopamine ou de l'adrénaline et la génération d'espèces neurotoxiques semblent impliquées dans le dysfonctionnement des fonctions métaboliques conduisant à la mort neuronale.

3.2.1. Toxicité de la dopamine

La dopamine est un neurotransmetteur de type catécholamine, biosynthétisée dans le cytoplasme. Malgré l'avantage clinique d'un supplément de dopamine chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, on soupçonne depuis longtemps que la dopamine peut contribuer au processus pathologique (**Fahn et Cohen, 1992 ; Jenner et Olanow, 1996 ; Stokes et al., 1999**).

Il y a plusieurs étapes métaboliques pour la dopamine dans la synapse, notamment sa libération dans la fente synaptique, sa recapture dans la fente présynaptique pour son recyclage, sa dégradation par oxydation enzymatique ou auto oxydation non enzymatique, puis son dépôt sous forme de neuromélanine, structure pigmentée qui donne son nom à la substance noire. Les principaux intermédiaires de ces voies métaboliques sont la dopamine-*o*-quinone et la dopaminochrome (ou aminochrome) (**Paris et al., 2009**) comme l'illustre la Figure 8. La neuromélanine est considérée comme protectrice puisqu'elle est capable de séquestrer les dérivés réactifs de la dopamine (**Zecca et al., 2003, 2008a, 2008b**)

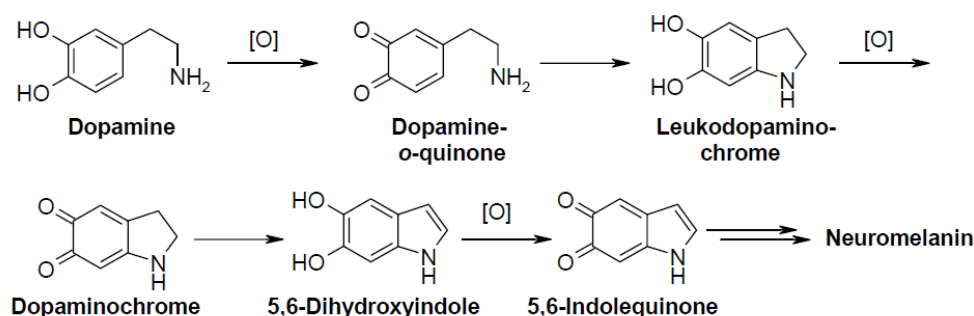


Figure 8. Biotransformation de la dopamine pour former la neuromélanine

Comme l'illustre la Figure 9, la synthèse de la dopamine dans le neurone commence par la transformation de la L-tyrosine en L-dopa, qui est catalysée par la tyrosine hydroxylase (TH). La L-dopa est alors convertie en dopamine par l'enzyme décarboxylase. Si le taux de dopamine est trop élevé, un auto rétrocontrôle se met en place par inhibition de la tyrosine hydroxylase pour stopper sa synthèse. La dopamine est ensuite transportée par les transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT2). L'environnement acide (pH~5,6) dans les vésicules prévient l'oxydation de la dopamine, instable à pH plus élevé. La dopamine cytosolique peut également être dégradée par oxydation catalysée par des enzymes, entraînant la formation de molécules potentiellement toxiques.

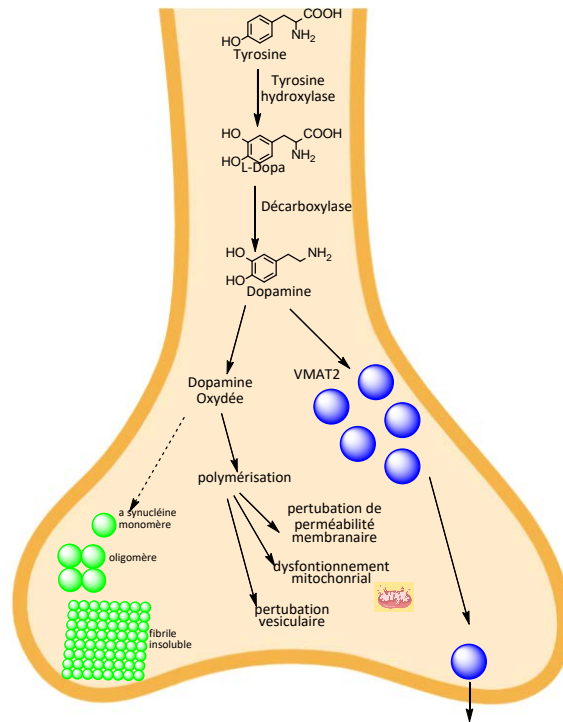


Figure 9. Formation et métabolisation de la dopamine dans la synapse (Mor et al., 2019)

Dans la fente synaptique, la monoamine oxydase catalyse la désamination oxydante de la dopamine pour former une neurotoxine, la 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde, générant également du peroxyde d'hydrogène. Le 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde, est alors oxydé en 3,4-dihydroxyphénylacétate non toxique par l'aldéhyde déshydrogénase.

Ainsi la formation de dopamine dans le cerveau donne lieu à la production d'espèces réactives pouvant endommager les constituants essentiels et conduire à des dysfonctionnements cellulaires voire à la mort des neurones. Plusieurs marqueurs du stress oxydant ont été identifiés post-mortem dans des tissus cérébraux de malades. Dans la substance noire, des teneurs réduites en acides gras polyinsaturés ont été mesurées par rapport à d'autres régions du cerveau ou des tissus témoins sains, tandis que des teneurs élevées de produits issus de la peroxydation lipidique, y compris le malondialdéhyde et le 4-hydroxynonéal, ont été constatées.

Des études *in vivo* ont cherché à déterminer la toxicité de la dopamine par injection de concentrations relativement élevées de dopamine (jusqu'à 1 μmol) dans le striatum de rats. Une perte de l'activité dopaminergique des terminaisons nerveuses et la formation de

protéines cystéinyl-dopamine ont été observées (**Filloux et Townsend, 1993 ; Hastings et al., 1996 ; Rabinovic et al., 2000**). Une augmentation des lésions avec la concentration en dopamine injectée et une atténuation de la toxicité avec l'administration concomitante de glutathion ou d'ascorbate ont été observées.

De même, chez les rats ayant reçu une injection d'aminochrome (un produit d'oxydation de la dopamine), dans la substance noire, a aggravé les signes de neurodégénérescence et de déficience motrice (**Díaz-Véliz et al., 2002**). De la même manière, des injections de 6-hydroxydopamine ayant une structure proche de la dopamine, provoquent chez l'animal la dégradation des neurones dopaminergiques de la même manière que la MP. Ces études suggèrent que des taux élevés de dopamine, de ses dérivés oxydés, ou de molécules ayant des structures proches peuvent être neurotoxiques.

D'autre part des études génétiques et pharmacologiques ont également montré que la dérégulation endogène de la dopamine provoquait des effets néfastes. Ainsi, la suppression totale des transporteurs VMAT2 est létale pour la souris. De plus, le taux élevé de dopamine cytosolique par surexpression de dopamine transporteur (DAT) dans la substance noire ou le striatum provoque une neurodégénérescence et un stress oxydant.

D'un point de vue chimique, la réactivité de la dopamine oxydée est strictement liée aux déséquilibres redox cellulaire. Un taux élevé de métaux de transition pouvant se chélater à la dopamine-*o*-quinone favorise sa tautomérisation en quinone méthide (Figure 10 voie A) (**Napolitano et al., 1999b, 1999a**). La quinone méthide peut soit être réduite en présence d'eau pour former l'adrénaline, soit subir une attaque nucléophile en présence de peroxyde d'hydrogène pour former le β -aminohydroperoxyde (très réactive) puis en 3,4-dihydroxybenzaldéhyde (via une formation de fragment carbonyle) par élimination de formaldimine.

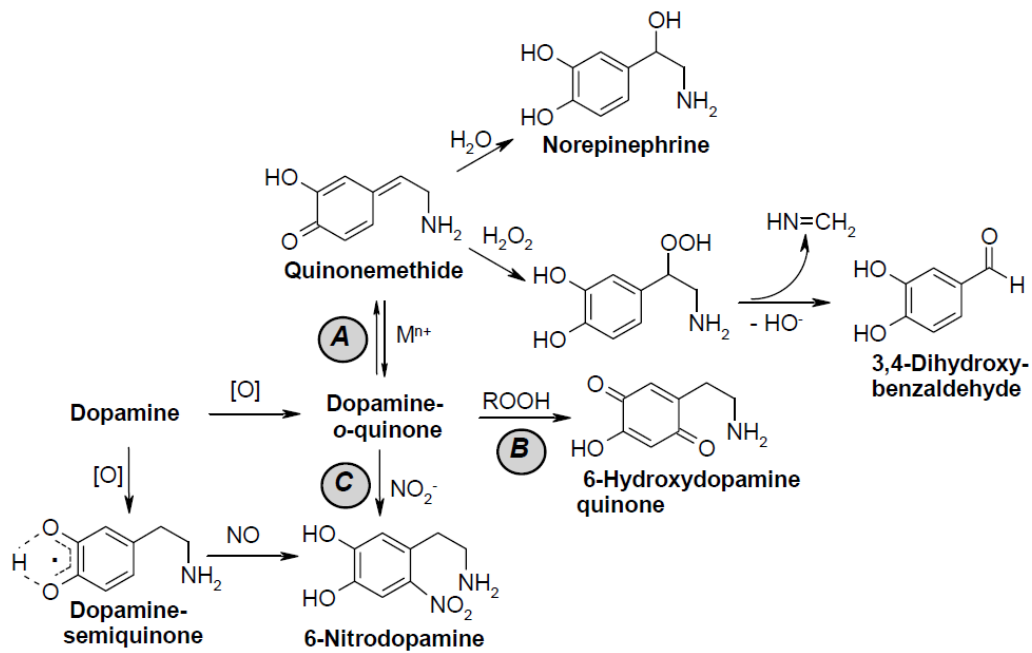


Figure 10. Biotransformation de la dopamine en quinone toxique (Napolitano et al., 2011)

Un taux élevé de peroxyde d'hydrogène ainsi que d'autres hydroperoxydes (ex. hydroperoxyde lipidique) peut favoriser la formation de 6-hydroxydopamine quinone (Figure 10 voie B) (Napolitano *et al.*, 1995, 1999b ; Pezzella *et al.*, 1997), une neurotoxine très puissante capable d'induire la destruction des terminaisons nerveuses catécholaminergiques (Tranzer et Thoenen, 1968). La spécificité de la 6-hydroxydopamine quinone pour les neurones dopaminergiques est sans doute liée à sa similarité structurale avec la dopamine. Cette molécule est en effet capturée par les transporteurs de dopamine (DAT) et s'accumule à l'intérieur des neurones dopaminergiques. Des études ont en effet montré que cette toxicité diminue *in vivo* et *in vitro* en présence d'inhibiteur de recapture dopaminergique (Ding *et al.*, 2004). Bien que la toxicité de la 6-hydroxydopamine ait été traditionnellement interprétée par la génération de radicaux libres intracellulaires et un dysfonctionnement mitochondrial (Blum *et al.*, 2001), des études récentes ont montré que la 6-hydroxydopamine peut également agir par un mécanisme extracellulaire (Blum *et al.*, 2000 ; Soto-Otero *et al.*, 2000). Comme la dopamine, la 6-hydroxydopamine est très sensible à l'oxydation générant des espèces réactives de l'oxygène et la quinone correspondante, une molécule qui peut s'avérer plus toxique que la dopamine-*o*-quinone elle-même. La conversion de la 6-hydroxydopamine quinone dépend des conditions de réaction. Elle peut former le 5,6-dihydroxyindole ou, pour

des concentrations très élevées, former un dimère avec la 6-hydroxydopamine (Manini *et al.*, 2003). La dopamine peut également former la 6-nitrodopamine *via* une attaque nucléophile de la dopamine-*o*-quinone par des ions nitrite (Figure 10 voie C) (Palumbo *et al.*, 1999) ou réaction de la dopamine semiquinone avec le monoxyde d'azote (**d'Ischia et Costantini, 1995 ; Daveu *et al.*, 1997 ; de la Bretèche *et al.*, 1994**).

La présence de 6-nitrodopamine formée par réaction avec l'ion nitrite (voie C) a attiré l'attention des chercheurs dès la première identification de cette nitrocatécholamine dans le cerveau de mammifères. Un certain nombre de propriétés biologiques a été attribué aux 6-nitrocatécholamines, y compris les effets modulateurs sur la neurotransmission de type catécholaminergique, sur l'inhibition de la catéchol-*o*-méthyletransférase (COMT) et sur la recapture des catécholamines (**Macarthur *et al.*, 1995 ; Shintani *et al.*, 1996**).

Le dopaminochrome possède également des voies de transformations métaboliques autres que la formation de la neuromélanine (Figure 10). Le dopaminochrome peut en effet également subir une réduction à deux électrons par des flavoenzymes telles que la quinone-réductase (**Baez *et al.*, 1995**) pour former la leukodopaminochrome-*o*-semiquinone (Figure 11) (**Arriagada *et al.*, 2004 ; Graumann *et al.*, 2002 ; Paris *et al.*, 2007**). Cette dernière est également considérée comme une puissante neurotoxine endogène en raison de sa capacité à réduire l'oxygène en anion superoxyde donnant lieu à un cycle redox infini qui persiste jusqu'à ce que le NADPH ou l'oxygène soit épuisé (**Arriagada *et al.*, 2004 ; Segura-Aguilar *et al.*, 1997**). Ce cycle redox entre le dopaminochrome et le radical leukodopaminochrome-*o*-semiquinone est extrêmement rapide et très efficace produisant une toxicité aiguë même à faible concentration de dopaminochrome.

Défense antioxydante

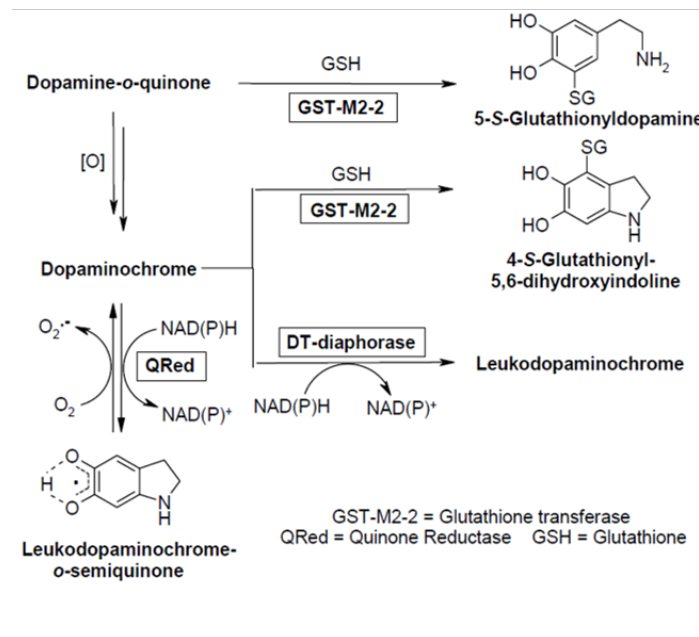


Figure 11. Biotransformation de la dopamine-o-quinone (Napolitano et al., 2011)

Comme le montre le schéma de la Figure 11, les voies principales de détoxification des produits d'oxydation de la dopamine font intervenir le glutathion (GSH) et des enzymes telles que la quinone-réductase 1 *via* une réduction à 2 électrons (**Napolitano et al., 2011**).

La conjugaison de la dopamine-o-quinone avec le glutathion conduit à la formation de 5-S-glutathionyle-dopamine, précurseur de la 5-S-cystéinyle-dopamine, identifié dans les régions du cerveau riches en dopamine comme le noyau caudé, le putamen et la substance noire (**Baez et al., 1997 ; Rosengren et al., 1985**). Cette réaction empêche la cyclisation intramoléculaire de la dopamine-o-quinone en dopaminochrome (ou aminochrome) (**Dagnino-Subiabre et al., 2000**). La conjugaison du dopaminochrome avec le glutathion produit le 4-S-glutathionyl-5,6-dihydroxyindoline, plus stable que la leukodopaminochrome-o-semiquinone (**Baez et al., 1997 ; Segura-Aguilar et al., 1997**).

L'aminochrome peut également, d'après la littérature, être réduit à 2 électrons par une NADPH quinone-oxydoréductase, la QR1, présente dans les neurones dopaminergiques (**Schultzberg et al., 1988**). Cette enzyme jouerait donc un rôle neuroprotecteur en catalysant les transferts de deux électrons au dopaminochrome pour générer directement le

leukodopaminochrome, évitant ainsi la formation de la leukodopaminochrome-*o*-semiquinone toxique (Graumann *et al.*, 2002).

3.2.2. Toxicité de la noradrénaline

La noradrénaline (norépinéphrine) est un des neurotransmetteurs principaux dans le cerveau. Comme la dopamine, la noradrénaline est une monoamine et une catécholamine. En fait, la noradrénaline est produite à partir de la dopamine. Par conséquent, l'oxydation de la noradrénaline n'est pas très différente de celle de la dopamine car sa réactivité chimique est principalement basée sur la partie catéchol. La désamination de la noradrénaline par oxydation enzymatique produit l'acide 3,4-dihydroxymandélique et le peroxyde d'hydrogène (Figure 12). La noradrénaline peut également participer à la formation de la neuromélanine par un procédé d'oxydation en noradrénaline-*o*-quinone suivie d'une cyclisation intramoléculaire en leukonoradrénochrome. Ce dernier peut à son tour s'oxyder en noradrénochrome ou subir une déshydratation en 5,6-dihydroxyindole (Figure 12), qui peut contribuer à la formation de neuromélanine *via* un processus oxydant de polymérisation complexe.

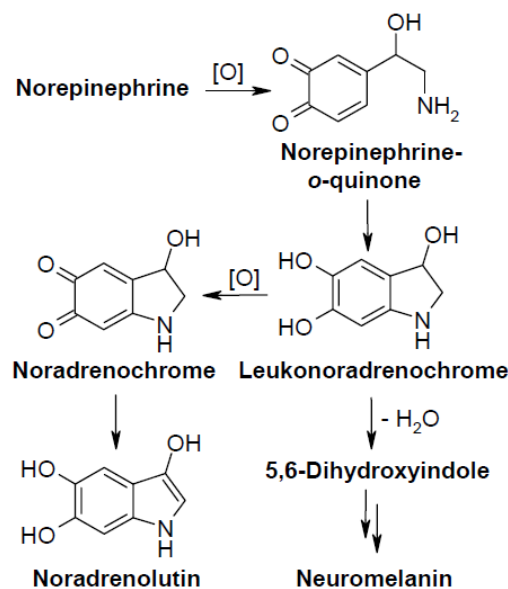


Figure 12. Biotransformation de la noradrénaline (Napolitano *et al.*, 2011)

Comme dans le cas de la dopamine, la noradrénaline-*o*-quinone peut réagir avec les espèces réactives de l'azote tels que NO et NO₂⁻ pour produire la 6-nitronoradrénaline pouvant

produire des effets délétères sur les neurones catécholaminergiques (inhibition de la COMT, et interférence avec la recapture des catécholamines) (**Mayer et Hemmens, 1997 ; Palumbo et al., 2001, 2002**).

3.3. QR2 et neurodégénérescence

Des études menées ces dix dernières années semblent mettre en évidence un lien entre la quinone-réductase 2 et la perte de mémoire. En effet, en 2011, Hashimoto et son équipe ont détecté post mortem la présence de quinone-réductase 2 dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Une quantité significativement élevée de QR2 chez les patients atteints de la MA par rapport aux sujets sains a été mesurée dans l'hippocampe (Hashimoto et Nakai, 2011).

Une étude génomique menée par Wang *et al.* (**Wang et al., 2008**) sur le sang de 118 patients atteints de la maladie de Parkinson a montré que le gène pour la transcription de l'enzyme quinone-réductase 2 des patients malades présentaient une délétion dans la zone du promoteur (-1-29). La zone absente correspond à la zone de fixation du répresseur de transcription du gène de QR2. Ainsi, la production de QR2 est plus importante chez les patients atteints de MP que chez le sujet sain.

En 2010, l'équipe de Rémi Quirion a réalisé une étude sur des souris KO en QR2. Cette étude a été basée sur l'apprentissage et la cognition des souris. Ils ont constaté que la capacité d'apprentissage était supérieure pour les souris KO par rapport aux souris contrôles. Un résultat similaire a été obtenu par inhibition de QR2 par son inhibiteur spécifique, le S29434 puisqu'on constate dans ce cas une amélioration de la cognition et de la mémoire des souris (**Benoit et al., 2010**). Sur le même principe, Rappaport *et al.* a montré une amélioration de la fonction cognitive par la suppression de quinone-réductase sur des souris (**Rappaport et al., 2015**).

Ainsi la question se pose d'un lien entre QR2 et la neurodégénérescence d'un point de vue redox compte tenu de la capacité de QR2 à générer des radicaux *via* la métabolisation de catéchol-quinone. Cette enzyme est-elle une enzyme détoxifiante comme souvent rapportée dans la littérature ou au contraire toxifiante ?

Plusieurs éléments semblent en effet montrer que les catéchol-quinones sont des substrats de la quinone-réductase 2 (Gaikwad *et al.*, 2009 ; Sampaio *et al.*, 2014). En 2008, Z. Zhang et son équipe ont montré grâce à des analyses cristallographiques que QR2 contrairement à QR1 était une catéchol-quinone-réductase (Fu *et al.*, 2008). De la même manière notre équipe a montré à la fois sur enzyme purifiée (Reybier *et al.*, 2011) et sur des modèles de cellules surexprimant QR2 (Cassagnes *et al.*, 2015) que la métabolisation de l'adrénochrome et de l'aminochrome s'accompagnait d'une production accrue de radicaux, confirmant l'activité de QR2 vis-à-vis de ces catéchol-quinones.

Afin d'établir un lien entre stress oxydant, neurodégénérescence et QR2 il est nécessaire de disposer d'outils performants et adaptés pour la détection et la quantification d'espèces réactives. Nous comparons dans le paragraphe suivant, les méthodes dédiées à l'analyse des espèces radicalaires et autres produits d'oxydation.

4. Détection et quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives, comme leur nom l'indique, sont de petites molécules extrêmement réactives ayant de ce fait des durées de vie très courtes de l'ordre de quelques millisecondes voire de quelques nanosecondes. Parmi ces espèces on peut citer des radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$) ou des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Ainsi leurs mesures directes ne sont pas aisées particulièrement dans des milieux complexes tels que les fluides biologiques ou les milieux intracellulaires. Plusieurs méthodes physico-chimiques sont nécessaires pour obtenir des résultats analytiques robustes, reproductibles et complémentaires.

4.1. Résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une méthode de choix pour étudier les espèces contenant un électron non apparié. La méthode a été découverte par Yevgeny Zavoisky en 1944 et repose sur l'effet Zeeman.

A l'état fondamental, un électron célibataire possède un spin et un moment magnétique associé. Lorsqu'on applique un champ magnétique (B_0), il y a dédoublement du niveau d'énergie (levée de la dégénérescence), le moment magnétique de l'électron pouvant être orienté soit parallèlement, soit anti parallèlement au champ B_0 (effet Zeeman). La transition entre les deux niveaux d'énergie a lieu lorsque qu'une quantité suffisante d'énergie ($\Delta E = h\nu$) est absorbée par l'électron (Figure 13). L'énergie nécessaire pour la transition de niveaux énergétiques est donnée par l'équation (1) :

$$h\nu = g_e\mu_B B_0 \quad (1)$$

avec μ_B magnéton de Bohr, B_0 champ magnétique et g_e facteur de Landé (g -factor) (2,0023 pour un électron libre).

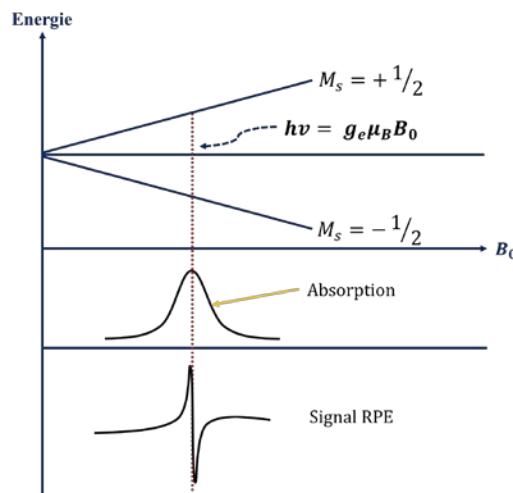


Figure 13. Principe de la résonance paramagnétique électronique

Le principe de la RPE consiste à faire varier le champ magnétique appliqué B_0 à l'aide de bobines et d'envoyer une onde électromagnétique de fréquence choisie (par exemple, 9,3 GHz pour un spectromètre bande X) permettant de faire transiter l'électron célibataire. Lorsque l'énergie du photon correspond à la différence des niveaux d'énergie de l'électron célibataire, il y a résonance et absorption d'énergie. Si l'électron est sur un atome dont le

noyau possède un moment magnétique non nul ($\text{spin} > 0$), celui-ci va interagir avec l'électron provoquant une multiplication des niveaux d'énergie et donc des transitions possibles. Le spectre RPE est la dérivée du signal d'absorption et est caractéristique du radical ; l'intensité est également proportionnelle à sa concentration.

Même si la RPE est une technique de choix pour étudier des radicaux libres, ces espèces très réactives ($\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2\bullet^-$) de très faibles durées de vie ne sont pas observables directement par RPE. La technique de spin-trapping ou piégeage de spin, permet en utilisant des molécules diamagnétiques dites spin-trap ou piègeur, de former des adduits radicalaires plus stables et ainsi de prolonger la durée de vie des radicaux libres afin de les détecter. Les deux piègeurs les plus couramment utilisés sont 5,5-diméthyl-1-pyrroline *N*-oxyde (DMPO) et la *N-tert*-butyl- α -phenylnitronne (PBN). Cependant ces deux piègeurs ne permettent pas la mesure des radicaux intracellulaires, la sonde ou l'adduit radicalaire étant rapidement dégradés dans la cellule.

L'avantage de la RPE est qu'elle peut être mise en œuvre sur des cultures cellulaires sans nécessiter de traitement préalable pour extraire l'adduit radicalaire, les cellules étant perméables aux champs magnétiques. L'un des principaux inconvénients est que cette technique est peu sensible et requiert de grande quantité de cellules pour produire des signaux détectables.

4.2. Fluorescence

La fluorescence est une méthode simple et facile pour détecter et quantifier les espèces réactives *via* l'utilisation de sondes particulières pour des mesures intracellulaires. On peut citer la dichlorodihydrofluorescéine diacétate (H_2DCFDA), une sonde capable de traverser les membranes pour donner un composé fluorescent après oxydation. A l'extérieur de la cellule, H_2DCFDA n'est pas fluorescente. Lorsqu'elle pénètre dans la cellule, la molécule subit une désesterification sous l'effet d'estérase pour former H_2DCF qui, après oxydation par des espèces réactives de type peroxyde, formera un produit hautement fluorescent, le DCF. Il s'agit d'un test relativement facile à mettre en œuvre mais qui souffre d'un manque de spécificité (Zhao *et al.*, 2003). Des composés tels que l'hydroéthidine et le bleu de nitrotétrazolium sont considérés comme des sondes fluorescentes spécifiques pour la

détection du radical superoxyde. L'acide coumarine-boronique (CBA) est utilisé comme sonde fluorescente pour le peroxydinitrite. Un grand nombre de dérivés ont vu le jour comme le CM-H₂DCFDA pour stabiliser la demi-vie du DCF intracellulaire, le Cell-ROX pour une meilleure sensibilité sans interaction avec le milieu de culture et le MitoSOX pour cibler des ROS mitochondriales.

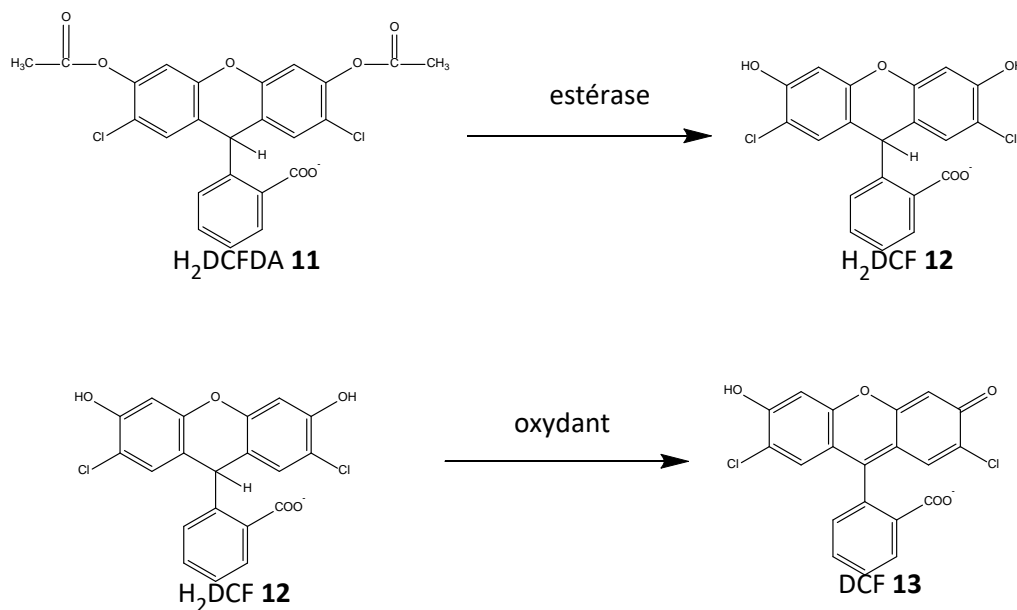


Figure 14. La transformation de H₂DCFDA en DFC (fluorescence) implique obligatoirement une enzyme estérase

4.3. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est une méthode renommée pour sa spécificité et sa sensibilité pour détecter et quantifier certains composés. Mais la détection directe des radicaux libres n'est pas possible par cette technique. En 2007, Dr. Zielonka et son équipe ont publié un protocole LC-MS pour quantifier les radicaux superoxydes. Ce protocole repose sur l'utilisation de l'hydroéthidine (HE) pour la détection du superoxyde intracellulaire. La fluorescence rouge portée par le produit d'oxydation à deux électrons, l'éthidium (E⁺), a longtemps été assimilée à la formation de superoxyde intracellulaire, ce qui explique l'utilisation de cette sonde en fluorescence. Cependant des analyses ont prouvé que E⁺ n'est pas formé par l'oxydation directe de l'HE par O₂^{•-} (**Dikalov Sergey et al., 2007 ; Zhao et al., 2005**). Un autre produit, le 2-hydroxyéthidium (2-OH-E⁺), a été identifié comme le produit formé par réaction entre HE et O₂^{•-} (**Zielonka et**

Kalyanaraman, 2010). Ce produit a les mêmes caractéristiques de fluorescence que E^+ mais ne se forme pas par réaction avec d'autres oxydants tels que le peroxydinitrite $ONOO^-$, le radical hydroxyle $\cdot OH$ ou le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 .

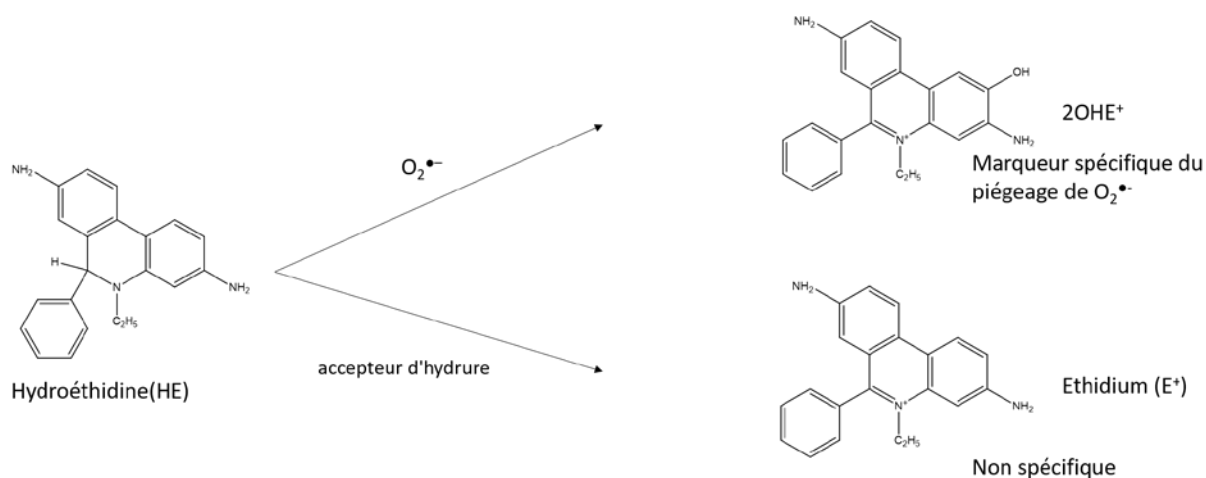


Figure 15. Réactivité de HE vis à vis du radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$

La formation du 2-OH-E⁺ peut alors être détectée en utilisant une technique séparative comme l'HPLC couplée à différents détecteurs tels que la fluorescence, l'électrochimie ou la spectrométrie de masse.

En ce qui concerne le mécanisme réactionnel, il a été proposé que la formation du 2-hydroxyéthidium passe par 2 étapes successives : la sonde hydroéthidine réagit dans un premier temps avec $O_2^{\bullet-}$ pour former l'HE-hydroperoxyde. Ce dernier se transforme en iminoquinone par élimination d'eau pour former après réarrangement le 2-OH-E⁺.

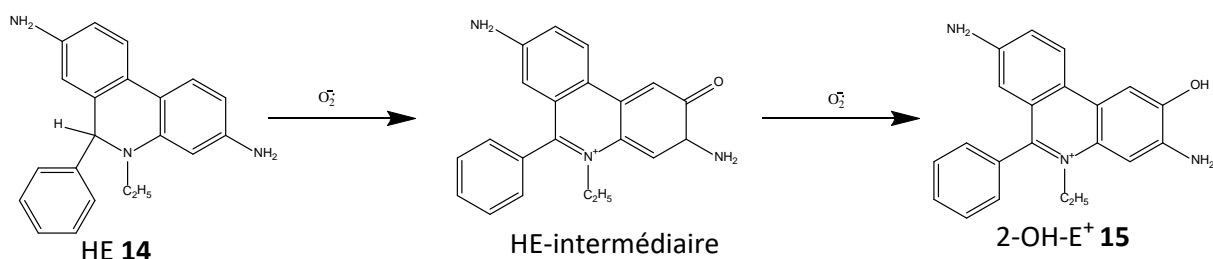


Figure 16. Formation de 2-OH-E⁺ à partir de HE

4.4. Comparaison des méthodes

En résumé, la méthode RPE est une technique simple et rapide à réaliser mais elle manque de sensibilité. De plus, les radicaux piégés et détectés sont à l'extérieur des cellules car les adduits piégeur-radicaux sont dégradés à l'intérieur des cellules. Etant donné cet inconvénient, il est intéressant de travailler sur homogénats de cellules. Par ailleurs, la fluorescence est plus sensible mais sa spécificité est limitée pour identifier les radicaux superoxydes, hydroxyles ou peroxy-nitrites. La méthode LC-MS est la meilleure méthode parmi les trois mais elle est longue à réaliser, nécessite d'avoir accès au bon d'appareillage et réclame des compétences techniques supérieures pour son utilisation. La manipulation de la LC-MS comprend plusieurs étapes en commençant par l'incubation de la sonde avec les cellules, puis l'extraction des composés d'intérêt dans les milieux intra et extracellulaires jusqu'à la séparation chromatographique et la détection de ces derniers par spectrométrie de masse. Mais les résultats sont fiables avec de bonnes sensibilité et spécificité.

Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons vu que les quinone-réductases étaient des enzymes cytosoliques capables de réduire les quinones à deux électrons pour former des hydroquinones plus stables que les semi-quinones produites par l'intermédiaire d'enzymes à un électron. Cette propriété confère à ces quinone-réductases un rôle détoxifiant. Plusieurs études ont montré que certaines catéchol-quinones issues de l'oxydation de neurotransmetteurs étaient bien des substrats des quinone-réductases et plus particulièrement de QR2. De plus, des études réalisées au laboratoire ont permis de montrer que la métabolisation de ces quinones par des cellules surexprimant QR2, conduisait à la formation de ROS par réoxydation de la forme réduite pour redonner à nouveau la quinone (en conditions aérobies). Ainsi un cycle futile se met en place générant des quantités importantes de ROS.

Compte tenu du lien établi entre QR2 et les maladies neurodégénératives et le rôle indiscutable des ROS dans la dégénérescence neuronale, la question se pose du lien entre ces ROS, la métabolisation des catéchol-quinones et la présence dans le cerveau des malades de grandes quantités de QR2. Cette question constitue le point de départ des travaux de recherche présentés dans ce mémoire.

Ainsi, afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette la quinone-réductase 2 et du lien possible avec la dégénérescence neuronale, nous avons choisi de développer nos travaux selon les étapes suivantes :

- Etude de la spécificité de la quinone réductase 2 vis-à-vis de différents substrats quinones ou pseudo-quinones d'intérêt, en comparaison avec la quinone-réductase 1.
- Etude de l'impact de QR2 vis-à-vis de la toxicité de quinones dans des cellules neuronales en mesurant le stress oxydant généré.
- Etude d'une voie de détoxification de la ménadione dans les neuroblastomes par association de la quinone-réductase 2 avec une enzyme de conjugaison.

Chapitre 2

Notions de spécificité de la quinone-réductase 2

Chapitre 2 – Notions de spécificité de la quinone-réductase 2

INTRODUCTION	45
1. CAS DES <i>PARA</i>-QUINONES	48
1.1. ACTIVITES ENZYMATIQUES DE QR2 VIS-A-VIS DES <i>PARA</i> -QUINONES	49
1.2. PRODUCTION DE RADICAUX ASSOCIES A LA REDUCTION DE LA QUINONE	51
2. CAS DES <i>ORTHO</i>-QUINONES	53
3. AUTRES SUBSTRATS	56
CONCLUSION	60

Introduction

Les organismes vivants se défendent des agressions dues aux molécules de l'environnement en ayant mis au point une série de stratégies très complètes pour les éliminer. Ces molécules sont des nutriments, des produits naturels (terpènes, flavonoïdes, etc.), des médicaments, des polluants, etc., mais également certaines molécules naturellement produites par le corps comme la bilirubine ou les stéroïdes. Les organismes vivants ont mis au point un système d'élimination, essentiellement hépatique, de ces molécules qu'on appelle le métabolisme des xénobiotiques. Une revue exhaustive de ces mécanismes a été faite par Testa et Kramer (Krämer et Testa, 2008, 2009 ; Testa et Krämer, 2006, 2007a, 2007b, 2008).

Ce système comprend deux grandes étapes, une étape de fonctionnalisation (Phase I) et une étape de conjugaison (Phase II). Les enzymes les plus représentatives de ces deux phases sont respectivement les cytochromes P450 (Anzenbacher et Anzenbacherová, 2001) et les UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) (Oda *et al.*, 2015 ; Yang *et al.*, 2017).

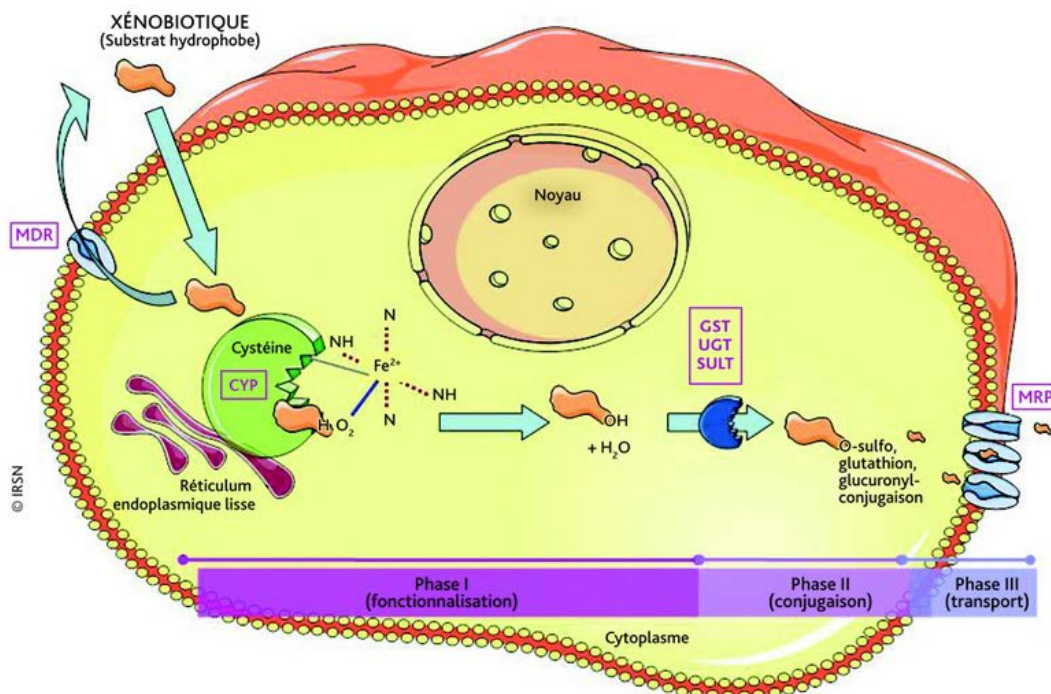


Figure 17. Métabolisation des xénobiotiques au niveau cellulaire (Rouas et Gueguen, 2011)

Comme schématisé Figure 17, la phase I de fonctionnalisation consiste à hydroxyler la molécule (Cytochrome P450), si elle ne l'est pas déjà. La phase II consiste à accrocher une molécule très hydrophile qui facilitera leur solubilisation en milieu aqueux, en particulier l'urine. Les molécules fixées sont principalement un dérivé du glucose, l'acide glucuronique – qui donnera un glucuronide, un sulfate et plus rarement une glycine. On connaît aussi, à côté de ces transférases une transférase du glutathion dont le rôle est plutôt de neutraliser des fonctions -SH.

La très grande diversité des molécules concernées a nécessité, au fil de l'Evolution, une adaptation des enzymes à ces classes de molécules de façon à pouvoir en reconnaître le plus grand nombre. Ces enzymes couvrent pratiquement toutes les classes chimiques, et en particulier toutes les molécules naturelles issues de plantes. L'Evolution a répondu à ce challenge de deux façons : soit une multiplicité des iso-enzymes (CytP450 : plus de 100 iso-enzymes ; UGT, plus d'une trentaine) chacune présentant des spécificités restreintes, soit une plasticité remarquable du site catalytique de l'enzyme (glutathion-S-transférase) qui permet aux 4 isoformes de reconnaître pratiquement toutes les molécules concernées (**Mohana et Achary, 2017**).

