

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA CÉRULOPLASMINE ET L'OXYDE NITRIQUE DANS
LA PROTECTION DES CELLULES CARDIAQUES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
JOSIANNE GAGNÉ

SEPTEMBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier ma directrice de recherche, la Dre Joanne Paquin, pour m'avoir permis de mener à terme ce projet. J'ai beaucoup apprécié son intérêt pour mon travail, sa confiance et sa grande disponibilité. Je remercie également mon co-directeur, le Dr Mircea-Alexandru Mateescu, pour sa collaboration au projet.

Je remercie M. Michel Marion (assistant de recherche) pour la documentation et l'aide technique qu'il m'a fournies, ainsi que le Dr Borhane Annabi (Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada) pour l'utilisation de son microscope à fluorescence.

Merci beaucoup à mes collègues de laboratoire, Frédéric Bouchard et Philippe Ducharme pour leur grande aide et leurs nombreux conseils tout au long de ces deux années. Leur présence et leur soutien ont été très précieux.

Je profite de l'occasion pour remercier les membres de ma famille, Lucie, Marcel et Annie, et mon conjoint, Patrick, qui ont toujours été là pour moi. Je tiens à ce qu'ils sachent que leurs encouragements constants sont une part importante de la réussite de mes études.

Finalement, je remercie le CRSNG pour le soutien financier et la Fondation de l'UQÀM pour les bourses qui m'ont été octroyées.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ.....	xi
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.1 Physiologie générale du cœur	1
1.1.1 Structure du cœur	1
1.1.2 La conduction cardiaque	2
1.1.3 L'innervation du cœur.....	3
1.1.4 La vascularisation du cœur.....	4
1.2 Les cellules cardiaques	4
1.3 Les maladies cardiovasculaires	6
1.3.1 L'ischémie-reperfusion et l'infarctus du myocarde	6
1.3.2 L'apoptose et la nécrose dans les maladies cardiovasculaires	7
1.4 Le stress oxydatif	8
1.4.1 Les EOR.....	8
1.4.2 La production d'EOR durant l'ischémie-reperfusion.....	9
1.4.3 Les effets délétères des EOR.....	10
1.4.4 Le stress oxydatif induit par le H ₂ O ₂	10
1.5 L'oxyde nitrique	11
1.5.1 La découverte du NO•.....	11
1.5.2 Les propriétés chimiques du NO•.....	11
1.5.3 La biosynthèse du NO•.....	13
1.6 L'action biologique du NO• sur les différents types cellulaires	15
1.6.1 Le NO• dans les muscles lisses vasculaires.....	15
1.6.2 Le NO• dans les cellules endothéliales.....	16
1.6.3 Le NO• dans le système neurologique cardiaque	17
1.6.4 Le NO• dans les cardiomyocytes.....	17

1.7 Les rôles du NO\cdot dans les maladies cardiovasculaires	18
1.7.1 La production de NO \cdot durant l'ischémie-reperfusion	18
1.7.2 Les effets cytoprotecteurs du NO \cdot	19
1.7.3 La cytotoxicité du NO \cdot	20
1.7.4 Les effets du NO \cdot sur la toxicité du H $_2$ O $_2$	21
1.8 Aspects généraux de la CP	21
1.8.1 La biosynthèse de la CP	21
1.8.2 Structure de la CP	22
1.8.3 Le catabolisme de la CP	25
1.9 Les fonctions de la CP	25
1.9.1 Transport du cuivre	26
1.9.2 Activité ferroxidasique	26
1.9.3 Activité oxydasique	28
1.9.4 Propriétés antioxydantes	28
1.9.5 Rôles dans le système cardiovasculaire	29
1.9.6 Rôles dans le métabolisme du NO \cdot	30
1.10 Hypothèse de recherche et objectifs	33
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	35
2.1 Purification de la CP	35
2.1.1 Synthèse de l'AE-agarose	35
2.1.2 Extraction du sérum de sang bovin	35
2.1.3 Chromatographie d'affinité de la CP sur AE-agarose	36
2.1.4 Dosage de l'activité oxydasique de la CP	37
2.2 Culture et traitement des cardiomyocytes de rats nouveau-nés	38
2.2.1 Isolement des cellules	38
2.2.2 Culture et traitement des cardiomyocytes	39
2.2.3 Mesure de la viabilité par coloration au Hoechst et à l'iodure de propidium	40
2.3 Électrophorèse et détection de la CP	41
2.3.1 Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	41
2.3.2 Coloration au nitrate d'argent	42

2.3.3	Électrotransfert en mode semi-sec	42
2.3.4	Immunobuvardage de type western.....	42
2.4	Dosage des dérivés du NO\cdot	43
2.4.1	S-nitrosation du BSA	43
2.4.2	Dosage de Griess.....	44
2.4.3	Dosage avec le 2,3-diaminonaphtalène (DAN).....	46
2.5	Déplétion de la CP dans les échantillons	47
2.5.1	Précipitation de la CP par l'AE-agarose.....	47
2.5.2	Dosage des protéines par la méthode de Bradford	47
CHAPITRE III : RÉSULTATS		48
3.1	Mise au point des dosages des dérivés du NO\cdot	48
3.1.1	Optimisation du dosage de Griess.....	48
3.1.2	Adaptation du dosage de Griess aux NO $_3^-$ et aux RSNO	51
3.1.3	Optimisation du dosage au DAN	56
3.1.4	Effet de différents milieux sur les courbes d'étalonnage des dérivés du NO \cdot	59
3.1.5	Interférence de la CP	64
3.2	Tests de viabilité sur les cardiomyocytes de rats nouveau-nés	67
3.2.1	Culture des cardiomyocytes dans différents milieux	67
3.2.2	Sensibilité des cardiomyocytes au H $_2$ O $_2$	69
3.2.3	Effets de la CP et du NO \cdot sur les cardiomyocytes.....	69
3.3	Évaluation des changements dans les milieux de culture lors des traitements cellulaires	72
3.3.1	Intégrité physique et fonctionnelle de la CP à la fin des traitements	72
3.3.2	Dosage des dérivés du NO \cdot dans les milieux à la fin des traitements	74
3.4	Étude de l'action de la CP sur les dérivés du NO\cdot en conditions acellulaires	74
3.4.1	Effet de la CP sur la détection du NO \cdot libéré par le PAPA NONOate.....	74
3.4.2	Effets à court terme de la CP sur la génération de dérivés du NO \cdot	77
3.5	Étude de l'activité S-nitrosante de la CP dans différentes conditions	79

CHAPITRE IV : DISCUSSION.....	83
4.1 Culture et traitement des cardiomyocytes de rats nouveau-nés.....	84
4.2 Absence de protection par la CP.....	87
4.3 Protection par le NO [•]	88
4.5 « Auto-nitrosation » de la CP.....	90
4.6 Inhibition de l'activité S-nitrosante de la CP par le BSA.....	91
CONCLUSION	94
BIBLIOGRAPHIE	96

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau	Page
3.1 Protocoles optimisés pour les dosages des dérivés du NO \cdot	60
Figure	Page
1.1 Schéma en coupe du cœur humain.	1
1.2 Schéma du système de conduction cardiaque autonome.	3
1.3 Mécanismes d'amplification de la réactivité du $\cdot\text{O}_2^-$	9
1.4 Biosynthèse du NO \cdot par une NOS.	14
1.5 Représentation schématique de la structure de la CP	23
1.6 Représentation tridimensionnelle de la CP par cristallographie à rayons X.....	24
1.7 Représentation schématique de la séquence C-terminale de la CP selon le patron d'épissage	25
1.8 Activité ferroxidasique de la CP et compétition avec la réaction de Fenton	27
1.9 Exemple de réaction d'oxydation catalysée par la CP.....	28
1.10 Mécanisme hypothétique de la formation de RSNO catalysée par la CP en présence de NO \cdot et de GSH.....	31
1.11 Mécanisme hypothétique de l'activité NO-oxydase/nitrite-synthase de la CP.....	32
2.1 Analyse protéique de la CP purifiée	37
2.2 Interprétation de photos de cardiomyocytes colorés au Hoechst et à l'iodure de propidium	41
2.3 Détection des NO $_2^-$ par les réactifs de Griess	44
2.4 Détection des NO $_2^-$ par la sonde fluorimétrique DAN	46
3.1 Optimisation du dosage des NO $_2^-$ par la méthode de Griess	50
3.2 Élimination des NO $_2^-$ par l'acide sulfamique	52
3.3 Optimisation du dosage des NO $_3^-$ par la méthode de Griess	53
3.4 Optimisation du dosage des RSNO par la méthode de Griess.....	55
3.5 Cinétique de la réaction de Griess dans les différents dosages	57
3.6 Optimisation du dosage des NO $_2^-$ avec le DAN	58
3.7 Courbes d'étalonnage des dosages de Griess dans différents milieux.....	61