En marge de ces deux systèmes bien compris, il existe des enzymes spécialisées dans la modification/détoxification d'autres types de molécules, comme par exemple les quinones. Les quinones réductases ont pour but de réduire le système quinone, naturellement peu stable et donc agressif/toxique pour le vivant. Jusque dans les années 1990, il n'existait, dans ce contexte, qu'une seule enzyme de ce type, la DT-diaphorase (**Ernster et al., 1962**), décrite en 1962, et bien étudiée depuis lors, malgré son changement de nom : NADH-quinone oxidoreductase 1 NQO1 (**Ross et Siegel, 2017**).

En 1997, le groupe de Talalay clone et caractérise une autre quinone reductase, QR2 ou NQO2 (Zhao *et al.*, 1997) qui sera une grande source de surprise. La première étant que cette enzyme ne fonctionne pas avec le même cosubstrat que QR1, le NAD(P)H, mais avec une obscure molécule, la N-ribosyldihydronicotinamide et ses dérivés dont la présence dans les cellules reste discrète (**Formentini et al., 2009**).

Si la spécificité de QR1 a été étudiée assez fréquemment, et rapportée dans plusieurs articles de la littérature, (**Dinkova-Kostova et Talalay, 2010 ; Ross et Siegel, 2017 ; Testa et Krämer, 2007a**) pour QR2, rien de systématique n'a été publié.

Ainsi nous avons commencé à explorer la spécificité de cette enzyme en menant deux types d'expérimentation :

une mesure de l'activité enzymatique de QR2 purifiée pour une série de substrats potentiels, en utilisant le BNAH comme un cosubstrat.

une mesure de la production de ROS associée à la réduction de la quinone, cette production étant un marqueur de la stabilité de la forme réduite (cf. Chapitre 1).

Ces expériences, dans la mesure du possible, ont également été réalisées avec QR1 (cosubstrat : NADH) pour comparaison. Différents substrats ont été testés parmi lesquelles majoritairement des quinones (*ortho* et *para*-quinones) mais également des molécules d'intérêt ayant, soit déjà été décrites comme substrats ou inhibiteurs de quinones réductases, soit ayant des structure pseudoquinoniques potentiellement réductibles par ces enzymes.

1. Cas des *para*-quinones

L'étude s'est, dans un premier temps, portée vers les *para*-quinones compte-tenu des nombreuses publications consacrées à l'activité enzymatique de QR2 vis-à-vis de la ménadione (**Benoit *et al.*, 2010 ; Choi *et al.*, 2011 ; Reybier *et al.*, 2011**). Nous avons en particulier testé la ménadione, la *para*-benzoquinone, les coenzymes Q0, Q2 et Q10, la duroquinone ainsi que la mitomycine C. La mitomycine C est un antibiotique anticancéreux, utilisé pour son activité « crosslinking » sur l'ADN mais ayant des effets indésirables sur le système nerveux *via* probablement l'établissement d'un stress oxydant (**Jamieson *et al.*, 2006 ; Kovalchuk *et al.*, 2016**). Les structures correspondantes sont présentées Figure 18 :

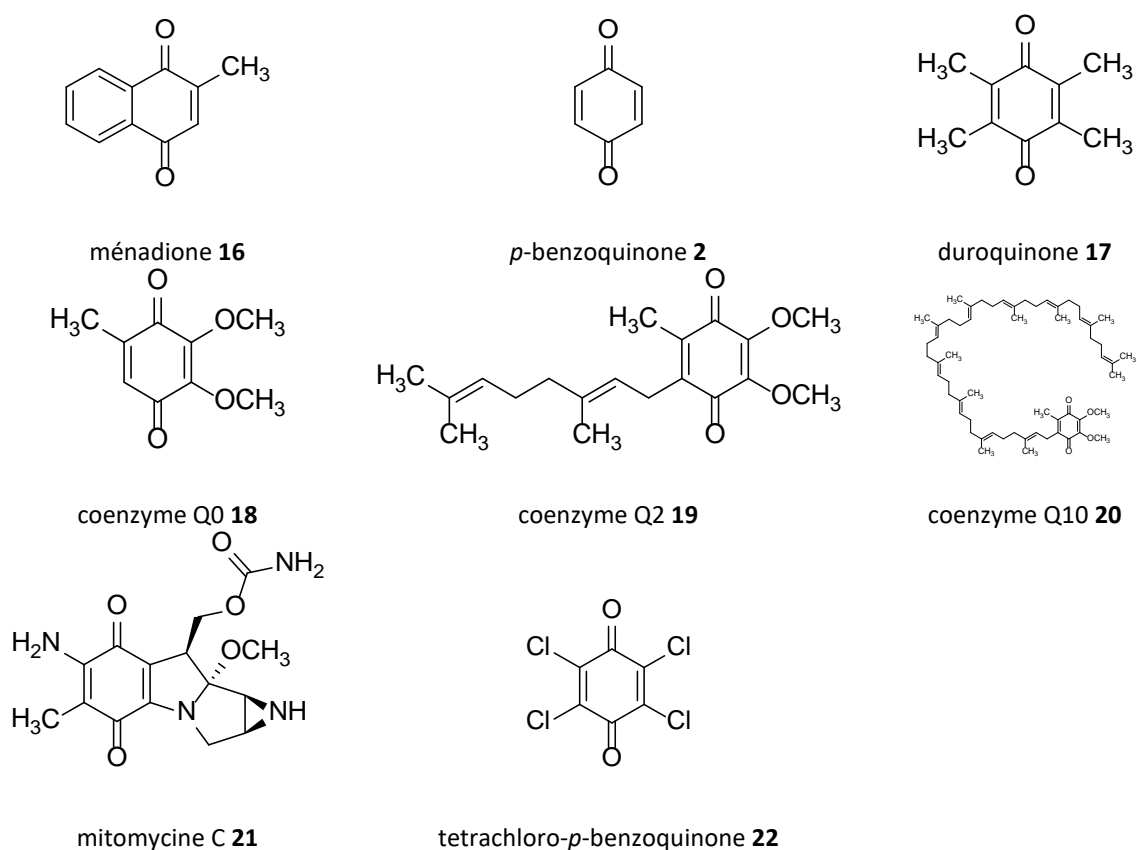


Figure 18. Structure des *para*-quinones testées

1.1. Activités enzymatiques de QR2 vis-à-vis des *para*-quinones

La mesure de l'activité enzymatique de la quinone-réductase 2 est basée sur la mesure de la consommation du cosubstrat pendant la réaction enzymatique. Le cosubstrat BNAH étant fluorescent, il est possible de suivre la diminution de la fluorescence due à sa consommation au cours du temps. Ce test permet de définir l'affinité de la quinone vis-à-vis de l'enzyme en basant sur sa vitesse de réaction.

La Figure 19 illustre les résultats obtenus en présence de la ménadione. On observe une diminution de la fluorescence du fait de la consommation de BNAH (ligne bleue) nécessaire à l'enzyme pour réduire la ménadione. Après 16 min, le cosubstrat a été entièrement consommé. La courbe noire représente la variation de la fluorescence due à une réaction entre BNAH et le substrat ménadione (sans enzyme). Cette réaction a eu lieu mais elle est beaucoup moins rapide que la réaction enzymatique ce qui explique les différences de pentes des deux courbes.

La quinone-réductase 2 réduit la ménadione en ménadiol en consommant le BNAH. Le ménadiol pouvant se réoxyder en ménadione en présence de l'oxygène, un cycle futile s'établit expliquant en outre la forte décroissance de la concentration en BNAH.

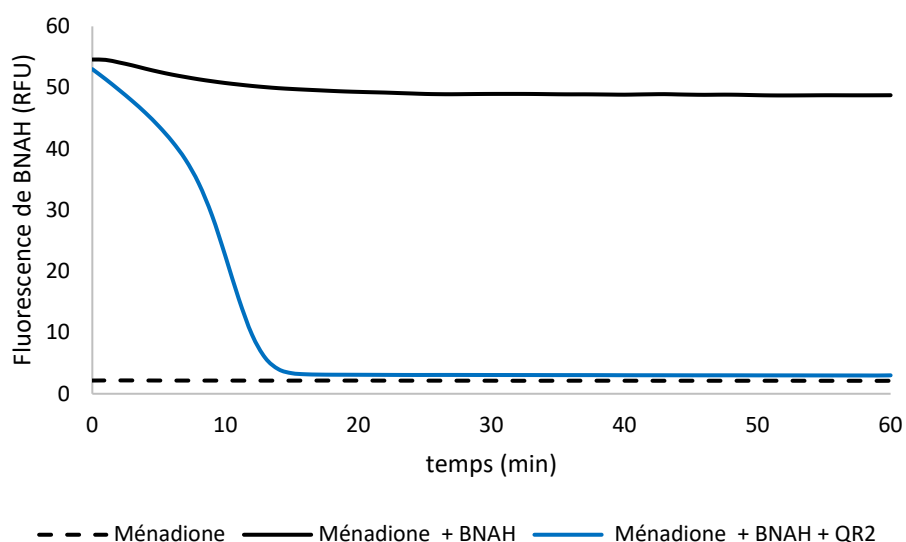


Figure 19. Activité enzymatique de la quinone-réductase 2 en présence de QR2 purifié (0,25 nM), BNAH (100 μ M), ménadione (100 μ M) pendant 60 min. $\lambda_{ex/em}$: 340/440 nm

Les vitesses de réaction, calculées à partir des pentes des courbes mesurées pour les cinq premières minutes (différence avec et sans enzyme) sont représentées sur la Figure 20 pour chacune des *para*-quinones testées. Les résultats font apparaître, en dépit des barres d'erreur importantes, des disparités suivant la molécule considérée. Ainsi, la ménadione donne lieu, comme attendu, à des vitesses de réaction importantes d'environ 0,98 nmol/min/mg de QR2 et 1,53 nmol/min/mg de QR1. Les co-enzymes Q0, Q2 et Q10 donnent lieu avec QR2 à des vitesses comparables, relativement faible de l'ordre de 0,33 nmol/min/mg de protéine, valeur du même ordre de grandeur que la *para*-benzoquinone. Ces molécules sont également métabolisées par QR1 mais beaucoup plus rapidement dans le cas de CoQ0. La duroquinone et la mitomycine C sont fortement métabolisées par QR2 avec des vitesses de réaction légèrement inférieures à la ménadione (0,88 et 0,74 nmol/min/mg de protéine, respectivement). On constate cependant que la mitomycine est moins rapidement métabolisée par QR1 (0,15 nmol/min/mg).

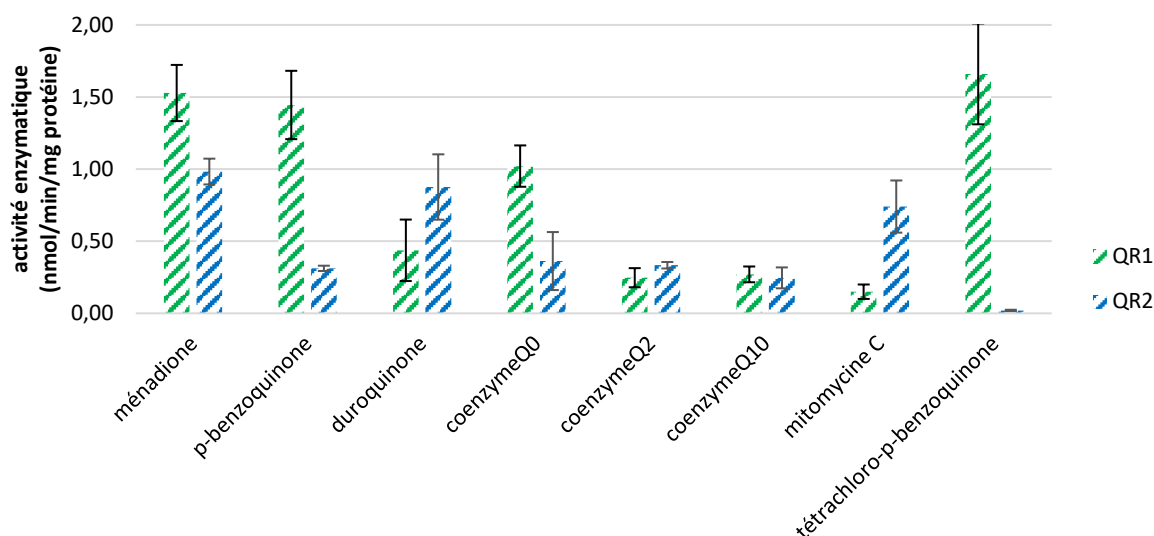


Figure 20. Activité catalytique de QR2 comparée à QR1 sur différentes *para*-quinones testées

La tétrachloro-*p*-benzoquinone n'est pas métabolisée par QR2 mais fortement par QR1 (1,66 nmol/min/mg de QR1). Ceci provient sans doute d'une différence de géométrie électrostatique des sites catalytiques des deux enzymes. En effet, l'encombrement stérique important de la tétrachloro-*p*-benzoquinone du fait de la présence des atomes de chlore pourrait l'empêcher d'entrer dans le site catalytique de QR2 comme l'ont démontré Dufour

et al. pour d'autres molécules par des mesures de docking sur l'enzyme cristallisée (**Calamini et al., 2008 ; Dufour et al., 2011 ; Zhao et al., 1997**). Le cas de la mitomycine C est intéressante d'un point de vue stérique : la molécule est très asymétrique, avec un « côté » très encombré, et un côté très accessible. Il serait intéressant de synthétiser des analogues dans lesquelles ces encombrements seraient modifiés et de voir comment ils influent sur l'activité catalytique.

Afin de compléter ces résultats, des analyses de la production de radicaux libres ont également été réalisées. Même si ces tests ne traduisent pas la capacité de l'enzyme à métaboliser une molécule, ils donnent cependant une indication sur la stabilité de la forme réduite et sur sa capacité à se réoxyder pour générer des radicaux pouvant être associés à la toxicité de la molécule.

1.2. Production de radicaux associés à la réduction de la quinone

La formation de radicaux, qui se produit par réoxydation de la forme réduite de la quinone, a été mesurée par résonance paramagnétique électronique (RPE) en utilisant le DMPO (5,5-diméthyl-1-pyrroline *N*-oxyde) comme piègeur de radicaux. 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. Pour chacune des quinones testées, la production de radicaux a été mesurée en présence d'enzyme purifiée (15 µg/mL), de quinone (100 µM), de BNAH (3 mM) et de DMPO (80 mM) en milieu tamponné Tris-HCl à pH 8,5 (**Reybier et al., 2011**). Les analyses ont également été réalisées en présence de QR1 afin de mettre en évidence des différences de métabolisation d'une enzyme à l'autre. Les intensités ont été calculées par double intégration des signaux RPE. Les valeurs obtenues pour chacune des quinones testées sont présentées Figure 21 pour QR1 et QR2. Les intensités ont été calculées en soustrayant l'intensité des pics obtenus en l'absence d'enzyme.

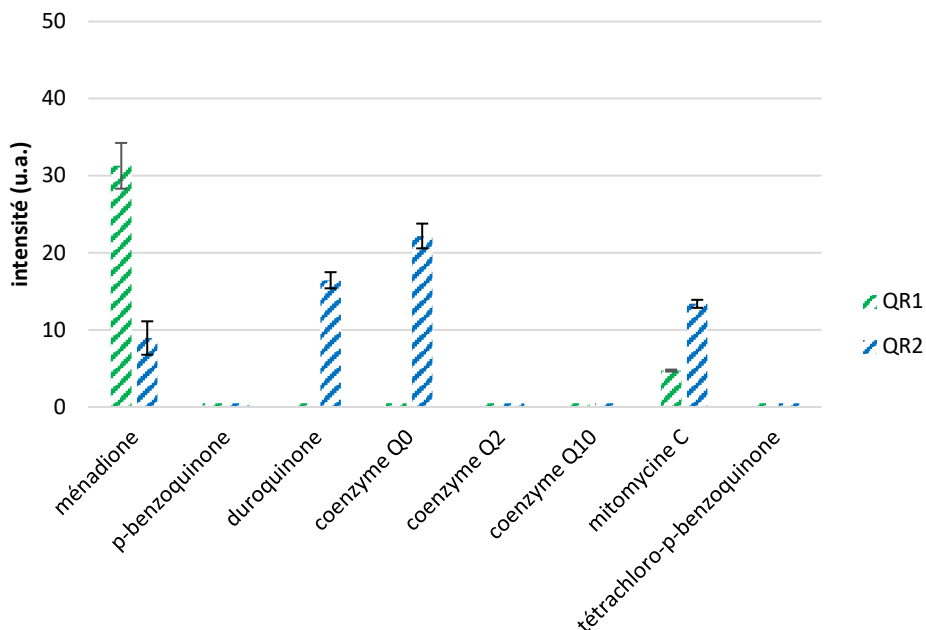


Figure 21. Comparaison de l'intensité des signaux RPE calculée par double intégration des signaux obtenus pour un mélange contenant : DMPO (80 mM), QR1/QR2 purifiée (15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), NADH/BNAH (3 mM), ménadione/*para*-benzoquinone/duroquinone/coenzyme Q0/coenzyme Q2/coenzyme Q10/mitomycine C/ tétrachloro-*p*-benzoquinone) (100 μM).

Ces résultats confirment bien la capacité des enzymes QR1 et QR2 à réduire la ménadione en ménadiol instable pouvant immédiatement se réoxyder pour former des radicaux. La mitomycine C donne également lieu, à la formation de radicaux avec QR2 et dans une moindre mesure avec QR1. Ces résultats sont en accord avec les vitesses de réaction mesurées.

Aucune production de radicaux n'a été enregistrée avec la *p*-benzoquinone alors que cette molécule est bien réduite par les deux enzymes indiquant que la forme réduite est stable. Dans le cas de CoQ0, de manière très surprenante, la production de radicaux n'a été enregistrée qu'avec QR2 alors que d'après les résultats précédents cette molécule est plus rapidement métabolisée par QR1. Aucune production n'est en revanche enregistrée dans le cas des CoQ2 et CoQ10. Ces résultats semblent indiquer, comme pour la *p*-benzoquinone, que, bien qu'étant réduites par les quinone-réductases, les formes réduites sont suffisamment stables. Cette stabilité peut, dans le cas des coenzyme Q2 et Q10, être imputée à leur structure fortement conjuguée pouvant stabiliser la forme réduite.

De la même manière, la duroquinone pourtant métabolisée par les deux enzymes (Figure 20) ne produit des radicaux qu'en présence de QR2. Ces résultats sont très surprenants car cette molécule est rapportée dans la littérature comme étant substrat de QR1 (Faig *et al.*, 2000).

Notons que dans ce cas, la nature des radicaux produits est différente puisqu'il s'agit du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et non du radical méthyle ($\bullet CH_3$) issue de la réaction du radical hydroxyle avec le DMSO utilisé pour dissoudre les molécules. La duroquinone et les coenzymes sont dans la série (Figure 18) les molécules les plus lipophiles qui pourraient stabiliser le radical $O_2^{\bullet-}$ comparativement aux autres.

Ainsi, au vu des résultats les trois meilleurs substrats de QR2 parmi ces *para*-quinones sont la ménadione, la duroquinone, le coenzyme Q0 et la mitomycine C. Ces quatre molécules donnent lieu, après réduction, à une production significative de radicaux. Le coenzyme Q0, bien que moins vite métabolisé par QR2, produit également des radicaux après réduction mais seulement avec QR2.

2. Cas des *ortho*-quinones

Nous nous sommes ensuite intéressés aux *ortho*-quinones. Plusieurs types de structure *ortho*-quinonique ont été testées. Des structures simples telles que la 3,5-*di-tert-butyl-o*-benzoquinone et la tétrachloro-*o*-benzoquinone et une structure de type catécholquinone, l'adrénochrome, en raison de leur filiation évidente avec la dopamine-quinone et du lien établi entre ces molécules et certaines maladies neurodégénératives. Deux autres molécules à structures fortement conjuguées ont également été testées : les tanshinone I et IIA qui ont des structures proches de l'inhibiteur spécifique de QR2, le S29434. Les structures correspondantes sont présentées sur la Figure 22.

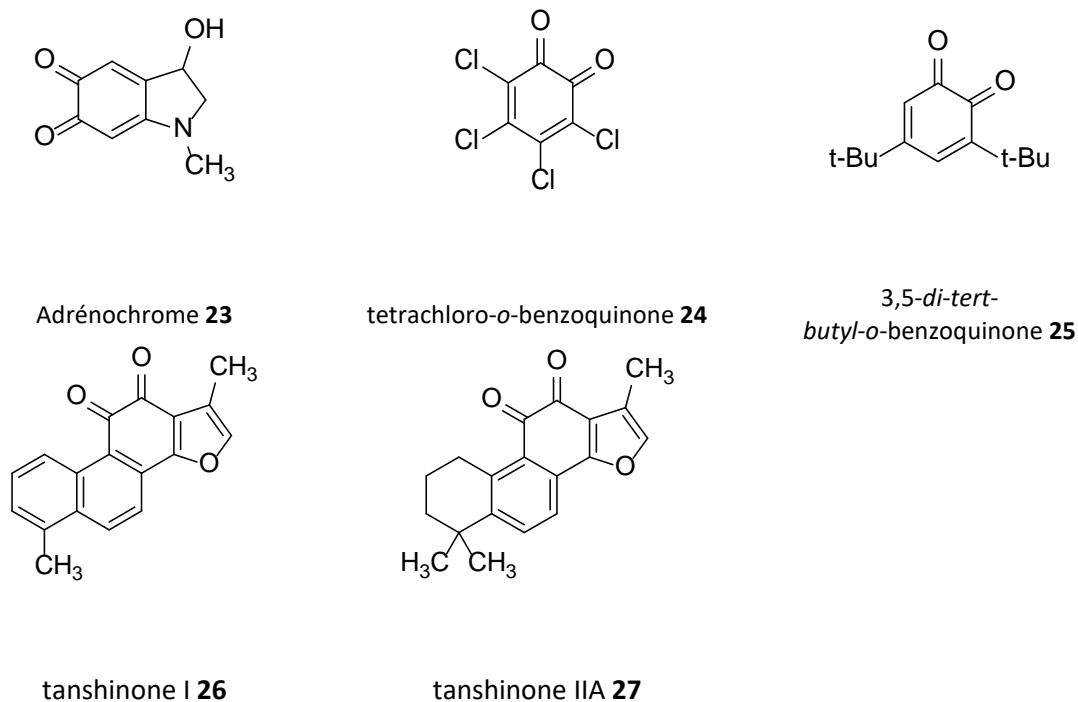


Figure 22. Structure des ortho-quinones testées

Comme dans le cas des *para*-quinones, la capacité de la quinone-réductase 2 à réduire ces composés et la formation de radicaux libres ont été mesurées. Les résultats sont regroupés sur la Figure 23.

Toutes les molécules testées sauf la tétrachloro-*o*-benzoquinone sont bien substrats de QR2 mais d'une manière générale avec des vitesses de réaction mesurées inférieures à celles obtenues avec les *para*-quinones. La tétrachloro-*o*-benzoquinone est très fortement métabolisée par QR1. Il faut noter que dans le cas des tanshinones I et IIA, alors que ces molécules sont bien substrats de QR1 et de QR2, on observe une production de radicaux uniquement avec QR1. Ces différences sont imputables aux vitesses de réactions qui sont bien inférieures pour QR2. Des expériences réalisées en l'absence d'enzymes ont montré que les tanshinones réagissent fortement avec le cosubstrat BNAH pour former des radicaux alors que ce n'est pas le cas avec NADH. Ceci explique que la production de radicaux imputable à QR2 soit très faible dans ce cas.

Ainsi, parmi les *ortho*-quinones testées, seules la tétrachloro-*o*-benzoquinone et les tanshinones I et IIA présentent une affinité très différente pour QR1 et QR2. Ceci est probablement dû à des différences mineures dans la géométrie électrostatique des deux sites catalytiques (celui de QR1 et celui de QR2).

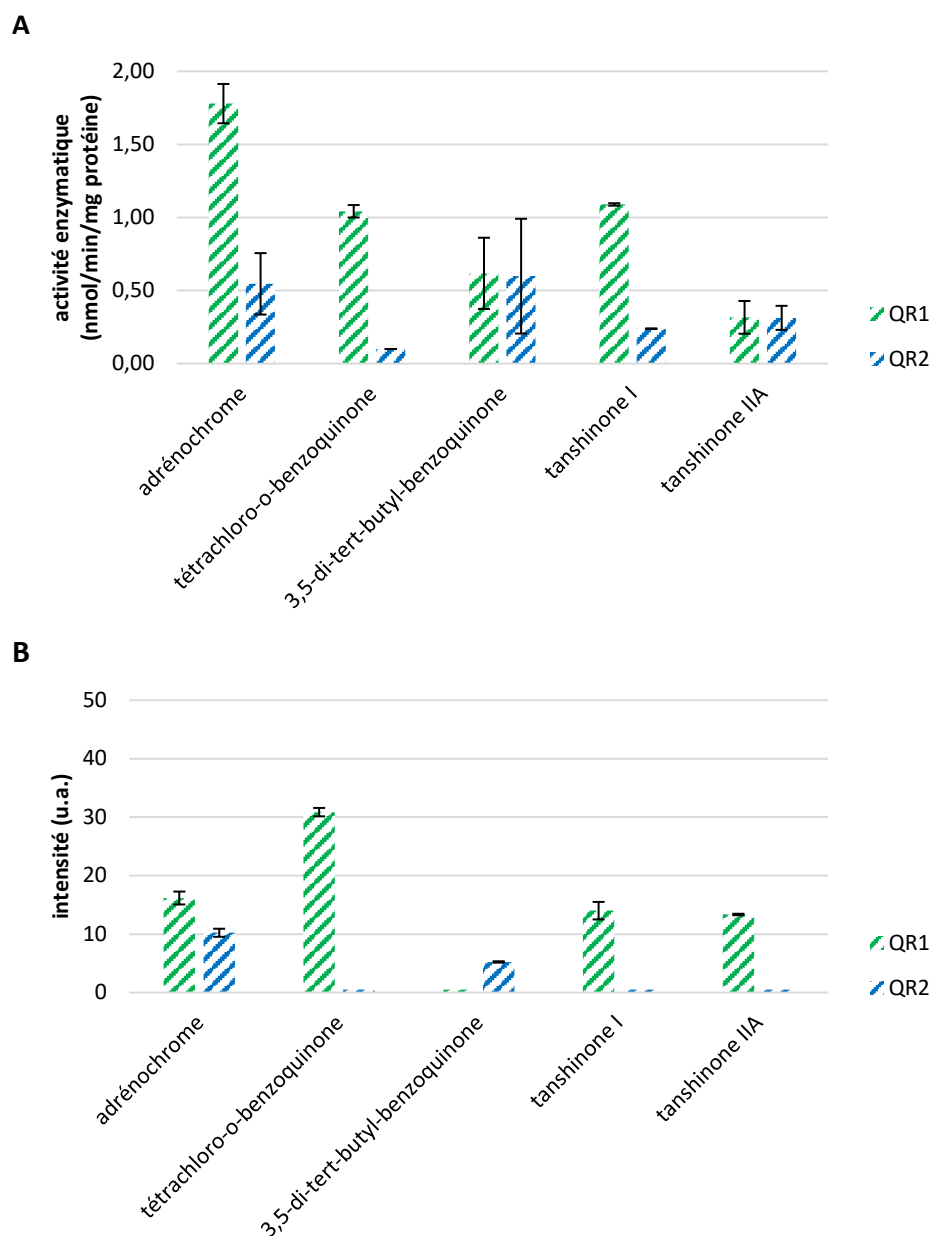


Figure 23. A Activité catalytique de QR2 comparée à QR1 sur différentes *ortho*-quinones testées. **B** Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus avec DMPO (80 mM), QR1/QR2 purifiée (15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), NADH/BNAH (3 mM), adrénochrome/tétrachloro-*o*-benzoquinone/3,5-di-*tert*-butyl-benzoquinone/tanshinone I/tanshinone IIA) (100 μM).

3. Autres substrats

D'autres molécules ont été testées parmi lesquelles :

l'imatinib, décrit dans la littérature comme étant un inhibiteur de QR2 (**Winger *et al.*, 2009**) ;

la curcumine, les dérivés de curcumine étant décrits comme des molécules antioxydantes induisant l'expression de la quinone-réductase 1 (**Dinkova-Kostova *et Talalay*, 2010 ; Nakai *et al.*, 2018 ; Wu *et al.*, 2013**);

le resvératrol, un inhibiteur de quinone-réductase 2, (**Buryanovskyy *et al.*, 2004**) et son métabolite le picéatannol (**Les *et al.*, 2016**) ;

le CB1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide), un anticancéreux décrit comme substrat de QR2 (**Knox *et al.*, 2000**) ;

le paracétamol, Miettinen et Björklund ayant montré que le paracétamol pouvait être à l'origine de la production d'anions superoxyde en présence de QR2 (**Miettinen et Björklund, 2014**) ainsi que son métabolite, le NAPQI (*N*-acétyl-*p*-benzoquinone imine), qui est une pseudoquinone ;

le DCPIP (2,6-dichlorophénol indolphénol) et le bleu de méthylène décrits comme substrats de la quinone-réductase 1 (**Shaw *et al.*, 1991**). Rappelons que le bleu de méthylène est utilisé pour déterminer la viabilité des cellules eucaryotes dans un test classique de biologie cellulaire mais aussi qu'il a été envisagé comme agent thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer (**Appleby et Cummings, 2013 ; Painting et Kirsop, 1990**). A ce titre, puisque son mécanisme d'action n'est pas connu comme « antioxydant », il était intéressant d'étudier son comportement en présence de QR2. des dérivés de la dopamine. Compte-tenu de la capacité de la dopamine à s'auto-oxyder (milieu basique), la dopamine ainsi que ses dérivés tels que la d-DOPA (précurseur de la dopamine), la 6-OH-dopamine (métabolite de la dopamine) et le catéchol ont également été testés (**Graham *et al.*, 1978**).

Les structures correspondantes sont présentées sur la Figure 24 et les résultats obtenus en termes d'activité enzymatique et de production de radicaux sont présentés sur la Figure 25. Il faut noter que pour ces molécules, et en raison d'un problème d'approvisionnement en

enzyme QR1, nous ne disposons des résultats d'activité enzymatique uniquement pour 5 molécules (6-OH-dopamine, CB1954, paracétamol, DCPIP et bleu de méthylène) pour cette enzyme.

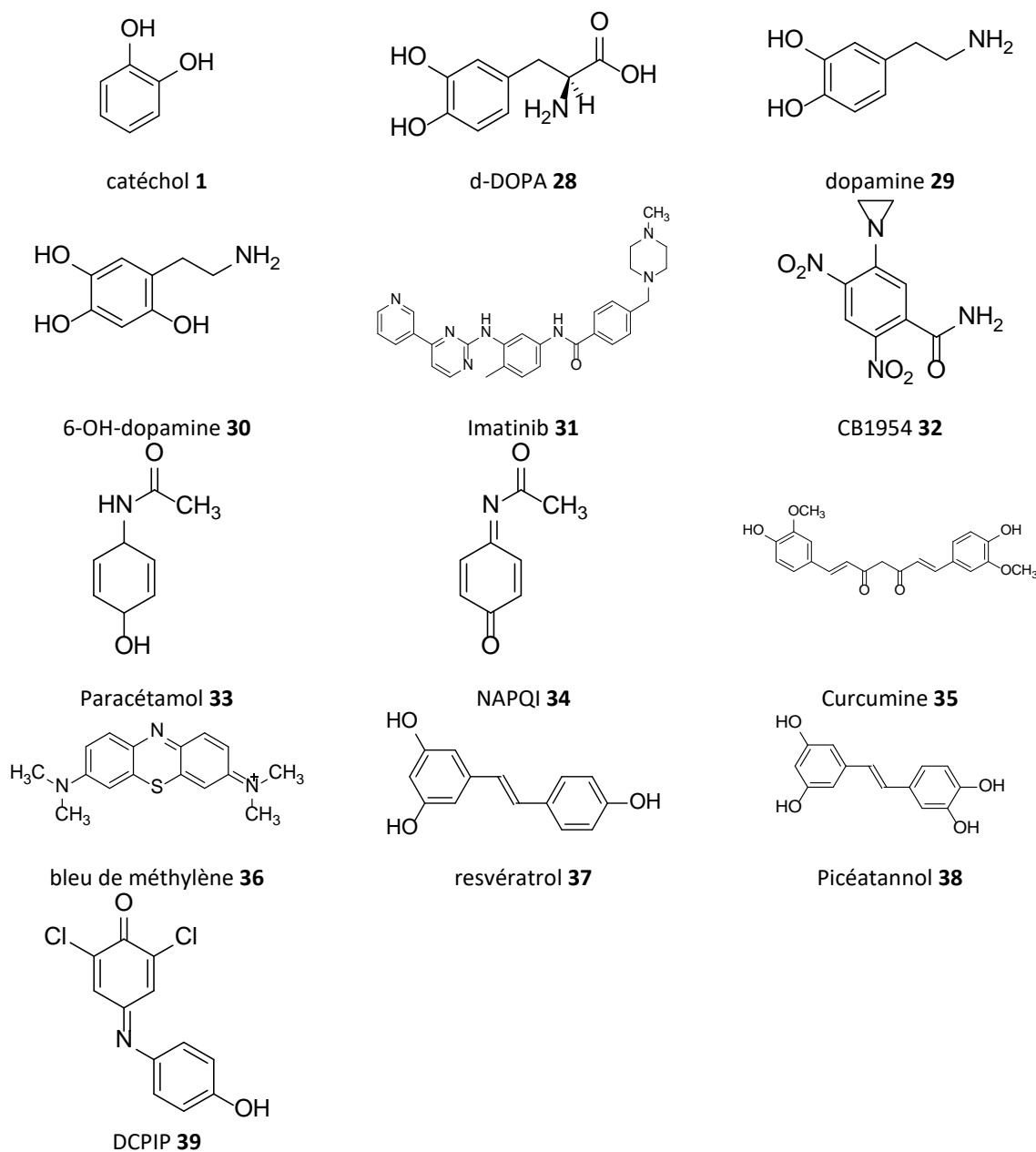


Figure 24. Structure de divers substrats testés.

Parmi ces composés, comme attendu, le CB1954 est bien métabolisé uniquement par QR2 avec une vitesse d'environ 0,69 nmol/min/mg de protéine. En effet QR2 est capable de réduire

le CB1954 par deux fois 2 électrons pour la réduction des deux fonctions NO₂ en NHOH (**AbuKhader *et al.*, 2005**) comme nous l'avons montré dans le chapitre I. En ce qui concerne la dopamine et ses dérivés, la d-DOPA et la 6-OH-dopamine, seule la 6-OH-dopamine est métabolisée par QR2. Les analyses ont confirmé que cette molécule était également rapidement métabolisée par QR1. Pour ces trois composés, aucune production de radicaux n'a été enregistrée avec QR2 alors que la 6-OH dopamine produit des radicaux avec QR1. Ceci pourrait provenir d'une très grande différence de spécificité de QR1 et QR2 pour cette molécule. La vitesse de métabolisation de la 6-OH dopamine est trop faible pour produire des quantités détectables de radicaux.

Le paracétamol est faiblement métabolisé par QR2 (0,22 nmol/min/mg de protéine), sa réduction s'accompagnant d'une production de radicaux libres, alors que son métabolite, le NAPQI, qui a pourtant une structure pseudoquinone, est inactif vis-à-vis de QR2.

Le DCPIP est bien métabolisé par QR1 comme décrit dans la littérature, mais très faiblement par QR2. Ces résultats sont confirmés par les analyses RPE (Figure 25), puisqu'on détecte la production de radicaux uniquement avec QR1.

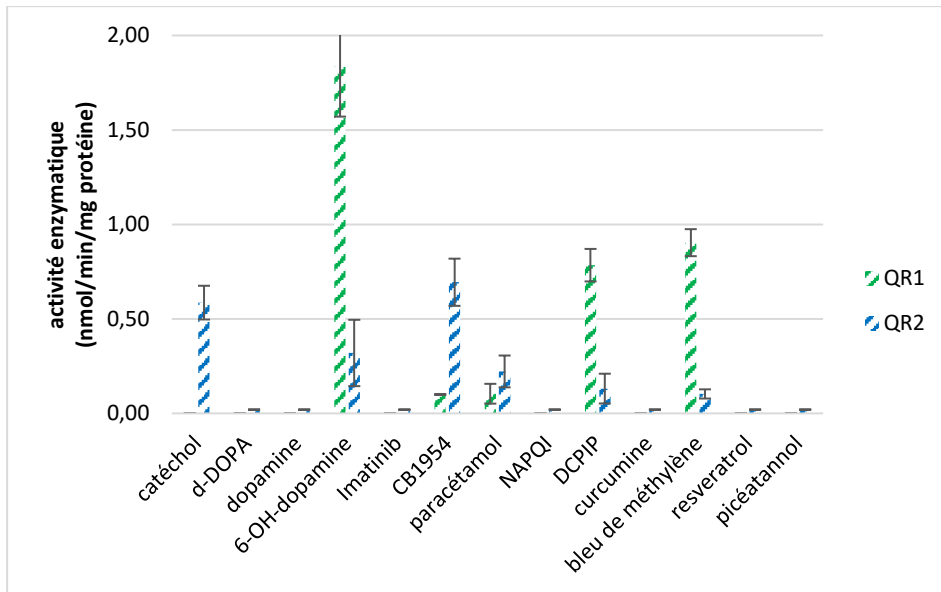
Le resvératrol et l'imatinib décrits comme inhibiteurs de QR2, ne sont pas, comme attendus, substrats de QR2. La curcumine, inducteur de quinone-réductase, est également inactif.

Le bleu de méthylène n'est quasiment pas métabolisé par QR2 (~ 0,10 nmol/min/mg de protéine) mais on note cependant une grande quantité de radicaux produits en présence de QR1 ce qui confirme l'analyse de l'activité enzymatique.

En conclusion les principales différences de spécificité entre QR1 et QR2 concernent le bleu de méthylène, le DCPIP et la 6-OH-Dopamine qui sont rapidement réduits par QR1 comparativement à QR2 pour laquelle l'activité est très faible. Au contraire, CB1954 et le paracétamol sont substrats de QR2 et non de QR1.

.

A



B

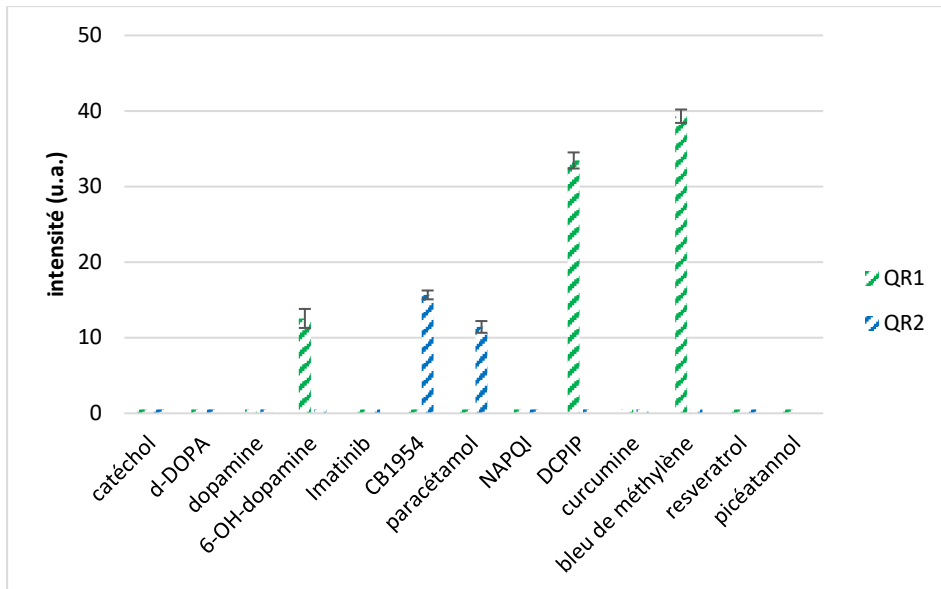


Figure 25. A) Activité enzymatiques des substrats testés **B)** Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus avec DMPO (80 mM), QR1/QR2 purifiée (15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), NADH/BNAH (3 mM), catéchol/d-dopa/dopamine/6-OH-dopamine/imatinib/CB1954/paracétamol/NAPQI/DCPIP /curcumine/bleu de méthylène/resvératrol/picéatannol) (100 μM).

Conclusion

Ce travail constitue une étude préliminaire sur la spécificité de QR2 vis-à-vis de divers substrats. Les résultats présentés dans ce chapitre sont ainsi nouveaux et ont permis de mettre en évidence des différences majeures de spécificité entre QR1 et QR2 concernant la tétrachloro-o-benzoquinone, la 6-OH-dopamine, le DCPIP, le bleu de méthylène, la duroquinone, la mitomycine C, le CB1954 et le paracétamol, les quatre derniers étant spécifiques de QR2.

Une part importante de ces différences peut être attribuée à la géométrie électrostatique des sites catalytiques de QR1 et de QR2. Bien que proches, ces sites catalytiques présentent néanmoins quelques différences notamment sur la taille de la cavité catalytique.

En ayant commencé à cartographier dans le présent travail les spécificités comparées de QR1 et de QR2, nous pensons avoir apporté un éclairage nouveau sur les rôles respectifs de ces enzymes, trop souvent simplifiés à outrance comme étant identiques ou, pire, en négligeant totalement le rôle potentiel de QR2. En effet, il est important de rappeler que si la quantité intracellulaire homéostatique de NADH est considérable – aux alentours de 1 μM – la quantité du cosubstrat de QR2 à l'état basal est négligeable (**Formentini *et al.*, 2009**). Il est donc évident qu'à l'état de repos, QR2 ne fonctionne pas et la totalité du métabolisme des quinones est bien due à QR1. Par contre, c'est le catabolisme du NADH, par exemple dans des cellules stressées, qui voit apparaître des quantités importantes du cosubstrat de QR2, aux dépens du NADH ($\text{NADH} \rightarrow \text{NRH} + \text{AMP}$) (voir Chowdhry *et al.* pour une discussion plus complète sur le catabolisme du NADH) (**Chowdhry *et al.*, 2019**).

Chapitre 3

Dérégulation redox induite par la métabolisation des quinones en présence de QR2

Chapitre 3 – Dérégulation redox induite par la métabolisation des quinones en présence de QR2

INTRODUCTION	63
1. ETUDE DE LA PRODUCTION DE ROS INDUITE PAR LA METABOLISATION DE <i>PARA</i> ET <i>ORTHO</i>-QUINONES PAR DES CELLULES K562	64
1.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES	64
1.2. METABOLISATION DE <i>PARA</i> -QUINONES	65
1.3. METABOLISATION D’ <i>ORTHO</i> -QUINONES	69
2. ETUDE DE LA PRODUCTION DE ROS INDUITE PAR LA METABOLISATION DE <i>PARA</i> ET <i>ORTHO</i>-QUINONES PAR DES CELLULES SH-SY5Y	72
2.1. METABOLISATION DE LA MENADIONE	73
2.1.1. <i>Analyse des spectres</i>	73
2.1.2. <i>Analyse quantitative</i>	76
2.2. METABOLISATION DE L’ADRENOCROME.....	78
2.2.1. <i>Analyse des spectres</i>	78
3. NEURONES PRIMAIRES	81
3.1. <i>Analyse des spectres</i>	81
3.2. <i>Analyse quantitative</i>	82
CONCLUSION	85

Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I les quinone-réductases sont des flavoenzymes cytosoliques connues pour protéger la cellule de la toxicité induite par des composés quinoniques (**Chen et al., 2000**). Les quinones-réductases 1 et 2 sont en effet capables de réduire les quinones à deux électrons pour former des hydroquinones relativement stables et ainsi éviter leur réduction à un électron pour former dans la cellule des semiquinones extrêmement réactives et délétères car à l'origine de la formation de radicaux libres.

Cependant des études par résonance paramagnétique électronique (RPE) menées au sein de l'équipe ont démontré, sur enzyme purifiée, que la réduction de certaines *para* et *ortho*-quinones d'intérêt s'accompagnait d'une production importante de radicaux imputable à la réoxydation de la forme réduite instable, l'hydroquinone, par transfert d'un électron à l'oxygène (**Reybiel et al., 2011**). D'autre part, des analyses RPE et de microscopie confocale ont fait apparaître, de manière surprenante, que la production de radicaux induite par la métabolisation de ces quinones, par une lignée cellulaire génétiquement modifiée pour surexprimer QR2 (lignée CHO, Cellules d'Ovaires de Hamster Chinois) dépendait de la nature de la quinone (**Cassagnes et al., 2015**). Le rôle bénéfique de QR2 a bien été mis en évidence dans le cas de la ménadione puisque la surexpression de QR2 induit une diminution du stress oxydant comparé aux cellules non transduites alors que l'ajout de l'inhibiteur spécifique de QR2 provoque une réaugmentation de la production d'espèces réactives. Dans le cas de catéchol-quinones issues de neurotransmetteurs tels que l'adrénochrome ou l'aminochrome, la présence de QR2 induit au contraire une forte augmentation de la production d'espèces radicalaires. Ainsi, il semblerait que les caractères toxifiant ou détoxifiant de la quinone-réductase 2 soient fortement liés, non seulement au type de quinones, mais également au type de cellules considérées.

Afin de valider d'infirmier cette hypothèse nous avons choisi de considérer d'autres types de cellules parmi lesquelles les cellules K562 qui surexpriment naturellement QR2 et des cellules neuronales. Compte tenu du lien avéré entre QR2, la perte et l'acquisition de la mémoire et des niveaux élevés de catéchol, les neuroblastomes (SH-SY5Y) et les neurones primaires de souris ont été choisis pour les expériences menées dans ce chapitre.

1. Etude de la production de ROS induite par la métabolisation de *para* et *ortho*-quinones par des cellules K562

Les cellules K562 sont des cellules leucémiques myéloïdes d'origine humaine. C'est une lignée immortalisée portant le gène BCR-ABL qui traduit une tyrosine kinase qui est un facteur de prolifération cellulaire. D'autre part, cette lignée exprime naturellement la quinone-réductase 2. Yan *et al.* ont mis en évidence une grand quantité de QR2 par rapport à QR1 sur la lignée K562 comme l'illustre le Western Blot présenté ci-dessous (Figure 26) (Yan *et al.*, 2011). Ces cellules ont déjà été utilisées dans de nombreuses études concernant QR2 et notamment pour étudier l'effet de QR2 vis-à-vis de la survie cellulaire (Michaelis *et al.*, 2012 ; Nolan *et al.*, 2012).

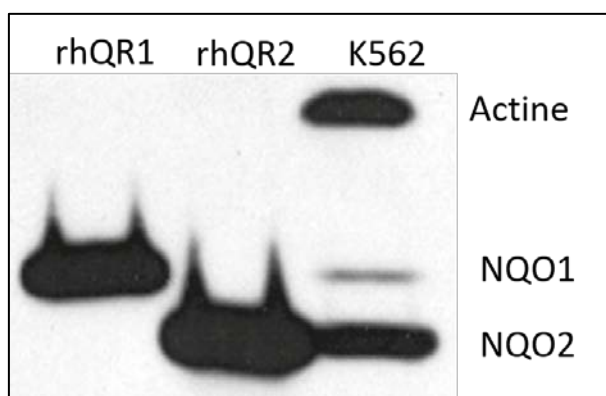


Figure 26. Expression de QR2 et QR1 sur la lignée K562 (Yan *et al.*, 2011)

1.1. Conditions expérimentales

Les mesures de production de radicaux libres ont été réalisées par résonance paramagnétique électronique en utilisant le DMPO (5,5-diméthyl-1-pyrroline *N*-oxyde) comme piègeur de radical. Les mesures ont été réalisées pour $5 \cdot 10^6$ cellules dans le tampon phosphate DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) après 2 minutes d'incubation en présence de la quinone étudiée et du cosubstrat BNAH (Figure 27). Pour confirmer l'implication de QR2 les analyses ont également été menées après 30 min de pré-incubation des cellules en présence de l'inhibiteur spécifique de QR2, le S29434 (Figure 27).

Tableau 2. Conditions de préparation des échantillons

	Concentration initiale	Volume prélevé (μL)	Volume final (μL)	Concentration finale
K562	5.10^6 cellules	300		5.10^6 cellules
DPBS		q.s.p 500	500	
inhibiteur	1 mM	10	500	20 μM
DMPO	1 M	25	500	50 mM
cosubstrat	1 mM	50	500	100 μM
substrat	1 mM	50	500	100 μM

Les solutions stock de substrats et de cosubstrats ont été préparées à 1 mM dans un mélange DMSO/DPBS à 10% de DMSO, l'échantillon final contient au maximum 5 % de DMSO.

Les structures des différents composés utilisés dans cette étude sont présentées Figure 27 :

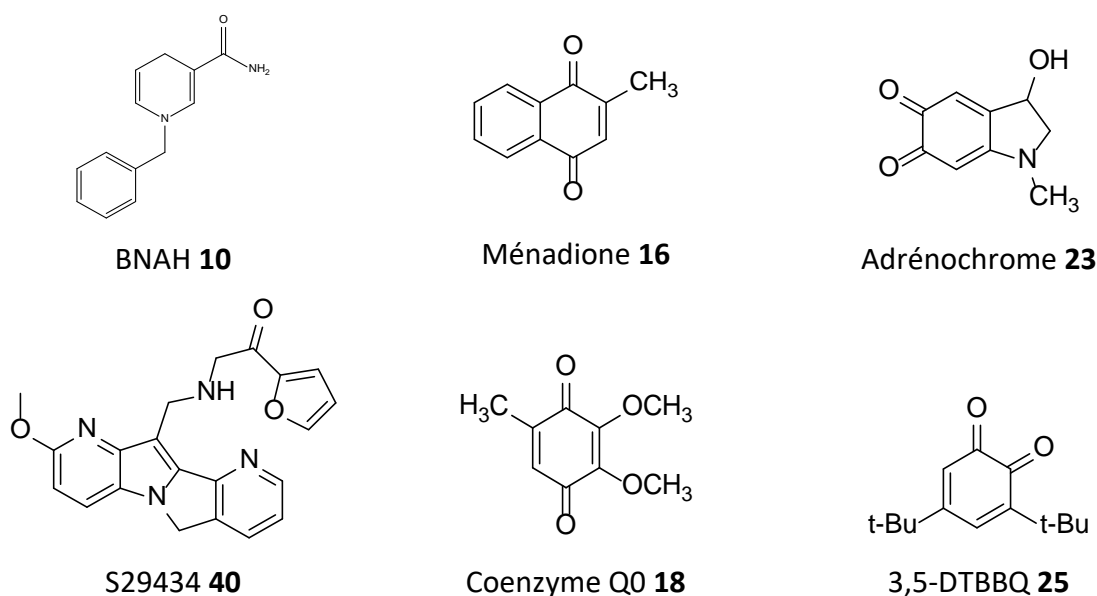


Figure 27. Structure des composés utilisés dans cette étude

1.2. Métabolisation de *para*-quinones

Les analyses ont été réalisées dans un premier temps en présence de ménadione. Le spectre RPE (Figure 28.1) se présente sous la forme d'un quadruplet caractéristique de l'adduit radicalaire DMPO-OH avec des constantes de couplage $a_N = a_H = 14.82$ G, valeurs conformes à ce qui est décrit dans la littérature (**Pieper et al., 1995**). Afin de vérifier si ce produit est issu du piégeage direct du radical hydroxyle ou de la transformation de l'adduit radicalaire DMPO-OOH, formé par piégeage du radical superoxyde, la même expérience a été réalisée en

présence de superoxyde dismutase (25 kU/mL), une enzyme transformant très rapidement l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Comme le montre le spectre correspondant (Figure 28.4), le signal a quasiment disparu confirmant que la métabolisation de la ménadione par les cellules K562 s'accompagne de la production de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$. Un spectre deux fois moins intense a été enregistré en l'absence du cosubstrat BNAH (Figure 28.2) ou après pré-incubation des cellules avec l'inhibiteur spécifique S29434 (Figure 28.3) confirmant que cette forte production de radicaux est bien en grande partie imputable à l'activité enzymatique de QR2 : la réaction enzymatique produit le ménadiol instable qui se réoxyde en transférant un électron à l'oxygène (Schéma 1). La production résiduelle de radicaux enregistrée en l'absence de cosubstrat ou en présence d'inhibiteur correspond à la production radicalaire lors de la réoxydation de la semi-quinone formée après une réduction à 1 électron de la quinone dans la cellule (**Monks et Jones, 2002**). Ces réductases à 1 électron sont par exemple le cytochrome P450 (CYP450) ou les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Nosoh et al., 1968**).

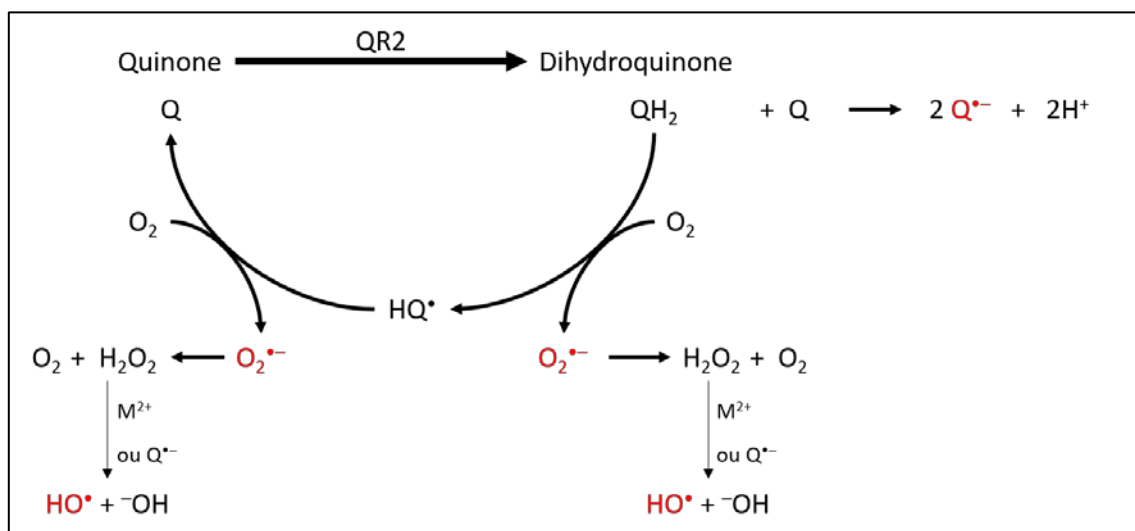


Schéma 1. Voies de production de radicaux libres après réduction d'une quinone en hydroquinone par une quinone-réductase.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons testé une autre quinone le coenzyme Q0 (Figure 27). Le spectre RPE obtenu fait apparaître un signal caractéristique d'une semi-quinone (Figure 28.5) caractérisé par les constantes de couplages : $a_H(3H) = 2,20$ G, $a_H(1H) = 1,55$ G (**Poderoso et al., 1999**). Ces constantes ont été déterminées par simulation du spectre à l'aide du logiciel

SIMFONIA et sont conformes à la littérature (**Poderoso et al., 1999**). Cependant dans ce cas, la production de ROS est extrêmement faible et difficilement quantifiable. On voit également apparaître sur le spectre un sextuplet de faible intensité qui correspondrait, d'après la simulation, au piégeage d'un radical de type carbone centré. Cet adduit pourrait avoir comme origine la production du radical $\cdot\text{OH}$ qui donne le radical $\cdot\text{CH}_3$ par réaction avec le DMSO (Figure 28.6). La détection de la forme semiquinonique ainsi que la faible concentration en radicaux de type hydroxyle (ou $\cdot\text{CH}_3$) ou superoxyde semblent indiquer que les formes réduites à 1 ou 2 électrons, contrairement au ménadiol, sont suffisamment stables pour ne pas se réoxyder. Ces résultats sont conformes à ceux qui avaient été précédemment obtenus sur les cellules CHO (**Cassagnes et al., 2015**).

Ainsi, comme le montre la Figure 29, qui illustre les variations de la production de radicaux évaluée par la double intégration des spectres RPE (logiciel WINEPR) dans les différentes conditions expérimentales, QR2 est responsable, dans les cellules K562, d'une production accrue de radicaux en présence de ménadione. Ces résultats sont en contradiction avec les résultats précédemment obtenus avec les cellules CHO pour lesquelles, la présence de QR2 conduisait à une diminution du stress oxydant. Ainsi afin de poursuivre nos investigations dans ce sens les mêmes expériences ont été menées avec des *ortho*-quinones.

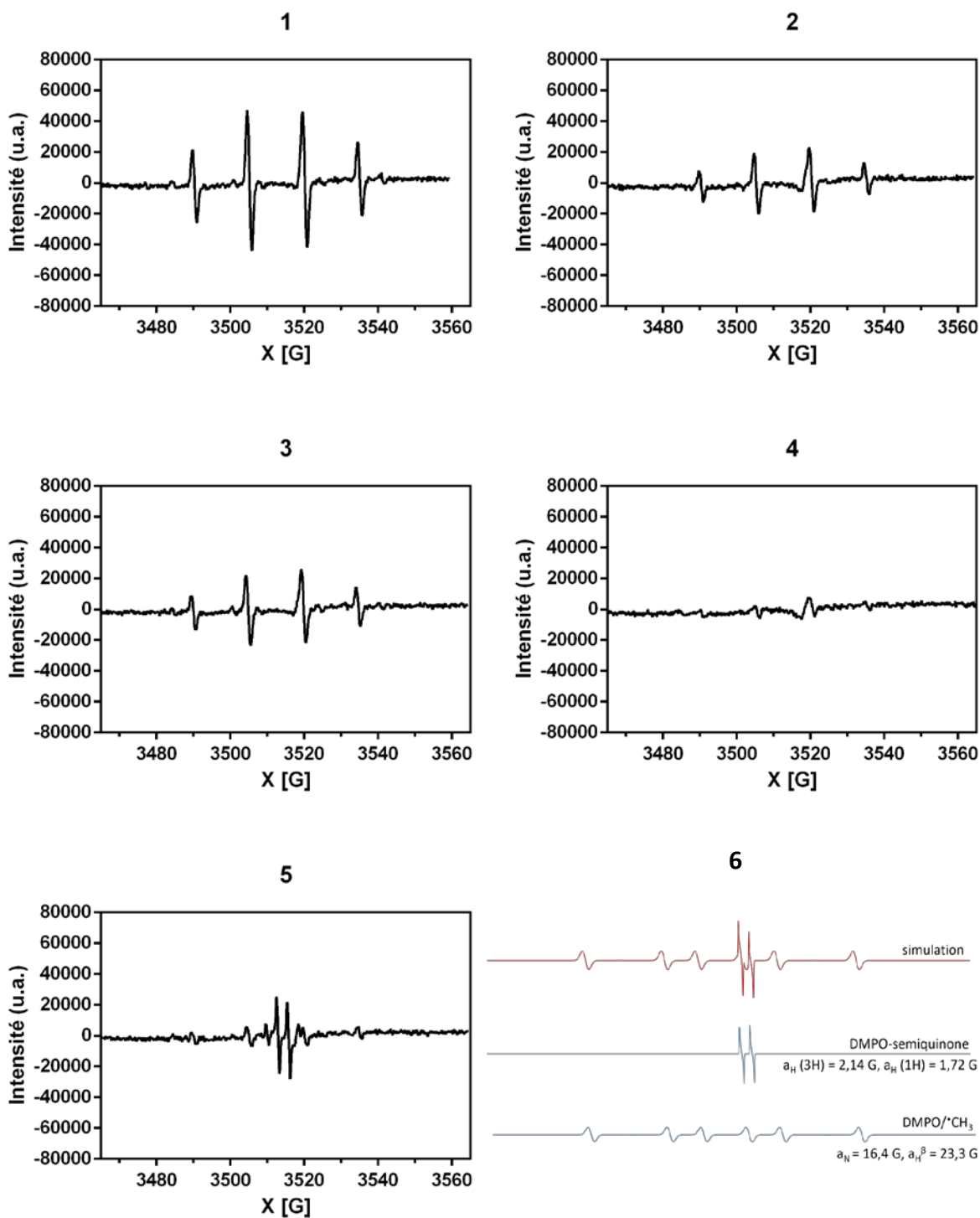


Figure 28. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) avec (1) ménadione (100 μM), BNAH (100 μM) ; (2) ménadione (100 μM), sans BNAH ; (3) ménadione (100 μM), BNAH (100 μM), S29434 (20 μM) ; (4) ménadione (100 μM), BNAH (100 μM), SOD (150 U/mL) ; (5) CoQ0 (100 μM , BNAH (100 μM) pour les cellules K562. ; (6) simulation du spectre (5). Gamme d'intensité ± 80000 . Gain : $2 \cdot 10^5$

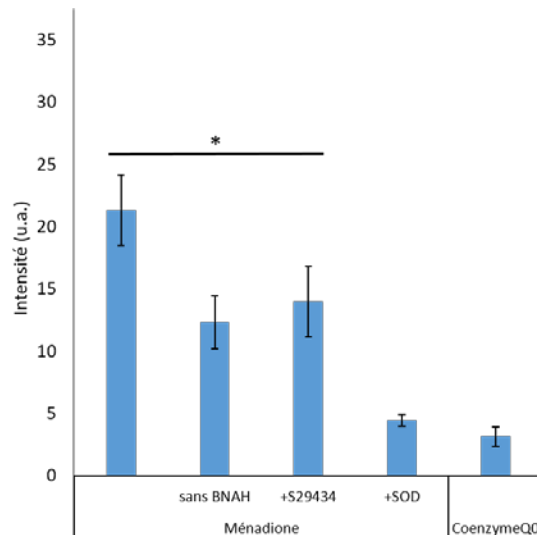


Figure 29. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus en présence de ménadione ou de Coenzyme Q0 pour les cellules K562. *P < 0,05

1.3. Métabolisation d'*ortho*-quinones

Les analyses ont été réalisées avec deux *ortho*-quinones, l'adrénochrome et le 3,5-di-tert-butyl-benzoquinone (3,5-DTBBQ) (Figure 30), deux molécules ayant été décrites comme substrat de QR2 (Fu *et al.*, 2008) et ayant effectivement donné lieu à une production radicalaire sur enzyme purifiée (chapitre 2). Les spectres correspondants sont présentés (Figure 30). En présence d'adrénochrome on observe l'apparition d'un quadruplet très intense, d'intensité presque deux fois supérieure à celle de la ménadione (Figure 30.1). Le quadruplet est caractérisé par les constantes de couplages $a_N = a_H = 14.96$ G, qui sont les mêmes que pour la ménadione. L'ajout de SOD fait disparaître le signal (Figure 30.4) confirmant qu'il s'agit également dans ce cas du signal de l'adduit radicalaire DMPO-OH issu de la transformation du DMPO-OOH formé par piégeage de l'anion superoxyde. Comme pour la ménadione, on observe une forte diminution du signal lorsque les cellules ont été pré-incubées en présence de l'inhibiteur S29434 (Figure 30.3). Comme l'illustre la Figure 31 cette diminution est très significative ($p < 0,01$), presque 50% des radicaux ayant disparu.

En l'absence de BNAH, l'intensité du signal est très faible (Figure 31). Ce résultat semble indiquer, dans ce cas, que la part des radicaux issus des réductions à 1 électron de l'adrénochrome dans la cellule est moins importante que celle pour la ménadione.

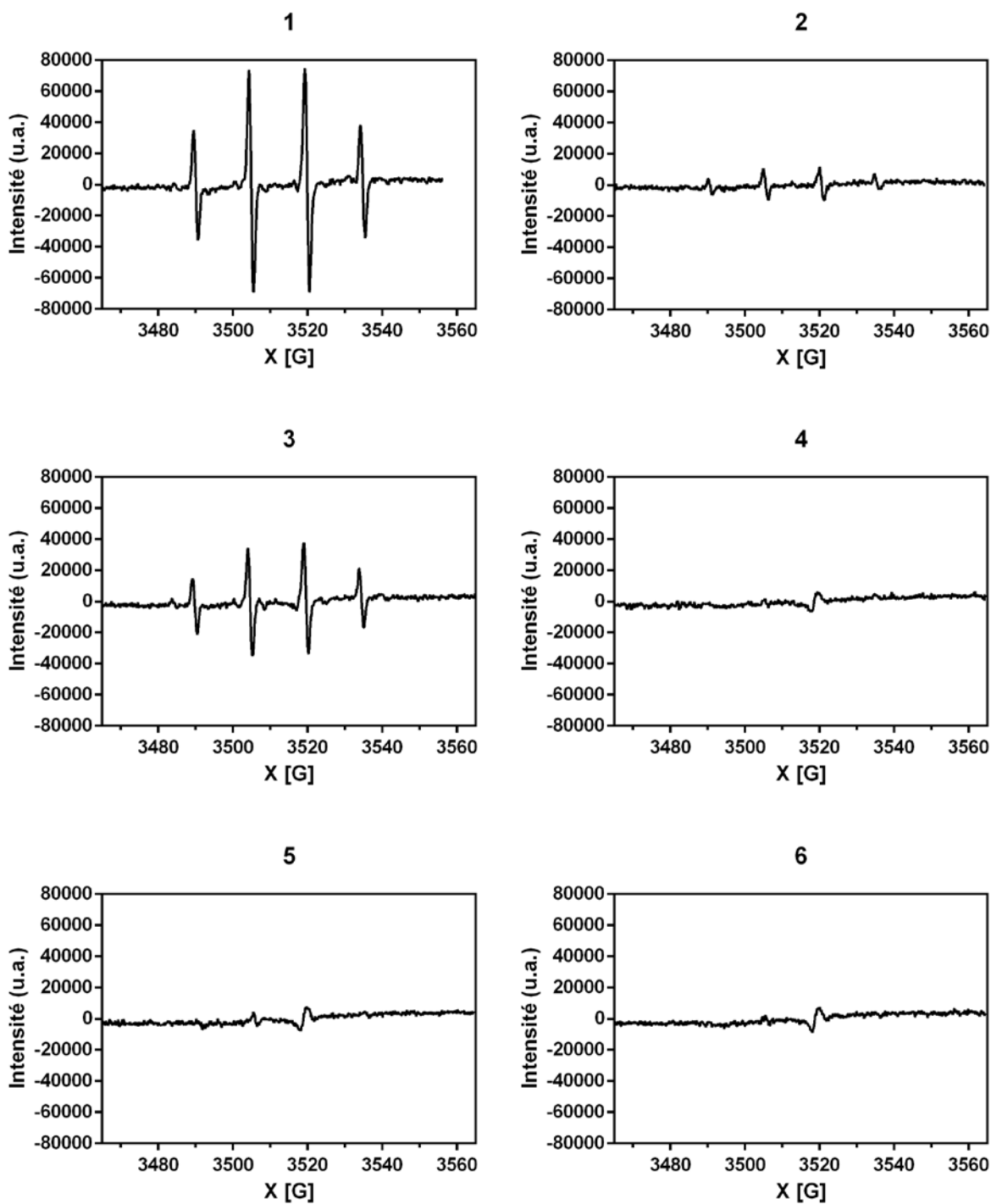


Figure 30. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) avec (1) adrénochrome (100 μ M), BNAH (100 μ M) ; (2) adrénochrome (100 μ M), sans BNAH ; (3) adrénochrome (100 μ M), BNAH (100 μ M), S29434 (20 μ M) ; (4) adrénochrome (100 μ M), BNAH (100 μ M), SOD (150 U/mL) ; (5) 3,5-DTBBQ (100 μ M), BNAH (100 μ M) ; (6) 3,5-DTBBQ (100 μ M), BNAH, S29434 (20 μ M) pour les cellules K562. Gamme d'intensité ± 80000 . Gain : $2 \cdot 10^5$

Dans le cas de la 3,5-di-*tert*-butyle-benzoquinone (3,5-DTBBQ), le signal est très faible (Figure 30.5). Ce résultat est surprenant car une importante production de radicaux avait été enregistrée dans le cas des cellules CHO surexprimant QR2 (Cassagnes *et al.*, 2015). Il est possible que la 3,5-DTBBQ ne puisse pas entrer dans les cellules K562.

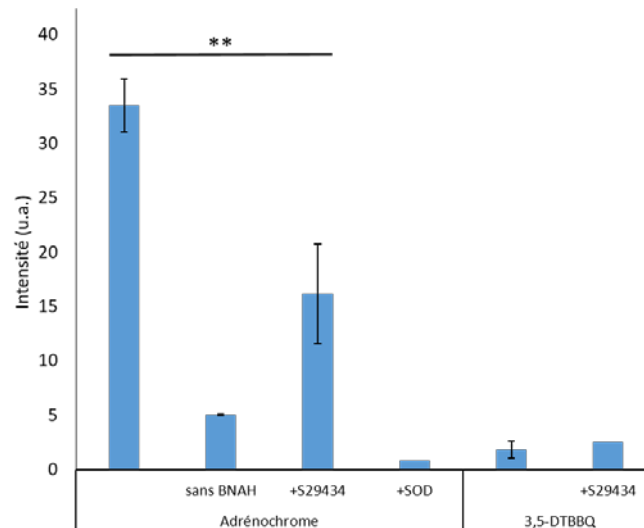


Figure 31. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus en présence d'adrénochrome et de 3,5-DTBBQ pour les cellules K562. **P < 0,01

En conclusion, les expériences réalisées avec les cellules K562 ont mis en évidence une production élevée de radicaux superoxydes en présence de ménadione ou d'adrénochrome, production provenant de l'activité enzymatique de QR2 puisque cette production diminue par ajout d'inhibiteur ou en l'absence du cosubstrat. Au contraire, des signaux très faibles ont été mesurés pour le CoQ0 et le 3,5 di-*tert*-butyl-benzoquinone (3,5-DTBBQ) en présence ou non d'inhibiteur.

Ainsi dans le cas particulier de ces cellules K562, les résultats démontrent que, quelle que soit la nature des quinones considérées (*ortho* ou *para*), QR2 n'a pas un rôle détoxifiant mais au contraire induit un stress oxydant accru. Ces résultats concordent avec les travaux de Buryanovskyy *et al.* (Buryanovskyy *et al.*, 2004) qui ont démontré que la suppression de l'activité QR2 dans les cellules K562, soit en utilisant un acide ribonucléique interférent (piARN) ou du resvératrol, un inhibiteur moins spécifique de QR2, augmentait la résistance de ces cellules à la toxicité de la ménadione.

Ainsi ces résultats confirment l'hypothèse de départ concernant les variations de toxicité des quinones suivant le type de quinones et surtout la nature de la cellule considérée. Il se pourrait que ces différences proviennent de la présence ou non d'enzymes de conjugaison capables de prendre en charge la forme réduite et ainsi éviter leur réoxydation et la production de radicaux.

2. Etude de la production de ROS induite par la métabolisation de *para* et *ortho*-quinones par des cellules SH-SY5Y

Etant donné que les catéchols quinones dérivées de la dopamine, l'adrénaline, ou la noradrénaline sont impliquées dans l'augmentation du stress oxydant associé aux troubles neurodégénératifs (Cf. Chapitre I), nous avons décidé d'étudier le rôle de QR2 dans les cellules neuronales.

Parmi plusieurs types de neurones disponibles pour la culture, la lignée de neuroblastomes d'origine humaine, le SH-SY5Y, a été choisie. C'est une lignée cellulaire immortalisée de neurones dopaminergiques (**Kovalevich et Langford, 2013**). De plus, selon la littérature, l'exposition des SH-SY5Y à des concentrations croissantes de L-Dopa provoque la mort cellulaire par l'intermédiaire de la formation de ROS (**Sabens *et al.*, 2010 ; Walkinshaw et Waters, 1995**).

Pour mettre en évidence un effet de QR2 sur cette lignée neuronale, les cellules ont été génétiquement modifiées afin de surexprimer QR2. Pour ce faire, des lentivirus contenant le gène codant pour l'enzyme QR2 a été introduit dans l'ADN des cellules SH-SY5Y pour qu'elle soit exprimée. L'expression d'hQR2 a ensuite été confirmée par des analyses Western blot (Figure 32).

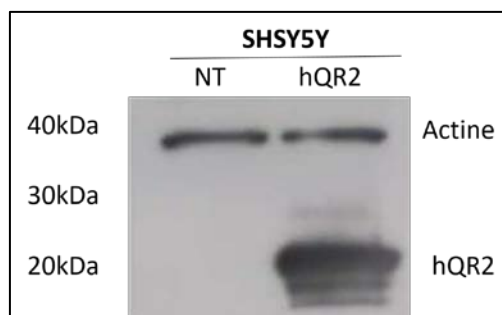


Figure 32. Expression de hQR2 dans la lignée SH-SY5Y : sauvage (NT ou WT) et hQR2-transduite

La production de radicaux a ensuite été mesurée après ajout de ménadione et d'adrénochrome sur la lignée SH-SY5Y de type sauvage (NT ou WT) et la lignée surexprimant la QR2 humaine (hQR2).

2.1. Métabolisation de la ménadione

Dans un premier temps, les analyses ont été réalisées en présence de ménadione pour les lignées SH-SY5Y-NT et SH-SY5Y-hQR2.

2.1.1. Analyse des spectres

Les spectres obtenus pour les deux types de cellules NT et hQR2 sont présentés Figure 33.1 et 33.3, respectivement. L'ajout de l'inhibiteur S29434 induit de manière surprenante une légère diminution des pics dans le cas des cellules non transduites alors que dans le cas des cellules surexprimant QR2, on constate une modification importante du spectre.

L'allure des spectres obtenu est beaucoup plus complexe que celles obtenues avec les cellules K562. Les spectres obtenus dans le cas des SH-SY5Y-hQR2 sont constitués de 10 pics. La simulation du spectre montre qu'il s'agit de la superposition de trois signaux correspondant à 3 adduits radicalaires formés par réaction avec le DMPO : un multiplet caractérisé par les constantes de couplage : $a_N = 14,18$ G, $a_H^\beta = 11,35$ G, $a_H^{\gamma^1} = 1,22$ G pour l'adduit DMPO/ \cdot OOH (piégeage du superoxyde) ; un second quadruplet caractérisé par les constantes $a_N = a_H = 14,85$ G pour l'adduit DMPO/ \cdot OH et un sextuplet caractérisé par les constantes $a_N = 16,21$ G, $a_H^\beta = 23,22$ G pour l'adduit DMPO/ \cdot CH₃ (Figure 34).

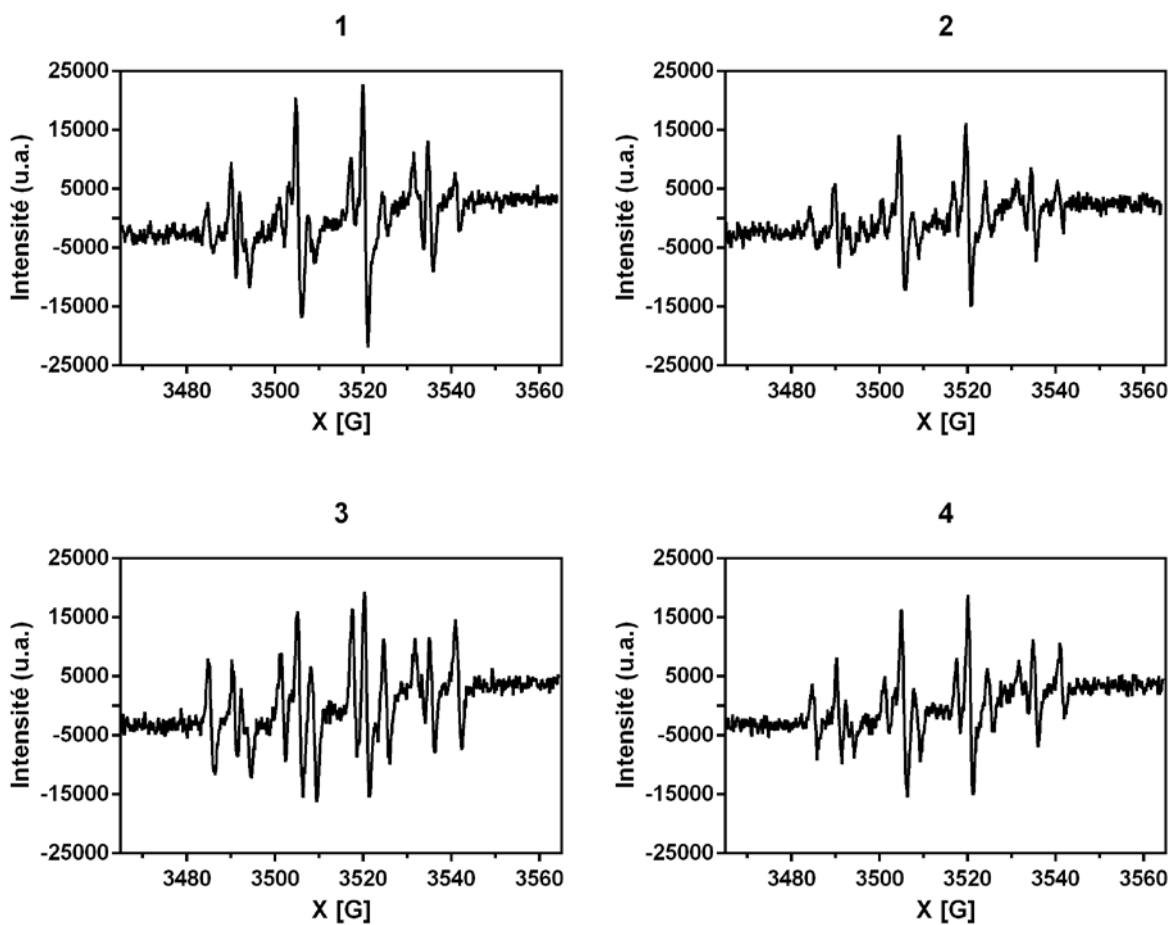


Figure 33. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) avec (1) SH-SY5Y-NT + ménadione (100 μ M), BNAH (100 μ M) ; (2) SH-SY5Y-NT + ménadione (100 μ M), BNAH (100 μ M), S29434 (20 μ M) ; (3) SH-SY5Y-QR2 + ménadione (100 μ M), BNAH (100 μ M) ; (4) SH-SY5Y-QR2 + ménadione (100 μ M), BNAH (100 μ M), S29434 (20 μ M). Gamme d'intensité ± 25000 . Gain : $2 \cdot 10^5$

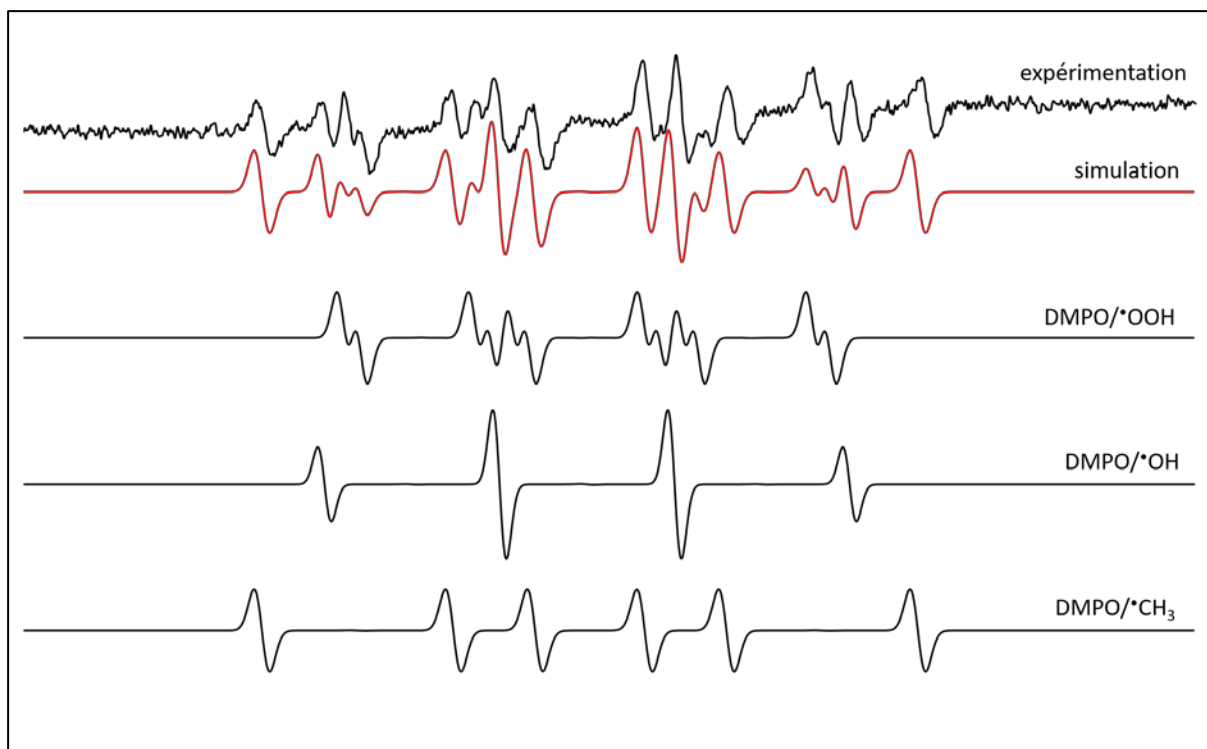


Figure 34. Spectres RPE simulés des adduits DMPO/•OOH ($a_N = 14,2$ G, $a_H^\beta = 11,4$ G, $a_H^{\gamma 1} = 1,2$ G), DMPO/•OH ($a_N = a_H = 14,9$ G), DMPO/•CH₃ ($a_N = 16,4$ G, $a_H^\beta = 23,3$ G)

Afin d'interpréter les signaux, un certain nombre de contrôles ont été réalisés. L'ajout de SOD (150 U/mL) supprime le sextuplet (Figure 35.2) alors que l'ajout de catalase (1800 U/mL) n'induit qu'une faible réduction de l'intensité du spectre (Figure 35.4) par rapport à la Figure 35.1. L'ajout concomitant de SOD et de catalase élimine totalement le signal (Figure 35.3). Ces résultats indiquent que les signaux enregistrés ont pour origine le radical superoxyde. La catalase n'ayant aucun effet sur le sextuplet, il est probable que ce radical ne corresponde pas au •CH₃ formé par l'intermédiaire du radical hydroxyle mais plutôt à un radical carbone centré formé par l'oxydation secondaire par le superoxyde d'une biomolécule à la surface de la cellule. Le quadruplet résiduel après ajout de la SOD qui disparaît par ajout de catalase proviendrait dans ce cas du H₂O₂ produit lors de la réduction enzymatique du superoxyde. Avec cette catalase, la réaction avec des métaux de transition produit le radical hydroxyle (Schéma 2).

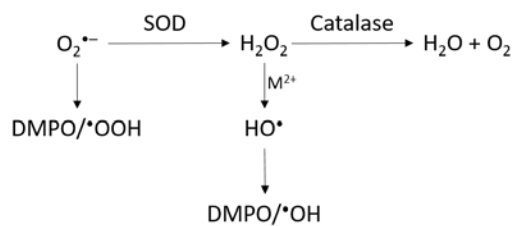


Schéma 2. Formation de l'adduit radicalaire DMPO/·OH

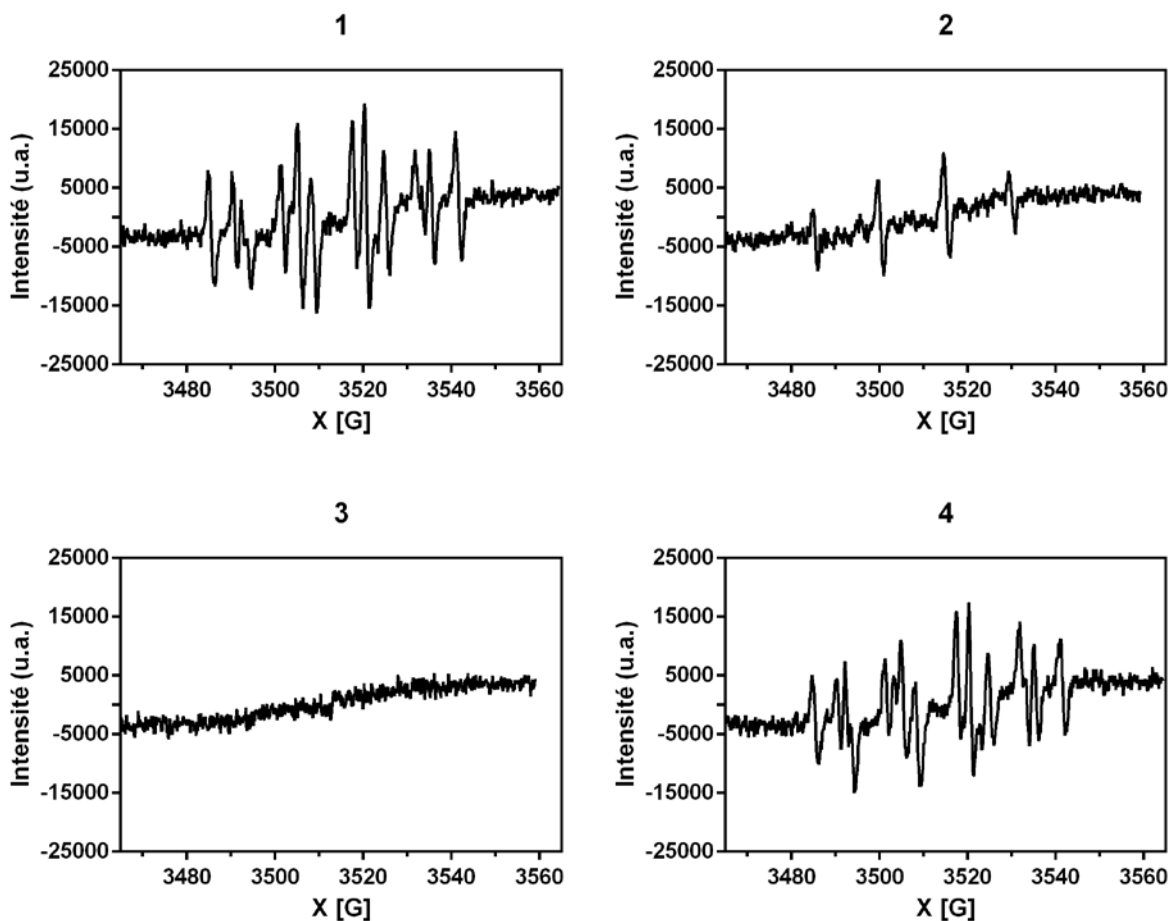


Figure 35. Spectres RPE obtenus en présence du DMPO (50 mM) avec (1) SH-SY5Y-hQR2+ ménadione (100 μM), BNAH (100 μM) ; (2) SH-SY5Y-hQR2 + ménadione (100 μM), BNAH (100 μM), SOD (150 U/mL) ; (3) SH-SY5Y-hQR2 + ménadione (100 μM), BNAH (100 μM), SOD (150 U/mL), Catalase (1800 U/mL) ; (4) SH-SY5Y-hQR2 + ménadione (100 μM), BNAH (100 μM), catalase (1800 U/mL). Gamme d'intensité ± 25000 . Gain : $2 \cdot 10^5$

2.1.2. Analyse quantitative

Afin de comparer plus finement la quantité de ROS produite dans chacun des cas, les signaux ont été intégrés (double intégration). Les résultats correspondants sont présentés Figures 36.