3.8 Courbes d'étalonnage des dosages au DAN dans différents milieux	63
3.9 Précipitation de la CP par l'AE-agarose.....	65
3.10 Interférence de la CP dans le dosage des dérivés du NO \cdot	66
3.11 Viabilité des cardiomyocytes de rats nouveau-nés cultivés dans différents milieux.	68
3.12 Sensibilité des cardiomyocytes de rats nouveau-nés au H $_2$ O $_2$	70
3.13 Évaluation de la protection des cardiomyocytes par la CP et le NO \cdot contre le H $_2$ O $_2$	71
3.14 Confirmation de l'intégrité physique et fonctionnelle de la CP dans les traitements cellulaires.....	73
3.15 Dosage des différents dérivés du NO \cdot dans les milieux de culture après les traitements cellulaires.....	75
3.16 Effet de la CP sur la libération du NO \cdot par le PAPA NONOate.....	76
3.17 Dosage des dérivés du NO \cdot générés par le PAPA NONOate dans différents milieux après un temps court.....	78
3.18 Évaluation de l'activité S-nitrosante de la CP	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	absorbance
AE-agarose	aminoéthyl-agarose
aFGF	facteur de croissance fibroblastique acide
AngII	angiotensine II
Ara-C	cytosine-β-D-arabinofuranoside hydrochlorure
bFGF	facteur de croissance fibroblastique basique
BSA	albumine sérique bovine
BSA-S-NO	BSA-S-nitrosé
cAMP	adénosine monophosphate cyclique
cGMP	guanosine monophosphate cyclique
CMLV	cellule de muscle lisse vasculaire
CP	céruloplasmine
DAN	2,3-diaminonaphtalène
DEA NONOate	Diethylamine NONOate
DM	milieu D-MEM (milieu d'Eagle modifié selon Dubelcco)
DM/F12	milieu D-MEM/F-12
DTPA	acide diéthylènetriaminepentaacétique
EDRF	facteur de relaxation endothélial (<i>endothelial derived relaxation factor</i>)
EGF	facteur de croissance endothélial
eNOS	isoforme de NOS isolée des cellules endothéliales
EOR	espèce oxygénée réactive
FAD	flavine adénine dinucléotide
FBS	sérum foetal bovin
Fe ²⁺	fer sous sa forme ferreuse
Fe ³⁺	fer sous sa forme ferrique
FMN	flavine mononucléotide
GADPH	glycéraldehyde-3-phosphate-déshydrogénase
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GSH	glutathion
GSNO	glutathion-S-nitrosé
HBSS	solution saline physiologique de Hank (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HOCl	acide hypochloreux
IL-1	interleukine-1
iNOS	isoforme de NOS isolée des macrophages immunoactivés
KPi	tampon phosphate de potassium
NADPH	forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAT	2,3-naphtotriazole
NEDD	N-(1-naphtyl)éthylènediamine dihydrochlorure
nNOS	isoforme de NOS isolée du tissu neuronal
NO·	oxyde nitrique
NO ⁻	anion nitroxyl
NO ⁺	cation nitrosonium

NO ₂	dioxyde d'azote
NO ₂ ⁻	nitrite
NO ₃ ⁻	nitrate
N ₂ O ₃	trioxyde d'azote
NONO	PAPA NONOate
NOS	NO-synthase
OONO ⁻	peroxynitrite
O ₂	oxygène moléculaire
·O ₂ ⁻	superoxyde
·OH	radical hydroxyl
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAPA NONOate	propylamine propylamine NONOate
PBS	tampon phosphate salin
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PKG	kinase cGMP-dépendante
P-NONOate	propylamine NONOate
pPD	p-phénylène diamine
PVDF	fluorure de polyvinylidène (<i>polyvinylidene fluoride</i>)
RSH	thiol
RSNO	S-nitrosothiol
SDS	sodium dodécylsulfate
TBS-Tw	tampon TRIS-HCl salin contenant du Tween-20
TGFβ1	facteur de croissance transformant-β1
TNFα	facteur de nécrose tumoral-α
VASP	phosphoprotéine stimulatrice de vasodilatation
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

RÉSUMÉ

L'infarctus du myocarde est une maladie très répandue dans les pays industrialisés. La condition d'ischémie-reperfusion qui en est à l'origine endommage les tissus par la production accrue d'espèces oxygénées réactives (EOR) qui conduisent les cellules à un état de stress oxydatif. L'oxyde nitrique ($\text{NO}\cdot$) est non seulement une EOR mais aussi une molécule de signalisation importante dans le système cardiovasculaire. Plusieurs effets cytoprotecteurs du $\text{NO}\cdot$ et de ses dérivés ont été démontrés dans le cœur ischémie-reperfusé, mais des effets cytotoxiques ont aussi été rapportés. La céruloplasmine (CP) est une glycoprotéine à cuivre circulante multifonctionnelle. Quoiqu'elle soit étudiée depuis longtemps, certaines de ses propriétés demeurent incomprises. Elle est entre autres reconnue comme un antioxydant circulant très important. L'équipe du Dr Mateescu a d'ailleurs rapporté qu'elle protège le cœur isolé des EOR durant l'ischémie-reperfusion. D'autres équipes ont toutefois montré une activité pro-oxydante de la CP qui ferait d'elle un facteur de risque associé aux maladies cardiovasculaires. Deux activités de la CP ont récemment été mises en évidence *in vitro* : la synthèse de nitrosothiols (RSNO) et de nitrites (NO_2^-), deux dérivés du $\text{NO}\cdot$ considérés comme des formes d'entreposage qui prolongeraient la durée de vie de ce facteur. Nous avons donc posé l'hypothèse d'une implication de la CP dans la potentialisation des effets du $\text{NO}\cdot$ par ses nouvelles activités.

Le but de cette étude était ainsi d'évaluer l'effet cytoprotecteur de la combinaison CP + $\text{NO}\cdot$ et de vérifier l'implication d'une activité S-nitrosante et/ou nitrite-synthase de la CP. Pour ce faire, des cultures de cardiomyocytes de rats nouveau-nés ont été soumises à un stress oxydatif généré par l'ajout de H_2O_2 au milieu de culture. L'effet toxique ou protecteur de la CP et d'un donneur de $\text{NO}\cdot$, le PAPA NONOate, a été déterminé par la mesure de la viabilité cellulaire à l'aide d'une coloration au Hoechst 33342 et à l'iodure de propidium. Les dérivés RSNO et NO_2^- du $\text{NO}\cdot$ ont été mesurés dans les milieux de culture par les réactifs colorimétriques de Griess ou par la sonde fluorescente DAN, après une optimisation de ces méthodes de dosage.

Les résultats, qui vont à l'encontre de l'hypothèse de départ, ont montré que ni la CP, ni la combinaison CP + $\text{NO}\cdot$ ne protègent les cardiomyocytes du H_2O_2 . La CP a même exercé un effet cytotoxique sur les cellules en présence de H_2O_2 . Le $\text{NO}\cdot$ à faible concentration procure une certaine protection contre le H_2O_2 , mais en intensifie la toxicité à forte concentration. En conditions acellulaires, l'activité S-nitrosante de la CP sur le glutathion a été confirmée et est comparable à celle de la littérature. La synthèse de NO_2^- n'a toutefois pas été observée à des niveaux détectables. Des faits nouveaux ont aussi été révélés : la CP est capable d'« auto-nitrosation » et l'albumine inhibe l'activité S-nitrosante de la CP. Cette étude indiquerait que l'action cardioprotectrice de la CP contre les dommages causés par l'ischémie-reperfusion n'inclurait pas une protection contre le H_2O_2 , ni une potentialisation de l'action du $\text{NO}\cdot$ contre ce H_2O_2 . L'albumine présente dans le milieu de culture pourrait avoir masqué les possibles interactions entre la CP et le $\text{NO}\cdot$. Ce dernier résultat suggère que la CP circulante aurait peu d'impact sur le métabolisme du $\text{NO}\cdot$ en situation physiologique.

Mots Clés : Céruloplasmine, oxyde nitrique, cardiomyocytes, stress oxydatif, S-nitrosation

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Physiologie générale du cœur

1.1.1 Structure du cœur

Le cœur a pour fonction de pousser le sang dans les artères avec une pression suffisante pour le faire circuler dans tout le corps et permettre son retour par les veines. Il est d'ailleurs constitué de deux systèmes de pompe. Le ventricule et l'oreillette droites (cœur droit) agissent ensemble pour propulser le sang provenant des grandes veines à la circulation pulmonaire, où se fait l'échange O_2/CO_2 . Le sang oxygéné revient ensuite au cœur et est ré-expédié à la circulation systémique par le ventricule et l'oreillette gauches (cœur gauche). Les principales structures du cœur sont montrées sur le schéma de la figure 1.1.

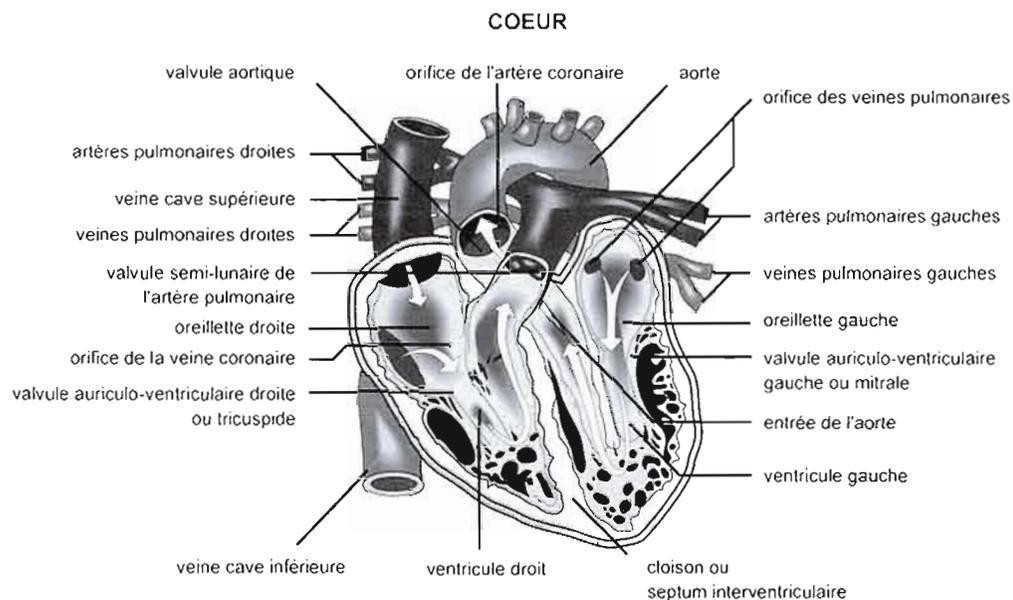


Figure 1.1 Schéma en coupe du cœur humain. Sont indiquées les principales structures et le sens de la circulation intracardiaque (Déry, 2005-2007).