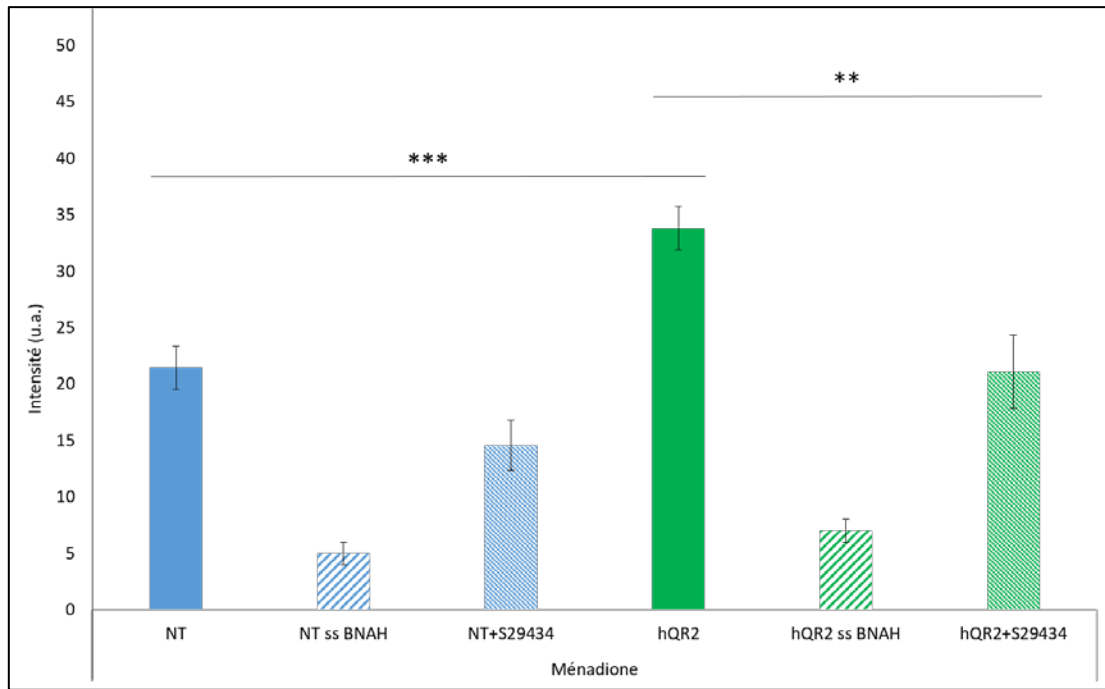


Figure 36. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus en présence de ménadione (100 μ M), avec ou sans BNAH (100 μ M) avec ou sans pré-incubation pendant 30 min avec S29434 (20 μ M) pour les cellules SH-SY5Y. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001

Les résultats obtenus font clairement apparaître une forte augmentation (57%) de la quantité de radicaux produits en présence de QR2 (*hQR2*) par comparaison aux cellules non transduites (*NT*). L'incubation préalable des cellules avec l'inhibiteur S29434 (*hQR2+S29434*) ainsi que l'absence du cosubstrat (*hQR2 ss BNAH*) induit bien une diminution des radicaux produits (respectivement 79 et 37 %) démontrant sans ambiguïté, comme dans le cas des cellules K562, que QR2 joue un rôle dans cette production accrue de radicaux libres (Figure 36). Une ambiguïté subsiste néanmoins dans le cas des cellules non transduites (*NT*), puisqu'une diminution de 76% de la production basale de ROS a été observée en l'absence de BNAH (*NT ss BNAH*) et une légère diminution (environ 32%) pour des cellules pré-incubées avec S29434 (*NT+S29434*). Ces résultats semblent confirmer que BNAH pourrait être un substitut efficace au NAD(P)H, et donc servir de cosubstrat pour une large gamme d'enzymes (Paul *et al.*, 2014).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Chomarat *et al.* qui ont mis en évidence, sur des cellules neuronales d'hippocampe de souris, les cellules HT-22, une diminution de 50% de la susceptibilité des cellules à la toxicité de la ménadione lorsque l'activité de QR2, est réduite de 70 à 80 %, par le biais de shRNA (Chomarat *et al.*, 2007). De même, des études *in vivo* ont

montré que les souris QR2 KO étaient moins sensibles à la toxicité de la ménadione que les souris sauvages (**Long et al., 2002**).

2.2. Métabolisation de l'adrénochrome

2.2.1. Analyse des spectres

Les spectres obtenus avec chacune des lignées sont présentés Figure 37.

Le spectre obtenu avec la lignée non transduite (Figure 37.1) est moins intense que celui obtenu avec la ménadione. Ceci pourrait provenir, comme proposé précédemment, d'une métabolisation moindre de l'adrénochrome par les réductases à 1 électron comparé à la ménadione. L'ajout de l'inhibiteur S29434 n'a comme attendu aucun effet sur l'intensité du spectre (Figure 37.2). Cela confirme bien que les radicaux n'ont pas pour origine l'activité enzymatique de QR2 alors que QR2 est présente à très faible concentration dans les cellules non transduites.

Par contre, le spectre obtenu avec les SH-SY5Y-QR2 est beaucoup plus intense confirmant l'activité enzymatique de QR2. Le spectre présente la même complexité que celui obtenu avec la même lignée en présence de ménadione. La Figure 38 illustre les données obtenues avec l'adrénochrome après le traitement des spectres. Une augmentation significative (145%) a été observée entre les SH-SY5Y-NT et les SH-SY5Y-QR2. Cette augmentation disparaît après ajout de l'inhibiteur S29434 confirmant le rôle de QR2.

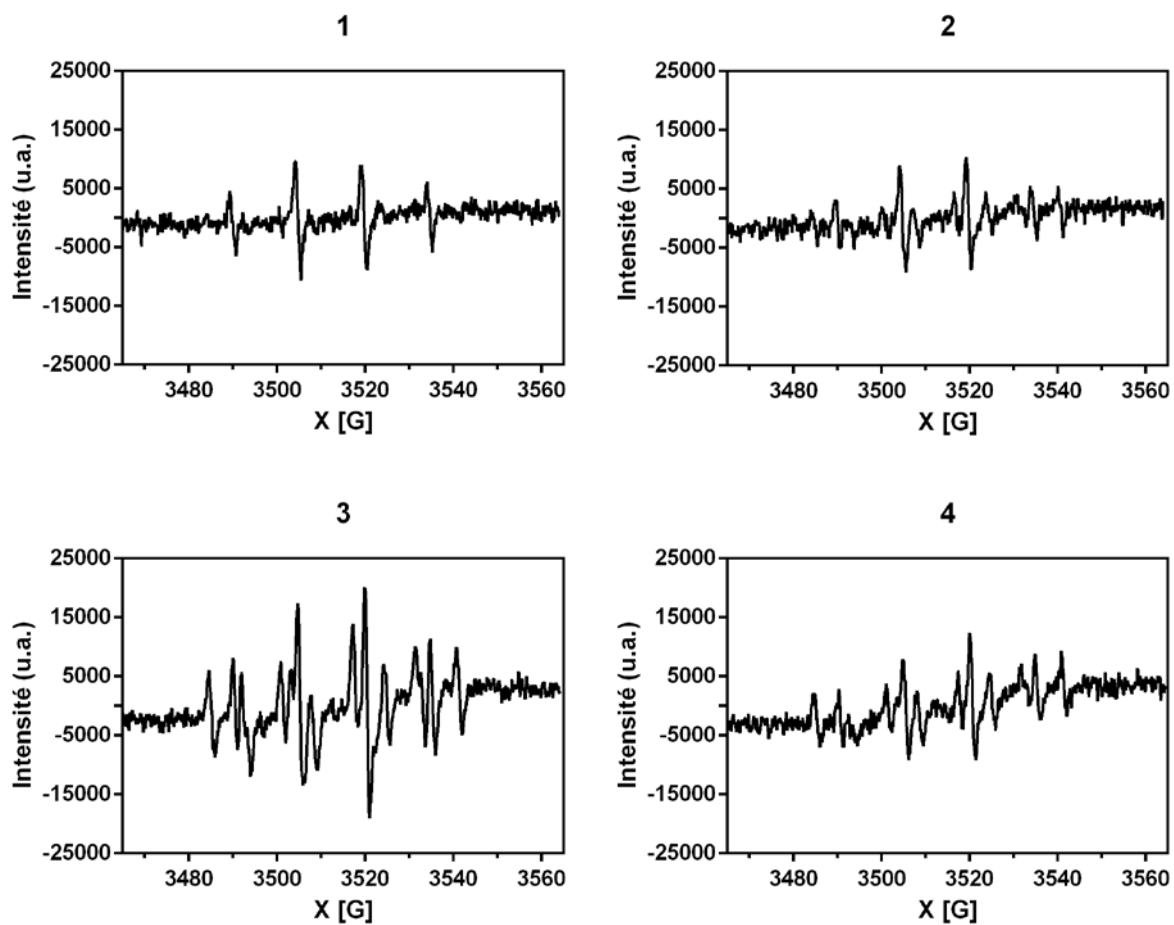


Figure 37. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) avec (1) SH-SY5Y-NT + adrénochrome (100 μ M), BNAH (100 μ M) ; (2) SH-SY5Y-NT + adrénochrome (100 μ M), BNAH (100 μ M), S29434 (20 μ M) ; (3) SH-SY5Y-QR2 + adrénochrome (100 μ M), BNAH (100 μ M) ; (4) SH-SY5Y-QR2 + adrénochrome (100 μ M), BNAH (100 μ M), S29434 (20 μ M). Gamme d'intensité \pm 25000. Gain : $2 \cdot 10^5$

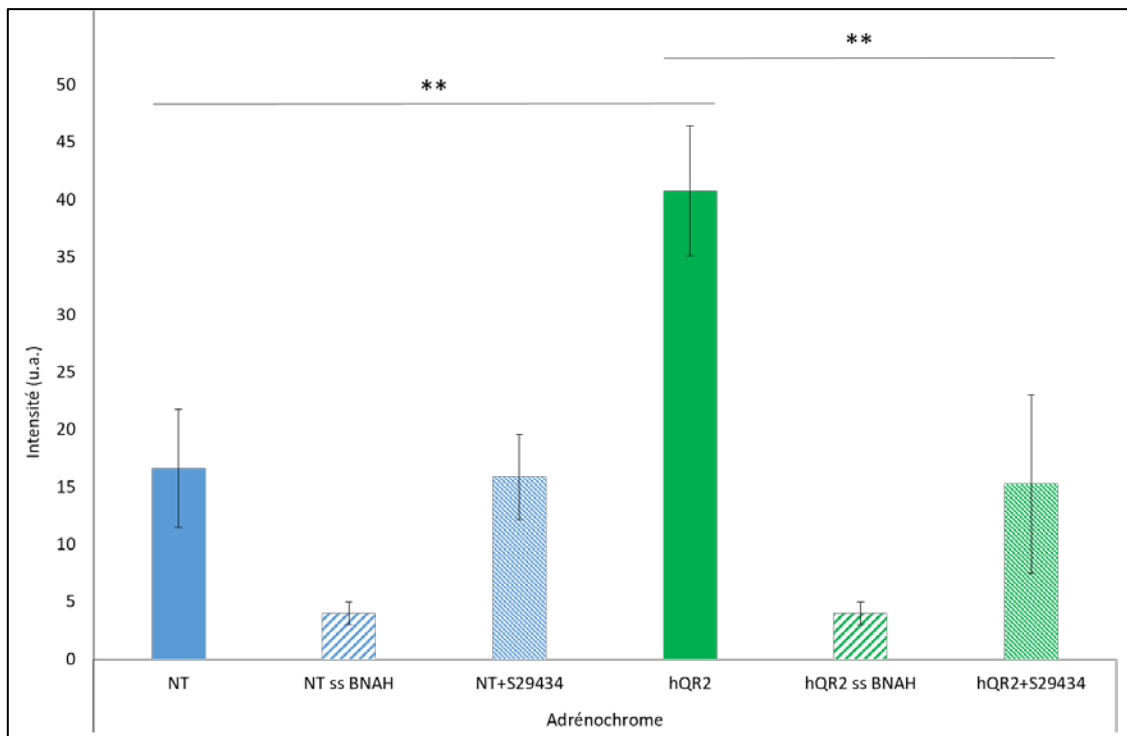


Figure 38. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus en présence d'adrénochrome (100 μ M), avec ou sans BNAH (100 μ M) avec ou sans pré-incubation pendant 30 min avec S29434 (20 μ M) pour les cellules SH-SY5Y. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001

En conclusion, ces analyses semblent mettre en évidence l'effet délétère de QR2 par la métabolisation de neurotransmetteurs tel que l'adrénochrome dans des cellules dopaminergiques. Des études antérieures avaient déjà mis en évidence l'effet délétère du catéchol sur les cellules catécholaminergiques (cf. Chapitre 1 partie 3.2) mais QR2 n'a jamais été mise en cause. Afin de confirmer ces résultats, les mêmes études ont été menées sur des cultures primaires de neurones.

3. Neurones primaires

Les neurones primaires utilisés sont des neurones extraits du cerveau d'embryon de souris E16 dans lesquels la protéine hQR2 n'était pas présente au départ. Les souris (C3H NT) ont été doublement génétiquement modifiées : une première fois pour ne pas exprimer hQR2 (cellules C3H QR2^{-/-}) et une seconde fois pour surexprimer hQR2 de manière contrôlée (cellules C3H QR2^{-/-}-hQR2) (Mailliet *et al.*, 2004). La transduction a été réalisée avec un lentivirus (rLV-EF1-hQR2) permettant d'induire l'expression de l'enzyme hQR2. L'expression de l'enzyme hQR2 dans chaque lignée a été contrôlée par une analyse en Western Blot et comparée aux cellules non transduites (C3H NT) (Figure 39).

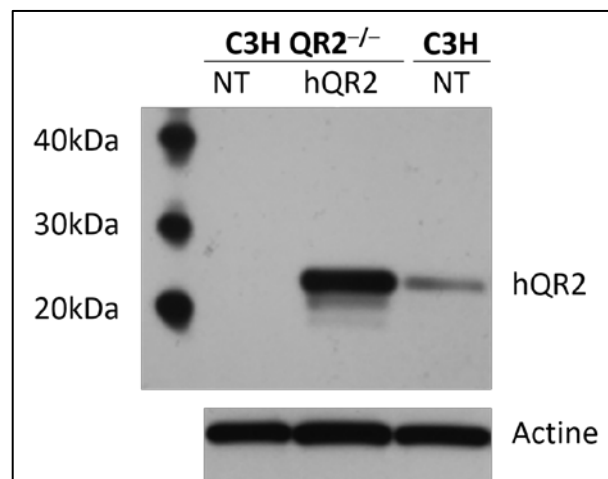


Figure 39. Expression de hQR2 dans les neurones primaires : sauvage (C3H), sans QR2(C3H QR2^{-/-}) et transuite hQR2(hQR2-transuite)

3.1. Analyse des spectres

Les spectres correspondants sont présentés Figure 40. Comme dans le cas des cellules SH-SY5Y, les spectres obtenus pour les cellules surexprimant QR2 sont très complexes. Etant donné le coût de production des échantillons il n'a pas été possible d'effectuer les contrôles pour déterminer la nature des radicaux produits. Cependant au vu de l'allure des courbes, il est probable qu'il s'agisse du radical superoxyde.

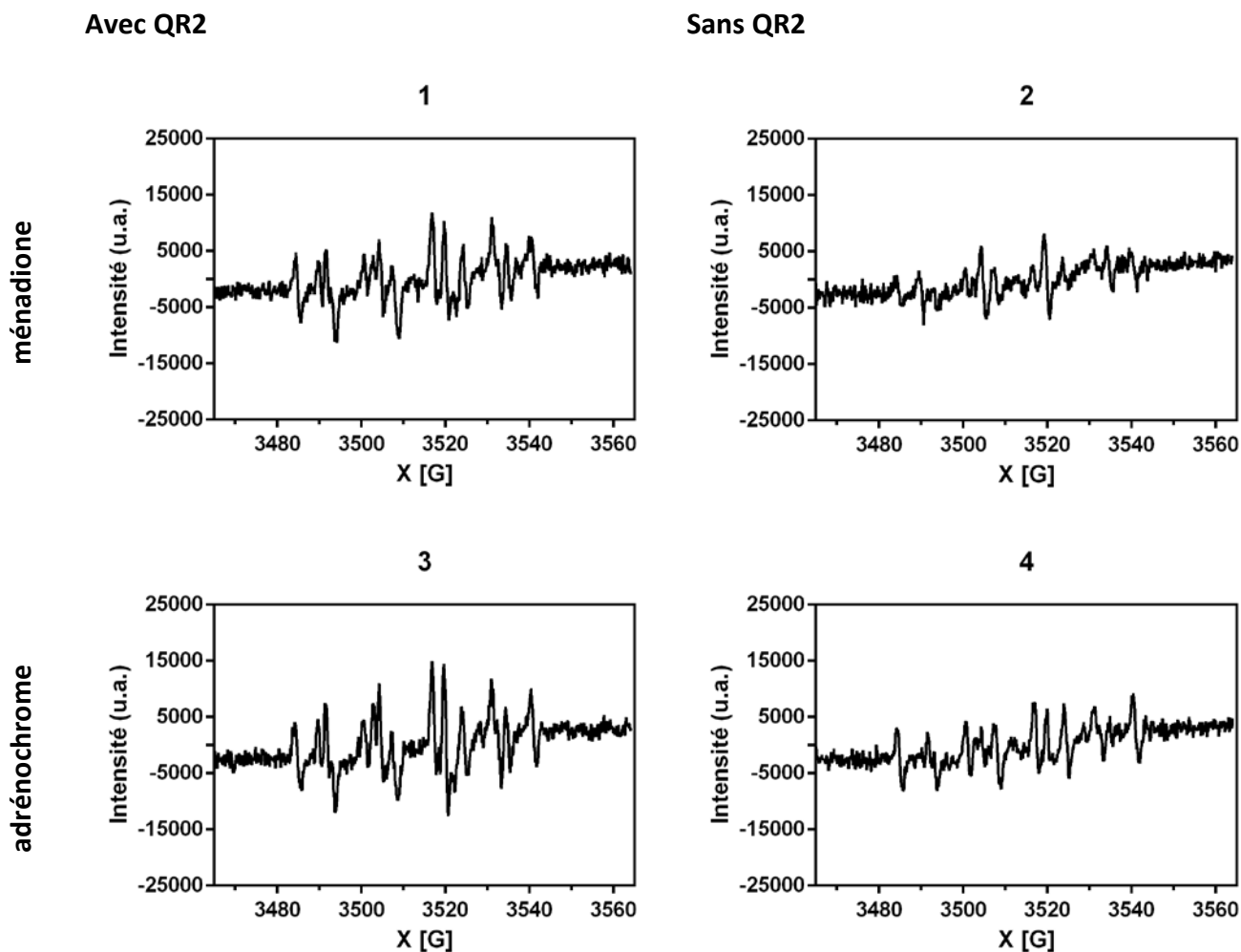


Figure 40. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) avec (1) C3HQR2^{-/-}-QR2 + Ménadione (100 μ M), BNAH (100 μ M) ; (2) C3HQR2^{-/-}-QR2 + Ménadione (100 μ M), BNAH (100 μ M), S29434 (20 μ M) ; (3) C3HQR2^{-/-}-QR2 + Adrénochrome (100 μ M), BNAH (100 μ M) ; (4) C3HQR2^{-/-}-QR2 + Adrénochrome (100 μ M), BNAH (100 μ M), S29434 (20 μ M). Gamme d'intensité \pm 25000. Gain : $2 \cdot 10^5$

3.2. Analyse quantitative

Les quantités de radicaux produites par métabolisation de la ménadione et de l'adrénochrome, déterminées par double intégration des signaux RPE sont présentées pour les trois lignées (Figure 41).

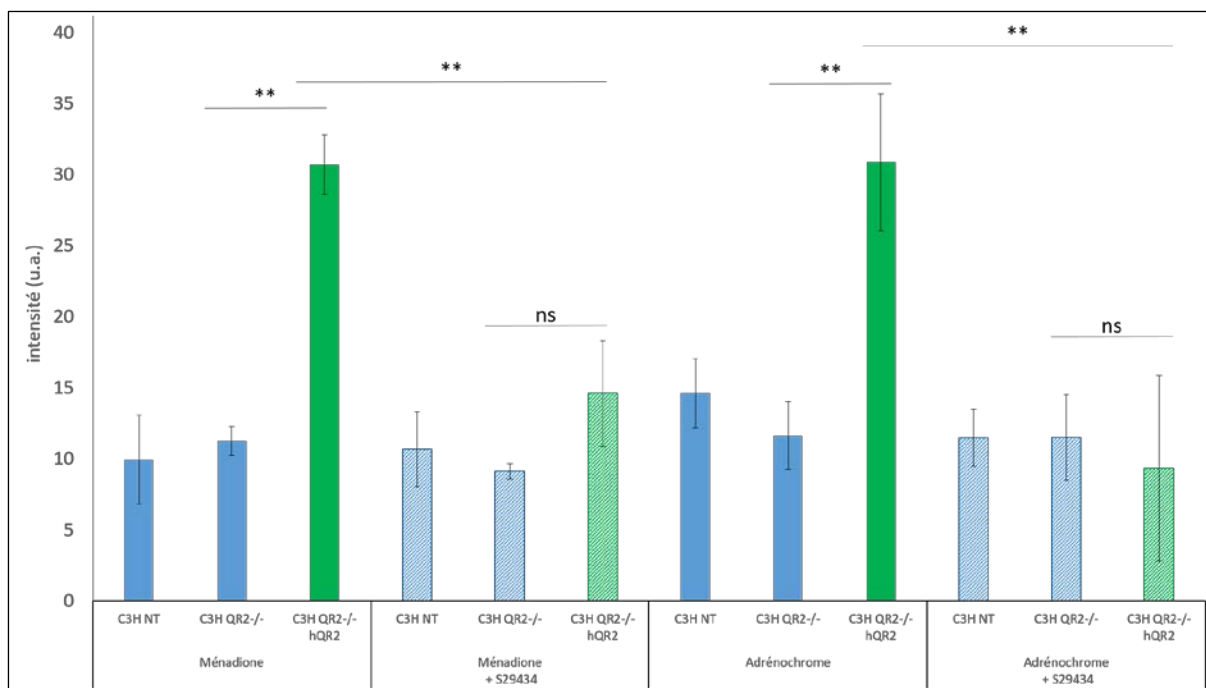


Figure 41. Production de ROS mesurée par RPE après l'incubation 5×10^6 neurones avec DMPO (50 mM), BNAH (100 μ M), et ménadione ou adrénochrome (100 μ M). Les neurones proviennent de cerveaux d'embryons de souris : sauvage (C3H NT), sans QR2 (C3H QR2^{-/-}), avec hQR2(C3H QR2^{-/-}-hQR2). Certains neurones ont été pré-incubés pendant 30 minutes avec l'inhibiteur spécifique de QR2 S29434 (20 μ M). Les résultats sont l'intensité moyenne du signal de la production de ROS, et les barres d'erreur indiquent l'erreur-type de la moyenne (MEB). Les valeurs ont été analysées par Test de Student (t) (non significative $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Comme dans le cas des cellules SH-SY5Y, l'expression de hQR2 dans les neurones transduits (C3H QR2^{-/-}-hQR2) entraîne clairement une augmentation de la production de ROS en présence des deux quinones comparées aux cellules non transduites et celles issues du cerveau de souris KO de QR2. La pré-incubation avec l'inhibiteur S29434 diminue fortement la production de radicaux, pour retrouver un niveau similaire à celui des neurones C3H NT et C3H QR2^{-/-}.

Ces résultats sont très intéressants puisqu'il pourrait expliquer l'effet néfaste de QR2 sur l'acquisition de la mémoire comme décrit dans la littérature (Benoit *et al.*, 2010 ; Rappaport *et al.*, 2015) sachant que les déficiences de la mémoire sont liées à la mort des neurones (Nobili *et al.*, 2017). En effet, les radicaux superoxydes formés par la métabolisation des catéchol-quinones par QR2 peuvent être facilement convertis en radicaux hautement délétères comme le peroxy-nitrite après réaction avec \cdot NO (Hall *et al.*, 2004 ; Singh *et al.*, 2007). De la même manière, le peroxyde d'hydrogène, formé par la dismutation du superoxyde, peut réagir avec le fer pour former le radical hydroxyle \cdot OH. Le rôle principal du

fer en participant à la génération de $\cdot\text{OH}$ a été décrit pour la maladie de Parkinson (**Cole, 2003 ; Kaur *et al.*, 2003 ; Youdim *et al.*, 2002, 2004**). Cependant, l'implication possible de QR2 en tant que promoteur radicalaire n'a jamais été envisagée dans les maladies dégénératives.

Conclusion

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre ont clairement mis en évidence, pour certains types de cellules, l'effet toxique de la quinone-réductase 2 dans la métabolisation des quinones, que ce soit une *para*-quinone avec la ménadione ou une *ortho*-quinone avec l'adrénochrome, forme oxydée de l'adrénaline.

En effet, pour les trois types de cellules considérées, les cellules K562 qui surexpriment naturellement QR2, les neuroblastomes (SH-SY5Y) ou les neurones primaires modifiés pour surexprimer QR2, une forte augmentation de la production du radical primaire, le superoxyde, imputable à QR2, a été constatée. Même si ces résultats sont en contradiction avec l'idée reçue que les quinones réductases sont des enzymes de détoxification vis-à-vis des quinones, ils vont dans le sens de diverses études (**Benoit *et al.*, 2010 ; Chomarat *et al.*, 2007**) ayant mis en évidence le rôle de QR2 dans la toxicité de la ménadione.

Compte tenu des différentes études établissant un lien entre QR2 et la perte ou l'acquisition de certains types de mémoire ainsi que des taux élevés de QR2 ayant été retrouvés dans l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la question se pose d'un lien possible entre neurodégénérescence et QR2. En effet le radical superoxyde n'est que le point de départ d'une cascade oxydante pouvant conduire à la production de radicaux hautement délétères (peroxynitrite, hydroxyle) pouvant induire *in fine* la mort des neurones.

D'autre part, ces résultats ont également mis en évidence des différences de toxicité importantes d'un type cellulaire à l'autre puisque des études préliminaires menées sur des cellules CHO avaient montré, au contraire, le caractère détoxifiant de QR2 vis-à-vis de la ménadione. Ainsi, nous pensons que ces différences pourraient provenir du fait que pour que QR2 soit effectivement détoxifiante, il faut qu'elle soit associée à une enzyme de conjugaison qui permettrait de bloquer la forme réduite et empêcher celle-ci de se réoxyder. L'étude de cette hypothèse constitue la problématique du Chapitre 4.

Chapitre 4

Coopération de QR2 avec une
enzyme de conjugaison pour la
détoxification de la
ménadione

Chapitre 4 – Coopération de QR2 avec une enzyme de conjugaison pour la détoxification de la ménadione

INTRODUCTION	88
1. CHOIX DE LA NOUVELLE LIGNEE CELLULAIRE : SH-SY5Y-QR2-UGT1A6	90
2. EFFET DE LA PRESENCE D'UNE ENZYME DE CONJUGAISON SUR LA PRODUCTION DE ROS MESUREE PAR RPE	91
2.1. ANALYSE SUR CELLULES, SH-SY5Y	91
2.2. ESSAIS SUR HOMOGENAT CELLULAIRE	93
3. EFFET DE LA PRESENCE D'UNE ENZYME DE CONJUGAISON SUR LA PRODUCTION DE SUPEROXYDE MESUREE PAR LC-MS	95
3.1. PRINCIPE DE LA METHODE	95
3.2. RESULTATS DES ANALYSES LC-MS.....	95
4. DETECTION DU METABOLITE GLUCURONIDE	98
4.1. PRINCIPE.....	98
4.2. RESULTATS	98
5. EFFET SUR L'HOMEOSTASIE REDOX CELLULAIRE	105
5.1. PRINCIPE DU TEST	105
5.2. EFFET DE L'EXPRESSION DE QR2	107
5.3. EFFET DE LA CO-EXPRESSION DE QR2 ET UGT1A6.....	108
5.4. VIABILITE DES CELLULES.....	110
5.5. INDUCTION DES ENZYMES ANTIOXYDANTES	111
CONCLUSION	113

Introduction

Le chapitre précédent a démontré que la métabolisation de certaines quinones (*ortho* ou *para*) par la quinone-réductase 2 était responsable d'une production importante de radicaux libres due à l'instabilité de la forme réduite de la quinone. Cette forte production de radicaux libres induite par l'activité de QR2 en présence de catéchol-quinones pourrait être l'un des facteurs de stress oxydant impliqué dans les maladies neurodégénératives conduisant à la dégénérescence neuronale (cf. Chapitre 1).

Les analyses menées sur différents types de cellules ont mis en évidence que la toxicité des quinones dépendait de la nature de la quinone mais également de la nature de la cellule. Ainsi dans le cas des cellules CHO, deux caractères contradictoires de QR2 ont été mis en évidence. Alors que la présence de QR2 diminue la toxicité de la ménadione, elle aggrave au contraire la toxicité de l'adrénochrome (**Cassagnes *et al.*, 2015**). Les travaux réalisés avec les cellules K562, qui expriment naturellement QR2, ou avec des cellules neuronales (SH-SY5Y ou neurones primaires) modifiées pour surexprimer QR2 ont montré que, pour ces cellules, la présence de QR2 était responsable d'une toxicité accrue pour ces deux types de quinones (*ortho* ou *para*). L'hypothèse proposée est qu'une coopération avec une enzyme de conjugaison pouvant réagir avec la forme réduite instable et empêcher sa réoxydation soit nécessaire pour effectivement détoxifier les quinones, comme l'a proposé Nishiyama pour QR1 (**Nishiyama *et al.*, 2010**). Ainsi dans ce cas, le caractère détoxifiant de QR2 vis-à-vis de ces quinones dépendrait de la présence ou non d'enzymes de conjugaison dans la cellule (Figure 42).

Afin de vérifier cette hypothèse, des lignées spécifiques de neuroblastomes surexprimant, en plus de la QR2, une enzyme de conjugaison, a été produite afin d'étudier l'effet de la présence de cette enzyme vis-à-vis de la toxicité de la ménadione. Différentes techniques d'analyse du stress oxydant intracellulaire ont été mises en œuvre telles que l'analyse LC-MS ou l'analyse « LUCS ». Des études ont également été réalisées pour détecter la présence de la forme glucuronidée de la quinone réduite. Les techniques utilisées ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans ce chapitre.

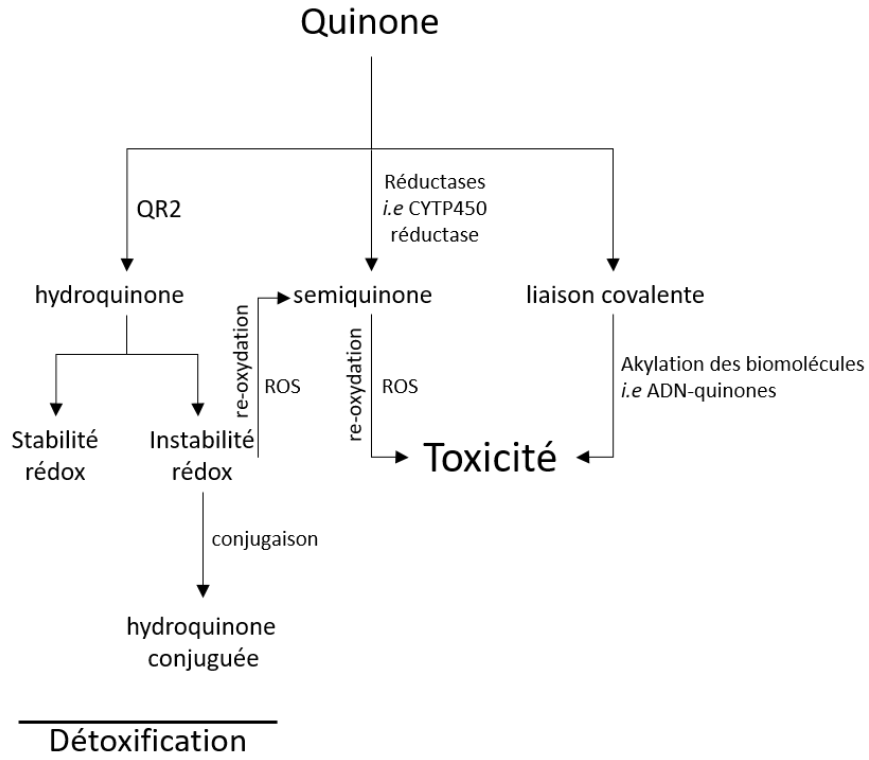
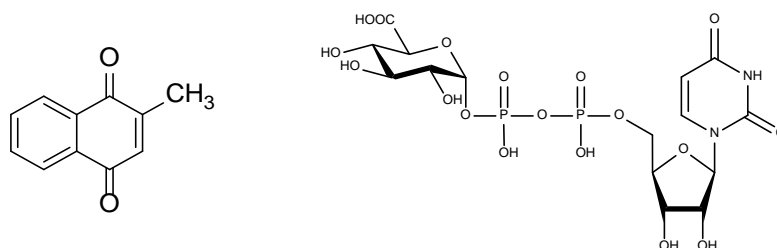


Figure 42. Résumé des voies de détoxification et de toxicité des quinones

1. Choix de la nouvelle lignée cellulaire : SH-SY5Y-QR2-UGT1A6

Ce chapitre est centré sur la ménadione. Les principales réactions de conjugaison mettant en jeu les hydroquinones sont les réactions de sulfatation, de glucuronidation et de méthylation catalysées respectivement par les sulfotransférases (SULT), les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) et les catéchol-*O*-méthyltransférases (**Taskinen *et al.*, 2003**). Des expériences menées sur des modèles animaux (rat et lapin) traités avec de la ménadione ont mis en évidence la présence du ménadiol-glucuronide dans la bile et l'urine (**Losito *et al.*, 1967 ; Richert, 1951 ; Thompson *et al.*, 1972**). Dans l'état actuel des connaissances, la famille des UGTs humaines comprend 16 isoformes sans compter les allozymes d'UGT. D'après les travaux de Nishiyama (**Nishiyama *et al.*, 2008**), seuls deux enzymes UGT, les UGT1A6 et UGT1A10, sont capables de réagir avec la forme réduite de la ménadione. L'UGT1A6 étant dix fois plus efficace que l'UGT1A10 dans la réaction de conjugaison, nous avons choisi de produire une lignée de neuroblastomes surexprimant UGT1A6 et QR2. Cette lignée est appelée SH-SY5Y-QR2-UGT1A6.

Les différentes expériences menées sur cette lignée ont été réalisées en présence d'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPGA), le cosubstrat d'UGT, cette molécule n'étant pas exprimée de façon naturelle dans ces cellules. Les expériences ont été réalisées à une concentration élevée en UDPGA (2 mM) pour assurer sa disponibilité vis-à-vis de l'enzyme de conjugaison (**Boutin *et al.*, 1993 ; Nishiyama *et al.*, 2006**).



Ménadione

UDPGA

2. Effet de la présence d'une enzyme de conjugaison sur la production de ROS mesurée par RPE

2.1. Analyse sur cellules, SH-SY5Y

Les analyses ont été réalisées en présence de ménadione. Les cellules ont été incubées 2 min en présence de BNAH (100 μ M), d'UDPGA (2 mM) et de ménadione (100 μ M). Les spectres obtenus pour les trois lignées cellulaires, la lignée sauvage ou "wild-type" (SH-SY5Y-WT), la lignée surexprimant QR2 (SH-SY5Y-QR2), et la lignée surexprimant à la fois QR2 et UGT1A6 (SH-SY5Y-QR2-UGT1A6) sont présentés Figure 43. Comme précédemment les spectres obtenus pour les cellules exprimant QR2 sont très complexes. Les intensités correspondantes, mesurées par double intégration des spectres, sont présentées Figure 44 pour les trois lignées. Les analyses ont également été réalisées en l'absence du cosubstrat BNAH ou après 30 min de pré-incubation des cellules en présence de l'inhibiteur S29434.

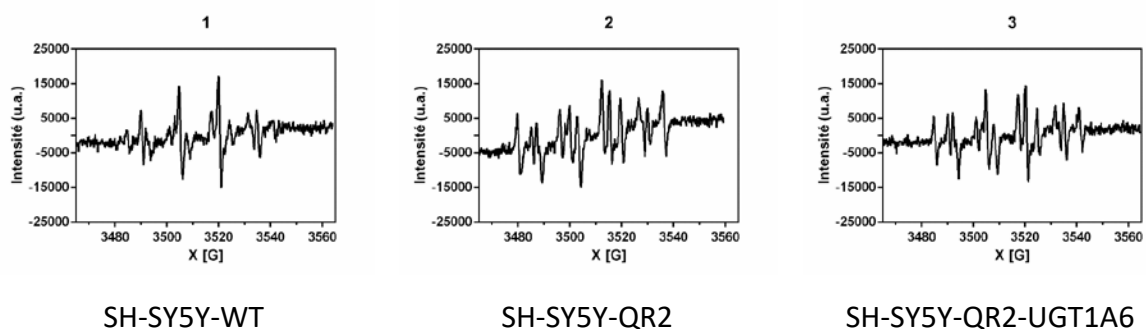


Figure 43. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM), ménadione (100 μ M), BNAH (100 μ M) avec des cellules de lignée (1) SH-SY5Y-WT, (2) SH-SY5Y-QR2, (3) SH-SY5Y-QR2-UGT1A6. Gamme d'intensité ± 25000 . Gain : 2.10^5

Pour les lignées SH-SY5Y-WT et SH-SY5Y-QR2 des résultats similaires ont été obtenus par rapport à ceux présentés dans le Chapitre II. On observe bien une augmentation de la production de radicaux en présence de QR2. Cette augmentation disparaît si les cellules sont pré-incubées avec l'inhibiteur ou en l'absence de cosubstrat.

Pour la lignée SH-SY5Y qui co-exprime les enzymes QR2 et UGT1A6, on remarque que l'expression de l'enzyme de conjugaison n'a aucun effet sur la production des radicaux. On observe même une diminution de la production de ROS en présence d'inhibiteur. Ainsi la technique RPE, dans ces conditions de mesures, n'a pas permis de discriminer les deux lignées et de démontrer l'intérêt ou non de la présence de l'enzyme de conjugaison vis-à-vis de la

toxicité de la ménadione. Ceci pourrait provenir d'un défaut de l'activité enzymatique d'UGT1A6. En effet pour que l'enzyme puisse réaliser la glucuronidation du ménadiol il est nécessaire d'ajouter l'UDPGA. Même si nous avons travaillé à des concentrations très élevées il est possible que l'UDPGA ne pénètre que faiblement dans la cellule et donc ne puisse pas servir de cosubstrat à UGT. D'autre part, il est important de rappeler que la RPE permet la détection extracellulaire des radicaux. En effet, même si le DMPO est capable de rentrer dans la cellule et de piéger un radical, l'adduit radicalaire est très souvent détruit dans la cellule (Samuni *et al.*, 1986).

Ainsi, afin de pallier ces éventuelles limites, nous avons décidé de réaliser les mêmes expériences sur des homogénats cellulaires afin de maximiser l'interaction des différents réactifs avec les enzymes.

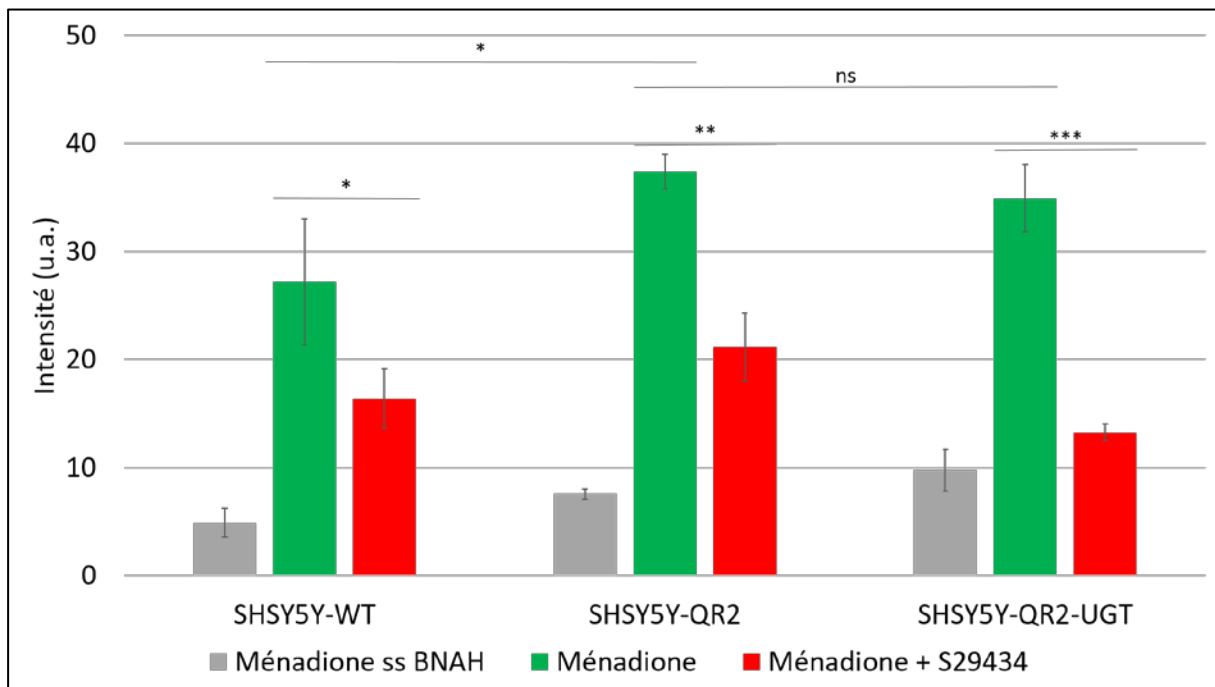


Figure 44. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres déterminée par double intégration des signaux RPE obtenus avec les lignées cellulaires SH-SY5Y-WT, SH-SY5Y-QR2, SH-SY5Y+QR2-UGT1A6 après 2 minutes d'incubation avec la ménadione (100 µM), BNAH (100 µM), UDPGA (2 mM), DMPO (50 mM) avec ou sans pré-incubation avec S29434 (20 µM).

2.2. Essais sur homogénat cellulaire

L'homogénat cellulaire est préparé à partir de 5 millions de neuroblastomes en utilisant un homogénéisateur (*Dounce Kimble tissue grinder*). Les lysats sont récupérés et centrifugés à $20000 \times g$ pendant 30 min, à 4°C . Les homogénats sont ensuite incubés 2 minutes en présence de BNAH ($100 \mu\text{M}$), de UDPGA (2 mM) et de ménadione ($100 \mu\text{M}$). Les spectres RPE obtenus dans ces conditions expérimentales pour chacune des lignées sont présentés sur la Figure 45. Par comparaison avec les spectres obtenus sur cellules entières, on observe très clairement une forte augmentation de l'intensité des spectres pour les lignées SH-SY5Y-QR2 et SH-SY5Y-QR2-UGT1A6 alors que pour la lignée sauvage, le signal est très faible. En présence de QR2 (Figure 45.2 et 45.3), on observe une augmentation du quadruplet correspondant au superoxyde alors que le sextuplet n'augmente pas. Ces résultats semblent montrer que le fait de travailler sur homogénat cellulaire a bien facilité l'interaction de la ménadione avec l'enzyme cytosolique QR2 et son cosubstrat. La production de ROS déduite de l'intégration des spectres en présence ou non de cosubstrat et d'inhibiteur est présentée (Figure 46). On note une augmentation 40 fois plus importante de la production de ROS en présence de QR2. Cette production diminue drastiquement (85 %) lorsque QR2 a été préalablement inhibée.

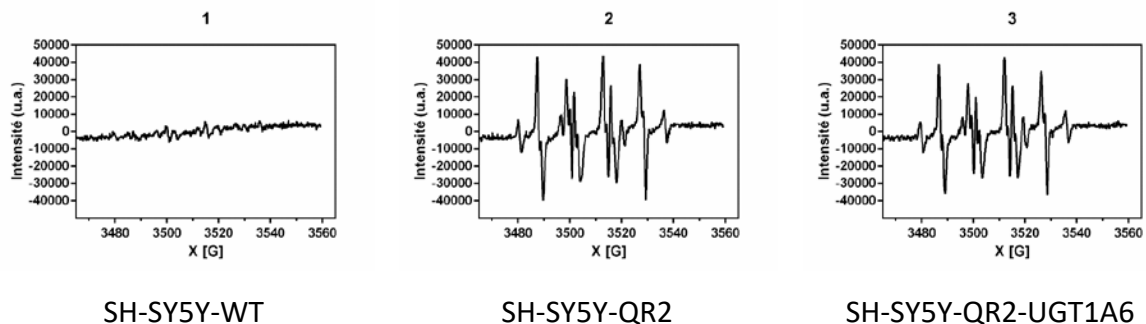


Figure 45. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM), ménadione ($100 \mu\text{M}$), BNAH ($100 \mu\text{M}$) avec des homogénats de lignée 1) SH-SY5Y-WT, 2) SH-SY5Y-QR2, 3) SH-SY5Y-QR2-UGT1A6. Gamme d'intensité ± 50000 . Gain : $2 \cdot 10^5$

Cependant aucune différence significative n'a été enregistrée entre les lignées SH-SY5Y-QR2 et SHSY-QR2-UGT1A6. Les quantités de radicaux produits sont les mêmes et l'inhibiteur a un effet comparable dans les deux cas. Il est possible que ce résultat soit dû au fait que le temps d'incubation des cellules avec la ménadione, seulement de deux minutes, soit trop court pour que l'activité de l'UGT ait le temps de se mettre en place.

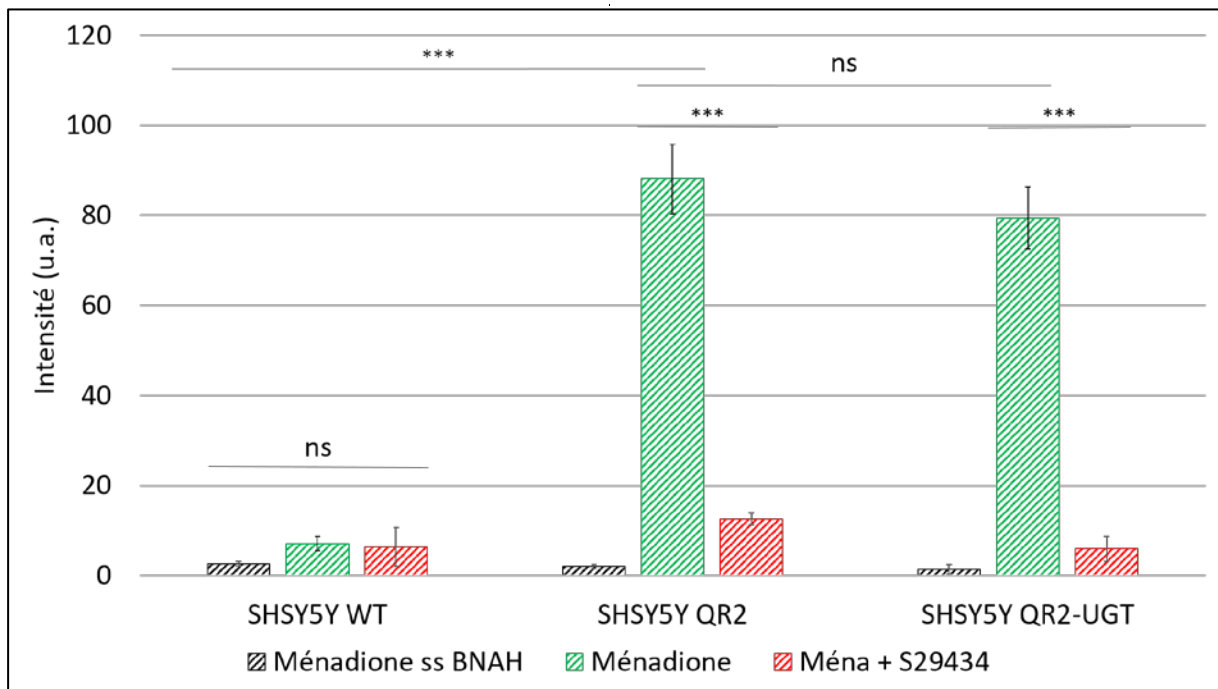


Figure 46. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus avec l'homogénat des lignées cellulaires SH-SY5Y-WT, SH-SY5Y-QR2, SH-SY5Y+QR2-UGT1A6 après 2 minutes d'incubation avec la ménadione (100 μ M), BNAH (100 μ M), UDPGA (2 mM), DMPO (50 mM) avec ou sans pré-incubation avec S29434 (20 μ M).

A ce stade de nos études, nous avons décidé de nous orienter vers une technique spécifique permettant de quantifier la production du radical superoxyde intracellulaire puisque c'est le principal radical produit. Cette technique est basée sur l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

3. Effet de la présence d'une enzyme de conjugaison sur la production de superoxyde mesurée par LC-MS

3.1. Principe de la méthode

La méthode est basée sur l'utilisation d'hydroéthidine (cf. Chapitre I). L'hydroéthidine (DHE) réagit avec le superoxyde pour former un composé spécifique, le 2-hydroxyéthidium (2-OH-E⁺), qui peut être détecté par LC-MS ($m/z = 330$). Cette méthode permet, par l'intermédiaire d'une droite d'étalonnage réalisée à partir de 2-OH-E⁺ synthétisé au laboratoire, d'accéder à la concentration intracellulaire en ions superoxyde. La droite d'étalonnage obtenue pour une gamme 1-1000 nM en 2-OH-E⁺ est présentée sur la Figure 47.

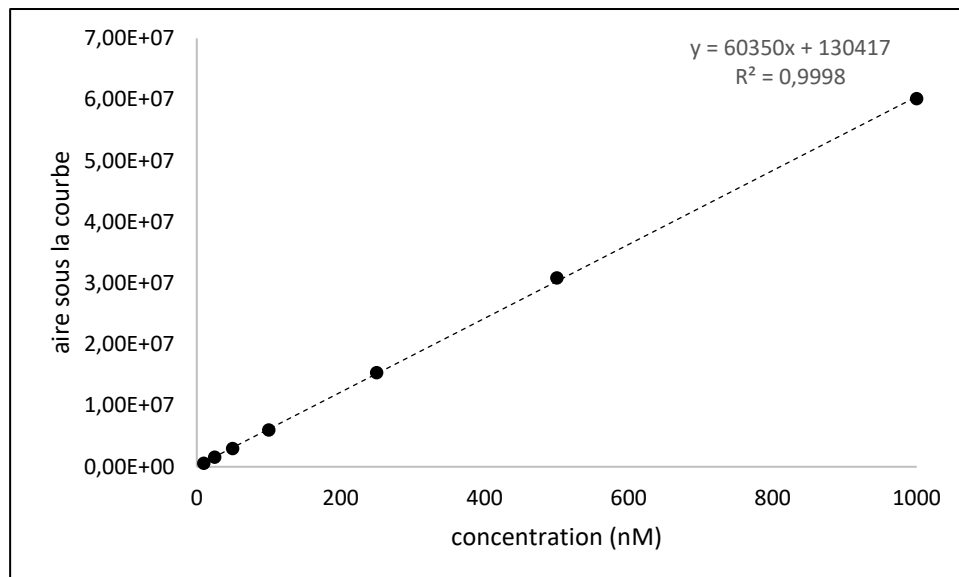


Figure 47. Droite d'étalonnage obtenue à partir du standard de 2-OH-E⁺ (10 – 1000 nM)

3.2. Résultats des analyses LC-MS

Les trois lignées SH-SY5Y ont été incubées 30 min en présence de BNAH (25 μ M), d'UDPGA (2 mM), d'hydroéthidine (10 μ M) et de ménadione (25 μ M). Comme le temps d'incubation est plus long que pour les analyses RPE, la concentration de la ménadione a été diminuée de 100 μ M à 25 μ M afin d'éviter la mort des cellules. Les cellules sont ensuite lysées à l'aide d'une solution de Triton X-100 (1%), puis centrifugées et le surnageant est analysé par LC-MS. Le signal chromatographique correspondant au rapport m/z (masse sur charge) du 2-

hydroxyéthidium ($m/z = 330$) est alors intégré afin de déterminer la concentration intracellulaire en ions superoxyde par comparaison avec la droite d'étalonnage (Figure 48).

Les résultats obtenus pour les trois lignées en concentration intracellulaire en ions superoxyde sont présentés sur la Figure 49.

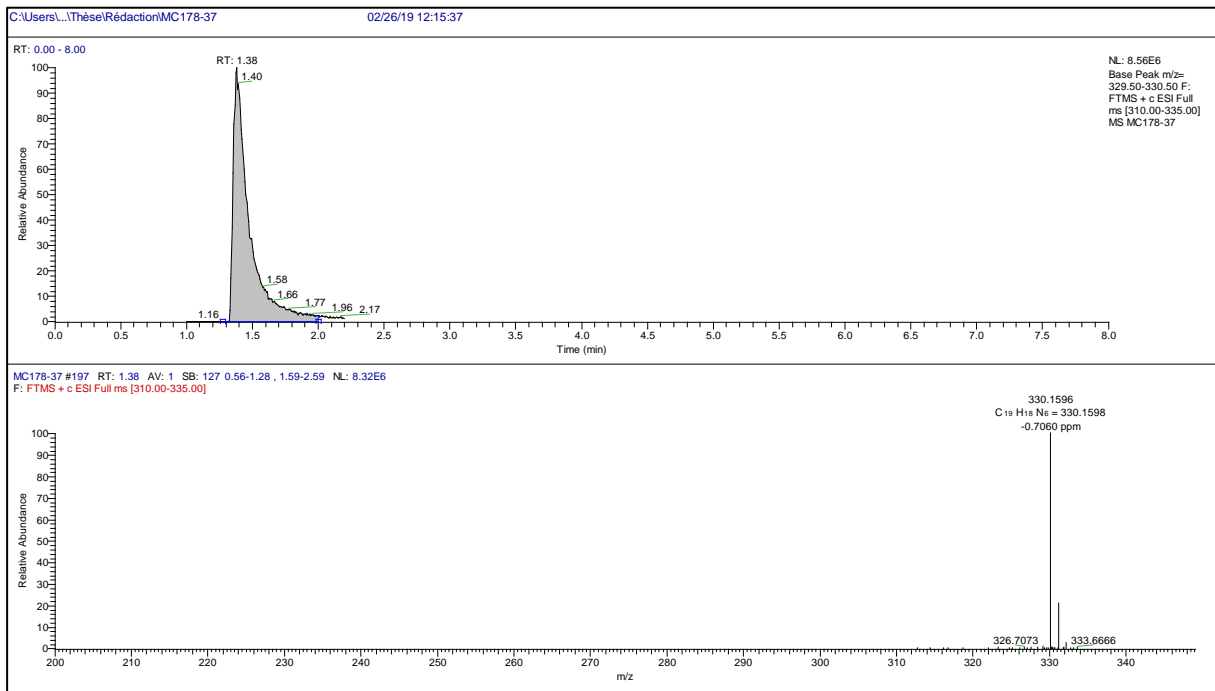


Figure 48. Chromatogramme obtenu par l'incubation des cellules avec DHE. Le signal détecté à $m/z = 330$ correspond à 2-OH-E⁺ formé après la réaction de DHE avec le radical superoxyde.

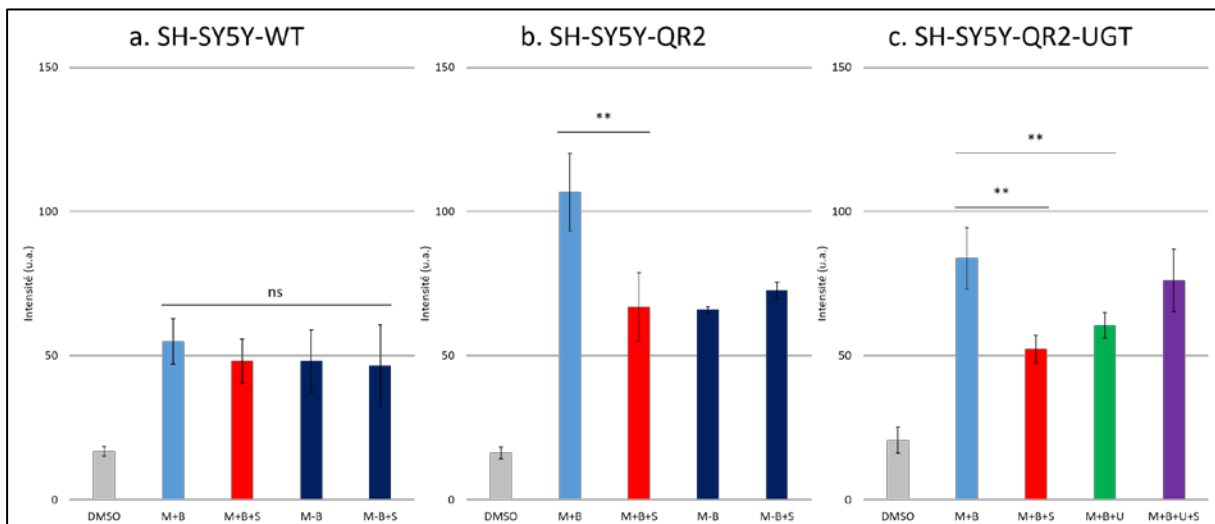


Figure 49. Comparaison de la production du radical superoxyde intracellulaire sur les lignées a. SH-SY5Y-WT, b. SH-SY5Y-QR2, c. SH-SY5Y-QR2-UGT après 30 min d'incubation avec la (M)énadione (25 μ M), (B)NAH (25 μ M), (U)DPGA (2 mM) avec ou sans pré-incubation avec (S)29434 (20 μ M).

Dans le cas des cellules sauvages (SH-SY5Y-WT), l'ajout de la ménadione induit une augmentation de la concentration en superoxyde comparée au contrôle réalisé avec du DMSO. L'ajout de l'inhibiteur ou l'absence de cosubstrat n'induit aucune variation significative (Figure 49a). Ces résultats confirment que, dans ce cas, la production de radicaux superoxyde est indépendante de QR2 et provient des réductions à 1 électron se produisant dans la cellule. Ces résultats semblent cohérents avec ce qui était attendu, les SH-SY5Y-WT n'exprimant QR2 qu'en très faibles quantités (d'après Cell atlas) (**The Human Protein Atlas, 2019b**).

Au contraire dans le cas des cellules SH-SY5Y-QR2 (Figure 49b), on observe une forte augmentation de la concentration intracellulaire en ions superoxyde en présence de ménadione. La concentration diminue quasiment de moitié par ajout de l'inhibiteur ou en l'absence du cosubstrat pour atteindre des niveaux similaires à ce qui a été observé pour les cellules sauvages confirmant le rôle toxifiant de QR2 pour ces cellules. Ce résultat est également cohérent car lorsque l'enzyme QR2 est inhibée, ce sont les enzymes à 1 électron qui prennent le relais.

Dans le cas des cellules SH-SY5Y-QR2-UGT (Figure 49c) c'est-à-dire les cellules surexprimant à la fois QR2 et l'enzyme de conjugaison UGT, en l'absence du cosubstrat de l'enzyme de conjugaison (pas d'UDPGA) on retrouve le même comportement que pour la lignée SH-SY5Y-QR2 à savoir une augmentation de la concentration en ions superoxyde en présence de ménadione, concentration qui diminue lorsque l'enzyme est inhibée. En présence d'UDPGA, c'est-à-dire lorsque l'enzyme de conjugaison fonctionne, on observe une augmentation moins élevée de la concentration en radicaux qui semble confirmer le rôle bénéfique de la présence de l'enzyme de conjugaison. Comme attendu, l'ajout de l'inhibiteur de QR2, dans ces conditions, entraîne une ré-augmentation des radicaux produits pour atteindre une concentration similaire aux cas des cellules SH-SY5Y-QR2.

Ainsi ces expériences permettant le dosage intracellulaire du superoxyde semblent démontrer le rôle bénéfique de la coopération entre QR2 et une enzyme de conjugaison dans le cas de la ménadione. En effet, cette coopération permet de bloquer le ménadiol instable et ainsi d'éviter sa réoxydation et l'établissement d'un cycle futile délétère pour la cellule.

Afin de confirmer ces résultats, des études LC-MS ont été mises en œuvre dans le but de détecter la forme glucuronidée du ménadiol dans les cellules.

4. Détection du métabolite glucuronidé

4.1. Principe

Théoriquement, lorsque la ménadione est réduite en ménadiol, l'enzyme de conjugaison, dans ce cas l'UGT1A6, prend en charge la forme réduite en fixant un groupement glucuronide via une liaison éther pour former le ménadiol-*o*-glucuronide, identifiable par LC-MS grâce à sa masse exacte (Figure 50).

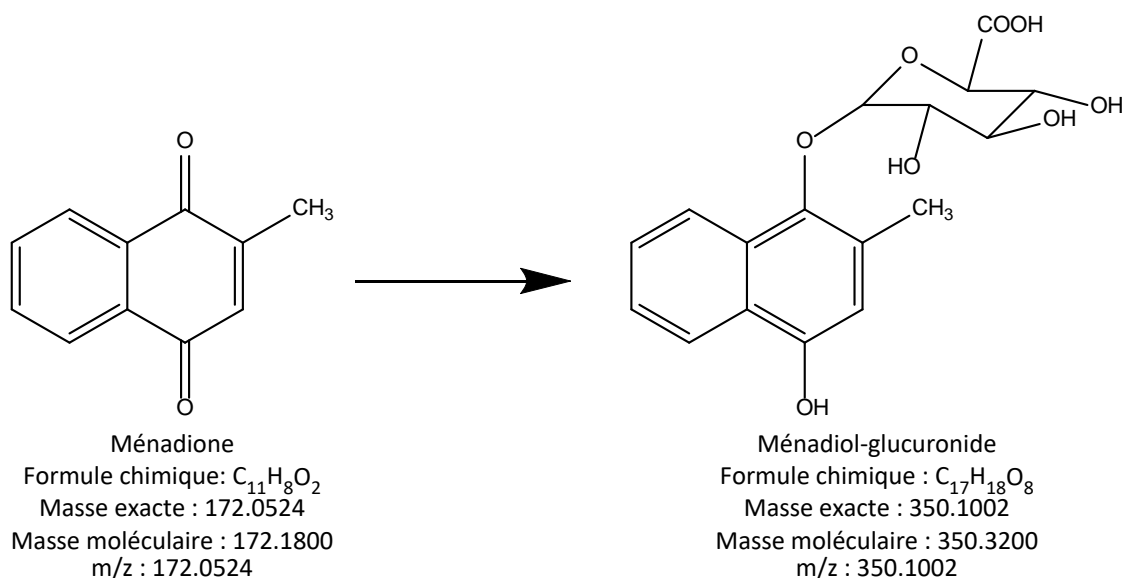


Figure 50. Structure chimique de la ménadione et du ménadiol-glucuronide

4.2. Résultats

Les manipulations ont, dans un premier temps, été réalisées sur homogénats cellulaires de SH-SY5Y-QR2-UGT1A6 après 3 h d'incubation à 37 °C avec la ménadione (25 μ M), le BNAH (25 μ M) et l'UDPGA (2 mM). Aucun pic correspondant au ménadiol-glucuronide n'a été détecté dans ces conditions, sans doute en raison d'une trop faible quantité de forme glucuronidée produite.

Ainsi de nouveaux essais ont été réalisés en augmentant à la fois la concentration en ménadione (100 μ M) mais également en BNAH (4 mM). En effet, la ménadione étant continuellement recyclée, il est nécessaire que QR2 dispose de suffisamment de cosubstrat pour pouvoir produire de grandes quantités de ménadiol et ainsi, après conjugaison par l'UGT, maximiser la concentration en forme glucuronidée.

Ces conditions expérimentales ont permis la détection de la forme glucuronidée. Les chromatogrammes et les spectres de masse correspondant à la ménadione ($m/z = 172$), toujours présente dans le milieu, et au ménadiol-glucuronide ($m/z = 349$) sont présentés Figure 51. Dans chacun des cas, le chromatogramme fait apparaître un seul pic aux temps de rétention $t_R = 2,60$ min pour la ménadione et $t_R = 2,22$ min, pour le ménadiol-glucuronide. La valeur $m/z = 349$ pour la forme conjuguée correspond au ménadiol ($m/z = 174$) auquel s'ajoute la valeur du glucuronide [$(m/z = 176) - 1$ (mode d'ionisation négatif)] qui correspond à la formule brute de $C_{17}H_{17}O_8$. Comme le montre la Figure 54, en l'absence de ménadione, le pic correspondant au ménadiol-glucuronide n'apparaît plus.

Afin de confirmer ce résultat des analyses tandem LC-MS/MS ont été mises en œuvre. La fragmentation des ions correspondant à $m/z = 349$ (Figure 53a) a permis d'obtenir les fragments caractéristiques du glucuronide à $m/z = 175$ et $m/z = 113$ (Figure 53b) conformément à ce qui est décrit dans la littérature (Figure 52) (Levsen *et al.*, 2005).

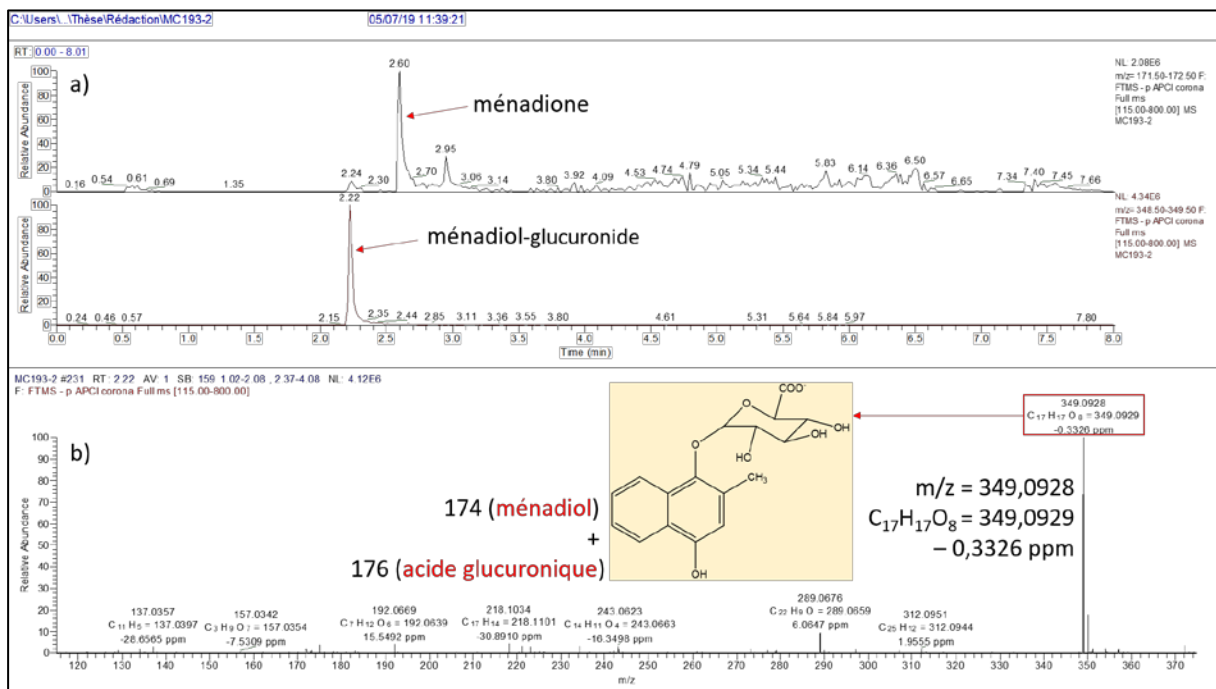


Figure 51. a) Chromatogrammes avec extraction des masses d'intérêt et b) spectre LC-MS obtenus pour un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après 3 h d'incubation avec la ménadione (100 μ M), le BNAH (4 mM) et UDPGA (2 mM).

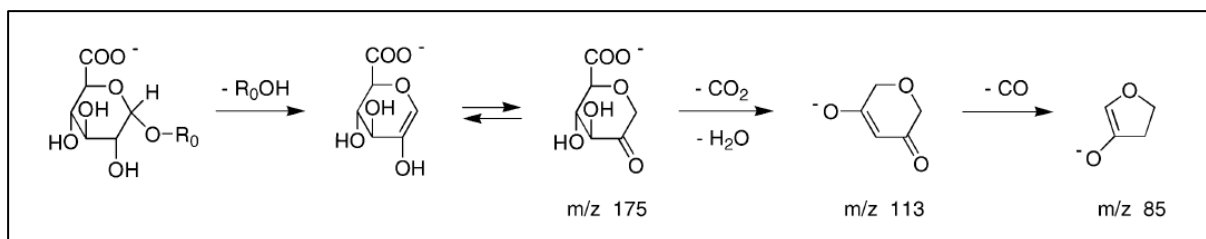


Figure 52. Voie de fragmentation caractéristique du glucuronide d'après Levsen *et al.* (Levsen *et al.*, 2005)

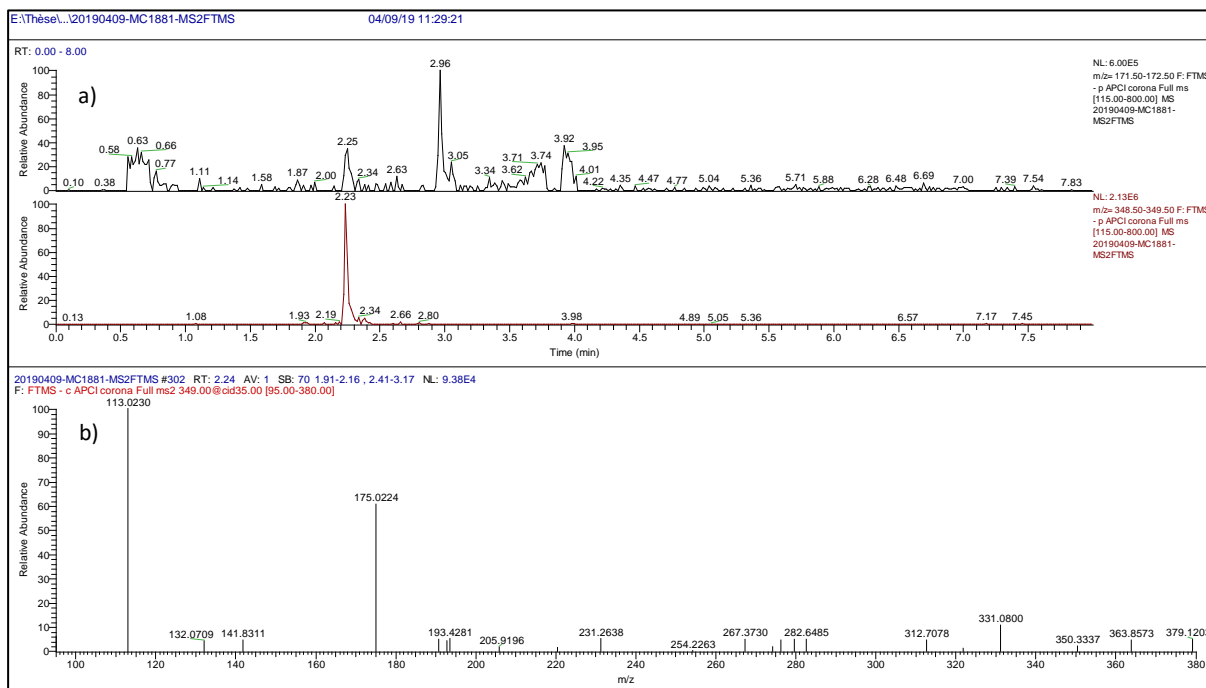


Figure 53. a) Chromatogramme obtenu d'un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec la ménadione (100 μ M), BNAH (4 mM), UDPGA (2 mM). b) fragmentation des ions $m/z = 349$ obtenu à $t_R = 2,23$ par MS/MS haute résolution.

Un certain nombre de contrôles ont été réalisés afin de confirmer le rôle de chacune des enzymes dans la formation du ménadiol-glucuronide.

En l'absence des deux cosubstrats indispensables au fonctionnement des enzymes, l'UDPGA et le BNAH (Figures 55 et 56 respectivement), la forme glucuronidée n'est plus détectée. Cependant, on constate une différence notable concernant le pic de la ménadione. En effet sans BNAH, le pic de la ménadione disparaît du fait de sa métabolisation par les réductases à 1 électron. La forme semiquinonique résultante n'a pas non plus été détectée soit à cause de l'instabilité de cette forme, soit parce que cette forme n'est pas ionisée par le spectromètre de masse dans les conditions expérimentales utilisées.

En revanche, en l'absence d'UDPGA, le pic de la ménadione apparaît sur le spectre. Ceci provient du fait que la ménadione se reforme continuellement par ré-oxydation de la forme réduite qui n'est plus prise en charge par l'enzyme de conjugaison.

Compte tenu de la présence, même en très faible quantité de QR1 dans les cellules SH-SY5Y, nous avons testé l'effet d'un inhibiteur spécifique de QR1, le dicoumarol, sur la détection de la forme glucuronidée. Comme le montre la Figure 57 aucun effet significatif n'a été observé avec le dicoumarol confirmant que la forme glucuronidée provient majoritairement de QR2.

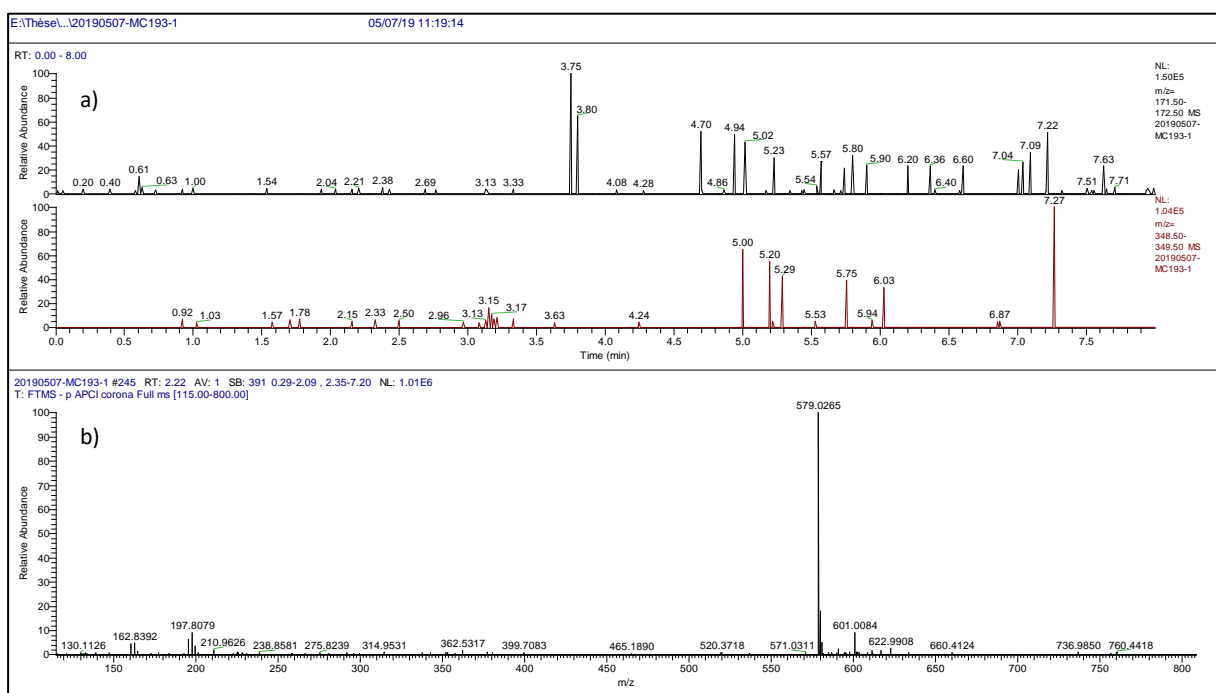


Figure 54. Contrôle négatif 1 : sans ménadione a) chromatogrammes avec extraction des masses d'intérêt et b) spectre LC-MS obtenu d'un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec BNAH (4 mM), UDPGA (2 mM).

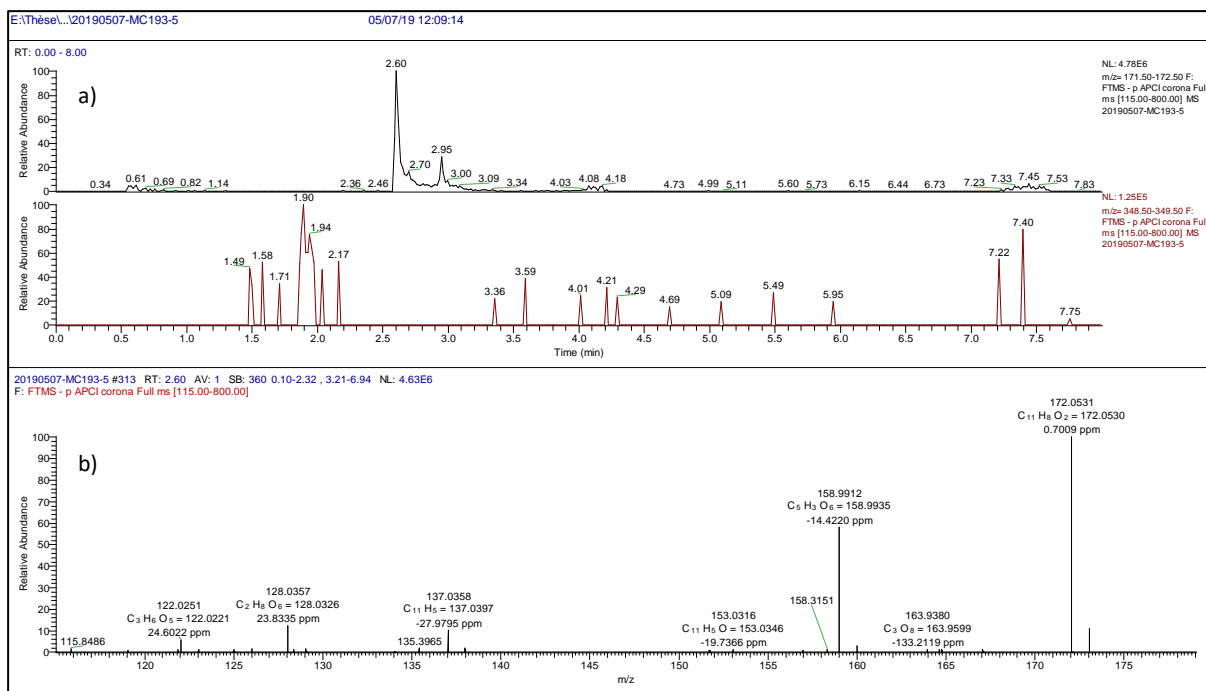


Figure 55. Contrôle négatif 2 : sans UDPGA a) Chromatogrammes avec extraction des masses d'intérêt et b) spectre LC-MS obtenu d'un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec la ménadione (100 μ M), BNAH (4 mM).

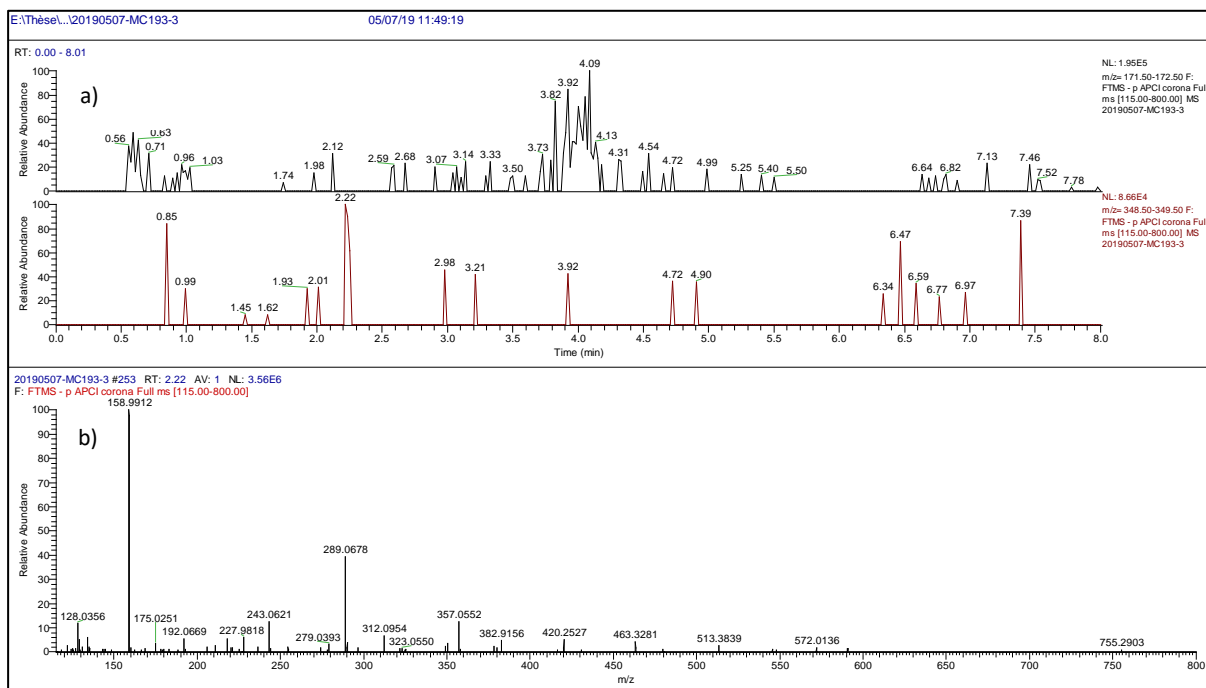


Figure 56. Contrôle négatif 3 : sans BNAH a) chromatogrammes avec extraction des masses d'intérêt et b) spectre LC-MS obtenu d'un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec la ménadione (100 μ M), UDPGA (2 mM).

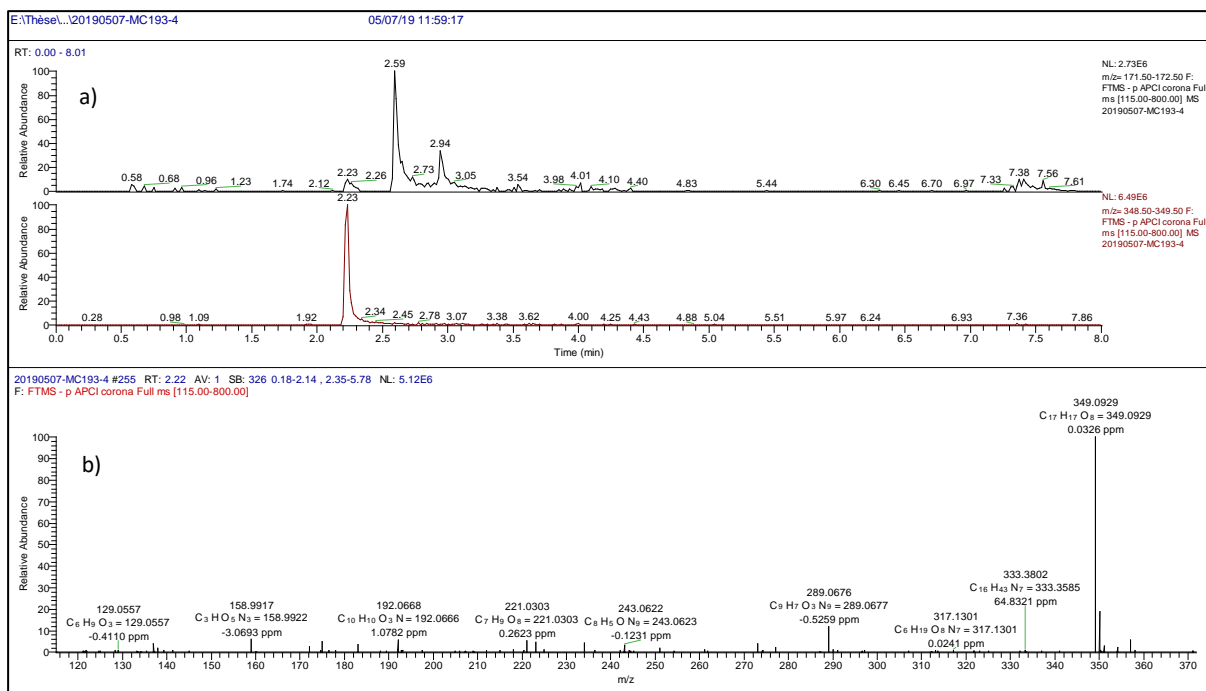


Figure 57. a) Chromatogrammes avec extraction des masses d'intérêt et b) spectre LC-MS obtenu d'un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec la ménadione (100 μ M), dicoumarole (20 μ M), BNAH (4 mM), UDPGA (2 mM).