Les oreillettes sont des structures extensibles servant de réservoir pour le sang qui retourne au cœur. Elles gardent le sang qui arrive par les veines pulmonaires (oreillette gauche) ou par les veines caves (oreillette droite) jusqu'à l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires. La paroi des oreillettes contient trois couches distinctes : l'épicarde (externe), le myocarde (musculaire) et l'endocarde (interne).

Puisqu'ils exercent une force de pression beaucoup plus grande que les oreillettes, les ventricules doivent avoir une paroi plus résistante. Le septum ventriculaire, c'est-à-dire la paroi mitoyenne qui sépare les deux ventricules, est la partie la plus épaisse du cœur. Le ventricule de gauche est aussi entouré d'un myocarde très épais, fait d'un agencement complexe de couches et de groupes de fibres musculaires. L'épicarde des ventricules est continu avec celui des oreillettes et contient la plupart des vaisseaux coronaires. Par contre, la surface intérieure des ventricules est faite d'un tissu musculaire irrégulier et d'aspect poreux, la *trabeculae carneae*. Lorsque le cœur bat, la contraction des ventricules provoque l'ouverture de valves de type semi-lunaires. Cela permet l'expulsion du sang dans l'aorte (ventricule gauche) ou dans l'artère pulmonaire (ventricule droit). Après la contraction, les valves se ferment hermétiquement pour empêcher un reflux du sang dans les ventricules.

Les oreillettes et les ventricules sont recouverts par le péricarde, un mince sac fibreux et rigide. L'espace entre lui et l'épicarde contient un liquide qui lubrifie le cœur et lui permet de bouger librement à l'intérieur de la cavité péricardienne.

1.1.2 La conduction cardiaque

Le cœur possède un système de conduction électrique qui initie et coordonne les battements cardiaques de façon autonome par rapport au reste du corps. Les noeuds (sinusal et auriculo-ventriculaire) sont des groupes de cellules connectées à de nombreuses terminaisons nerveuses, capables de produire des signaux électriques et de commander le rythme cardiaque. Les signaux sont transmis à travers des faisceaux (internodaux, de His) et des réseaux (de Purkinje) de fibres. Ces structures sont faites de fibres myocardiques parallèles et de différents types de myocytes spécialisés, tous agencés de façon dense et linéaire. Ce serait d'ailleurs la linéarité qui leur procurerait une vitesse de conductivité plus

grande que dans le reste du myocarde, où les cellules sont moins bien alignées. Tel que l'illustre la figure 1.2, le signal de contraction parcourt les oreillettes du sommet jusqu'à la base et traverse le septum ventriculaire avant de remonter dans les parois externes du myocarde ventriculaire (Little, 1985).

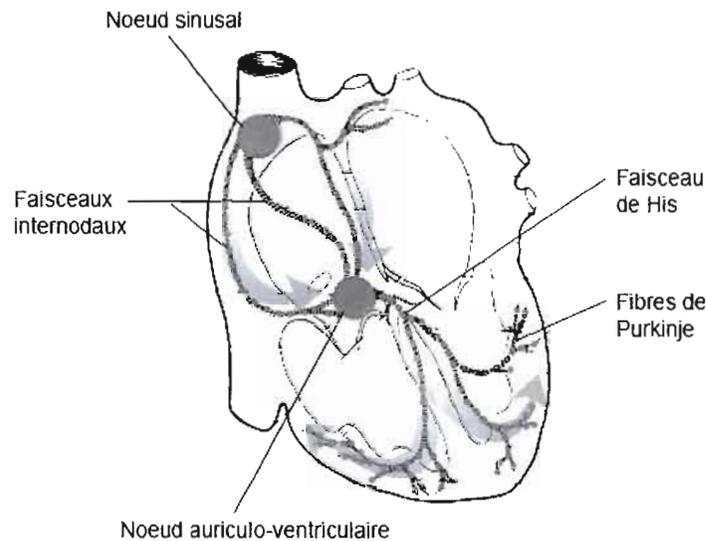


Figure 1.2 Schéma du système de conduction cardiaque autonome. Sont indiqués les principaux éléments du système et le sens de la signalisation.

1.1.3 L'innervation du cœur

La fonction cardiaque peut également être influencée par le système nerveux périphérique, par l'intermédiaire d'hormones. Les fibres du système sympathique s'emmêlent pour former un important plexus épicaldial entourant tout le cœur. Certaines fibres rejoignent aussi les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire et le myocarde auriculaire. Des hormones comme l'adrénaline et la noradrénaline stimulent les récepteurs cardiaques sympathiques, majoritairement de type β_1 . Elles entraînent l'augmentation de la force contractile du myocarde, du rythme cardiaque et de la mobilisation du glycogène myocardique. Les fibres du système parasympathique arrivent au cœur par les nerfs vagues. Contrairement aux fibres sympathiques, elles innervent presque uniquement le myocarde auriculaire et les tissus spécialisés des nœuds. Par des synapses avec les fibres

cholinergiques, elles sont soumises à l'action de l'acétylcholine. Elles provoquent donc le ralentissement du rythme et la diminution de la vigueur des contractions. Le cœur possède aussi des nerfs sensitifs, par lesquels voyagent les pulsions des terminaisons nerveuses présentes dans les parois du cœur, autour des artères coronaires et dans le péricarde (Little, 1985).

1.1.4 La vascularisation du cœur

Évidemment, le muscle cardiaque est lui-même approvisionné en sang par un système d'artères. Les artères coronaires gauche et droite prennent leur source à l'aorte et sont divisées et sous-divisées en une multitude de branches parcourant et irriguant toutes les parties du cœur. Les artérioles et métartérioles pénètrent le myocarde et prolifèrent en un réseau dense de vaisseaux capillaires. Ceux-ci sont retrouvés entre les fibres musculaires et parallèles à celles-ci. En général, il doit y avoir un capillaire pour chaque fibre musculaire puisque la capacité de diffusion à l'extérieur du capillaire est très petite (8 à 10 μm). Les lits capillaires sont drainés par différents vaisseaux qui convergent et se déversent dans l'oreillette droite. En plus de son réseau sanguin, le cœur a un réseau lymphatique important. Des vaisseaux fins aux parois très minces forment une sorte de plexus distribué dans tout le myocarde. Ces vaisseaux suivent le parcours du système de conduction et accompagnent les artères coronaires (Little, 1985).

1.2 Les cellules cardiaques

Différents types cellulaires constituent le cœur et permettent son fonctionnement. Les cardiomyocytes sont les cellules musculaires qui assurent la fonction contractile du cœur. Les fibroblastes cardiaques sont des cellules d'une grande plasticité, qui présentent une morphologie allongée ou étoilée en culture. Leur principale fonction est la synthèse et le maintien de la matrice extracellulaire, mais ils synthétisent en plus une grande variété de molécules, comme des facteurs de croissance. Les cellules endothéliales vasculaires forment la paroi interne des petits et gros vaisseaux sanguins coronaires et périphériques. Elles contrôlent les échanges entre le sang et le milieu extracellulaire, ce qu'on appelle la barrière endothéliale. Par la libération de facteurs de régulation, ils modulent aussi la coagulation

sanguine et la vasodilatation. Finalement, les cellules des muscles lisses vasculaires (CMLV) contrôlent de façon directe la vasoconstriction et la vasodilatation grâce à leurs propriétés contractiles. Les cellules cardiaques sont entourées et supportées par la matrice extracellulaire cardiaque, dont les principales composantes sont des protéines structurales comme le collagène et l'élastine, des protéines adhésives comme la laminine, la fibronectine et le collagène de type IV, des protéines anti-adhésives comme la ténascine, la thrombospondine et l'ostéopondine, et des protéoglycans. Les protéines d'adhésion sont liées aux cellules par les intégrines, une famille de récepteurs transmembranaires très répandue (Corda *et al.*, 2000).

Les cellules du muscle cardiaque s'intercalent et se connectent de façon très étroite, formant un arrangement de type syncytium. La jonction entre les cellules est faite par des structures appelées disques intercalants. À cet endroit, les membranes des deux cellules se rejoignent et fusionnent en plusieurs points pour former des jonctions serrées. Ces jonctions permettent de propager le courant électrique de dépolarisation avec une très faible résistance. Il en résulte une propagation très rapide du courant dans tout le muscle du ventricule ou de l'oreillette. La contraction cardiaque se fait selon un mécanisme semblable à celui de la contraction musculaire squelettique. Brièvement, la dépolarisation de la membrane cause le relâchement du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique et l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire. Ces deux événements causent l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire. Celui-ci se lie ensuite à la troponine et produit un changement de conformation qui se propage dans les autres éléments contractiles (tropomyosine, myosine et actine) et a pour résultat final le raccourcissement du muscle (Little, 1985).

Dans le développement des cardiomyocytes de mammifères, deux formes de croissance programmées sont possibles. *In utero*, la masse ventriculaire est augmentée par la prolifération de cardiomyocytes différenciés. Après la naissance, les cardiomyocytes ventriculaires ne sont plus soumis au cycle cellulaire et ne peuvent plus entrer en mitose. Ils s'adaptent à la croissance du cœur en augmentant en taille (Schaub *et al.*, 1997).