Les mêmes essais ont été réalisés en présence de duroquinone, une *para*-quinone substrat des quinone-réductases (**Audi et al., 2003**) devant théoriquement être prise en charge par UGT1A6. Les résultats correspondants sont présentés sur la Figure 58. Le spectre fait très clairement apparaitre le pic de la forme glucuronidée de la durohydroquinone, produit issu de la réduction à 2 électrons de la duroquinone.

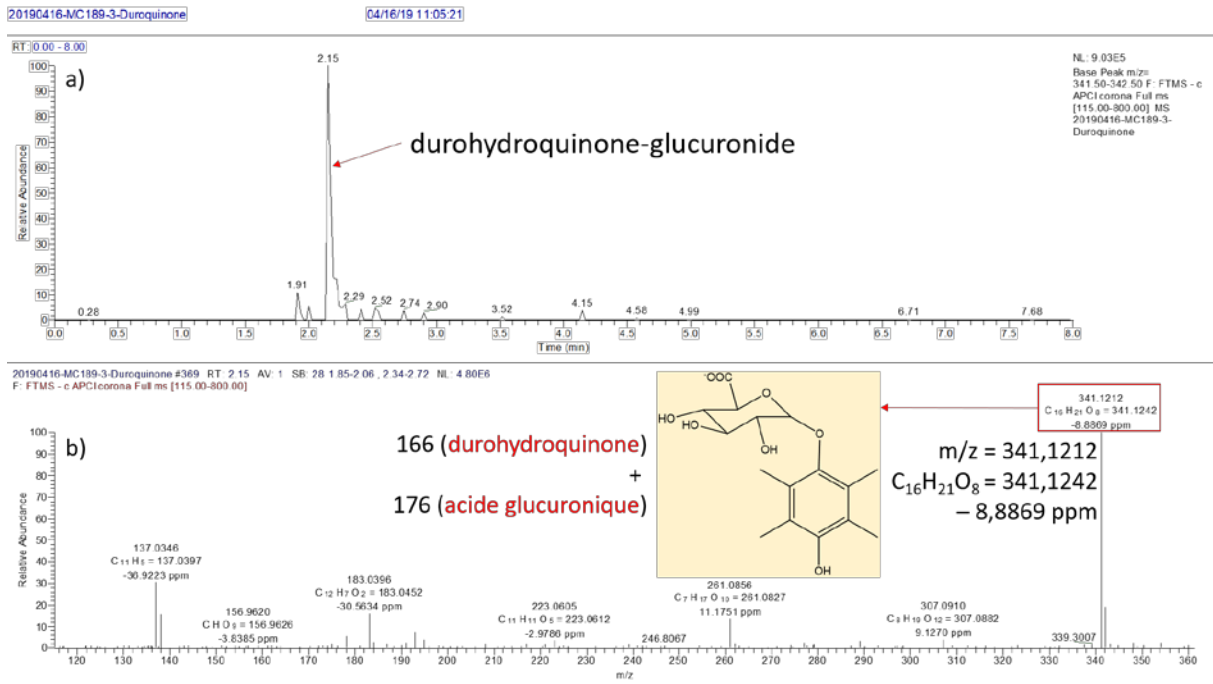


Figure 58. a) Chromatogramme et b) spectre LC-MS obtenus à partir d'homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec la duroquinone (100 μ M), BNAH (4 mM), UDPGA (2 mM).

5. Effet sur l'homéostasie redox cellulaire

Jusqu'à présent la toxicité cellulaire des quinones et l'effet bénéfique de la co-expression d'une enzyme de conjugaison a été décrite en terme de variation de la production de ROS et plus particulièrement de superoxyde. Afin d'appréhender la problématique d'une manière plus globale nous avons choisi d'étudier la toxicité de la quinone sur la cellule en mesurant des modifications de l'homéostasie redox cellulaire.

5.1. Principe du test

Le test que nous avons utilisé s'inspire de la technologie « LUCS » (Light-Up Cell System) développée par la Société AOP (AntiOxydant Power) avec qui notre équipe collabore depuis plusieurs années (**Derick et al., 2017**). Cette technologie est basée sur l'utilisation du thiazole orange (TO), un intercalant de l'ADN, associé à un système d'illumination de la cellule produisant des flashes de lumière. Alors que le niveau de fluorescence du TO est faible dans les cellules saines, l'induction lumineuse déclenche la génération intracellulaire d'espèces oxydantes qui perturbent l'homéostasie redox cellulaire. Cette perturbation entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire permettant une entrée massive du TO et par conséquent une augmentation de la fluorescence comme l'illustre la Figure 59.

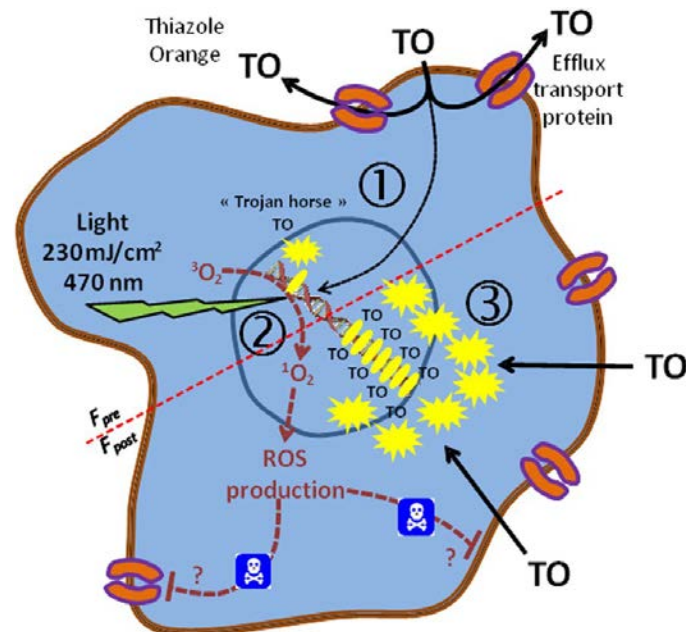


Figure 59. Mécanisme proposé pour le flux intracellulaire de thiazole orange d'après Derick et al. (**Derick et al., 2017**)

Il est alors possible, dans ces conditions, de déterminer la capacité de molécules à protéger la cellule du stress oxydant induit en étudiant les variations de fluorescence du TO.

Dans notre protocole, l'illumination est remplacée par l'ajout d'une quinone. L'ajout de la quinone produit, du fait de sa métabolisation intracellulaire, une grande quantité de radicaux libres qui vont induire, comme dans le cas de l'illumination, une entrée massive de TO et donc une augmentation de la fluorescence. Ainsi, en mesurant des variations de fluorescence, il est possible d'évaluer l'effet de la présence de QR2 et d'enzymes de conjugaison sur le stress oxydant généré et donc sur la toxicité de la quinone.

Les cellules sont dans un premier temps incubées 1 h en présence du TO (2 μ M). La ménadione est ensuite ajoutée dans le milieu de culture et l'intensité de fluorescence immédiatement mesurée en fonction du temps (4 h). La courbe obtenue est de forme sigmoïde, forme similaire à ce qui est obtenu avec les flashes de lumière (**Derick *et al.*, 2017**). Ainsi en comparant l'allure des courbes enregistrées pour différentes lignées cellulaires dans différentes conditions, on peut conclure quant à l'effet bénéfique ou aggravant de la présence de telle ou telle enzyme d'intérêt.

Comme l'illustre le schéma ci-dessous, si la fluorescence enregistrée est plus importante (courbe rouge), cela signifie que la toxicité augmente, au contraire si la fluorescence est moins importante (courbe verte), on conclura à une diminution de la toxicité de la quinone (Figure 60).

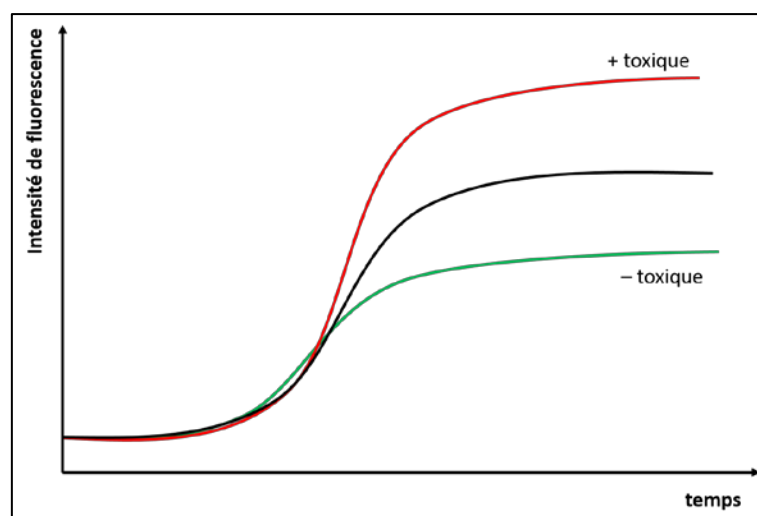


Figure 60. Courbe sigmoïde représentant la fluorescence de thiazole orange au cours du temps

5.2. Effet de l'expression de QR2

Les expériences ont été réalisées avec des cellules SH-SY5Y-QR2 en présence de BNAH (50 μM), \pm S29434 (20 μM) avec les différentes concentrations en ménadione (6 – 50 μM). Les courbes correspondantes sont présentées sur la Figure 61 (courbes jaunes). Ces courbes mettent clairement en évidence un effet-dose pour la ménadione puisque l'augmentation de la fluorescence et donc l'entrée du TO est d'autant plus retardée que la concentration en ménadione diminue. La fluorescence est en effet maximale après 2 h d'incubation pour une concentration de 50 μM , après 3 h à 25 μM et 4 h à 12 μM . A 6 μM , le maximum d'intensité est atteint au-delà des 4 h de mesure.

Afin de confirmer le rôle de QR2 sur la toxicité accrue de la ménadione, les mêmes expériences ont été réalisées après incubation des cellules (30 min) en présence de l'inhibiteur spécifique S29434 (courbes rouges).

Les courbes mettent clairement en évidence une diminution de l'intensité maximale de la fluorescence et donc une diminution du stress oxydant généré dans la cellule lorsque l'enzyme est inhibée c'est-à-dire lorsque la métabolisation de la ménadione se fait par les réductases à 1 électron. Ainsi la toxicité de la ménadione augmente lorsque QR2 est active. Ces résultats sont en parfaite adéquation avec les résultats précédents obtenus par RPE ou LC-MS pour la détection du superoxyde : la métabolisation de la ménadione par QR2 va générer de grandes quantités de ménadiol et donc un stress oxydant accru du fait de l'auto-oxydation de la forme réduite.

Dans le cas particulier d'une concentration en ménadione de 12 μM on observe néanmoins pendant un certain laps de temps (1 – 3 h) une toxicité plus importante lorsque QR2 est inhibée. Cependant au-delà de 3 h on observe bien une nette inflexion de la courbe correspondant à QR2 inhibée par rapport à la courbe pour laquelle QR2 est active.

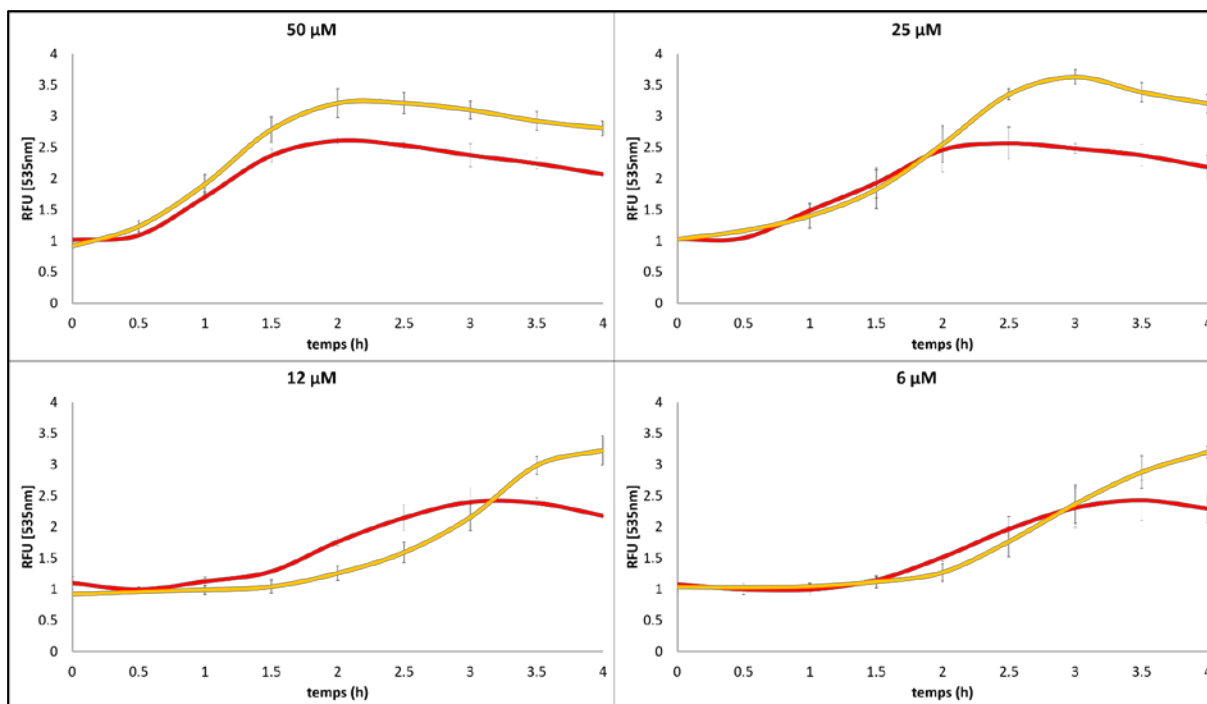


Figure 61. Variation de la fluorescence du TO mesurée sur le SH-SY5Y-QR2 avec S29434 (20 μ M) (courbe rouge) ou sans S29434 (courbe jaune) en présence de BNAH (50 μ M), ménadione (50, 25, 12 et 6 μ M) λ_{ex}/em : 505/535 nm.

5.3. Effet de la co-expression de QR2 et UGT1A6

Les mêmes analyses ont été réalisées avec la lignée SHSY5Y-QR2-UGT1A6 en présence de UDPGA (cosubstrat d'UGT). Les lignées SH-SY5Y-QR2-UGT1A6 et SH-SY5Y-QR2 étant très différentes l'une par rapport à l'autre du fait des modifications génétiques, il est très difficile de comparer les intensités des courbes obtenues pour chacune des lignées. Cependant en jouant sur l'activité de QR2, qui peut être modulée par ajout de l'inhibiteur, nous avons pu tirer un certain nombre de conclusions.

Les résultats obtenus avec la lignée SHSY5Y-QR2-UGT1A6 sont présentés Figure 62 (courbes vertes). Les mêmes analyses ont été réalisées après incubation des cellules en présence de S29434 (courbes violettes). Dans les deux cas, on observe, comme pour les cellules SHSY5Y-QR2, un effet dose puisque la fluorescence augmente moins rapidement lorsque la concentration en ménadione diminue. La comparaison des deux courbes obtenues avec ou sans inhibiteur montre que, quelle que soit la concentration en ménadione, l'intensité de fluorescence augmente plus rapidement lorsque QR2 est inhibée pour atteindre des niveaux de fluorescence supérieurs. On constate néanmoins que l'effet est d'autant plus important quand la concentration en ménadione est faible. Ceci pourrait provenir du fait que pour des

concentrations trop importantes seule une petite partie de la ménadione pourrait être prise en charge par QR2 et donc l'effet bénéfique de l'association QR2-UGT serait moindre.

Ainsi, alors que la présence de QR2 seule augmente la toxicité de la ménadione, l'association de QR2 avec UGT1A6 au contraire diminue sa toxicité.

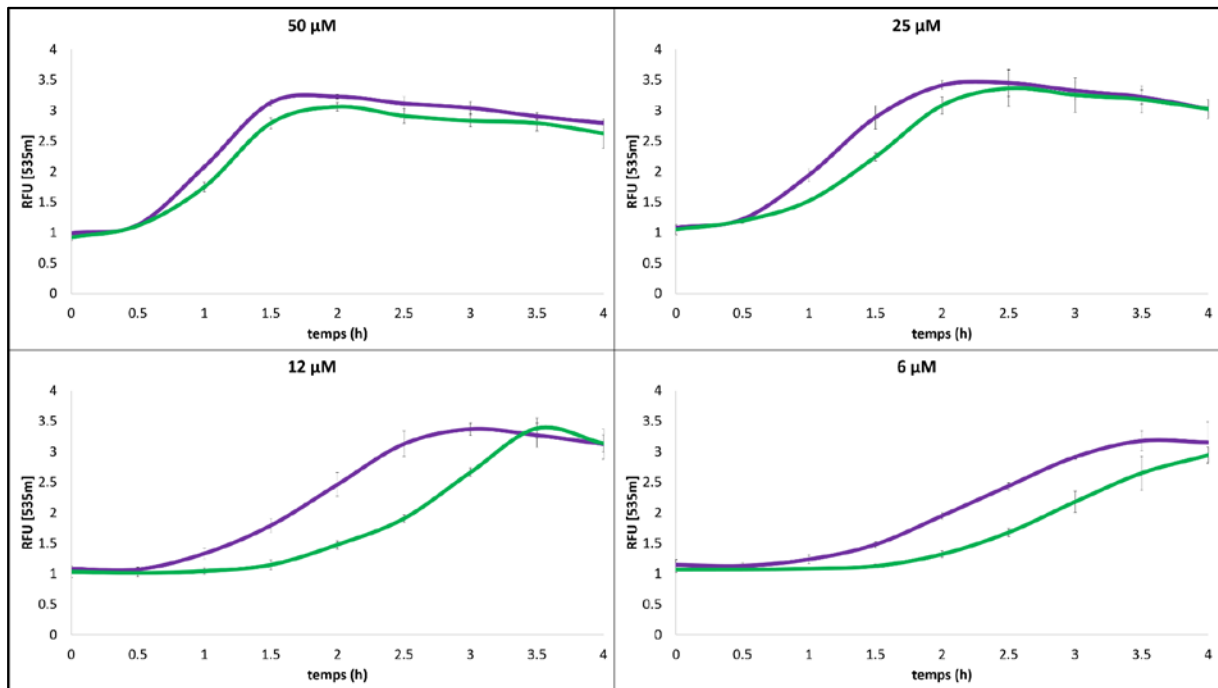


Figure 62. Variation de la fluorescence du TO mesurée sur le SH-SY5Y-QR2-UGT1A6 avec S29434 (20 μM) (courbe violette) ou sans S29434 (courbe verte) en présence de BNAH (50 μM), UDPGA (2 mM), ménadione (50, 25, 12 et 6 μM), $\lambda_{ex/em}$: 505/535 nm.

Les manipulations avec le thiazole orange montrent un plateau toxique que l'on ne sait pas expliquer. Nous avons donc étudié la survie des cellules après 4 h d'incubation avec la ménadione pour vérifier si les cellules sont encore vivantes ou non lorsque la fluorescence atteint le plateau.

5.4. Viabilité des cellules

Les courbes obtenues précédemment pour les lignées SHSY5Y-QR2-UGT1A6 font clairement apparaître qu'au bout d'un certain temps d'incubation, les niveaux de fluorescence obtenus, en présence ou non de l'inhibiteur, sont les mêmes, comme si la toxicité n'était que retardée. Ce temps est d'autant plus court que la concentration en ménadione est élevée. Ainsi, afin de mieux comprendre ce qui se passe nous avons évalué la viabilité des cellules pour les différentes lignées après 4 h d'incubation. La viabilité des cellules a été évaluée avec le test MTT utilisant un sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Ce test permet de compter les cellules vivantes capables de réduire le sel de tétrazolium en formazan. Ce dernier précipite sous la forme de cristaux violets. Après solubilisation des cristaux par le DMSO, une mesure d'absorbance permet d'évaluer la viabilité des cellules.

Les résultats obtenus pour chacune des conditions sont présentés sur la Figure 63. Ces résultats montrent clairement que, pour des concentrations comprises entre 50 et 12 μM , la toxicité de la ménadione après 4 h d'incubation est la même quelle que soit la lignée considérée. Si l'on compare les différentes lignées, les taux de survie sont similaires. A noter néanmoins une susceptibilité plus importante de la lignée doublement modifiée (SHSY5Y-QR2-UGT1A6).

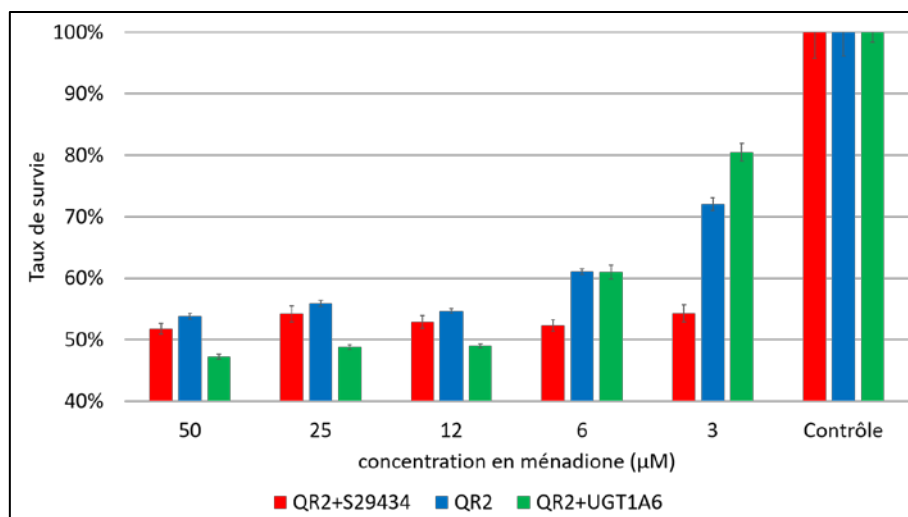


Figure 63. Taux de survie après incubation avec la ménadione à différentes concentrations

En revanche, pour des concentrations plus faibles en ménadione, il semblerait que les tendances s'inversent. En effet, on observe très clairement que la survie des cellules surexprimant QR2 et UGT1A6 est très nettement augmentée par rapport aux autres lignées à 6 et 3 μM . A 3 μM la survie augmente de 45 à 80%. Ce résultat est tout à fait cohérent avec l'hypothèse de l'effet bénéfique de la coopération d'effet entre QR2 et UGT. Il est logique que pour des concentrations trop importantes, la ménadione ne puisse pas être entièrement prise en charge par cette voie de détoxification. On note que c'est également le cas, dans une moindre mesure, pour la lignée surexprimant uniquement QR2 (augmentation de 55 à 70 %). Ce résultat est plus surprenant car l'ensemble des expériences précédentes ont au contraire démontré une toxicité accrue de la ménadione en présence de QR2.

Ainsi, il est extrêmement difficile de tirer des conclusions de cet essai. En particulier, le facteur temps est à prendre en compte. En effet, toutes les expériences précédentes ont été menées pour des temps d'incubation courts, de quelques minutes à quelques dizaines de minutes au plus, ce qui ne laisse pas le temps à la cellule d'enclencher des modifications protéiques. Or des travaux récents ont démontré que l'exposition de cellules à de faibles concentrations en agents toxiques, pouvait après 3 ou 4 h d'incubation, induire l'expression d'enzymes antioxydantes (**He et al., 2017 ; López-Alarcón et Denicola, 2013**). Pour cette raison nous avons décidé de vérifier l'expression d'enzymes antioxydantes majeurs pour les différentes lignées après 4 h d'incubation en présence d'une faible concentration en ménadione.

5.5. Induction des enzymes antioxydantes

Les analyses ont été réalisées par RT-qPCR, en collaboration avec des biologistes du laboratoire. Nous avons mesuré l'expression des gènes correspondant pour les enzymes d'intérêt après 4 h d'incubation en présence de ménadione. Quatre enzymes ont été évaluées : la superoxyde dismutase (SOD), le complexe Nrf2, la glutathion réductase (GlutR) et l'hème oxygénase (HO-1). Les mesures ont été réalisées pour les trois lignées (Figure 64). Les résultats présentés sur la Figure 64 démontrent bien une augmentation des défenses antioxydantes de la cellule en présence de QR2 suite au traitement des cellules par la ménadione par comparaison aux cellules ne surexprimant pas QR2 (SH-SY5Y-WT). Cet effet

semble diminuer lorsque UGT est co-exprimée confirmant un stress oxydant moindre dans ce cas.

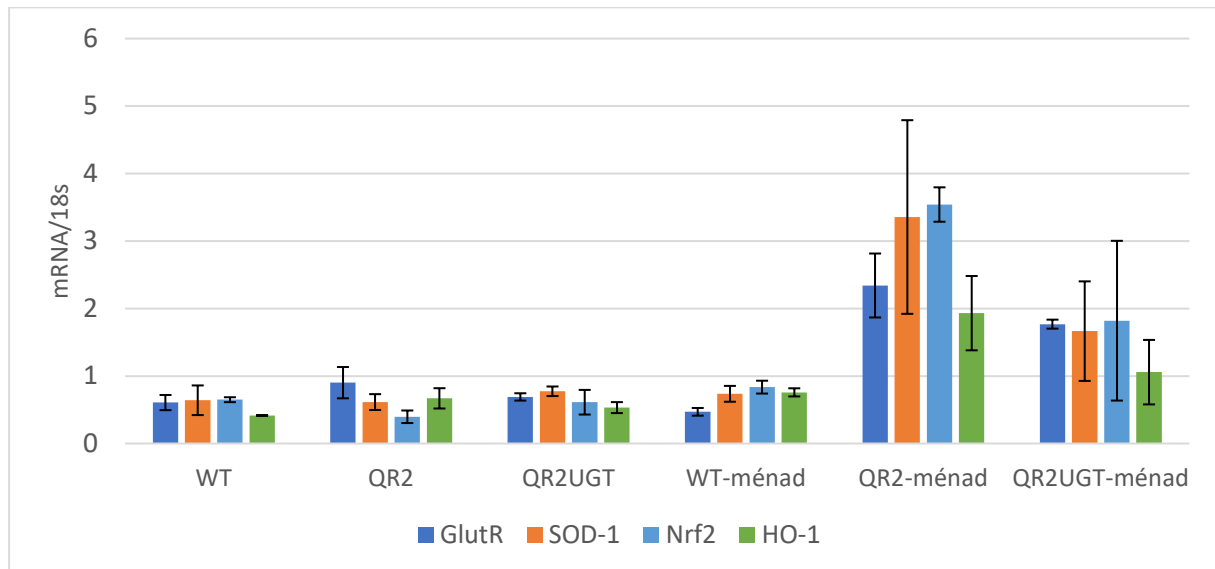


Figure 64. Expression des gènes antioxydants dans les neuroblastomes après 4h d'incubation avec ou sans ménadione (5 μ M) pendant 4 h. (**WT** = SHSY5Y-WT sans ménadione, **QR2** = SHSY5Y-QR2 sans ménadione, **QR2-UGT** = SHSY5Y-QR2-UGT1A6 sans ménadione, **WT-ménad** = SHSY5Y-WT avec ménadione, **QR2-ménad** = SHSY5Y-QR2 avec ménadione, **QR2-UGT-ménad** = SHSY5Y-QR2-UGT1A6 avec ménadione)

Conclusion

L'objectif de ce chapitre était d'étudier si la coopération entre QR2 et une enzyme de conjugaison pouvait diminuer la toxicité de la ménadione par comparaison à des cellules surexprimant uniquement QR2. Pour répondre à cette question une nouvelle lignée surexprimant à la fois QR2 et une enzyme de conjugaison spécifique des *para*-quinones, la UGT1A6 a été produite.

Différentes techniques d'analyses du stress oxydant ont ensuite été mises en œuvre sur ces trois lignées afin de mettre en évidence des variations de la toxicité de la ménadione. Les analyses RPE menées sur des cellules entières ou sur homogénats cellulaires n'ont pas permis de mettre en évidence une diminution du stress oxydant par rapport aux cellules contrôle. Des analyses plus fines sur la production intracellulaire du superoxyde par LC-MS ont permis d'observer une diminution de la toxicité de la ménadione lorsque UGT et QR2 sont co-exprimées. La présence de la forme glucuronidée de la ménadione a également été détectée sur la lignée SHSY5Y-QR2-UGT confirmant cette voie de détoxification de la ménadione.

Finalement des analyses originales de mesure de l'homéostasie redox cellulaire basée sur l'utilisation du thiazole orange soutiennent également notre hypothèse. Ainsi la ménadione, en présence de quinone-réductase 2 seule induit une toxicité cellulaire alors que la coopération de la quinone-réductase 2 avec une enzyme de conjugaison, la UGT1A6, permet de diminuer voire de supprimer cette toxicité.

Conclusion générale

Les quinone-réductases sont des enzymes cytosoliques capables de réduire les quinones à deux électrons pour former des hydroquinones plus stables que les semi-quinones produites par l'intermédiaire d'enzymes à un électron. Cette propriété confère à ces quinone-réductases un rôle détoxifiant. Cependant, même si un grand nombre d'études ont été réalisées sur QR1 le rôle de QR2 est très mal connu.

Une étude préliminaire sur la spécificité de QR2 vis-à-vis de divers substrats a permis de mettre en évidence des différences majeures de spécificité entre QR1 et QR2 pour différentes quinones comme la duroquinone, la tétrachloro-*o*-benzoquinone, le bleu de méthylène, le dichlorophénol indolphénol et la 6-hydroxydopamine. Une part importante de ces différences peut être attribuée à la géométrie des sites catalytiques de QR1 et de QR2. Un large panel de molécules a été étudié dans ce travail montrant la capacité de la quinone-réductase 2 à réduire de nombreuses structures chimiques. Les informations obtenues mériteront d'être complétées. Les études menées sur différents types de cellules ont mis en évidence une toxicité accrue de certaines quinones telles que la ménadione lorsque QR2 est exprimée par la cellule. En outre, cette toxicité est très importante dans le cas de cellules neuronales en présence d'adrénochrome, forme oxydée l'adrénaline, neurotransmetteur. Ce dernier résultat a permis d'établir un lien possible entre QR2 et neurodégénérescence d'autant plus qu'un lien avait déjà été établi entre perte et acquisition de mémoire et QR2. Des taux élevés de QR2 ont été retrouvés dans l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les radicaux produits seraient le point de départ d'une cascade oxydante pouvant conduire à *in fine* à la mort des neurones.

Les résultats obtenus dans ce travail ont également mis en évidence des différences de toxicité importantes d'un type cellulaire à l'autre alors que des études préliminaires menées sur des cellules CHO avaient montré, au contraire, le caractère détoxifiant de QR2 vis-à-vis de la ménadione. Ainsi, dans la dernière partie de ce travail, nous avons démontré, en utilisant des méthodes originales que la coopération entre QR2 et une enzyme de conjugaison peut effectivement diminuer la toxicité de la quinone. Ainsi l'expression d'enzymes de conjugaison spécifiques dans une cellule peut complètement inverser le rôle de QR2.

En conclusion, ce mémoire nous a permis de mieux comprendre le rôle de QR2 dans la toxicité des quinones au niveau de la cellule et notamment des cellules neuronales. L'étude menée sur l'association de QR2 avec un enzyme de conjugaison a été réalisée uniquement dans le cas de la ménadione et devait maintenant être étendue au cas de catéchol-quinones issus de neurotransmetteurs afin de se rapprocher de la problématique de la neurodégénérescence.

D'autre part d'un point de vue analytique il serait pertinent d'étendre l'analyse à d'autres espèces réactives telles que le peroxyde d'hydrogène ou le peroxyde d'azote. Incontestablement les meilleurs résultats ayant été obtenus avec la LC-MS, nous souhaitons poursuivre dans cette voie en utilisant des dérivés de la coumarine permettant la détection de ces espèces (**Zielonka et al., 2012**).

Partie Expérimentale

Partie Expérimentale

1. MATERIEL	118
1.1. ORIGINE DES REACTIFS	118
1.2. SOUCHES CELLULAIRES	119
1.2.1. <i>Procédé de culture des lignées SH-SY5Y</i>	120
2. METHODES EXPERIMENTALES	120
2.1. EXPERIENCES SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES QUINONE REDUCTASES	120
2.2. EXPERIENCES PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE)	121
2.2.1. <i>Expériences sur enzyme purifiée</i>	121
2.2.2. <i>Expériences sur cellules</i>	122
2.3. MESURE DE LA PRODUCTION DE SUPEROXYDE DANS LES CELLULES PAR UHPLC-MS.....	123
2.3.1. <i>Synthèse du standard 2-hydroxyéthidium (2-OH-E+)</i>	124
2.3.2. <i>Traitement des cellules</i>	126
2.3.3. <i>Analyse UHPLC-MS</i>	126
3. EXPERIENCES PAR FLUORESCENCE AVEC LE THIAZOLE ORANGE (TO).....	127
4. EXPERIENCES DE VIABILITE CELLULAIRE	127

1. Matériel

1.1. Origine des réactifs

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

Corning : Plaque 96 puits (ref : 3595), Flask 75 cm² (ref : 3290), Trypsine (ref : 25-052-CV), Cryovial (ref : 430487)

Dojindo (Kumamoto, Japon) : DMPO (ref : D048-10).

IdRS (Croissy-sur-Seine, France): S29434 (*N*-[2-(2-methoxy-6H-dipyrido[2,3-a:3,2-e] pyrrolizin-11-yl)ethyl]-2-furamide), lot L03EFS156A), hQR2 purifiée produite en Sf9 (lot 998-QR2-04p), hQR1 produite en *E. coli*.

Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) : ménadione (ref : M5625), adrénochrome (ref : A5752), tampon phosphate (DPBS) (ref : D8662), dopamine HCl (ref : H8502), dicoumarol (ref : M1390), catalase (ref : C400), superoxyde dismutase (ref : S5389) , flavine adénine dinucléotide (FAD) (ref : F6625), hydrochlorure de trishydroxyméthylaminométhane (tris-HCl) (ref : T3253), β -octyl-D-glucopyranoside (ref : O8001), dihydroéthidium DHE (ref : 37291), NAD(P)H (ref : N1630) et NADH (ref : N8129), Amicon Ultra 0,5mL Centrifugal Filter (ref : Z740169-96EA), thiazole orange (ref : 390062), nitrosodisulfonate de potassium (ref : 220930), acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) (ref : D6518), bromure de tétrazolium (MTT) (ref : M2128), Triton X-100 (ref : T9284-100ML), phosphate de potassium monobasique (ref : P0662), phosphate de potassium dibasique (ref : 795496), acide phosphorique (ref : 695017), acide chlorhydrique (Ref : 258148), UDPGA (ref : U6751), Bleu de Trypan (ref : T8154)

TCI Chemicals (Zwijndrecht, Belgique) : 1-benzyl-1,4-dihydronicotinamide (BNAH) (ref : B1156).

ThermoFisher Scientific (Illkirch, France) : diméthylsulfoxyde (DMSO) (ref : 10387791), FBS (ref : 11550356), DMEM/F12 (ref : 11554546), Acétate d'ammonium (ref : 11317490), Méthanol (ref : 10031094). Acétonitrile (ref : 10660131)

Fluorimètre : **Xenius® de SAFAS** (Monaco) piloté par le logiciel SP2000 version 7.4.13.0.

Spectrophotomètre : **BioTek** : Winooski, Vermont, États-Unis

UHPLC-HRMS: Ultimate 3000 UHPLC + LTQ-Orbitrap XL ThermoFisher Scientifique

1.2. Souches cellulaires

La lignée K562 a été cultivée par la Société Vectalys (Ramonville Saint-Agne, France) et fournie sous forme de suspensions cellulaires de 5 millions cellules chacune pour réaliser les expériences RPE. Les conditions de culture des cellules K562 requiert un milieu complet contenant le milieu RPMI, 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine et 0,5% de P/S (pénicilline/streptomycine). Les neurones primaires sont fournis sous forme de suspensions cellulaires de 5 millions cellules par la Société Vectalys. Les neurones primaires sont extraits du cortex des embryons de souris C3H et C3H QR2^{-/-} (Laboratoire Charles River, France). Les morceaux de cortex sont dissociés par la digestion papainique puis ensemencer dans le flacon contenant du milieu Neurobasal et 0,5 mM de L-glutamine sans SVF pendant trois jours. Ces cellules sont ensuite transduites par des lentivirus contenant le gène EF1-hQR2. Trois jours après la transduction, les neurones primaires sont comptés, lavés et prêts pour les analyses RPE. Les lignées SH-SY5Y sont fournies par Vectalys (financement par l’Institut de Recherche Servier) et cultivées au sein du Laboratoire Pharmadev par le protocole décrit ci-dessous. Les différentes lignées utilisées sont résumées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Récapitulatif des différentes lignées cellulaires étudiées avec le taux d’expression de QR2, origine de la lignée et milieu de culture requis.

Lignée cellulaire	Expression de QR2	Origine du tissu / espèce	Milieu requis
K562	Moyenne	Moëlle osseuse leucémique, <i>Homo sapiens</i>	RPMI
SH-SY5Y-NT	Faible	Moëlle osseuse neuroblastome, <i>Homo sapiens</i>	DMEM/Ham F12
SH-SY5Y-QR2	Elevée	Moëlle osseuse neuroblastome, <i>Homo sapiens</i>	DMEM/Ham F12
SH-SY5Y-QR2-UGT-1A6	Elevée	Moëlle osseuse neuroblastome, <i>Homo sapiens</i>	DMEM/Ham F12
C3H NT	Faible	Cortex, souris C3H	Neurobasal
C3H QR2 ^{-/-} NT	Absente	Cortex, souris C3H QR2 ^{-/-}	Neurobasal
C3H QR2 ^{-/-} -QR2	Elevée	Cortex, souris C3H QR2 ^{-/-}	Neurobasal

1.2.1. Procédé de culture des lignées SH-SY5Y

1.2.1.1. Décongélation

Les lignées SH-SY5Y-WT, SH-SY5Y-UGT, SH-SY5Y-QR2, SH-SY5Y-QR2-UGT sont fournies sous forme d'un échantillon de 1 mL contenant 1 million de cellules. Les échantillons sont conservés à - 80 °C. L'échantillon de chaque lignée SHSY5Y est décongelé et transféré dans 9 mL de milieu de culture complet (y compris 5% de SVF, 2 mM de L-glutamine et 0,5% de p/s). La suspension est centrifugée pour éliminer le DMSO provenant du milieu de congélation. Le culot est re-suspendu dans 5 mL de milieu complet et mis dans un flacon de culture de 25 cm² (T25). Les cellules sont placées dans l'incubateur à 37 °C avec 5% de CO₂ pendant 4 jours puis remises en culture. Les cultures cellulaires ont été réalisées au laboratoire.

1.2.1.2. Passage de culture

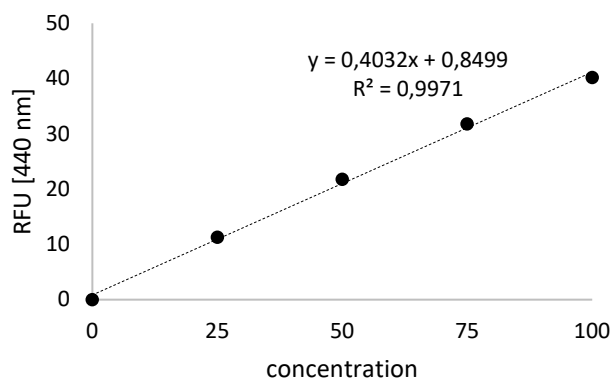
L'ancien milieu est enlevé. Le flacon contenant les cellules est lavé avec 10 mL de DPBS pour éliminer le résidu de SVF dans le milieu car il pourrait inhiber l'effet de la trypsine. Ensuite, le DPBS est enlevé et 4 mL de trypsine sont ajoutés pour décoller les cellules. Le décollage des cellules est vérifié grâce à un microscope inversé. Dès que 80% des cellules sont décollées, 6 mL de milieu de culture sont ajoutés sur le tapis cellulaire pour récupérer les cellules. Puis la suspension est transférée vers un tube de 15 mL et centrifugée à 120 × g pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est re-suspendu dans 1 mL de milieu. Les cellules sont comptées grâce à une cellule de Malassez. 5 millions de cellules sont ensuite transférées dans un nouveau flacon de 75 cm² contenant le milieu de culture (10 mL). Le passage des lignées SH-SY5Y est réalisé tous les 4 jours. Après le 20^e passage les cellules sont jetées.

2. Méthodes expérimentales

2.1. Expériences sur l'activité enzymatique des quinone réductases

La mesure de l'activité enzymatique de QR2 est basée sur le suivi de la diminution de la concentration du cosubstrat BNAH en utilisant la spectrofluorimétrie. Cette méthode permet de suivre indirectement la réduction des substrats par QR2 et est décrite par Mailliet et *al.* (**Mailliet et al., 2005**). Le tampon de réaction est du tampon tris β-octyle (**Boutin et al., 2005**). Ce tampon est préparé en diluant du TRIS-HCl et du β-octyle glucopyranoside dans l'eau

distillée pour avoir une concentration finale de 50 mM et 1 mM respectivement. Le pH du tampon est ensuite ajusté à 8,5 avec l'hydroxyde de sodium 1M. La gamme de BNAH est composée de 5 concentrations (0, 25, 50, 75, 100 μ M) diluées dans la solution du tampon tris- β -octyle contenant 500 nM de FAD.



Les expériences sont réalisées dans une microplaque noire à fond transparent de 96 puits en ajoutant dans l'ordre : tampon, \pm QR2 purifiée (0,25 nM), \pm BNAH (100 μ M), et substrat (100 μ M). L'acquisition est réalisée après l'ajout du substrat marquant le début de la réaction. Chaque condition est réalisée en trois réplicas. L'intensité de fluorescence du BNAH est mesurée par un fluorimètre Xenius® SAFAS (Monaco, piloté par le logiciel SP2000 version 7.4.13.0) pendant 60 minutes à intervalles réguliers de 60 secondes aux longueurs d'onde d'excitation 340 nm et d'émission 440 nm. La pente du mélange [BNAH + substrat] sert de ligne de base de la réaction. La vitesse en unité fluorescence par minute (UF/min) est calculée par soustraction entre la pente du mélange [QR2 + BNAH + substrat] et la pente du mélange [BNAH + substrat]. Cette vitesse est divisée par la pente de la gamme de BNAH pour obtenir une activité de nmol/min puis divisée par la concentration de QR2 afin de déterminer l'activité spécifique en nmol/min/mg de QR2

2.2. Expériences par Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)

2.2.1. Expériences sur enzyme purifiée

Le tampon de la réaction est du tampon tris β -octyle (**Boutin et al., 2005**). Les substrats et cosubstrat sont préparés en dilution dans du DMSO à la concentration de 5 mM et 60 mM, respectivement. Le DMPO est préparé à 1 M dans de l'eau distillée désoxygénée. La solution de QR2 purifiée est préparée en diluant la solution stock (4,5 mg.ml⁻¹) pour avoir une

concentration de travail à 428 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le tampon tris β -octyle. Le mélange est introduit dans l'ordre suivant : enzyme purifiée, tampon, DMPO, cosubstrat et substrat. Une incubation de 2 minutes à température ambiante est effectuée après l'ajout du substrat, avant l'acquisition du spectre RPE.

Tableau 4. Conditions de préparation des solutions d'analyse d'enzyme purifiée pour étude par résonance paramagnétique électronique (RPE).

Produit et ordre d'introduction	Concentration solution mère	Volume prélevé	Volume final essai	Concentration finale dans l'essai
Enzyme purifiée	428 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	14 μL	400 μL	15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Tampon		q.s.p 400 μL	400 μL	
DMPO	1 M	32 μL	400 μL	50 mM
Cosubstrat	60 mM	20 μL	400 μL	3 mM
Substrat	5 mM	8 μL	400 μL	100 μM

2.2.2. Expériences sur cellules

Pour les expériences sur cellules, les solutions de travail de substrats et cosubstrats sont préparées à 1 mM dans un mélange DMSO/DPBS à 10% de DMSO et la solution de S29434 à 1 mM dans du DMSO. La catalase est préparée à 100 kU/mL et la SOD à 15 kU/mL dans du DPBS. Le DMPO est préparé à 1M dans de l'eau distillée désoxygénée.

Si nécessaire, les cellules sont incubées pendant 30 min avec l'inhibiteur spécifique de QR2 (S29434) à 20 μM , dans un agitateur oscillant avec incubation à 37 °C avant de réaliser les analyses RPE.

2.2.2.1. Préparation des solutions d'analyse des cellules

Pour tous les essais (K562, SHSY5Y, neurone primaire), 5.10^6 cellules sont traitées selon les conditions décrites dans le Tableau 5. Le mélange est ensuite incubé 2 minutes avant l'acquisition du spectre RPE. Le pourcentage maximal de DMSO dans ces conditions est de 5%.

Tableau 5. Conditions de préparation des solutions d'analyse de suspensions cellulaires pour étude par résonance paramagnétique électronique (RPE).

Produit et ordre d'introduction	Concentration solution mère	Volume prélevé	Volume final essai	Concentration finale dans l'essai
Cellules	5.10^6 cellules	300 μL	500 μL	5.10^6 cellules
DPBS		q.s.p 500 μL	500 μL	
Inhibiteur	1 mM	10 μL	500 μL	20 μM
SOD	15 kU/mL	5 μL	500 μL	150 U/mL
Catalase	100 kU/mL	9 μL	500 μL	1800 U/mL
DMPO	1 M	25 μL	500 μL	50 mM
BNAH	1 mM	50 μL	500 μL	100 μM
UDPGA	20 mM	50 μL	500 μL	2 mM
Substrat	1 mM	50 μL	500 μL	100 μM

2.2.2.2. Préparation des solutions d'analyse des homogénats cellulaires

Pour ces expériences, les cellules sont remplacées par un homogénat cellulaire qui est préparé à partir de 5 millions des neuroblastomes en utilisant un homogénéisateur (*Dounce Kimble tissue grinder*). Les lysats sont récupérés et centrifugés à 20.000 × g pendant 30 min, à 4 °C.

Tableau 6. Conditions de préparation des solutions d'analyse des homogénats cellulaires pour étude par résonance paramagnétique électronique (RPE).

Produit et ordre d'introduction	Concentration solution mère	Volume prélevé	Volume final essai	Concentration finale dans l'essai
Homogénat		300 µL	500 µL	
DPBS		q.s.p 500 µL	500 µL	
Inhibiteur	1 mM	10 µL	500 µL	20 µM
DMPO	1 M	25 µL	500 µL	50 mM
BNAH	1 mM	50 µL	500 µL	100 µM
UDPGA	20 mM	50 µL	500 µL	2 mM
Substrat	1 mM	50 µL	500 µL	100 µM

2.2.2.3. 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. L'analyse RPE est faite en utilisant les paramètres suivants : champs magnétiques : 3460 – 3560 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 2.10^5 .

2.2.2.4. Analyse des données RPE

Les résultats sont analysés en se basant sur l'allure du spectre obtenu, les valeurs des constantes de couplage et l'intensité est calculée après une double intégration des pics du spectre grâce au logiciel WINEPR.

2.3. Mesure de la production de superoxyde dans les cellules par UHPLC-MS

Pour quantifier le radical superoxyde intracellulaire, les cellules sont incubées avec la sonde hydroéthidine (DHE) à la concentration finale de 10 µM pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La sonde hydroéthidine réagit spécifiquement sur le radical

superoxyde en produisant du 2-hydroxyéthidium détectable par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. L'ensemble du protocole a été décrit par l'équipe de Zielonka (**Zielonka et al., 2008**). A partir de l'intégration du signal chromatographique, la concentration de 2-hydroxyéthidium est déterminée en utilisant une droite d'étalonnage réalisée avec le standard de 2-hydroxyéthidium synthétisé. La procédure de synthèse du standard 2-hydroxyéthidium est décrite ci-dessous.

2.3.1. Synthèse du standard 2-hydroxyéthidium (2-OH-E+)

2.3.1.1. Préparation des solutions

Le 2-hydroxyéthidium est synthétisé par la réaction entre l'hydroéthidine (DHE) et le nitrosodisulfonate de sodium (NDS) en utilisant 2 moles de NDS pour une mole d'hydroéthidine dans une solution de tampon phosphate (50 mM) DTPA (100 µM).

La solution de tampon phosphate (0,5 M) est préparée en diluant du phosphate dibasique et du phosphate monobasique aux concentrations respectives de 0,39 M et 0,11 M dans l'eau. Le pH est ensuite ajusté à 7,4. Les solutions de tampon phosphate (100 mM) DTPA (200 µM) et de tampon phosphate (50 mM) DTPA (100 µM) sont préparées à partir de la solution tampon phosphate (0,5 M) en ajoutant le DTPA. Une autre solution de tampon phosphate acide (1 M) est préparée en mélangeant de l'acide phosphorique (0,3 M) et du phosphate monobasique (0,7 M). Le pH est ensuite ajusté à 2,4.

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

La solution de nitrosodisulfonate de sodium (NDS) est préparée en diluant 3,6 mg dans 10 mL de solution de tampon phosphate (50 mM) DTPA (100 µM). Il faut noter que la solution de NDS est instable dans ce milieu. Par conséquent, la solution de NDS doit être préparée extemporanément et gardée à 4 °C pendant quelques heures uniquement. La concentration de la solution de NDS est ensuite mesurée aux absorptions maximales à 248 nm et 545 nm par

spectrophotométrie UV-Visible avec une correction du blanc par le tampon phosphate (50 mM) DTPA (100 μ M) ($\epsilon_{248\text{nm}} = 1,69 \times 10^3$ et $\epsilon_{545\text{nm}} = 20,8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

$$C_{\text{cuvette}} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] = \frac{A}{\epsilon \left[\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1} \right] \times l \left[\text{cm} \right]}$$

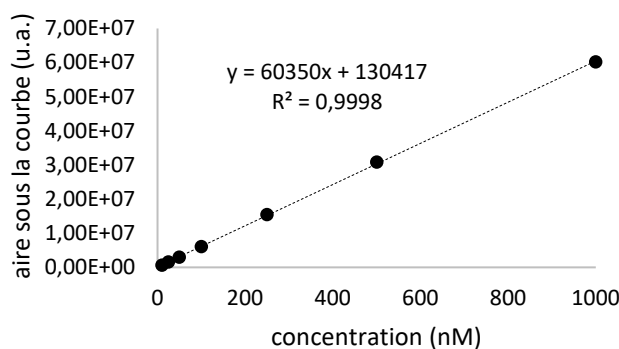
La synthèse est réalisée en mélangeant 200 μ L d'hydroéthidine (20 mM) dans 4 mL du tampon phosphate (50 mM) DTPA (100 μ M), 24 mL d'eau, et 8 mL de NDS (1 mM) en agitant doucement. Le mélange est conservé à température ambiante pendant 2 h. Ce mélange est ensuite purifié par extraction en phase solide (SPE).

La cartouche SPE est d'abord conditionnée en passant 6 mL d'eau, 3 mL d'eau/MeOH (50/50), 3 mL de MeOH, 6 mL d'eau. Ensuite, le mélange de synthèse est déposé dans la cartouche. Des séries d'éluants sont ensuite ajoutés : 1) 4 x 3 mL d'eau, 2) 2 x 3 mL d'eau/MeOH (50/50), 3) 3 x 3 mL d'eau/MeOH (20/80). Le 2-hydroxyéthidium (2-OH-E⁺) (bande orange) doit être élué à cette étape. La solution orange obtenue est ensuite évaporée sous flux d'azote. A la fin du séchage, le produit est pesé avant dissolution dans une solution d'HCl (100 mM) afin d'obtenir une solution de 2-hydroxyéthidium à 10 mM. Cette solution est ensuite diluée 100 fois dans l'eau pour obtenir une solution de 0,1 mM de 2-hydroxyéthidium.

La solution 2-hydroxyéthidium (0,1 mM) est ensuite mélangée (100 μ L / 100 μ L) avec la solution du tampon phosphate (0,1 M) DTPA (200 μ M) DTPA. La concentration de cette solution est mesurée par spectrophotométrie en soustrayant le blanc (100 μ L de tampon + 100 μ L d'HCl 1 mM). La valeur d'absorbance à la longueur d'onde maximale est enregistrée ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$, $\epsilon_{470\text{nm}} = 1,2 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

2.3.1.2. Droite d'étalonnage

Les courbes d'étalonnages sont obtenues en préparant des séries de dilutions de 2-hydroxyéthidium à 1000, 500, 250, 100, 50, 25 et 10 nM dans le solvant méthanol/acétate d'ammonium (25/75), pour un volume final de 200 μ L, et en déterminant par UHPLC-MS les aires des pics. Un exemple de courbe d'étalonnage obtenu est présenté ci-dessous.



2.3.2. Traitement des cellules

Les cellules sont re-suspendues dans le DPBS (5 millions de cellules). Dans le cas des expériences avec inhibition de QR2, les cellules sont pré-incubées avec l'inhibiteur S29434 (20 μM) à 37 °C pendant 30 min. Les échantillons non inhibés sont incubés avec le DMSO à la place de l'inhibiteur. Après l'incubation, des réactifs sont ajoutés dans l'ordre suivant : BNAH (25 μM), UDPGA (2 mM), DHE (10 μM) et ménadione (25 μM). Les cellules sont ensuite incubées et agitées à 37 °C pendant 30 minutes à l'obscurité. Après l'incubation, les cellules sont centrifugées à 120 \times g. Le culot cellulaire est récupéré et lavé avec une solution de DPBS glacée. Le culot peut être conservé à – 80 °C. L'extraction de 2-OH-E⁺ est réalisée en utilisant une solution de Triton X-100 (1% dans DPBS). La solution est diluée au demi avec une solution méthanol/acétate d'ammonium (50/50) puis centrifugée à 20 000 \times g pendant 30 min. Le surnageant est récupéré pour l'analyse par UHPLC-MS.

2.3.3. Analyse UHPLC-MS

L'équipement utilisé pour la séparation et la détection du 2-OH-E⁺ consiste en un système de chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) couplé à un détecteur par spectrométrie de masse (MS) équipé d'une source d'ionisation par electrospray en mode positif et d'un analyseur hybride alliant une trappe ionique linéaire et une Orbitrap (ThermoFisher, Courtaboeuf, France). L'éluant A est constitué d'acétate d'ammonium 20 mM pH 9 et l'éluant B est l'acétonitrile. Le débit est de 0,4 mL/min et le four est réglé à 50 °C. 2 μL de chaque d'échantillon, ou de standard, sont injectés dans le système UHPLC (Dionex Ultimate 3000, ThermoFisher, Courtaboeuf, France) équipé d'une colonne Kinetex EVO C18 100 \times 2,1 mm, 1,7 μm (Phenomenex, Le Pecq, France), équilibrée avec 75% d'éluant A. La proportion d'éluant B est portée à 95% en 2,5 minutes par un gradient concave, maintenue

pendant 0,5 minute avant de revenir aux conditions initiales. Le système est piloté par le logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) permettant également d'intégrer l'aire des signaux chromatographiques et de quantifier les composés.

3. Expériences par fluorescence avec le thiazole orange (TO)

Le test que nous avons utilisé s'inspire de la technologie « LUCS » (Light-Up Cell System) développée par la Société AOP (AntiOxydant Power) (Derick *et al.*, 2017). L'expérience est basée sur la technique de fluorescence en utilisant le thiazole orange comme une sonde intracellulaire. Les cellules neuroblastomes sontensemencées sur la plaque 96 puits (35 000 cellules par puits). La plaque est incubée pendant 24 h à 37 °C avec 5% de CO₂. Le jour suivant, le milieu est retiré et 25 µL de solution de thiazole orange à 2 µM (± S29434, 20µM) sont introduites dans chaque puits. La plaque est incubée pendant 60 min pour stabiliser la concentration de thiazole orange à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. 25 µL de différentes concentrations de ménadione sont introduites. Ensuite 50 µL du cofacteur (BNAH et UDPGA) et du thiazole orange sont ajoutés puis le volume est complété à 100 µL avec le milieu de culture sans SVF. La concentration de DMSO finale est de 4%. La fluorescence du thiazole orange est mesurée par un fluorimètre Xenius® de SAFAS (Monaco, piloté par le logiciel SP2000 version 7.4.13.0). Les analyses sont réalisées toutes les 2 minutes pendant 240 minutes aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission du thiazole orange (excitation : 505 nm / émission : 535 nm) bande passante 10 nm avec filtrage complet.

4. Expériences de viabilité cellulaire

Après l'incubation des cellules en plaque 96 puits comme décrit dans le paragraphe précédent le surnageant est retiré et remplacé par 50 µL de bromure de tétrazolium (MTT) à 0,5 mg/mL. Après 120 min d'incubation, la solution de Triton X-100 est ajoutée pour lyser les cellules et libérer les cristaux de formazan. Ces cristaux sont ensuite solubilisés dans le DMSO. L'absorbance de chaque puits est ensuite mesurée à 570 nm (BioTek, Winooski, Vermont, Etats-Unis).

Bibliographie

Bibliographie

- **AbuKhader, M.**, Heap, J., De Matteis, C., Kellam, B., Doughty, S. W., Minton, N. et Paoli, M. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2005**, 48 (24), 7714-7719. Binding of the Anticancer Prodrug CB1954 to the Activating Enzyme NQO2 Revealed by the Crystal Structure of Their Complex. DOI: 10.1021/jm050730n
- **Alam, Z. I.**, Jenner, A., Daniel, S. E., Lees, A. J., Cairns, N., Marsden, C. D., Halliwell, B. *Journal of Neurochemistry*. **1997**, 69 (3), 1196-1203. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69031196.x
- **Alzheimer's Association.** *Alzheimer's & Dementia*. **2016**, 12 (4), 459-509. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. <https://DOI.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001>
- **Andersen, J. K.** *Nature Medicine*. **2004**, 10, 18-25. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. DOI: 10.1038/nrn1434
- **Antoine, M.**, Marcheteau, E., Delagrangé, P., Ferry, G. et Boutin, J. A. *International Journal of Mass Spectrometry*. **2012**, 312, 87-96. Characterization of cofactors, substrates and inhibitor binding to flavoenzyme quinone reductase 2 by automated supramolecular nano-electrospray ionization mass spectrometry. DOI: 10.1016/j.ijms.2011.07.011
- **Anzenbacher, P. et Anzenbacherová, E.** *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **2001**, 58 (5-6), 737-747. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. DOI: 10.1007/PL00000897
- **Appleby, B. S. et Cummings, J. L.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2013**, 13 (18), 2306-2327. Discovering new treatments for Alzheimer's disease by repurposing approved medications. DOI: 10.2174/15680266113136660162
- **Arriagada, C.**, Paris, I., Sanchez de las Matas, M. J., Martinez-Alvarado, P., Cardenas, S., Castañeda, P., Segura-Aguilar, *Neurobiology of Disease*, **2004**, 16 (2), 468-477. On the neurotoxicity mechanism of leukoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation. DOI: 10.1016/j.nbd.2004.03.014
- **Audi, S. H.**, Bongard, R. D., Dawson, C. A., Siegel, D., Roerig, D. L. et Merker, M. P. *American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology*, **2003**, 285 (5), L1116-1131. Duroquinone reduction during passage through the pulmonary circulation. DOI: 10.1152/ajplung.00185.2003
- **Baez, S.**, Segura-Aguilar, J., Widersten, M., Johansson, A. S. et Mannervik, B. *The Biochemical Journal*, **1997**, 324, 25-28. Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. DOI: 10.1042/bj3240025
- **Bandmann, O.**, Sweeney, M. G., Daniel, S. E., Marsden, C. D. et Wood, N. W. *Journal of Neurology*, **1997**, 244 (4), 262-265. Mitochondrial DNA polymorphisms in pathologically proven Parkinson's disease. DOI: 10.1007/s004150050082
- **Barnham, K. J.**, Masters, C. L. et Bush, A. I. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2004**, 3 (3), 205. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. DOI: 10.1038/nrd1330
- **Baum, C. L.**, Selhub, J. et Rosenberg, I. H. *Biochemical Journal*, **1982**, 204 (1), 203-207. The hydrolysis of nicotinamide adenine nucleotide by brush border membranes of rat intestine. DOI: 10.1042/bj2040203

- **Benoit, C. E.**, Bastianetto, S., Brouillette, J., Tse, Y., Boutin, J. A., Delagrangé, P. Wong T, Sarret P, Quirion R. *Journal of Neuroscience*, **2010**, 30 (38), 12690-12700. Loss of Quinone Reductase 2 Function Selectively Facilitates Learning Behaviors. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2808-10.2010
- **Bianchet, M. A.**, Erdemli, S. B. et Amzel, L. M. *Vitamins and Hormones*, **2008**, 78,63-84. Academic Press. Structure, function, and mechanism of cytosolic quinone reductases. DOI: 10.1016/S0083-6729(07)00004-0
- **Bianchet, M. A.**, Faig, M. et Amzel, L. M. *Methods in Enzymology*, **2004**, 382, 144-174. Structure and mechanism of NAD[P]H:quinone acceptor oxidoreductases (NQO). DOI: 10.1016/S0076-6879(04)82009-3
- **Blesa, J.**, Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A. et Jackson-Lewis, V. R. *Frontiers in Neuroanatomy*, **2015**, 9, 91. Oxidative stress and Parkinson's disease. DOI: 10.3389/fnana.2015.00091
- **Blum, D.**, Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A. L., Sadoul, R. et Verna, J. M. *Progress in Neurobiology*, **2001**, 65 (2), 135-172. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. DOI: 10.1016/S0301-0082(01)00003-x
- **Blum, D.**, Torch, S., Nissou, M.F., Benabid, A. L. et Verna, J. M. *Neuroscience Letters*, **2000**, 283 (3), 193-196. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. DOI: 10.1016/S0304-3940(00)00948-4
- **Boutin JA**, Bouillaud F., Janda E., Gacsalyi I., Guillaumet G., Hirsch E. C., Kane D. A., Nepveu F., Reybier K., Dupuis P., Bertrand M., Chhour M., Le Diguarher T., Antoine M., Brebner K., Da Costa H., Ducrot P., Giganti A., Goswami V., Guedouari H., Michel P. P., Patel A., Paysant J., Stojko J., Viaud-Massuard M. C., Ferry G. *Molecular Pharmacology*, **2019**, 95 (3), 269-285. S29434, a Quinone Reductase 2 Inhibitor: Main Biochemical and Cellular Characterization. DOI: 10.1124/mol.118.114231
- **Boutin, J. A.**, Chatelain-Egger, F., Vella, F., Delagrangé, P. et Ferry, G. *Chemico-Biological Interactions*, **2005**, 151 (3), 213-228. Quinone reductase 2 substrate specificity and inhibition pharmacology. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.01.002
- **Boutin, J. A.**, Meunier, F., Lambert, P. H., Hennig, P., Bertin, D., Serkiz, B. et Volland, J. P. *Drug Metabolism and Disposition*, 1993, 21 (6), 1157-1166. In vivo and in vitro glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats.
- **Brown, W. H.**, Iverson, B. L., Anslyn, E. et Foote, C. S. *Organic Chemistry*, 8^{ème} édition, USA, Cengage Learning, 2017, 1312p. ISBN:978-1305580350
- **Brunmark, A. et Cadenas, E.** *Free Radical Biology and Medicine*, **1989**, 7 (4), 435-477. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. DOI: 10.1016/0891-5849(89)90126-3
- **Bubber, P.**, Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P. et Gibson, G. E. *Annals of Neurology*, **2005**, 57 (5), 695-703. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. DOI: 10.1002/ana.20474
- **Buryanovskyy, L.**, Fu, Y., Boyd, M., Ma, Y., Hsieh, T., Wu, J. M. et Zhang, Z. *Biochemistry*, **2004**, 43 (36), 11417-11426. Crystal Structure of Quinone Reductase 2 in Complex with Resveratrol. DOI: 10.1021/bi049162o
- **Calamini, B.**, Santarsiero, B. D., Boutin, J. A. et Mesecar, A. D. *The Biochemical Journal*, **2008**, 413 (1), 81-91. Kinetic, thermodynamic and X-ray structural insights into the interaction of melatonin and analogues with quinone reductase 2. DOI: 10.1042/BJ20071373

- **Cassagnes, L. E.**, Perio, P., Ferry, G., Moulharat, N., Antoine, M., Gayon, R., Boutin, J. A., Nepveu F., Reybier, K. *Free Radical Biology and Medicine*, **2015**, 89, 126-134. In cellulo monitoring of quinone reductase activity and reactive oxygen species production during the redox cycling of 1,2 and 1,4 quinones. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.150
- **Cassagnes, L. E.**, Rakotoarivelo, N., Sirigu, S., Pério, P., Najahi, E., Chavas, L. M., Thomson A., Gayon R., Ferry G., Boutin J. A., Valentin A., Reybier K., Nepveu, F. *Molecules*, **2017**, 22 (2), 210. Role of Quinone Reductase 2 in the Antimalarial Properties of Indolone-Type Derivatives. DOI: 10.3390/molecules22020210
- **Cenini, G.**, Lloret, A. et Cascella, R. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2105607, 18p. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. DOI: 10.1155/2019/2105607
- **Chen, S.**, Wu, K. et Knox, R. *Free Radical Biology and Medicine*, **2000**, 29 (3), 276-284. Structure-function studies of DT-diaphorase (NQO1) and NRH:quinone oxidoreductase (NQO2). DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00308-7
- **Choi, Y.**, Jermihov, K., Nam, S. J., Sturdy, M., Maloney, K., Qiu, X., van Breemen, R. R. *Analytical chemistry*, **2011**, 83 (3), 1048-1052. Screening natural products for inhibitors of quinone reductase-2 using ultrafiltration LC-MS. DOI: 10.1021/ac1028424
- **Chomarat, P.**, Cogé, F., Guénin, S. P., Mailliet, F., Vella, F., Mallet, C., Boutin, J. A. *Biochimie*, **2007**, 89 (10), 1264-1275. Cellular knock-down of quinone reductase 2: A laborious road to successful inhibition by RNA interference. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.07.004
- **Chowdhry S.**, Zanca C., Rajkumar U., Koga T., Diao Y., Raviram R., Liu F., Turner K., Yang H., Brunk E., Bi J., Furnari F., Bafna V., Ren B., Mischel PS. *Nature*, **2019**, 569 (7757), 570-575. NAD metabolic dependency in cancer is shaped by gene amplification and enhancer remodelling. DOI: 10.1038/s41586-019-1150-2
- **Cole, G. M. N.** *Neurone*, **2003**, 37 (6), 889-890. Ironic fate: can a banned drug control metal heavies in neurodegenerative diseases?. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00160-0
- **d'Ischia, M. et Costantini, C.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1995**, 3 (7), 923-927. Nitric oxide-induced nitration of catecholamine neurotransmitters: A key to neuronal degeneration? DOI: 10.1016/0968-0896(95)00083-S
- **Dagnino-Subiabre, A.**, Cassels, B. K., Baez, S., Johansson, A. S., Mannervik, B. et Segura-Aguilar, J. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2000**, 274 (1), 32-36. Glutathione transferase M2-2 catalyzes conjugation of dopamine and dopa o-quinones. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3087
- **Daveu, C.**, Servy, C., Dendane, M., Marin, P. et Ducrocq, C. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **1997**, 1 (3), 234-243. Oxidation and nitration of catecholamines by nitrogen oxides derived from nitric oxide. DOI: 10.1006/niox.1997.0123
- **David D. C.**, Hauptmann S., Scherping I., Schuessel K., Keil U., Rizzu P., Ravid R., Dröse S., Brandt U., Müller W. E., Eckert A., Götz J. *The Journal of Biological Chemistry*, **2005**, 280 (25), 23802-23814. Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. DOI: 10.1074/jbc.M500356200
- **De la Bretèche, M. L.**, Servy, C., Lenfant, M. et Ducrocq, C. *Tetrahedron Letters*, **1994**, 35 (39), 7231-7232. Nitration of catecholamines with nitrogen oxides in mild conditions: a hypothesis for the reactivity of NO in physiological systems. DOI: 10.1016/0040-4039(94)85368-1

- **Derick, S.**, Gironde, C., Perio, P., Reybier, K., Nepveu, F., Jauneau, A. et Furger, C. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1), 18069. LUCS (Light-Up Cell System), a universal high throughput assay for homeostasis evaluation in live cells. DOI: 10.1038/s41598-017-18211-2
- **Dexter, D. T.**, Wells, F. R., Lees, A. J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P. et Marsden, C. D. *Journal of Neurochemistry*, 1989, 52 (6), 1830-1836. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb07264.x
- **Díaz-Véliz, G.**, Mora, S., Dossi, M. T., Gómez, P., Arriagada, C., Montiel, J., Segura-Aguilar, J. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 2002, 73 (4), 843-850. Behavioral effects of aminochrome and dopachrome injected in the rat substantia nigra. DOI: 10.1016/s0091-3057(02)00923-1
- **Dikalov S.**, Griendling Kathy K. et Harrison David G. *Hypertension*, 2007, 49 (4), 717-727. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. DOI: 10.1161/01.HYP.0000258594.87211.6b
- **Ding, Y. M.**, Jaumotte, J. D., Signore, A. P. et Zigmond, M. J. *Journal of Neurochemistry*, 2004, 89 (3), 776-787. Effects of 6-hydroxydopamine on primary cultures of substantia nigra: specific damage to dopamine neurons and the impact of glial cell line-derived neurotrophic factor. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02415.x
- **Dinkova-Kostova, A. T. et Talalay, P.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 501 (1), 116-123. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. DOI: 10.1016/j.abb.2010.03.019
- **Dufour M.**, Yan C., Siegel D., Colucci M. A., Jenner M., Oldham N. J., Gomez J., Reigan P., Li Y., De Matteis C. I., Ross D., Moody C. J. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 2011, 12 (8), 1203-1208. Mechanism-based inhibition of quinone reductase 2 (NQO2): selectivity for NQO2 over NQO1 and structural basis for flavoprotein inhibition. DOI: 10.1002/cbic.201100085
- **EC 1.6.5.2.** *IUBMB Enzyme Nomenclature*. Format HTML, disponible sur <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC1/6/5/2.html> , consulté le 27 mars 2019
- **EC 1.6.99.2.** *IUBMB Enzyme Nomenclature*. Format HTML, disponible sur <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC1/6/99/2.html>, consulté le 27 mars 2019
- **EC 1.10.5.1.** *IUBMB Enzyme Nomenclature*. Format HTML, disponible sur <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC1/10/5/1.html>, consulté le 27 mars 2019
- **Ernster, L.**, Danielson, L. et Ljunggren, M. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1962, 58 (2), 171-188. Dt diaphorase I. Purification from the soluble fraction of rat-liver cytoplasm, and properties. DOI: 10.1016/0006-3002(62)90997-6
- **Ernster, L.** et Navazio, F. *Acta Chemica Scandinavica*, 1958, 12 (3), 595-602. Soluble diaphorase in animal tissues. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.12-0595
- **Fahn, S. et Cohen, G.** *Annals of Neurology*, 1992, 32 (6), 804-812. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. DOI: 10.1002/ana.410320616
- **Faig, M.**, Bianchet, M. A., Talalay, P., Chen, S., Winski, S., Ross, D. et Amzel, L. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 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. DOI: 10.1073/pnas.97.7.3177
- **Ferry G.**, Hecht S., Berger S., Moulharat N., Coge F., Guillaumet G., Leclerc V., Yous S., Delagrance P., Boutin J. A. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 186 (2), 103-109. Old and new inhibitors of quinone reductase 2. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.04.006

- **Filloux, F. et Townsend, J. J.** *Experimental Neurology*, 1993, 119 (1), 79-88. Pre- and postsynaptic neurotoxic effects of dopamine demonstrated by intrastriatal injection. DOI: 10.1006/exnr.1993.1008
- **Formentini, L., Moroni, F. et Chiarugi, A.** *Biochemical Pharmacology*, **2009**, 77 (10), 1612-1620. Detection and pharmacological modulation of nicotinamide mononucleotide (NMN) in vitro and in vivo., DOI: 10.1016/j.bcp.2009.02.017
- **Foster, C. E., Bianchet, M. A., Talalay, P., Faig, M. et Amzel, L. M.** *Free Radical Biology and Medicine*, **2000**, 29 (3), 241-245. Structures of mammalian cytosolic quinone reductases. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00299-9
- **Foster, C. E., Bianchet, M. A., Talalay, P., Zhao, Q. et Amzel, L. M.** *Biochemistry*, **1999**, 38 (31), 9881-9886. Crystal Structure of Human Quinone Reductase Type 2, a Metalloflavoprotein. DOI: 10.1021/bi990799v
- **Franco-Iborra, S., Vila, M. et Perier, C.** *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, **2016**, 22 (3), 266-277. The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis: Where Are We at?. DOI: 10.1177/1073858415574600
- **Fu, Y., Buryanovskyy, L. et Zhang, Z.** *Journal of Biological Chemistry*, **2008**, 283 (35), 23829-23835. Quinone Reductase 2 Is a Catechol Quinone Reductase. DOI: 10.1074/jbc.M801371200
- **Gaikwad, N. W., Yang, L., Rogan, E. G. et Cavalieri, E. L.** *Free Radical Biology and Medicine*, **2009**, 46 (2), 253-262. Evidence for NQO2-mediated reduction of the carcinogenic estrogen ortho-quinones. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.029
- **Gandhi, S. et Abramov, A. Y.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2012**, 428010, Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. DOI: 10.1155/2012/428010
- **Graham, D. G., Tiffany, S. M., Bell, W. R. et Gutknecht, W. F.** *Molecular Pharmacology*, **1978**, 14 (4), 644-653. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro.
- **Graumann, R., Paris, I., Martinez-Alvarado, P., Rumanque, P., Perez-Pastene, C., Cardenas, S. P., ... Segura-Aguilar, J.** *Polish Journal of Pharmacology*, **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.
- **Hall, E. D., Detloff, M. R., Johnson, K. et Kupina, N. C.** *Journal of Neurotrauma*, **2004**, 21 (1), 9-20. Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. DOI: 10.1089/089771504772695904
- **Halverson, R. A., Lewis, J., Frausto, S., Hutton, M. et Muma, N. A.** *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **2005**, 25 (5), 1226-1233 Tau protein is cross-linked by transglutaminase in P301L tau transgenic mice. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3263-04.2005
- **Hashimoto, T. et Nakai, M.** *Neuroscience Letters*, **2011**, 502 (1), 10-12. Increased hippocampal quinone reductase 2 in Alzheimer's disease. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.07.008
- **Hastings, T. G., Lewis, D. A. et Zigmond, M. J.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1996**, 93 (5), 1956-1961. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. DOI: 10.1073/pnas.93.5.1956
- **Hauser, D. N. et Hastings, T. G.** *Neurobiology of Disease*, **2013**, 51, 35-42. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. DOI: 10.1016/j.nbd.2012.10.011

- **He, L.,** He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T. et Ma, X. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **2017**, 44 (2), 532-553. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. DOI: 10.1159/000485089
- **Ito, E.,** Oka, K., Etcheberrigaray, R., Nelson, T. J., McPhie, D. L., Tofel-Grehl, B., Gibson G. E., Alkon, D. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1994**, 91 (2), 534-538. Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. DOI: 10.1073/pnas.91.2.534
- **Iyanagi, T. et Yamazaki, I.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **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). DOI: 10.1016/0005-2728(70)90220-3
- **Jaiswal, A. K.** *Journal of Biological Chemistry*, **1994**, 269 (20), 14502-14508. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase2. Gene structure, activity, and tissue-specific expression.
- **Jaiswal, A. K.,** Bell, D. W., Radjendirane, V. et Testa, J. R. *Pharmacogenetics*, **1999**, 9 (3), 413-418. Localization of human NQO1 gene to chromosome 16q22 and NQO2-6p25 and associated polymorphisms. DOI: 10.1097/00008571-199906000-00020
- **Jamieson, D.,** Tung, A. T. Y., Knox, R. J. et Boddy, A. V. *British Journal of Cancer*, **2006**, 95 (9), 1229-1233. Reduction of mitomycin C is catalysed by human recombinant NRH:quinone oxidoreductase 2 using reduced nicotinamide adenine dinucleotide as an electron donating co-factor.. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603414
- **Jeftić, L. et Manning, G.** *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **1970**, 26 (2), 195-200. A survey on the electrochemical reduction of quinones. DOI: 10.1016/S0022-0728(70)80303-5
- **Jenner, P. et Olanow, C. W.** *Neurology*, **1996**, 47 (6 Suppl 3), S161-170. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. DOI: 10.1212/wnl.47.6_suppl_3.161s
- **Kalyanaraman, B.,** Premovic, P. I. et Sealy, R. C. *Journal of Biological Chemistry*, **1987**, 262 (23), 11080-11087. Semiquinone anion radicals from addition of amino acids, peptides, and proteins to quinones derived from oxidation of catechols and catecholamines. An ESR spin stabilization study.
- **Kappus, H. et Sies, H.** *Experientia*, **1981**, 37 (12), 1233-1241. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. DOI: 10.1007/BF01948335
- **Kaur, D.,** Yantiri, F., Rajagopalan, S., Kumar, J., Mo, J. Q., Boonplueang, R., Andersen, J. K. *Neuron*, **2003**, 37 (6), 899-909. Genetic or Pharmacological Iron Chelation Prevents MPTP-Induced Neurotoxicity In Vivo: A Novel Therapy for Parkinson's Disease. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00126-0
- **Knox, R. J.,** Jenkins, T. C., Hobbs, S. M., Chen, S., Melton, R. G. et Burke, P. J. *Cancer Research*, **2000**, 60 (15), 4179-4186. Bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by human NAD(P)H quinone oxidoreductase 2: a novel co-substrate-mediated antitumor prodrug therapy.
- **Kovalchuk, A.,** Rodriguez-Juarez, R., Ilnytsky, Y., Byeon, B., Shpyleva, S., Melnyk, S., Kovalchuk, O. *Aging Albany NY*, **2016**, 8 (4), 697-708. Sex-specific effects of cytotoxic chemotherapy agents cyclophosphamide and mitomycin C on gene expression, oxidative DNA damage, and epigenetic alterations in the prefrontal cortex and hippocampus – an aging connection. DOI: 10.18632/aging.100920

- **Kovalevich, J. et Langford, D.** *Methods in molecular biology*, **2013**, 1078, 9-21. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. DOI: 10.1007/978-1-62703-640-5_2
- **Krämer, S. D. et Testa, B.** *Chemistry & Biodiversity*, **2008**, 5 (12), 2465-2578. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 6. Inter-individual factors affecting drug metabolism. DOI: 10.1002/cbdv.200890214
- **Krämer, S. D. et Testa, B.** *Chemistry & Biodiversity*, **2009**, 6 (10), 1477-1660. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 7. Intra-individual factors affecting drug metabolism. DOI: 10.1002/cbdv.200900233
- **Kwiek, J. J.,** Haystead, T. A. J. et Rudolph, J. *Biochemistry*, **2004**, 43 (15), 4538-4547. Kinetic mechanism of quinone oxidoreductase 2 and its inhibition by the antimalarial quinolines. DOI: 10.1021/bi035923w
- **Les F.,** Deleruyelle S., Cassagnes L. E., Boutin J. A., Balogh B., Arbones-Mainar J. M., Biron S., Marceau P., Richard D., Nepveu F., Mauriège P., Carpéné C. *Chemico-Biological Interactions*, **2016**, 258, 115-125. Piceatannol and resveratrol share inhibitory effects on hydrogen peroxide release, monoamine oxidase and lipogenic activities in adipose tissue, but differ in their antilipolytic properties. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.07.014
- **Levsen, K.,** Schiebel, H.-M., Behnke, B., Dötzer, R., Dreher, W., Elend, M. et Thiele, H. *Journal of Chromatography. A*, **2005**, 1067 (1-2), 55-72. Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.165
- **Lewén, A.,** Matz, P. et Chan, P. H. *Journal of Neurotrauma*, **2000**, 17 (17), 871-890. Free radical pathways in CNS injury. DOI: 10.1089/neu.2000.17.871
- **Liao, S.** et Williams-Ashman, H. G. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1961**, 4 (3), 208-213. Enzymatic oxidation of some non-phosphorylated derivatives of dihydronicotinamide. DOI: 10.1016/0006-291X(61)90272-8
- **Lin, M. T. et Beal, M. F.** *Nature*, **2006**, 443 (7113), 787. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. DOI: 10.1038/nature05292
- **Long, D. J.,** Iskander, K., Gaikwad, A., Arin, M., Roop, D. R., Knox, R., Barrios R., Jaiswal, A. K. *Journal of Biological Chemistry*, **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. DOI: 10.1074/jbc.M208675200
- **Long, D. J. et Jaiswal, A. K.** *Chemico-Biological Interactions*, **2000**, 129 (1), 99-112. NRH:quinone oxidoreductase2 (NQO2). DOI: 10.1016/S0009-2797(00)00200-3
- **López-Alarcón, C. et Denicola, A.** *Analytica Chimica Acta*, **2013**, 763, 1-10. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.051
- **Losito, R.,** Owen, C. A. et Flock, E. V. *Biochemistry*, **1967**, 6 (1), 62-68. Metabolism of [¹⁴C]Menadione*. DOI: 10.1021/bi00853a012
- **Macarthur, H.,** Mattammal, M. B. et Westfall, T. C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1995**, 216 (2), 686-692. A New Perspective on the Inhibitory Role of Nitric Oxide in Sympathetic Neurotransmission. DOI: 10.1006/bbrc.1995.2676
- **Mailliet, F.,** Ferry, G., Vella, F., Berger, S., Cogé, F., Chomarar, P., Mallet C., Guénin S. P., Guillaumet G., Viad-Massuard M. C. Yous S., Delagrangé P., Boutin, J. A. *Biochemical Pharmacology*, **2005**, 71 (1), 74-88. Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme.. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.09.030

- **Mailliet, F.**, Ferry, G., Vella, F., Thiam, K., Delagrance, P. et Boutin, J. A. *FEBS Letters*, **2004**, 578 (1-2), 116-120. Organs from mice deleted for NRH:quinone oxidoreductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT 3. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.10.083
- **Manini, P.**, Panzella, L., Napolitano, A. et d'Ischia, M. *Tetrahedron*, **2003**, 59 (13), 2215-2221. A novel hydrogen peroxide-dependent oxidation pathway of dopamine via 6-hydroxydopamine. DOI: 10.1016/S0040-4020(03)00242-4
- **Matsuoka, Y.**, Picciano, M., La Francois, J. et Duff, K. *Neuroscience*, **2001**, 104 (3), 609-613. Fibrillar beta-amyloid evokes oxidative damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. DOI: 10.1016/S0306-4522(01)00115-4
- **Mattson, M. P.** *Nature*, **2004**, 430 (7000), 631-639. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. DOI: 10.1038/nature02621
- **Mayer, B. et Hemmens, B.** *Trends in Biochemical Sciences*, **1997**, 22 (12), 477-481. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. DOI: 10.1016/S0968-0004(97)01147-X
- **Michaelis, S.**, Marais, A., Schrey, A. K., Graebner, O. Y., Schaudt, C., Sefkow, M., Kroll F., Dreger M. Glinski M., Koester H., Metternich R., Fischer, J. J. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 55 (8), 3934-3944. Dabigatran and Dabigatran Ethyl Ester: Potent Inhibitors of Ribosylidihyronicotinamide Dehydrogenase (NQO2). DOI: 10.1021/jm3001339
- **Miettinen, T. P. et Björklund, M.** *Molecular Pharmaceutics*, **2014**, 11 (12), 4395-4404. NQO2 Is a Reactive Oxygen Species Generating Off-Target for Acetaminophen. DOI: 10.1021/mp5004866
- **Mohana, K. et Achary, A.** *Drug Metabolism Reviews*, **2017**, 49 (3), 318-337. Human cytosolic glutathione-S-transferases: quantitative analysis of expression, comparative analysis of structures and inhibition strategies of isozymes involved in drug resistance. DOI: 10.1080/03602532.2017.1343343
- **Monks, T. J.**, Hanzlik, R. P., Cohen, G. M., Ross, D. et Graham, D. G. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **1992**, 112 (1), 2-16. Quinone chemistry and toxicity. DOI: 10.1016/0041-008X(92)90273-U
- **Monks, T. J. et Jones, D. C.** *Current Drug Metabolism*, **2002**, 3 (4), 425-438. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. DOI: 10.2174/1389200023337388
- **Moon, H. E. et Paek, S. H.** *Experimental Neurobiology*, **2015**, 24 (2), 103-116. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. DOI: 10.5607/en.2015.24.2.103
- **Mor, D. E.**, Daniels, M. J. et Ischiropoulos, H. *Movement Disorders*, **2019**, 34 (2), 167-179. (2019). The usual suspects, dopamine and alpha-synuclein, conspire to cause neurodegeneration. DOI: 10.1002/mds.27607
- **Nakai, R.**, Fukuda, S., Kawase, M., Yamashita, Y. et Ashida, H. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **2018**, 82 (4), 616-628. Curcumin and its derivatives inhibit 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin-induced expression of drug metabolizing enzymes through aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway. DOI: 10.1080/09168451.2017.1386086
- **Napolitano, A.**, Crescenzi, O., Pezzella, A. et Prota, G. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1995**, 38 (6), 917-922. Generation of the Neurotoxin 6-Hydroxydopamine by Peroxidase/H₂O₂ Oxidation of Dopamine. DOI: 10.1021/jm00006a010
- **Napolitano, A.**, Manini, P. et d'Ischia, M. *Current Medicinal Chemistry*, **2011**, 18 (12), 1832-1845. Oxidation chemistry of catecholamines and neuronal degeneration: an update. DOI: 10.2174/092986711795496863