1.3 Les maladies cardiovasculaires

Il est généralement admis que les cardiomyocytes adultes n'ont pas la capacité de proliférer. Des études récentes ont rapporté l'existence de cellules progénitrices cardiaques capables de se différencier en cardiomyocytes, mais pour le moment, cette population de cellules apparaît trop faible pour soutenir une régénération massive de l'organe malade (Engel, 2005). Le cœur des mammifères répond donc aux dommages principalement par la cicatrisation plutôt que par la régénération. C'est pourquoi les maladies cardiovasculaires ont un taux de mortalité et de morbidité très élevé. Plusieurs de ces maladies se développent avec les habitudes de vie et le vieillissement et sont ainsi fréquentes dans les pays industrialisés.

1.3.1 L'ischémie-reperfusion et l'infarctus du myocarde

L'ischémie myocardique causée par l'obstruction de vaisseaux sanguins produit un état de déséquilibre entre l'apport sanguin artériel et les besoins en oxygène du myocarde qui nuit au fonctionnement normal du cœur. La reperfusion, c'est-à-dire le retour du sang dans les artères, est nécessaire à la survie des tissus, mais cause d'autres dommages aux cellules par différents phénomènes. Par exemple, l'entrée massive d'oxygène dans les cellules produit une quantité d'espèces oxygénées réactives (EOR) supérieure aux capacités des défenses antioxydantes. La reperfusion provoque aussi l'infiltration de neutrophiles qui initie une réponse inflammatoire pouvant mener à la destruction des tissus (Mayumi *et al.*, 1993).

Une ischémie prolongée peut entraîner des dommages irréversibles aux tissus, conduisant à l'infarctus, c'est-à-dire la mort d'une partie du tissu. L'infarctus du myocarde est le plus souvent causé par l'obstruction d'une artère coronaire par une plaque d'athérome (Roberts, 1997). Celle-ci naît de l'infiltration de lipides dans la paroi des artères qui entraîne la formation d'une plaque inflammatoire instable. Les tissus touchés par l'infarctus sont remplacés par une cicatrice fibreuse faite de collagène. En plus de nuire aux contractions du cœur, les tissus ainsi cicatrisés augmentent le risque d'arythmie.

L'insuffisance cardiaque est la manifestation clinique finale d'une atteinte sévère au cœur. En de telles conditions, il est fréquent d'assister à un remodelage de la zone du myocarde endommagée pour compenser la perte de cardiomyocytes. Ce remodelage est dit pathologique car il a pour conséquences une augmentation de la fibrose interstitielle et une perte aggravée de cardiomyocytes par apoptose ou nécrose (Braunwald et Bristow, 2000), en plus d'une hypertrophie inadaptée des cardiomyocytes survivants (Esposito *et al.*, 2002).

1.3.2 L'apoptose et la nécrose dans les maladies cardiovasculaires

Dans le cœur adulte sain, l'apoptose est rarement observée. Elle joue pourtant un rôle vital dans l'embryogenèse, permettant la formation de certaines structures comme les valves (Kunapuli *et al.*, 2006). On a longtemps cru que la perte de myocytes lors de maladies se faisait seulement par nécrose. Durant la dernière décennie, pourtant, il est devenu évident que l'apoptose est importante dans le développement et la progression de plusieurs maladies cardiovasculaires. L'apoptose a été détectée dans le myocarde d'individus atteints de maladies comme l'ischémie-reperfusion, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque en phase terminale (Thomson, 1995; Narula *et al.*, 1996). Dans les modèles d'infarctus du myocarde de rongeurs, la plus grande partie de la mort cellulaire qui survient dans les premières heures suivant l'occlusion coronaire est due à l'apoptose (Kajstura, 1996). Par contre, dans les 24 heures après l'événement, la nécrose joue un rôle prédominant (Garg *et al.*, 2005). Ces observations pourraient expliquer que les thérapies anti-apoptotiques soient moins efficaces dans cette dernière fenêtre thérapeutique. Fait surprenant, l'ischémie associée avec une reperfusion aurait un meilleur potentiel de stimulation de l'apoptose que l'ischémie seule (Garg *et al.*, 2005). La raison d'un tel phénomène serait que, bien qu'elle diminue le nombre de cellules qui subissent l'apoptose, la reperfusion accélérerait l'apoptose dans les cellules déjà irréversiblement endommagées (Fliss et Gattinger, 1996). Les EOR, les altérations de l'homéostasie du Ca^{2+} , l'augmentation de l'étirement mécanique et les réactions inflammatoires sont quelques-uns des facteurs associés à l'ischémie-reperfusion qui induisent l'apoptose des myocytes.

1.4 Le stress oxydatif

1.4.1 Les EOR

Une très grande variété de types cellulaires sont capables de produire des EOR, par des enzymes comme les oxydases et les peroxydases. Les EOR, qui incluent les radicaux libres oxygénés, ont d'ailleurs des fonctions utiles dans les cellules. Toutefois, des conditions pathologiques peuvent conduire à une surproduction de ces espèces, au-delà des besoins métaboliques. Un tel état est appelé stress oxydatif. Les EOR en excès peuvent alors devenir ou produire des espèces potentiellement cytotoxiques. Une fois enclenchés, ces processus peuvent aboutir à l'altération de systèmes enzymatiques critiques et à la peroxydation des membranes.

Les principales EOR produites durant les processus physiologiques normaux sont le superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxyde nitrique ($\text{NO}\cdot$). Le $\cdot\text{O}_2^-$ est produit par le système enzymatique xanthine/xanthine-oxydase des cellules endothéliales vasculaires (Bellavite, 1988) ou par la NADPH-oxydase des cellules phagocytaires (Segal et Abo, 1993). La toxicité de cette espèce peut être amplifiée par des interactions avec les autres EOR, comme l'illustre la figure 1.3. Le $\cdot\text{O}_2^-$ peut d'abord être dismuté par la superoxyde-dismutase en H_2O_2 . La réaction du H_2O_2 avec le fer ou le cuivre produit ensuite le radical hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) très réactif. Les protéines à fer comme la myoglobine et l'hémoglobine peuvent aussi être attaquées par le H_2O_2 et produire des radicaux ferryls sur leur groupement hème (Rice-Evans et Bruckdorfer, 1995). La myéloperoxydase relâchée par les neutrophiles peut produire l'acide hypochloreux (HOCl), un oxydant très fort, à partir du H_2O_2 et l'ion chlorure (Cl^-). Le $\text{NO}\cdot$ est produit par les enzymes NO-synthases (NOS), dans différents types cellulaires. Sa réaction avec le $\cdot\text{O}_2^-$ produit l'anion peroxynitrite (OONO^-), capable d'oxyder une vaste gamme de substrats (Ischiropoulos *et al.*, 1992).

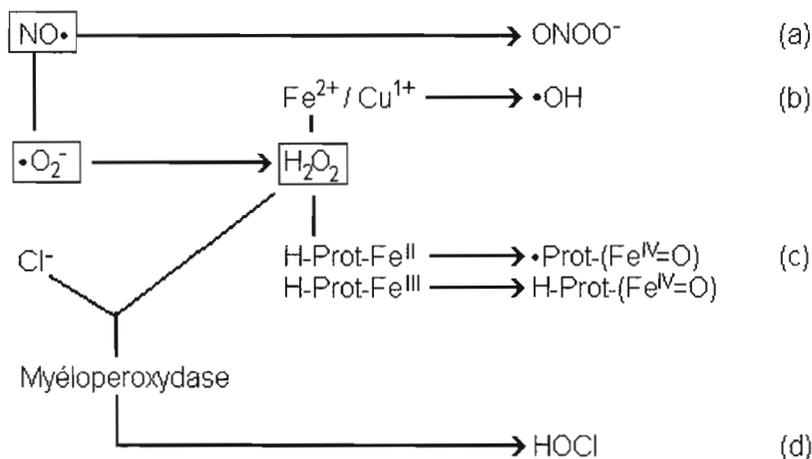


Figure 1.3 Mécanismes d'amplification de la réactivité du $\cdot\text{O}_2^-$. Le $\cdot\text{O}_2^-$ réagit avec le $\text{NO}\cdot$ (a), ou bien sa forme dismutée, le H_2O_2 , réagit avec les métaux de transition (b), les protéines à hème (c) ou la myéloperoxydase (d) (d'après Rice-Evans et Bruckdorfer, 1995).

1.4.2 La production d'EOR durant l'ischémie-reperfusion

Il existe plusieurs sources potentielles d'EOR durant le syndrome d'ischémie-reperfusion, et celles-ci sont reliées entre elles de façon complexe. Il y a d'abord l'infiltration de leucocytes et de neutrophiles activés dans le myocarde endommagé, conséquemment à une réponse inflammatoire aiguë (Lucchesi, 1990). Le mécanisme de défense antimicrobien de ces cellules, qui passe principalement par la libération du $\cdot\text{O}_2^-$ et d'autres EOR, a un effet délétère sur les myocytes viables. De plus, la relâche de EOR dans le milieu extracellulaire amplifie la réponse inflammatoire. Suite à un dommage au tissu, des ions métalliques de transition peuvent être relâchés dans le milieu extracellulaire. Ils peuvent même être relâchés de protéines à hème ou de métalloprotéines par des protéases ou des oxydants délocalisés. Ces ions métalliques peuvent réagir avec le H_2O_2 et augmenter la production de radicaux $\cdot\text{OH}$ et ferryll (Fe^{4+}). Une autre source d'EOR provient de la conversion de la xanthine-déshydrogenase en xanthine-oxydase. La conversion peut être provoquée par une oxydation ou par une protéase dépendante du calcium, activée par l'accumulation de calcium cytosolique durant l'ischémie. Après la reperfusion, la xanthine-oxydase catalyse la conversion de métabolites purines, comme l'hypoxanthine, en urate et génère le $\cdot\text{O}_2^-$ et le H_2O_2 (McCord, 1988). À l'intérieur des cellules, les radicaux peuvent aussi être produits par

le largage d'électrons de la chaîne de transport mitochondriale, conséquemment au manque d'oxygène accepteur pour terminer la chaîne respiratoire (Turrens et Boveris, 1980). La déplétion du glutathion (GSH) sous sa forme réduite est un autre effet néfaste de l'ischémie. Les myocytes contiennent peu de catalase et la dégradation des peroxydes dans ces cellules se fait principalement par le système glutathion-péroxydase/réductase. En cas de manque de substrat GSH, le système de défense antioxydant est donc compromis, prédisposant le myocarde à de plus grands dommages (Rice-Evans et Bruckdorfer, 1995).

1.4.3 Les effets délétères des EOR

Les acides gras polyinsaturés sont particulièrement susceptibles à l'attaque des radicaux libres. La peroxydation de ces lipides est initiée par la soustraction d'un atome d'hydrogène de la chaîne d'acides gras. Suit un réarrangement qui résulte, après liaison à l'oxygène moléculaire, en la formation d'un radical peroxy. Des réactions de propagation menant à la formation d'hydroperoxydes de lipides peuvent se répéter de façon à amplifier l'attaque radicalaire initiale. La décomposition des hydroperoxydes en radicaux alkoxy et peroxy accélère la réaction en chaîne qui conduit à des dommages oxydatifs aux différents composants de la cellule. Les conséquences potentielles de la peroxydation des lipides membranaires incluent la perte d'acides gras polyinsaturés, l'altération de la fluidité et de la perméabilité membranaires, l'altération d'enzymes membranaires et du transport des ions, la libération d'éléments de compartiments sous-cellulaires et la génération de métabolites cytotoxiques. Les protéines, intracellulaires ou extracellulaires, sont aussi des cibles critiques de l'attaque par les radicaux libres. Elles peuvent être endommagées par les radicaux peroxy et $\cdot\text{OH}$ ou par des EOR comme le HOCl et le H_2O_2 . Différents mécanismes sont possibles, dont l'oxydation d'acides aminés, la désamination, la décarboxylation, la scission ou la réticulation (Rice-Evans et Bruckdorfer, 1995).

1.4.4 Le stress oxydatif induit par le H_2O_2

Le H_2O_2 est considéré comme une cause majeure des dommages infligés au cœur durant la reperfusion. Il est d'ailleurs largement utilisé dans les études *in vitro* pour induire un stress oxydatif sur des modèles de cultures cellulaires ou des organes isolés. Le H_2O_2 est une espèce plus stable que les autres EOR. Il a une plus grande capacité de diffusion à travers les

tissus et donc un plus grand potentiel d'action. Ses effets toxiques seraient surtout dus à la production de $\cdot\text{OH}$ (Loh *et al.*, 2003). En plus de peroxyder des lipides, d'activer ou désactiver des enzymes, d'oxyder des protéines et de produire des changements dans la concentration intracellulaire de calcium, le H_2O_2 et le $\cdot\text{OH}$ affectent les courants transmembranaires du Na^+ , du K^+ et du Ca^{2+} (Cerbai *et al.*, 1991; Tarr et Valenzeno, 1991). Ils altéreraient aussi la durée du potentiel d'action et la force contractile du muscle cardiaque (Satoh et Matsui, 1997).

1.5 L'oxyde nitrique

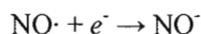
1.5.1 La découverte du $\text{NO}\cdot$

Le $\text{NO}\cdot$ est non seulement une EOR ayant un certain potentiel oxydant mais aussi une molécule ayant plusieurs rôles dans une variété de systèmes cellulaires et physiologiques. Sa découverte dans le système cardiovasculaire a d'ailleurs valu le Prix Nobel de physiologie/médecine de 1998 aux chercheurs Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad. Les effets vasodilatateurs de la nitroglycérine et autres nitrates étaient connus depuis longtemps. En 1978, le groupe du Dr Murad a démontré qu'un produit de dégradation très instable, le $\text{NO}\cdot$, était capable d'activer la guanylyl-cyclase soluble dans les CMLV (Murad *et al.*, 1978). Le Dr Furchgott a proposé en 1980 que la relaxation des vaisseaux sanguins nécessitait un facteur de régulation qui a été nommé EDRF pour *endothelial derived relaxation factor* (Furchgott et Zawadzki, 1980). C'est finalement en 1986 que les groupes des Drs Furchgott et Ignarro ont indépendamment proposé à une conférence internationale que le EDRF était réellement le $\text{NO}\cdot$ (Furchgott, 2005).

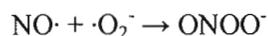
1.5.2 Les propriétés chimiques du $\text{NO}\cdot$

Le $\text{NO}\cdot$ est un radical libre qui peut participer à une panoplie de réactions biochimiques. En comparaison avec d'autres radicaux libres, le $\text{NO}\cdot$ a tout de même une réactivité limitée et est capable de diffuser sur de plus longues distances, jusqu'à quelques microns, avant de s'engager dans une réaction. Sa demi-vie *in vivo* est d'environ 10 secondes. À température ambiante, le $\text{NO}\cdot$ est un gaz incolore de solubilité comparable à celle de l'oxygène dans les solutions aqueuses (Moncada *et al.*, 1991). Plusieurs formes de l'oxyde d'azote peuvent être

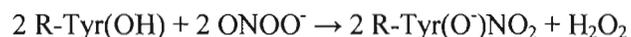
retrouvées dans les systèmes aqueux, dont le cation nitrosonium (NO^+) généré par oxydation ou l'anion nitroxyl (NO^-) généré par réduction :



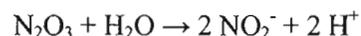
Comme il a été mentionné précédemment, le $\text{NO}\cdot$ peut réagir avec le $\cdot\text{O}_2^-$ pour former le ONOO^- . Le ONOO^- est une espèce relativement stable en milieu alcalin. En milieu acide, la protonation favorise l'isomérisation de la molécule en nitrate (NO_3^-) :



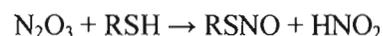
Le ONOO^- peut oxyder plusieurs molécules biologiques, dont l'acide aminé tyrosine, et peut ainsi former des groupements nitrotyrosine sur des protéines ou des peptides :



De plus, le $\text{NO}\cdot$ réagit facilement avec l'oxygène pour former du dioxyde d'azote (NO_2). Le NO_2 se décompose rapidement en un intermédiaire N_2O_3 qui réagit avec l'eau pour former le nitrite (NO_2^-), le produit d'oxydation final :



Les dérivés oxydés du $\text{NO}\cdot$, comme le trioxyde d'azote (N_2O_3), ont aussi la capacité de réagir avec les thiols (RSH) et de former des S-nitrosothiols (RSNO) :



L'intermédiaire N_2O_3 est donc capable de former des NO_2^- ou des RSNO , selon qu'il réagisse avec de l'eau ou des thiols (Loscalzo et Vita, 2000). La réaction de S-nitrosation est favorisée dans le milieu intracellulaire où la grande concentration de GSH (de l'ordre du millimolaire), lui permet de réagir avec le N_2O_3 de 5 à 10 fois plus rapidement que l'eau, pour former du GSNO (Kharitonov *et al.*, 1995). La réaction de trans-S-nitrosation est le transfert du $\text{NO}\cdot$ d'un thiol à l'autre, par exemple du GSH à l'albumine sérique. Cette dernière peut être S-nitrosée sur sa cystéine libre (cys 83). L'albumine et les autres protéines et thiols S-nitrosés jouent un rôle de réserve et de transport du $\text{NO}\cdot$ important pour son action biologique. La S-nitrosation des protéines est aussi, dans certains cas, considérée comme une

modification post-traductionnelle puisqu'elle peut modifier leur fonction et leurs effets biologiques (Loscalzo et Vita, 2000).

Les termes « nitrosation » et « nitrosylation » sont souvent employés indifféremment même si, du point de vue chimique, leur signification est différente. La « nitrosation » est définie comme l'incorporation covalente du groupement nitroso (NO) tandis que le terme « nitrosylation » désigne l'addition du groupement nitrosyl (NO), un groupement qui, s'il serait libre, serait radicalaire. Bien que dans le cas de l'oxyde nitrique les deux groupements soient identiques, certains auteurs utilisent le terme « nitrosylation » pour distinguer l'incorporation du radical $\cdot\text{NO}$ à un métal par un lien de coordination. Dans tous les cas, l'addition d'une portion NO à un thiol peut être clairement indiquée par le préfixe « S- », en référence à l'atome de soufre participant au lien S-NO. Le terme « S-nitrosation » sera utilisé dans ce travail puisque la réaction en question implique une liaison covalente. En effet, le N_2O_3 , qui est considéré comme l'espèce dérivée du $\text{NO}\cdot$ ayant le plus grand potentiel nitrosant, agit par la génération du cation nitrosonium (NO^+). Le N_2O_3 se dissocie partiellement en $[\text{ON-NO}_2]^+$ et favorise ainsi la réaction de la portion NO^+ avec l'atome de soufre nucléophile (Martínez-Ruiz et Lamas, 2004). Le transfert du NO^+ se produit aussi dans les réactions de trans-S-nitrosation (Hogg, 1999).

1.5.3 La biosynthèse du $\text{NO}\cdot$

Le $\text{NO}\cdot$ est produit par les NO-synthases (NOS), des enzymes homodimériques. Celles-ci oxydent l'un des deux atomes d'azote de la chaîne latérale de l'acide aminé L-arginine et forment le $\text{NO}\cdot$ et la L-citrulline (figure 1.4). La réaction implique la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et l'oxygène moléculaire (O_2) comme cosubstrats, en plus des flavines adénine dinucléotide (FAD) et mononucléotide (FMN) et de la tétrahydrobioptérine (BH4) comme cofacteurs.