- **Napolitano, A.**, Pezzella, A. et Prota, G. *Tetrahedron Letters*, **1999a**, 40 (14), 2833-2836. 6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline formation by iron mediated dopamine oxidation: a novel route to endogenous neurotoxins under oxidative stress conditions. DOI: 10.1016/S0040-4039(99)00272-5
- **Napolitano, A.**, Pezzella, A. et Prota, G. *Chemical Research in Toxicology*, **1999b**, 12 (11), 1090-1097. New Reaction Pathways of Dopamine under Oxidative Stress Conditions: Nonenzymatic Iron-Assisted Conversion to Norepinephrine and the Neurotoxins 6-Hydroxydopamine and 6,7-Dihydroxytetrahydroisoquinoline. DOI: 10.1021/tx990079p
- **Nishiyama, T.**, Izawa, T., Usami, M., Ohnuma, T., Ogura, K. et Hiratsuka, A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2010**, 394 (3), 459-463. Cooperation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and UDP-glucuronosyltransferases reduces menadione cytotoxicity in HEK293 cells. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.113
- **Nishiyama, T.**, Kobori, T., Arai, K., Ogura, K., Ohnuma, T., Ishii, K., Hayashi K., Hiratsuka, A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2006**, 454 (1), 72-79. Identification of human UDP-glucuronosyltransferase isoform(s) responsible for the C-glucuronidation of phenylbutazone. DOI: 10.1016/j.abb.2006.07.010
- **Nishiyama, T.**, Ohnuma, T., Inoue, Y., Kishi, T., Ogura, K. et Hiratsuka, A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2008**, 371 (2), 247-250. UDP-glucuronosyltransferases 1A6 and 1A10 catalyze reduced menadione glucuronidation. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.04.040
- **Nobili, A.**, Latagliata, E. C., Viscomi, M. T., Cavallucci, V., Cutuli, D., Giacobozzo, G., D'Amelio, M. *Nature Communications*, **2017**, 8, 14727. Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. DOI: 10.1038/ncomms14727
- **Nolan, K. A.**, Dunstan, M. S., Caraher, M. C., Scott, K. A., Leys, D. et Stratford, I. J. *Molecular Cancer Therapeutics*, **2012**, 11 (1), 194-203. In Silico Screening Reveals Structurally Diverse, Nanomolar Inhibitors of NQO2 That Are Functionally Active in Cells and Can Modulate NF- κ B Signaling. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0543
- **Nosoh, Y.**, Kajioka, J. et Itoh, M. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1968**, 127 (1), 1-6. Effect of menadione on the electron transport pathway of yeast mitochondria. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90193-8
- **Oakley, A. E.**, Collingwood, J. F., Dobson, J., Love, G., Perrott, H. R., Edwardson, J. A., Elstner M., Morris, C. M. *Neurology*, **2007**, 68 (21), 1820-1825. Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. DOI: 10.1212/01.wnl.0000262033.01945.9a
- **Oda, S.**, Fukami, T., Yokoi, T. et Nakajima, M. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **2015**, 30 (1), 30-51. A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. DOI: 10.1016/j.dmpk.2014.12.001
- **Painting, K. et Kirsop, B.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **1990**, 6 (3), 346-347. A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. DOI: 10.1007/BF01201311
- **Palumbo, A.**, Astarita, G. et d'Ischia, M. *Biochemical Journal*, **2001**, 356, 105-110. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 6-nitrocatecholamines, putative reaction products of nitric oxide with catecholamines under oxidative stress conditions. DOI: 10.1042/0264-6021:3560105
- **Palumbo, A.**, Napolitano, A., Barone, P. et d'Ischia, M. *Chemical Research in Toxicology*, **1991**, 12 (12), 1213-1222. Nitrite- and peroxide-dependent oxidation pathways of dopamine: 6-nitrodopamine and 6-hydroxydopamine formation as potential contributory mechanisms of oxidative stress- and nitric oxide-induced neurotoxicity in neuronal degeneration. DOI: 10.1021/tx990121g

- **Palumbo, A.**, Napolitano, A. et d'Ischia, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2002**, 12 (1), 13-16. Nitrocatechols versus nitrocatecholamines as novel competitive inhibitors of neuronal nitric oxide synthase: lack of the aminoethyl side chain determines loss of tetrahydrobiopterin-antagonizing properties. DOI: 10.1016/s0960-894x(01)00680-1
- **Paris, I.**, Cardenas, S., Lozano, J., Perez-Pastene, C., Graumann, R., Riveros, A., Caviedes P. Segura-Aguilar, J. *Neurotoxicity Research*, **2007**, 12 (2), 125-134. Aminochrome as a preclinical experimental model to study degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. DOI: 10.1007/BF03033921
- **Paul, C. E.**, Churakova, E., Maurits, E., Girhard, M., Urlacher, V. B. et Hollmann, F. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2014**, 22 (20), 5692-5696. In situ formation of H₂O₂ for P450 peroxxygenases. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.05.074
- **Pegan, S. D.**, Sturdy, M., Ferry, G., Delagrangre, P., Boutin, J. A. et Mesecar, A. D. *Protein Science*, **2011**, 20 (7), 1182-1195. X-ray structural studies of quinone reductase 2 nanomolar range inhibitors. DOI: 10.1002/pro.647
- **Pezzella, A.**, d'Ischia, M., Napolitano, A., Misuraca, G. et Prota, G. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1997**, 40 (14), 2211-2216. Iron-Mediated Generation of the Neurotoxin 6-Hydroxydopamine Quinone by Reaction of Fatty Acid Hydroperoxides with Dopamine: A Possible Contributory Mechanism for Neuronal Degeneration in Parkinson's Disease. DOI: 10.1021/jm970099t
- **Picone, P.**, Nuzzo, D., Caruana, L., Scafidi, V. et Di Carlo, M. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014**, 780179. Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. DOI: 10.1155/2014/780179
- **Pieper, G. M.**, Felix, C. C., Kalyanaraman, B., Turk, M. et Roza, A. M. *Free Radical Biology and Medicine*, **1995**, 19 (2), 219-225. Detection by ESR of DMPO hydroxyl adduct formation from islets of langerhans. DOI: 10.1016/0891-5849(95)00018-S
- **Poderoso, J. J.**, Carreras, M. C., Schöpfer, F., Lisdero, C. L., Riobó, N. A., Giulivi, C., Boveris A. D., Boveris A., Cadenas, E. *Free Radical Biology and Medicine*, **1999**, 26 (7), 925-935. The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00277-9
- **Powis, G.**, Svingen, B. A. et Appel, P. *Molecular Pharmacology*, **1981**, 20 (2), 387-394. Quinone-Stimulated Superoxide Formation by Subcellular Fractions, Isolated Hepatocytes, and Other Cells.
- **Rabinovic, A. D.**, Lewis, D. A. et Hastings, T. G. *Neuroscience*, **2000**, 101 (1), 67-76. Role of oxidative changes in the degeneration of dopamine terminals after injection of neurotoxic levels of dopamine. DOI: 10.1016/s0306-4522(00)00293-1
- **Radi, E.**, Formichi, P., Battisti, C. et Federico, A. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, **2014**, 42, 125-152. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. DOI: 10.3233/JAD-132738
- **Rappaport, A. N.**, Jacob, E., Sharma, V., Inberg, S., Elkobi, A., Ounallah-Saad, H., Pasmanik-Chor M., Edry E., Rosenblum, K. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **2015**, 35 (47), 15568-15581. Expression of Quinone Reductase-2 in the Cortex Is a Muscarinic Acetylcholine Receptor-Dependent Memory Consolidation Constraint. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1170-15.2015
- **Reybier, K.**, Ayala, S., Alies, B., Rodrigues, J. V., Bustos Rodriguez, S., La Penna, G., Collin F., Gomes C. M., Hureau C., Faller, P. *Angewandte Chemie International Edition*, **2016**, 55 (3), 1085-1089. Free Superoxide is an Intermediate in the Production of H₂O₂ by Copper(I)-A β Peptide and O₂. DOI: 10.1002/anie.201508597

- **Reyber, K.**, Perio, P., Ferry, G., Bouajila, J., Delagrangé, P., Boutin, J. A. et Nepveu, F. *Free Radical Research*, **2011**, 45 (10), 1184-1195. Insights into the redox cycle of human quinone reductase 2. DOI: 10.3109/10715762.2011.605788
- **Richert, D. A.** *The Journal of Biological Chemistry*, **1951**, 189 (2), 763-768. Studies on the detoxification of 2-methyl-1,4-naphthoquinone in rabbits.
- **Rosengren, E.**, Linder-Eliasson, E. et Carlsson, A. *Journal of Neural Transmission*, **1985**, 63 (3), 247-253. Detection of 5-S-cysteinyldopamine in human brain. DOI: 10.1007/BF01252029
- **Ross, D. et Siegel, D.** *Frontiers in Physiology*, **2017**, 8, 595. Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ10 Metabolism and its Potential Role as a Redox Sensitive Molecular Switch. DOI: 10.3389/fphys.2017.00595
- **Rouas, C. et Gueguen, Y.** *L'actualité de la recherche à l'IRSN*, **2011**, Le système de détoxification des xénobiotiques est-il affecté par une exposition chronique à l'uranium ?. Disponible sur : <https://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/aktis-lettre-dossiers-thematiques/envirhom/xenobiotique/Pages/xeno1.aspx>, consulté le 27 mars 2019.
- **Sabens, E. A.**, Distler, A. M. et Mieyal, J. J. *Biochemistry*, **2010**, 49 (12), 2715-2724. Levodopa deactivates enzymes that regulate thiol-disulfide homeostasis and promotes neuronal cell death: implications for therapy of Parkinson's disease. DOI: 10.1021/bi9018658
- **Sampaio, L. de F. S.**, Mesquita, F. P., de Sousa, P. R. M., Silva, J. L. et Alves, C. N. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **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. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2014.09.001
- **Samuni, A.**, Carmichael, A. J., Russo, A., Mitchell, J. B. et Riesz, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1986**, 83 (20), 7593-7597. On the spin trapping and ESR detection of oxygen-derived radicals generated inside cells. DOI: 10.1073/pnas.83.20.7593
- **Sayre, L. M.**, Smith, M. A. et Perry, G. *Current Medicinal Chemistry*, **2001**, 8 (7), 721-738. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. DOI: 10.2174/0929867013372922
- **Schapira, A. H. V.** *The Lancet. Neurology*, **2008**, 7 (1), 97-109. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70327-7
- **Schultzberg, M.**, Segura-Aguilar, J. et Lind, C. *Neuroscience*, **1988**, 27 (3), 763-776. Distribution of DT diaphorase in the rat brain: biochemical and immunohistochemical studies. DOI: 10.1016/0306-4522(88)90181-9
- **Segura-Aguilar, J.**, Baez, S., Widersten, M., Welch, C. J. et Mannervik, B. *The Journal of Biological Chemistry*, **1997**, 272 (9), 5727-5731. Human class Mu glutathione transferases, in particular isoenzyme M2-2, catalyze detoxication of the dopamine metabolite aminochrome. DOI: 10.1074/jbc.272.9.5727
- **Shaw, P. M.**, Reiss, A., Adesnik, M., Nebert, D. W., Schembri, J. et Jaiswal, A. K. *European Journal of Biochemistry*, **1991**, 195 (1), 171-176. The human dioxin-inducible NAD(P)H: quinone oxidoreductase cDNA-encoded protein expressed in COS-1 cells is identical to diaphorase 4. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb15691.x
- **Shintani, F.**, Kinoshita, T., Kanba, S., Ishikawa, T., Suzuki, E., Sasakawa, N., Kato R., Nakaki, T. *The Journal of Biological Chemistry*, **1996**, 271 (23), 13561-13565. Bioactive 6-nitronorepinephrine identified in mammalian brain. DOI: 10.1074/jbc.271.23.13561

- **Sian, J.**, Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner P., Marsden, C. D. *Annals of Neurology*, **1994**, 36 (3), 348-355. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. DOI: 10.1002/ana.410360305
- **Singh, I. N.**, Sullivan, P. G. et Hall, E. D. *Journal of Neuroscience Research*, **2007**, 85 (10), 2216-2223. Peroxynitrite-mediated oxidative damage to brain mitochondria: Protective effects of peroxynitrite scavengers. DOI: 10.1002/jnr.21360
- **Soto-Otero, R.**, Méndez-Álvarez, E., Hermida-Ameijeiras, Á., Muñoz-Patiño, A. M. et Labandeira-Garcia, J. L. *Journal of Neurochemistry*, **2000**, 74 (4), 1605-1612. Autoxidation and Neurotoxicity of 6-Hydroxydopamine in the Presence of Some Antioxidants. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741605.x
- **Stamer, K.**, Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. et Mandelkow, E. M. *The Journal of Cell Biology*, **2002**, 156 (6), 1051-1063. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. DOI: 10.1083/jcb.200108057
- **Stokes, A. H.**, **Hastings, T. G.** et **Vrana, K. E.** *Journal of Neuroscience Research*, **1999**, 55 (6), 659-665. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19990315)55:6<659::AID-JNR1>3.0.CO;2-C
- **Swerdlow, R. H.**, Parks, J. K., Miller, S. W., Tuttle, J. B., Trimmer, P. A., Sheehan, J. P., Bennet JP. Jr., Davis R. E., Parker, W. D. *Annals of Neurology*, **1996**, 40 (4), 663-671. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. DOI: 10.1002/ana.410400417
- **Taskinen, J.**, Ethell, B. T., Pihlavisto, P., Hood, A. M., Burchell, B. et Coughtrie, M. W. H. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, **2003**, 31 (9), 1187-1197. Conjugation of catechols by recombinant human sulfotransferases, UDP-glucuronosyltransferases, and soluble catechol O-methyltransferase: structure-conjugation relationships and predictive models. DOI: 10.1124/dmd.31.9.1187
- **Testa, B. et Krämer, S. D.** *Chemistry & Biodiversity*, **2006**, 3 (10), 1053-1101. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 1. Principles and overview. DOI: 10.1002/cbdv.200690111
- **Testa, B. et Krämer, S. D.** *Chemistry & Biodiversity*, **2007a**, 4 (3), 257-405. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. DOI: 10.1002/cbdv.200790032
- **Testa, B. et Krämer, S. D.** *Chemistry & Biodiversity*, **2007b**, 4 (9), 2031-2122. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 3. Reactions of hydrolysis and their enzymes. DOI: 10.1002/cbdv.200790169
- **Testa, B. et Krämer, S. D.** *Chemistry & Biodiversity*, **2008**, 5 (11), 2171-2336. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 4. reactions of conjugation and their enzymes. DOI: 10.1002/cbdv.200890199
- **The Human Protein Atlas**, Cell Atlas, NQO1, **2019a**, consulté le 27 mars 2019. disponible sur: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000181019-NQO1/cell>
- **The Human Protein Atlas**, Cell Atlas, NQO2, **2019b**, consulté le 27 mars 2019. disponible sur: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000124588-NQO2/cell>
- **Thompson, R. M.**, Gerber, N., Seibert, R. A. et Desiderio, D. M. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, **1972**, 4 (3), 543-552. Identification of 2-methyl-1,4-naphthohydroquinone monoglucuronide as a metabolite of 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione) in rat bile.

- **Tranzer, J. P. et Thoenen, H.** (1968). An electron microscopic study of selective, acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine. *Experientia*, 24 (2), 155-156. DOI: 10.1007/BF02146956
- **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.** (2014). Expression profiles of genes involved in xenobiotic metabolism and disposition in human renal tissues and renal cell models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 279 (3), 409-418. DOI: 10.1016/j.taap.2014.07.007
- **Walkinshaw, G. et Waters, C. M.** *The Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95 (6), 2458-2464. (1995). Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. DOI: 10.1172/JCI117946
- **Wang, W., Le, W.-D., Pan, T., Stringer, J. L. et Jaiswal, A. K.** *The Journals of Gerontology: Series A*, 2008, 63 (2), 127-134. (2008). Association of NRH:Quinone Oxidoreductase 2 Gene Promoter Polymorphism With Higher Gene Expression and Increased Susceptibility to Parkinson's Disease. DOI: 10.1093/gerona/63.2.127
- **Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. et Zhu, X.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **2014**, 1842 (8), 1240-1247. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.10.015
- **Wilson, I., Wardman, P., Lin, T. S. et Sartorelli, A. C.** *Journal of Medicinal Chemistry*, **1986**, 29 (8), 1381-1384. One-electron reduction of 2- and 6-methyl-1,4-naphthoquinone bioelectroactive alkylating agents. DOI: 10.1021/jm00158a010
- **Winger, J. A., Hantschel, O., Superti-Furga, G. et Kuriyan, J.** *BMC Structural Biology*, **2009**, 9 (1), 7. The structure of the leukemia drug imatinib bound to human quinone reductase 2 (NQO2). DOI: 10.1186/1472-6807-9-7
- **Wu, J., Li, Q., Wang, X., Yu, S., Li, L., Wu, X., Chen Y., Zhao J. Zhao, Y.** *PLOS ONE*, **2013**, 8 (3), e59843. Neuroprotection by Curcumin in Ischemic Brain Injury Involves the Akt/Nrf2 Pathway.,. DOI: 10.1371/journal.pone.0059843
- **Wu, K., Knox, R., Sun, X. Z., Joseph, P., Jaiswal, A. K., Zhang, D., Deng S. K. P., Chen, S.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1997**, 347 (2), 221-228. Catalytic Properties of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-2 (NQO2), a Dihyronicotinamide Riboside Dependent Oxidoreductase. DOI: 10.1006/abbi.1997.0344
- **Yan, C., Dufour, M., Siegel, D., Reigan, P., Gomez, J., Shieh, B., Moody, C. J. Ross, D.** *Biochemistry*, **2011**, 50 (31), 6678-6688. Indolequinone Inhibitors of NRH:Quinone Oxidoreductase 2. Characterization of the Mechanism of Inhibition in both Cell-Free and Cellular Systems. DOI: 10.1021/bi2002967
- **Yang, N., Sun, R., Liao, X., Aa, J. et Wang, G.** *Pharmacological Research*, **2017**, 121, 169-183. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and their related metabolic cross-talk with internal homeostasis: A systematic review of UGT isoforms for precision medicine. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.05.001
- **Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T. C., Suhara T., Trojanowski J. Q., Lee, V. M.Y.** *Neuron*, **2007**, 53 (3), 337-351. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.01.010
- **Youdim, M. B. H., Grünblatt, E., Levites, Y., Maor, G. et Mandel, S.** *Neurotoxicity Research*, **2002**, 4 (7), 679-689. Early and late molecular events in neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson's disease MPTP model as assessed by cDNA microarray; the role of iron. DOI: 10.1080/1029842021000045507

- **Youdim, M. B. H.**, Stephenson, G. et Shachar, D. B. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2004**, 1012 (1), 306-325. (2004). Ironing Iron Out in Parkinson's Disease and Other Neurodegenerative Diseases with Iron Chelators: A Lesson from 6-Hydroxydopamine and Iron Chelators, Desferal and VK-28. DOI: 10.1196/annals.1306.025
- **Zecca, L.**, Bellei, C., Costi, P., Albertini, A., Monzani, E., Casella, Gallorini M, Bergamaschi L, Moscatelli A, Turro NJ, Eisner M, Crippa PR, Ito S, Wakamatsu K, Bush WD, Ward WC, Simon JD, Zucca FA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008a**, 105 (45), 17567-17572. New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals. DOI: 10.1073/pnas.0808768105
- **Zecca, L.**, Casella, L., Albertini, A., Bellei, C., Zucca, F. A., Engelen, M., Zadlo A, Szewczyk G, Zareba M, Sarna T. *Journal of Neurochemistry*, **2008b**, 106 (4), 1866-1875. Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05541.x
- **Zecca, L.**, Zucca, F. A., Wilms, H. et Sulzer, D. *Trends in Neurosciences*, **2003**, 26 (11), 578-580. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. DOI: 10.1016/j.tins.2003.08.009
- **Zhao, H.**, Joseph, J., Fales, H. M., Sokoloski, E. A., Levine, R. L., Vasquez-Vivar, J. et Kalyanaraman, B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2005**, 102 (16), 5727-5732. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. DOI: 10.1073/pnas.0501719102
- **Zhao, Kalivendi, S.**, Zhang, H., Joseph, J., Nithipatikom, K., Vásquez-Vivar, J. et Kalyanaraman, B. *Free Radical Biology and Medicine*, **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. DOI: 10.1016/S0891-5849(03)00142-4
- **Zhao, Q.**, Yang, X. L., Holtzclaw, W. D. et Talalay, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94 (5), 1669-1674. Unexpected genetic and structural relationships of a long forgotten flavoenzyme to NAD(P)H:quinone reductase (DT-diaphorase). DOI: 10.1073/pnas.94.5.1669
- **Zhao, Y. et Zhao, B.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2013**, 316523. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. DOI: 10.1155/2013/316523
- **Zielonka, J. et Kalyanaraman, B.** *Free Radical Biology and Medicine*, **2010**, 48 (8), 983-1001. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.028
- **Zielonka, J.**, Vasquez-Vivar, J. et Kalyanaraman, B. *Nature Protocols*, **2008**, 3 (1), 8-21. Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. DOI: 10.1038/nprot.2007.473
- **Zielonka, J.**, Sikora, A., Hardy, M., Joseph, J., Dranka, B. P. et Kalyanaraman, B. *Chemical research in toxicology*, **2012**, 25 (9), 1793-1799. Boronate probes as diagnostic tools for real time monitoring of peroxynitrite and hydroperoxides. DOI: 10.1021/tx300164j

Liste de Figures

Figure 1 Comportement redox et acido-basique de la p-benzoquinone. Les chiffres verticaux correspondent aux potentiels redox et les chiffres horizontaux aux valeurs de pKa (Jefić et Manning, 1970 ; Monks et al., 1992).....	15
Figure 2. Voie de métabolisation d'une quinone (Monks et al., 1992).....	16
Figure 3. Structure de l'enzyme QR1 humaine en présence de ses deux cofacteurs FAD (Faig et al., 2000).....	18
Figure 4. Mécanisme de réduction à deux électrons d'une quinone par QR1 (Bianchet et al., 2004).....	19
Figure 5. Structure cristalline d'un monomère de QR2 en présence de deux FAD et deux atomes zinc (Cassagnes et al., 2017).....	21
Figure 6. 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 (Long et Jaiswal, 2000).....	22
Figure 7. Mécanisme supposé de la réduction par deux fois deux électrons du groupement nitro de CB1954 par la quinone-réductase 2 en présence de deux molécules de cosubstrat NRH (AbuKhader et al., 2005).....	23
Figure 8. Biotransformation de la dopamine pour former la neuromélanine.....	28
Figure 9. Formation et métabolisation de la dopamine dans la synapse (Mor et al., 2019).....	29
Figure 10. Biotransformation de la dopamine en quinone toxique (Napolitano et al., 2011).....	31
Figure 11. Biotransformation de la dopamine-o-quinone (Napolitano et al., 2011).....	33
Figure 12. Biotransformation de la noradrénaline (Napolitano et al., 2011).....	34
Figure 13. Principe de la résonance paramagnétique électronique.....	37
Figure 14. La transformation de H ₂ DCFDA en DFC (fluorescence) implique obligatoirement une enzyme estérase.....	39
Figure 15. Réactivité de HE vis à vis du radical superoxyde O ₂ ^{•-}	40
Figure 16. Formation de 2-OH-E ⁺ à partir de HE.....	40
Figure 17. Métabolisation des xénobiotiques au niveau cellulaire (Rouas et Gueguen, 2011).....	45
Figure 18. Structure des para-quinones testées.....	48
Figure 19. Activité enzymatique de la quinone-réductase 2 en présence de QR2 purifié (0,25 nM), BNAH (100 µM), ménadione (100 µM) pendant 60 min. λ _{exc/em} : 340/440 nm.....	49
Figure 20. Activité catalytique de QR2 comparée à QR1 sur différentes para-quinones testées.....	50
Figure 21. Comparaison de l'intensité des signaux RPE calculée par double intégration des signaux obtenus pour un mélange contenant : DMPO (80 mM), QR1/QR2 purifiée (15 µg.mL ⁻¹), NADH/BNAH (3 mM), ménadione/para-benzoquinone/duroquinone/coenzyme Q0/coenzyme Q2/coenzymeQ10/mitomycine C/ tétrachloro-p-benzoquinone) (100 µM)......	52
Figure 22. Structure des ortho-quinones testées.....	54
Figure 23. A Activité catalytique de QR2 comparée à QR1 sur différentes ortho-quinones testées. B Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus avec DMPO (80 mM), QR1/QR2 purifiée (15 µg.mL ⁻¹), NADH/BNAH (3 mM), adrénochrome/tétrachloro-o-benzoquinone/3,5-di-tert-butyl-benzoquinone/tanshinone I/tanshinone IIA) (100 µM)......	55
Figure 24. Structure de divers substrats testés.	57
Figure 25. A) Activités enzymatiques des substrats testés B) Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus avec DMPO (80 mM), QR1/QR2 purifiée (15 µg.mL ⁻¹), NADH/BNAH (3 mM), catéchol/d-	

dopa/dopamine/6-OH-dopamine/imatinib/CB1954/paracétamol/NAPQI/DCPIP /curcumine/bleu de méthylène/resvératrol/ picéatannol) (100 µM).....	59
Figure 26. Expression de QR2 et QR1 sur la lignée K562 (Yan et al., 2011)	64
Figure 27. Structure des composés utilisés dans cette étude	65
Figure 28. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) avec (1) ménadione (100 µM), BNAH (100 µM) ; (2) ménadione (100 µM), sans BNAH ; (3) ménadione (100 µM), BNAH (100 µM), S29434 (20 µM) ; (4) ménadione (100 µM), BNAH (100 µM), SOD (150 U/mL) ; (5) CoQ0 (100 µM, BNAH (100 µM) pour les cellules K562. ; (6) simulation du spectre (5). Gamme d'intensité ± 80000. Gain : 2.10 ⁵	68
Figure 29. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus en présence de ménadione ou de Coenzyme Q0 pour les cellules K562. *P < 0,05.....	69
Figure 30. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) avec (1) adrénochrome (100 µM), BNAH (100 µM) ; (2) adrénochrome (100 µM), sans BNAH ; (3) adrénochrome (100 µM), BNAH (100 µM), S29434 (20 µM) ; (4) adrénochrome (100 µM), BNAH (100 µM), SOD (150 U/mL) ; (5) 3,5-DTBBQ (100 µM), BNAH (100 µM) ; (6) 3,5-DTBBQ (100 µM), BNAH, S29434 (20 µM) pour les cellules K562. Gamme d'intensité ±80000. Gain : 2.10 ⁵	70
Figure 31. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus en présence d'adrénochrome et de 3,5-DTBBQ pour les cellules K562. *P < 0,05.....	71
Figure 32. Expression de hQR2 dans la lignée SH-SY5Y : sauvage (NT ou WT) et hQR2-transduite	72
Figure 33. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) avec (1) SH-SY5Y-NT + ménadione (100 µM), BNAH (100 µM) ; (2) SH-SY5Y-NT + ménadione (100 µM), BNAH (100 µM), S29434 (20 µM) ; (3) SH-SY5Y-QR2 + ménadione (100 µM), BNAH (100 µM) ; (4) SH-SY5Y-QR2 + ménadione (100 µM), BNAH (100 µM), S29434 (20 µM). Gamme d'intensité ± 25000. Gain : 2.10 ⁵	74
Figure 34. Spectres RPE simulés des adduits DMPO/*OOH (a _N = 14,2 G, a _H ^β = 11,4 G, a _H ^{γ1} = 1,2 G), DMPO/*OH (a _N = a _H = 14,9 G), DMPO/*CH ₃ (a _N = 16,4 G, a _H ^β = 23,3 G)	75
Figure 35. Spectres RPE obtenus en présence du DMPO (50 mM) avec (1) SH-SY5Y-hQR2+ ménadione (100 µM), BNAH (100 µM) ; (2) SH-SY5Y-hQR2 + ménadione (100 µM), BNAH (100 µM), SOD (150 U/mL) ; (3) SH-SY5Y-hQR2 + ménadione (100 µM), BNAH (100 µM), SOD (150 U/mL), Catalase (1800 U/mL) ; (4) SH-SY5Y-hQR2 + ménadione (100 µM), BNAH (100 µM), catalase (1800 U/mL). Gamme d'intensité ± 25000. Gain : 2.10 ⁵	76
Figure 36. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus en présence de ménadione (100 µM), avec ou sans BNAH (100 µM) avec ou sans pré-incubation pendant 30 min avec S29434 (20 µM) pour les cellules SH-SY5Y. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001	77
Figure 37. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) avec (1) SH-SY5Y-NT + adrénochrome (100 µM), BNAH (100 µM) ; (2) SH-SY5Y-NT + adrénochrome (100 µM), BNAH (100 µM), S29434 (20 µM) ; (3) SH-SY5Y-QR2 + adrénochrome (100 µM), BNAH (100 µM) ; (4) SH-SY5Y-QR2 + adrénochrome (100 µM), BNAH (100 µM), S29434 (20 µM). Gamme d'intensité ± 25000. Gain : 2.10 ⁵	79
Figure 38. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus en présence d'adrénochrome (100 µM), avec ou sans BNAH (100 µM) avec ou sans pré-incubation pendant 30 min avec S29434 (20 µM) pour les cellules SH-SY5Y. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001	80
Figure 39. Expression de hQR2 dans les neurones primaires : sauvage (C3H), sans QR2(C3H QR2 ^{-/-}) et transduite hQR2(hQR2-transduite).....	81

Figure 40. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM) avec (1) C3HQR2 ^{-/-} -QR2 + Ménadione (100 μM), BNAH (100 μM) ; (2) C3HQR2 ^{-/-} -QR2 + Ménadione (100 μM), BNAH (100 μM), S29434 (20 μM) ; (3) C3HQR2 ^{-/-} -QR2 + Adrénochrome (100 μM), BNAH (100 μM) ; (4) C3HQR2 ^{-/-} -QR2 + Adrénochrome (100 μM), BNAH (100 μM), S29434 (20 μM). Gamme d'intensité ± 25000. Gain : 2.10 ⁵	82
Figure 41. Production de ROS mesurée par RPE après l'incubation 5 ×10 ⁶ neurones avec DMPO (50 mM), BNAH (100 μM), et ménadione ou adrénochrome (100 μM). Les neurones proviennent de cerveaux d'embryons de souris : sauvage (C3H NT), sans QR2 (C3H QR2 ^{-/-}), avec hQR2(C3H QR2 ^{-/-} -hQR2). Certains neurones ont été pré-incubés pendant 30 minutes avec l'inhibiteur spécifique de QR2 S29434 (20 μM). Les résultats sont l'intensité moyenne du signal de la production de ROS, et les barres d'erreur indiquent l'erreur-type de la moyenne (MEB). Les valeurs ont été analysées par Test de Student (t) (non significative p > 0,05, * p < 0,05, ** p < 0,01).....	83
Figure 42. Résumé des voies de détoxification et de toxicité des quinones	89
Figure 43. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM), ménadione (100 μM), BNAH (100 μM) avec des cellules de lignée (1) SH-SY5Y-WT, (2) SH-SY5Y-QR2, (3) SH-SY5Y-QR2-UGT1A6. Gamme d'intensité ± 25000. Gain : 2.10 ⁵	91
Figure 44. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres déterminée par double intégration des signaux RPE obtenus avec les lignées cellulaires SH-SY5Y-WT, SH-SY5Y-QR2, SH-SY5Y+QR2-UGT1A6 après 2 minutes d'incubation avec la ménadione (100 μM), BNAH (100 μM), UDPGA (2 mM), DMPO (50 mM) avec ou sans pré-incubation avec S29434 (20 μM).	92
Figure 45. Spectres RPE obtenus en présence de DMPO (50 mM), ménadione (100 μM), BNAH (100 μM) avec des homogénats de lignée 1) SH-SY5Y-WT, 2) SH-SY5Y-QR2, 3) SH-SY5Y-QR2-UGT1A6. Gamme d'intensité ± 50000. Gain : 2.10 ⁵	93
Figure 46. Comparaison de l'intensité des signaux RPE traduisant la production des radicaux libres calculée par double intégration des signaux RPE obtenus avec l'homogénat des lignées cellulaires SH-SY5Y-WT, SH-SY5Y-QR2, SH-SY5Y+QR2-UGT1A6 après 2 minutes d'incubation avec la ménadione (100 μM), BNAH (100 μM), UDPGA (2 mM), DMPO (50 mM) avec ou sans pré-incubation avec S29434 (20 μM).	94
Figure 47. Droite d'étalonnage obtenue à partir du standard de 2-OH-E ⁺ (10 – 1000 nM)	95
Figure 48. Chromatogramme obtenu par l'incubation des cellules avec DHE. Le signal détecté à m/z = 330 correspond à 2-OH-E ⁺ formé après la réaction de DHE avec le radical superoxyde.....	96
Figure 49. Comparaison de la production du radical superoxyde intracellulaire sur les lignées a. SH-SY5Y-WT, b. SH-SY5Y-QR2, c. SH-SY5Y-QR2-UGT après 30 min d'incubation avec la (M)énadione (25 μM), (B)NAH (25 μM), (U)DPGA (2 mM) avec ou sans pré-incubation avec (S)29434 (20 μM).....	96
Figure 50. Structure chimique de la ménadione et du ménadiol-glucuronide.....	98
Figure 51. a) Chromatogrammes avec extraction des masses d'intérêt et b) spectre LC-MS obtenus pour un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après 3 h d'incubation avec la ménadione (100 μM), le BNAH (4 mM) et UDPGA (2 mM).	99
Figure 52. Voie de fragmentation caractéristique du glucuronide d'après Levsen et al. (Levsen et al., 2005).....	100
Figure 53. a) Chromatogramme obtenu d'un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec la ménadione (100 μM), BNAH (4 mM), UDPGA (2 mM). b) fragmentation des ions m/z = 349 obtenu à t _R = 2,23 par MS/MS haute résolution.	100
Figure 54. Contrôle négatif 1 : sans ménadione a) chromatogrammes avec extraction des masses d'intérêt et b) spectre LC-MS obtenu d'un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec BNAH (4 mM), UDPGA (2 mM).....	101

Figure 55. Contrôle négatif 2 : sans UDPGA a) Chromatogrammes avec extraction des masses d'intérêt et b) spectre LC-MS obtenu d'un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec la ménadione (100 µM), BNAH (4 mM).	102
Figure 56. Contrôle négatif 3 : sans BNAH a) chromatogrammes avec extraction des masses d'intérêt et b) spectre LC-MS obtenu d'un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec la ménadione (100 µM), UDPGA (2 mM).	102
Figure 57. a) Chromatogrammes avec extraction des masses d'intérêt et b) spectre LC-MS obtenu d'un homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec la ménadione (100 µM), dicoumarole (20 µM), BNAH (4 mM), UDPGA (2 mM).	103
Figure 58. a) Chromatogramme et b) spectre LC-MS obtenus à partir d'homogénat de cellules SH-SY5Y-QR2-UGT après incubation 3 h avec la duroquinone (100 µM), BNAH (4 mM), UDPGA (2 mM).	104
Figure 59. Mécanisme proposé pour le flux intracellulaire de thiazole orange d'après Derick et al. (Derick et al., 2017)	105
Figure 60. Courbe sigmoïde représentant la fluorescence de thiazole orange au cours du temps ...	106
Figure 61. Variation de la fluorescence du TO mesurée sur le SH-SY5Y-QR2 avec S29434 (20 µM) (courbe rouge) ou sans S29434 (courbe jaune) en présence de BNAH (50 µM), ménadione (50, 25, 12 et 6 µM) λ_{ex}/em : 505/535 nm.	108
Figure 62. Variation de la fluorescence du TO mesurée sur le SH-SY5Y-QR2-UGT1A6 avec S29434 (20 µM) (courbe violette) ou sans S29434 (courbe verte) en présence de BNAH (50 µM), UDPGA (2 mM), ménadione (50, 25, 12 et 6 µM), λ_{ex}/em : 505/535 nm.	109
Figure 63. Taux de survie après incubation avec la ménadione à différentes concentrations.	110
Figure 64. Expression des gènes antioxydants dans les neuroblastomes après 4h d'incubation avec ou sans ménadione (5 µM) pendant 4 h. (WT = SHSY5Y-WT sans ménadione, QR2 = SHSY5Y-QR2 sans ménadione, QR2-UGT = SHSY5Y-QR2-UGT1A6 sans ménadione, WT-ménad = SHSY5Y-WT avec ménadione, QR2-ménad = SHSY5Y-QR2 avec ménadione, QR2-UGT-ménad = SHSY5Y-QR2-UGT1A6 avec ménadione)	112

Liste des Tableaux

Tableau 1. Liste des principaux inhibiteurs de QR2 et leur concentration inhibitrice à 50% dans la littérature	21
Tableau 2. Conditions de préparation des échantillons	65
Tableau 3. Récapitulatif des différentes lignées cellulaires étudiées avec le taux d'expression de QR2, origine de la lignée et milieu de culture requis.....	119
Tableau 4. Conditions de préparation des solutions d'analyse d'enzyme purifiée pour étude par résonance paramagnétique électronique (RPE).	122
Tableau 5. Conditions de préparation des solutions d'analyse de suspensions cellulaires pour étude par résonance paramagnétique électronique (RPE).	122
Tableau 6. Conditions de préparation des solutions d'analyse des homogénats cellulaires pour étude par résonance paramagnétique électronique (RPE).	123

Liste des Schémas

Schéma 1. Voies de production de radicaux libres après réduction d'une quinone en hydroquinone par une quinone-réductase.....	66
Schéma 2. Formation de l'adduit radicalaire DMPO/*OH.....	76

Author: Monivan CHHOUR

Title: Study of intracellular metabolism of quinones, generated oxidative stress and associated detoxification processes

DIRECTOR OF THESIS : Pr. Karine REYBIER

Abstract:

Quinones are ubiquitous compounds in nature. They are also one of the essential elements in living organisms. However, their metabolisms are considered as toxic because there are highly reactive. Their structure is easily reduced by one or two electrons. The intracellular metabolism of these quinones via one-electron reduction such as cytochrome P450 reductase or others flavoproteins generates an unstable semiquinones which leads to a burst of free radical production that results in oxidative stress. On the other hand, quinone-reductases 1 and 2 (QR1 and QR2) catalyze quinone reduction via two electrons to form hydroquinones that chemically more stable. This property is well-known as the detoxifying character of quinone-reductase enzymes. However, previous analyses have shown that this detoxifying effect was appeared only for certain types of quinones and depended, in particular, on the type of cells. Thus, in order to better understand the mechanisms leading to the generation of reactive species and in consideration to those links that were mentioned in the literature between QR2 and neurodegeneration, studies were conducted on primary neurons and neuroblastoma cells genetically modified to overexpress in QR2. These studies have shown, by various analytical techniques such as electron paramagnetic resonance or LC-MS, an increase in the toxicity of menadione but also of adrenochrome in the presence of quinone-reductase 2. In order to explain the contradictory characteristics of QR2 from one cell to another, we proposed a hypothesis that a cooperation with another conjugating enzyme, which could react with the unstable reduced form that prevent its reoxidation, is needed to effectively detoxify quinones. Additional analyses (RPE, LCMS, fluorescence) conducted on neuroblastoma cells overexpressing both QR2 and a para-hydroquinone specific conjugation enzyme (UGT) have shown a decrease in oxidative stress when both enzymes are co-expressed.

Keywords: ménadione, neurodegeneration, quinone, quinone-reductase 2, UGT, EPR, neuroblastoma, oxidative stress.

AUTEUR : Monivan CHHOUR

TITRE : Etude de la métabolisation intracellulaire de quinones, du stress oxydant généré et des processus de détoxification associés

DIRECTEUR DE THÈSE : Pr. Karine REYBIER

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Faculté de Pharmacie, Université Toulouse III Paul Sabatier, le 24 janvier 2020

Résumé

Les quinones sont des composés ubiquitaires naturels indispensables aux organismes vivants. Cependant leur métabolisation est considérée comme toxique en raison de leur réactivité élevée. Les quinones sont en effet facilement réductibles à un ou deux électrons. La métabolisation intracellulaire de ces quinones par des réductases à un électron telles que le cytochrome P450 réductase ou d'autres flavoprotéines génèrent des semiquinones instables à l'origine de la production de radicaux libres conduisant à un stress oxydant. Les quinones-réductases 1 et 2 (QR1 et QR2) catalysent leur réduction à deux électrons pour former des hydroquinones chimiquement plus stables. Cette propriété est à l'origine du caractère détoxifiant généralement associé aux quinone-réductases. Cependant des analyses antérieures ont montré que ce caractère détoxifiant était remis en cause pour certains types de quinones et dépendait, notamment, du type de cellules. Ainsi afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la génération d'espèces réactives et compte tenu du lien évoqué dans la littérature entre QR2 et neurodégénérescence, des études ont été menées sur des neurones primaires et des neuroblastomes génétiquement modifiés pour surexprimer QR2. Ces études ont mis en évidence, par diverses techniques analytiques telles que la résonance paramagnétique électronique ou la LC-MS, une augmentation de la toxicité de la ménadione mais également de l'adrénochrome en présence de la quinone-réductase 2. Afin d'expliquer les caractères contradictoires de QR2 d'une cellule à l'autre nous avons proposé l'hypothèse qu'une coopération avec une enzyme de conjugaison pouvant réagir avec la forme réduite instable et empêcher sa réoxydation soit nécessaire pour effectivement détoxifier les quinones. Des analyses complémentaires (RPE, LCMS, fluorescence) menées sur des neuroblastomes surexprimant à la fois QR2 et une enzyme de conjugaison spécifique des para-hydroquinone (UGT) ont en effet mis en évidence une diminution du stress oxydant lorsque les deux enzymes sont co-exprimées.

Mot-clés : ménadione, neurodégénérescences, quinones, quinone-réductase 2, UGT, RPE, neuroblastomes, stress oxydant.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Chimie, Biologie, Santé

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