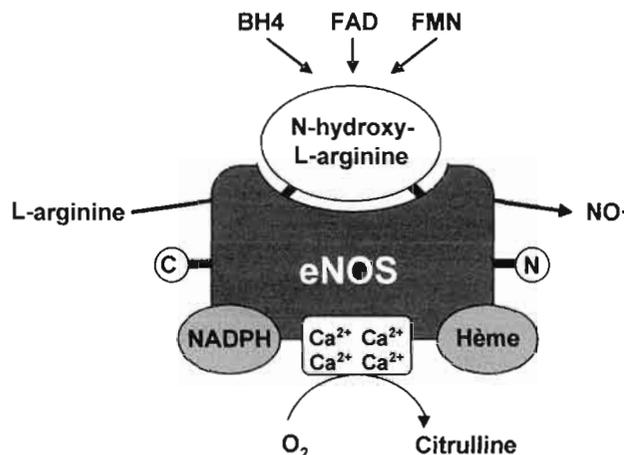


Figure 1.4 Biosynthèse du NO• par une NOS. Les électrons sont donnés par le NADPH au domaine réductase (terminaison-C) de l'enzyme. La liaison de la calmoduline chargée en Ca²⁺ permet le transport de ces électrons jusqu'au groupement hème situé dans le domaine oxygénase (terminaison-N) de l'enzyme. Celui-ci active alors l'O₂. Il en résulte l'oxydation successive de la L-arginine en N-hydroxy-L-arginine, puis en citrulline avec libération de NO•. Les cofacteurs BH4, FMN et FAD sont aussi requis (d'après Acosta *et al.*, 2006).

Les NOS ont été retrouvées dans de nombreux tissus et trois isoformes ont été identifiées. La nomenclature de ces isoformes est basée sur le tissu à partir duquel a été fait leur isolement initial. La nNOS, la iNOS et la eNOS ont donc été isolées dans du tissu neuronal, des macrophages immunoactivés et des cellules endothéliales, respectivement. Leur nomenclature officielle, correspondant à celle de leurs gènes, est NOS1, NOS2 et NOS3, respectivement (Loscalzo et Vita, 2000). Chez l'humain, la similarité entre leurs séquences d'acides aminés est d'environ 50-55% et leur structure génomique est très semblable, suggérant une origine ancestrale commune. La régulation de leur transcription et la spécificité tissulaire de leur expression sont toutefois très différentes. Les trois enzymes sont activées par la liaison de la protéine régulatrice calmoduline, elle-même devant être activée par la liaison de Ca²⁺. Mais tandis que la nNOS et la eNOS ne lient la calmoduline qu'une fois cette dernière chargée en Ca²⁺, la iNOS lie la calmoduline avec une haute affinité, même à de très faibles concentrations de Ca²⁺. Ainsi, contrairement aux autres isoformes, l'activité de la iNOS est indépendante de la concentration intracellulaire de Ca²⁺, et directement reliée à son niveau d'expression. Cette NOS est d'ailleurs généralement exprimée de façon

inductible alors que la nNOS et la eNOS sont généralement exprimées constitutivement (Nathan et Xie, 1994).

1.6 L'action biologique du NO· sur les différents types cellulaires

Les cellules endothéliales sont responsables de la majorité de la production de NO· dans les vaisseaux sanguins. Elles le produisent principalement par la eNOS et le relâchent en réponse à des stimuli vasodilatateurs comme l'acétylcholine ou le stress de tension. Le NO· diffuse ensuite de l'endothélium aux tissus adjacents. Le plus souvent, il active la guanylate cyclase soluble, en se liant à son groupement hème, et permet la synthèse de guanosine monophosphate cyclique (cGMP). Le cGMP est considéré comme le second messager du NO· puisqu'il agit comme un intermédiaire dans plusieurs de ses voies de signalisation. Les nombreux effets du NO· sur les cellules sont très variés et spécifiques aux types cellulaires.

Ces effets sont étudiés en agissant sur l'activité des NOS ou en générant du NO· dans le sang, le tampon de perfusion ou le milieu de culture. Outre le NO· gazeux, on peut utiliser pour générer du NO· des nitrites, des donneurs sulfhydryls (GSNO, SNAP), dans lesquels une cystéine est S-nitrosée et des donneurs non sulfhydryls, comme les NONOates. Cette dernière famille de molécules a la particularité de générer deux équivalents de NO· et de les relâcher d'une manière contrôlée.

1.6.1 Le NO· dans les muscles lisses vasculaires

Les CMLV ont été considérées comme la cible typique du NO· depuis l'identification du EDRF, son principal effet étant, bien entendu, la relaxation. Les mécanismes de transduction du signal aboutissant à la vasorelaxation sont divers. Le NO· permet d'abord la réduction du niveau de calcium intracellulaire. De façon indirecte, il active les calcium-ATPases qui transportent le Ca^{2+} à l'extérieur de la cellule ou le séquestrent à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique. Il inhibe aussi les canaux calciques voltage-dépendants de type L qui font entrer le Ca^{2+} dans la cellule et la phospholipase C qui permet sa libération du réticulum sarcoplasmique. Ces changements ont pour effet de diminuer l'activation de certaines protéines contractiles dépendantes de la calmoduline/ Ca^{2+} , comme la myosine.

L'hyperpolarisation membranaire causée par une stimulation des canaux potassiques calcium-dépendants (Bolotina *et al.*, 1994) et voltage-dépendants (Carrier *et al.*, 1997) est un autre mécanisme par lequel le NO \cdot provoque la relaxation des muscles lisses. Plusieurs des mécanismes qui ont été mentionnés requièrent une activation directe de la kinase cGMP-dépendante (PKG) par le NO \cdot .

Le NO \cdot a également un effet inhibiteur sur la prolifération des CMLV. Cette inhibition de la prolifération n'est pas reliée à des dommages cellulaires ni à une dégradation des facteurs de croissance, mais bien à un arrêt du cycle cellulaire par une élévation du niveau de cGMP (Garg et Hassid, 1989). D'autres mécanismes indépendants du cGMP ont aussi été démontrés, impliquant une inhibition par S-nitrosation de la ribonucléotide-réductase (Guittet *et al.*, 1998), du récepteur du facteur de croissance endothélial (EGF) ou d'un des facteurs de régulation de ce récepteur (Estrada *et al.*, 1997).

Une induction de l'apoptose, spécifique aux cellules de muscle lisse, par de grandes concentrations de NO \cdot a été rapportée. Cet effet ne requiert pas la participation de cGMP/PKG (Nishio *et al.*, 1996). Il peut être en partie causé par la dégradation protéolytique de la glyceraldehyde-3-phosphate-déshydrogénase (GAPDH) initiée par une S-nitrosation (Mohr *et al.*, 1996). Une autre cause critique est la S-nitrosation du glutathion qui abaisse l'état redox des thiols cellulaires et induit une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique p53 (Zhao *et al.*, 1997).

1.6.2 Le NO \cdot dans les cellules endothéliales

Certaines voies de régulation du tonus des muscles lisses débutent par une action du NO \cdot sur les cellules endothéliales. Par exemple, le NO \cdot module la libération de facteurs endothéliaux comme l'endothéline-1, le principal peptide responsable de la contraction des CMLV (Kuchan et Frangos, 1993), et les prostacyclines vasodilatatrices (Sievi *et al.*, 1997). Le NO \cdot a également une importance critique pour le maintien de la barrière endothéliale. Il contrevient à l'augmentation de la perméabilité endothéliale par la thrombine (Draijer *et al.*, 1995) ou module celle induite par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF; Wu *et al.*, 1996). Il est aussi impliqué dans l'action de la phosphoprotéine

stimulatrice de vasodilatation (VASP; Haffner *et al.*, 1995). De plus, en absence de stimuli vasoactifs, le NO· induit une augmentation du largage de Ca²⁺ par le réticulum endoplasmique, probablement par une réaction de nitrosation (Volk *et al.*, 1997). Cette dernière action du NO· dans les cellules endothéliales est à l'opposé de l'effet provoqué dans les CMLV.

De plus, contrairement aux CMLV, les cellules endothéliales voient leur croissance stimulée et leur apoptose inhibée par le NO·. La stimulation de la croissance et de la migration par le VEGF et l'interleukine-1 (IL-1), qui peut être observée *in vivo* durant l'angiogenèse et la cicatrisation de blessures, nécessitent la production de NO· (Papapetropoulos *et al.*, 1997; Noiri *et al.*, 1997). Il a aussi été rapporté que la suppression de l'apoptose des cellules endothéliales par un stress de tension était dépendante du NO·. L'effet antiapoptotique de celui-ci serait vraisemblablement dû à une inhibition de protéases à cystéine, comme les caspases, par S-nitrosation (Dimmeler *et al.*, 1997a).

1.6.3 Le NO· dans le système neurologique cardiaque

Le NO· est un important modulateur de la signalisation neuronale cardiaque. Ses mécanismes d'action sont divers et peuvent même conduire à des actions opposées dans différents sites. La source du NO· (isoforme de la NOS), sa proximité spatiale avec la cible et d'autres facteurs intracellulaires pourraient influencer l'effet final (Paton *et al.*, 2002). Parmi les différentes actions du NO·, une facilitation de la signalisation cardiaque parasympathique couplée à une limitation de l'excitabilité sympathique a été montrée par plusieurs études (Ashley *et al.*, 2002; Elvan *et al.*, 1997). Le NO· serait un modulateur pré-synaptique qui inhibe la neurotransmission sympathique. Il pourrait, de cette façon, altérer la balance sympathovagale en faveur d'états anti-arythmiques (Danson *et al.*, 2005).

1.6.4 Le NO· dans les cardiomyocytes

L'effet le plus important du NO· sur les cardiomyocytes est sans doute son effet inotropique négatif impliqué dans la réponse aux récepteurs muscariniques et dans l'atténuation de la stimulation β -adrénergique (Sterin-Borda *et al.*, 1995; 1998). Le NO· diminue la contraction, la fréquence de battement et la concentration de Ca²⁺ cytosolique

maximale dans les cardiomyocytes. Tout comme dans les CMLV, ces effets dépendent du cGMP. Celui-ci permet l'augmentation de la concentration de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP), en inhibant les phosphodiésterases qui le dégradent. Les canaux calciques de la membrane plasmique sont régulés par le NO \cdot . Différents mécanismes sont possibles, selon l'abondance du NO \cdot et du \cdot O $_2^-$ (qui génèrent le ONOO \cdot) et les types de phosphodiésterases exprimées (Méry *et al.*, 1993). Finalement, l'activation de certains canaux calciques par une S-nitrosation, indépendamment du cGMP, a aussi été établie (Xu *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1996).

1.7 Les rôles du NO \cdot dans les maladies cardiovasculaires

1.7.1 La production de NO \cdot durant l'ischémie-reperfusion

Il est maintenant connu que toutes les cellules cardiaques, incluant les cardiomyocytes, sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires en réponse au stress (Kapadia *et al.*, 1995). Des niveaux élevés sont produits dans des conditions d'ischémie-reperfusion. Les cytokines joueraient un rôle cytoprotecteur en faisant augmenter les niveaux de différentes protéines protectrices dans le cœur, dont les NOS. Il est toutefois possible que la surexpression des cytokines permette la progression de l'infarctus (Mehra *et al.*, 2005). L'infarctus du myocarde est accompagné d'une élévation du NO \cdot et de ses dérivés dans le sang périphérique. Cela est principalement dû à l'induction de l'expression de la iNOS dans les macrophages durant la phase inflammatoire. La iNOS peut aussi être induite dans les cardiomyocytes, quoique dans une moindre mesure (Akiyama *et al.*, 1998).

En conditions physiologiques, l'ion nitrite NO $_2^-$ était considéré comme un produit du NO \cdot métaboliquement inerte ayant une activité biologique intrinsèque limitée. Toutefois, nous savons maintenant que le NO $_2^-$ peut être réduit en NO \cdot par la désoxyhémoglobine, ce qui en fait une réserve de NO \cdot biodisponible majeure (Cosby *et al.*, 2003). L'action nitrite-réductase de la désoxyhémoglobine est contrôlée par le gradient d'oxygène et par le pH. La réduction de l'apport d'oxygène et du pH durant l'ischémie permettent donc la libération du NO \cdot de cette réserve (Duranski *et al.*, 2005). De plus, la xanthine-oxydoréductase, une enzyme endothéliale dont l'expression est accrue durant l'hypoxie et les maladies

cardiovasculaires, est également capable de convertir le NO_2^- en $\text{NO}\cdot$. Cette activité a montré un potentiel protecteur contre les dommages induits au cœur par une ischémie-reperfusion (Webb *et al.*, 2004). Ainsi, des mécanismes en place dans le cœur permettent une abondante production de $\text{NO}\cdot$ durant l'ischémie/reperfusion.

1.7.2 Les effets cytoprotecteurs du $\text{NO}\cdot$

Plusieurs effets cytoprotecteurs du $\text{NO}\cdot$ ont été démontrés, et ceux-ci impliquent de faibles concentrations de cette molécule (nanomolaires ou faibles micromolaires). Par exemple, le myocarde de souris transgéniques surexprimant le gène de la eNOS subissait des dommages moins étendus suite à une ischémie-reperfusion que celui de type sauvage (Jones *et al.*, 2004). Le $\text{NO}\cdot$ agirait de différentes manières. Ses propriétés vasodilatatrices et antiplaquettaires (Lieberman *et al.*, 1991) favorisent la circulation du sang en cas d'obstruction. Le $\text{NO}\cdot$ limite aussi les effets délétères du stress oxydatif sur les lipides, par exemple en inhibant la lipoxigénase par réduction de la forme ferrique (Fe^{3+}) active de l'enzyme en sa forme ferreuse (Fe^{2+}) inactive (Kanner *et al.*, 1992).

Le $\text{NO}\cdot$ est également capable de réduire la fibrose interstitielle cardiaque. Les fibroblastes cardiaques sont les principales cellules qui produisent et maintiennent la matrice extracellulaire du cœur. Dans des conditions pathologiques comme le remodelage ventriculaire suite à un infarctus du myocarde, ils peuvent être responsables d'une fibrose cardiaque. Leur prolifération et leur dépôt de protéines matricielles, en particulier du collagène, peuvent devenir excessifs et affecter la performance du cœur. L'angiotensine II (AngII) est un peptide vasoconstricteur impliqué dans la pathogénèse de la fibrose cardiaque. Le $\text{NO}\cdot$ modulerait cette action de l'AngII en interférant dans le cycle cellulaire, de façon à réduire la mitose et, de ce fait, la fibrose (Takizawa *et al.*, 1997).

Le $\text{NO}\cdot$ a de plus une action antiapoptotique directe dans une variété de types cellulaires et de tissus. Des mécanismes de protection impliquant la cGMP (Liu et Stamler, 1999) ou la terminaison de la chaîne de peroxydation des lipides ont été proposés (Hogg *et al.*, 1995). Un grand intérêt a également été porté à l'action du $\text{NO}\cdot$ sur les caspases. Des tests enzymatiques ont montré que leur activité est inhibée par une S-nitrosation du site actif, et

que cette activité peut être rétablie par un excès d'équivalents réducteurs (Rössig *et al.*, 1999). On a rapporté un effet protecteur du NO \cdot par ce mécanisme dans plusieurs types cellulaires (Liu et Stamler, 1999). Plus particulièrement, le NO \cdot inhibe l'apoptose des cardiomyocytes par la suppression de l'activité de la caspase-3 (Maejima *et al.*, 2005).

On peut facilement comprendre que plusieurs études arrivent à la conclusion que le NO \cdot représente un outil thérapeutique prometteur pour atténuer les conséquences de l'ischémie-reperfusion, par la réduction de la taille de l'infarctus et par le maintien de la fonction cardiaque. Il faut toutefois demeurer prudent quant aux effets néfastes possibles de ce genre de traitement considérant les effets cytotoxiques potentiels du NO \cdot .

1.7.3 La cytotoxicité du NO \cdot

Des données contradictoires au sujet des propriétés protectrices/toxiques du NO \cdot ont été rapportées. De hauts niveaux, non physiologiques, de NO \cdot (micromolaires élevés ou millimolaires) provoquent la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. De telles concentrations et de tels effets peuvent être produits par la iNOS dans des conditions pathologiques (Dimmeler et Zeiher, 1997b). À l'opposé de résultats qui ont été mentionnés précédemment (Jones *et al.*, 2004), une étude sur des cœurs isolés de souris *knockout* pour le gène de la eNOS a montré que cette isoforme contribuait aussi aux dommages fonctionnels et métaboliques dus à l'ischémie/reperfusion, vraisemblablement par la formation de ONOO \cdot (Flögel *et al.*, 1999). La perfusion de cœurs de lapin avec un inhibiteur des NOS, le L-NAME, ou avec leur substrat, la L-arginine a également montré que l'inhibition de la synthèse de NO \cdot procurait une meilleure protection contre l'ischémie/reperfusion que la stimulation de la synthèse (Schulz et Wambolt, 1995). Le NO \cdot peut aussi déclencher l'apoptose par l'inhibition de la respiration mitochondriale en affectant le potentiel membranaire, les pores de transition de perméabilité et la relâche du cytochrome *c* (Moncada et Erusalimsky, 2002). Il apparaît donc que certains paramètres comme la dose, la source et la durée de l'exposition au NO \cdot sont critiques pour l'effet final cytoprotecteur ou cytotoxique du NO \cdot .

1.7.4 Les effets du NO \cdot sur la toxicité du H $_2$ O $_2$

Le H $_2$ O $_2$ et le NO \cdot sont deux EOR produites dans le cœur durant des réactions d'inflammation et de reperfusion. Un effet coopératif menant à des dommages cellulaires a été décrit dans plusieurs types de cellules, dont des cardiomyocytes et des cellules endothéliales (Volk *et al.*, 1995; Rabkin et Kong, 2000). Une étude récente a montré que le NO \cdot , à haute concentration, inhibe la dégradation du H $_2$ O $_2$ en inactivant la catalase et la glutathion-réductase (Rauen *et al.*, 2007a). Cependant, de nombreuses études ont aussi décrit un effet cytoprotecteur du NO \cdot contre le H $_2$ O $_2$ (Kim *et al.*, 2004; Cottart *et al.*, 2003; Takuma *et al.*, 2002). Un des effets protecteurs du NO \cdot les plus probables est l'inhibition de la peroxydation des lipides initiée par la formation du \cdot OH. Étant lui-même un radical présent dans la phase lipidique de la membrane cellulaire, il peut très bien se combiner avec les intermédiaires radicalaires et ainsi interrompre la chaîne de réaction (Kelley *et al.*, 1999). Le NO \cdot inhibe également l'une des voies de l'apoptose induite par le H $_2$ O $_2$ et le récepteur de la transferrine (Kotamraju *et al.*, 2003). La différence dans les effets observés dépend, bien sûr, du type cellulaire, mais aussi des conditions expérimentales comme les concentrations des espèces réactives utilisées. Il a d'ailleurs été démontré que l'effet protecteur sur des cellules endothéliales est prédominant à de faibles concentrations de NO \cdot et de fortes concentrations de H $_2$ O $_2$, et que la toxicité était aggravée avec beaucoup de NO \cdot et peu de H $_2$ O $_2$ (Rauen *et al.*, 2007b).

1.8 Aspects généraux de la CP

1.8.1 La biosynthèse de la CP

La céruloplasmine (CP) est une glycoprotéine oxydasique à cuivre abondante dans le sang. Elle est connue depuis 1948 (Holmberg et Laurell, 1948), mais ses propriétés sont toujours étudiées et certaines demeurent incomprises. Elle est synthétisée en majeure partie par le foie, d'abord sous forme d'apo-CP. Elle gagne la circulation sanguine sous sa forme holo, c'est-à-dire après avoir été chargée en cuivre. Plusieurs autres tissus ont également montré une capacité de synthèse de la CP, dont les leucocytes (Yang *et al.*, 1986), des lignées cellulaires du cancer du côlon et du sein (Kunapuli *et al.*, 1987), le placenta, les testicules (Aldred *et al.*, 1987), les glandes mammaires (Jaeger *et al.*, 1991), les poumons (Fleming *et*

al., 1991) et les reins (Linder *et al.*, 1998). Une forme de CP liée à la membrane plasmique par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) a aussi été identifiée au niveau des testicules, dans les cellules de Sertoli (Fortna *et al.*, 1999) et, au niveau du tissu cérébral, dans les astrocytes (Patel et David, 1997).

La concentration de la CP sérique varie normalement autour de 150 à 300 µg/mL. Plusieurs facteurs sont toutefois susceptibles d'influencer ces niveaux. Une augmentation des niveaux de CP a par exemple été mesurée durant la phase aiguë de la réponse inflammatoire, la grossesse, l'infarctus du myocarde, l'hyperthyroïdie, une déficience en fer et certains types de cancer (Cousins, 1985; Adelstein *et al.*, 1956). En conditions inflammatoires, comme dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, sa concentration peut atteindre jusqu'à 900 µg/mL (Louro *et al.*, 2000). Des études *in vitro* ont démontré que l'adrénaline pouvait aussi augmenter la biosynthèse de la CP (Evans, 1973).

1.8.2 La structure de la CP

La CP fait partie de la famille des métalloprotéines à cuivre bleu, qui comprend aussi la laccase et l'ascorbate oxydase (Messerschmidt et Huber, 1990). Ces protéines ont une activité enzymatique qui permet l'oxydation de différents substrats couplée à la formation d'une molécule d'eau. Les homologies au niveau de leurs séquences peptidiques suggèrent qu'elles ont évolué d'un ancêtre commun (Dwulet et Putnam, 1981; Rydén, 1988).

Chez l'humain, la CP sérique est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 1046 acides aminés (figure 1.5). Le degré de conservation de cette séquence est très élevé parmi les différentes espèces animales (Calabrese *et al.*, 1983; Lockart et Mercer, 1999). La séquence d'acides aminés de la CP est sous-divisée en trois segments (U1 à U3) homologues à 30 % et formés de deux domaines chacun, pour un total de six domaines (D1 à D6). La protéine contient 6 atomes de cuivre intégraux de différents types de coordination, déterminés d'après les acides aminés auxquels ils sont coordonnés. Comme l'illustre la figure 1.5, trois atomes de cuivre de type I sont situés dans les domaines 2, 4 et 6. Ces atomes sont responsables de la couleur bleu ciel caractéristique de la CP puisqu'ils absorbent dans les longueurs d'onde de 610 nm (Fox *et al.*, 1995). Trois atomes de cuivre de type II et III sont

aussi présents à la jonction des domaines 1 et 6. La structure de la CP comporte de plus deux sites de liaison pour des atomes de cuivre labiles, dans les domaines 3 et 6 (Zaitsev *et al.*, 1999).

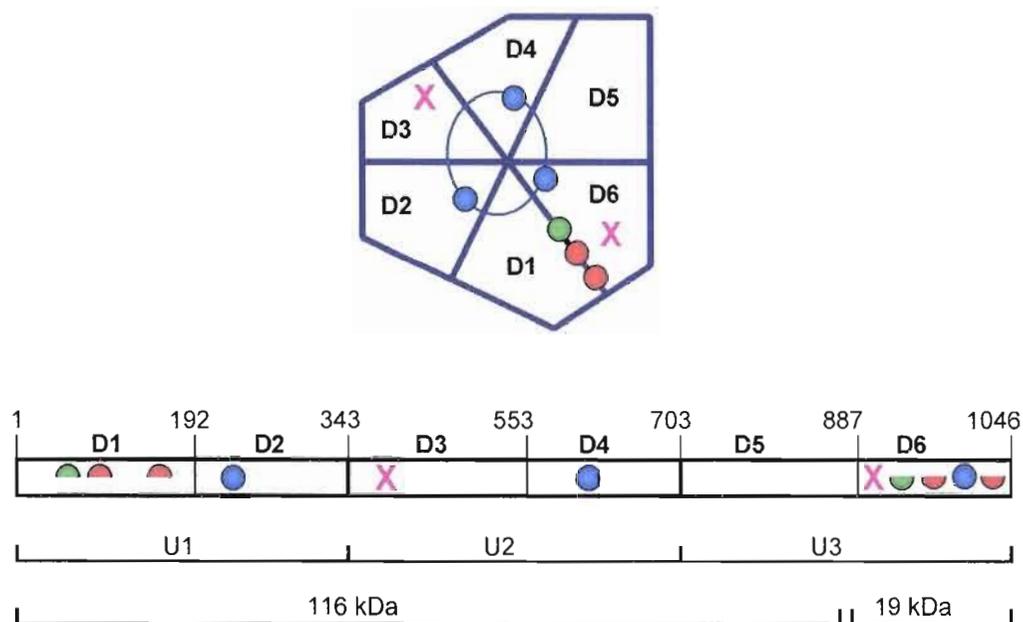


Figure 1.5 Représentation schématique de la structure de la CP. L'arrangement des six domaines (D1-D6) de la CP est illustré de façon spatiale (en haut) et linéaire (en bas). Sont aussi montrés les unités homologues (U1-U3), et le patron de fragmentation le plus fréquent (116 et 19 kDa). Les sites liant les atomes de cuivre intégraux de type I, II et III sont représentés par des ronds bleu, vert et rouge, respectivement. Ceux pour les atomes de cuivre labiles sont représentés par la marque X (d'après Takahashi *et al.*, 1984; Zaitseva *et al.*, 1996; Mukhopadhyay *et al.*, 1997).

La conformation tridimensionnelle de la CP (fig. 1.6), de type α -2-globuline, est préservée par 5 ponts disulfure (Takahashi *et al.*, 1984). Son poids moléculaire approximatif déterminé par électrophorèse est de 132 kDa, quoiqu'une étude récente par spectrométrie de masse MALDI-TOF l'ait établi à 125 kDa chez le boeuf et à 129 kDa chez l'humain (Boivin *et al.*, 2001). Certaines préparations peuvent également révéler deux fragments de 110-116 kDa et 16-20 kDa à l'électrophorèse. Une métalloprotéase, pouvant parfois être co-purifiée avec la CP, serait la cause du clivage (Fox *et al.*, 1995). Finalement, une glycosylation

assureraient une longue durée de vie en circulation (Morell *et al.*, 1968), sans toutefois être nécessaire à son activité enzymatique (Aouffen *et al.*, 2001).

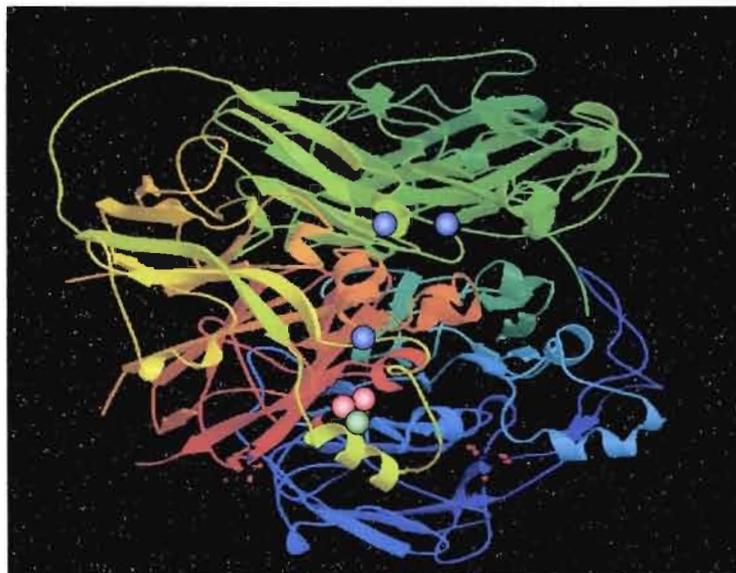


Figure 1.6 Représentation tridimensionnelle de la CP par cristallographie à rayons X. Les six atomes de cuivre constitutifs de type I, II et III sont représentés en bleu, en vert ou en rouge, respectivement (modifié de Zaitsev *et al.*, 1999).

La forme ancrée (GPI) de la CP retrouvée dans les testicules et le cerveau est immunologiquement presque identique à la forme sérique. La différence provient d'un épissage alternatif de l'ARNm qui substitue les cinq acides aminés C-terminaux de la protéine par une séquence de 30 acides aminés hydrophobes (figure 1.7). Cette séquence constitue à la fois le signal et le site d'addition du groupement GPI (Patel *et al.*, 2000).

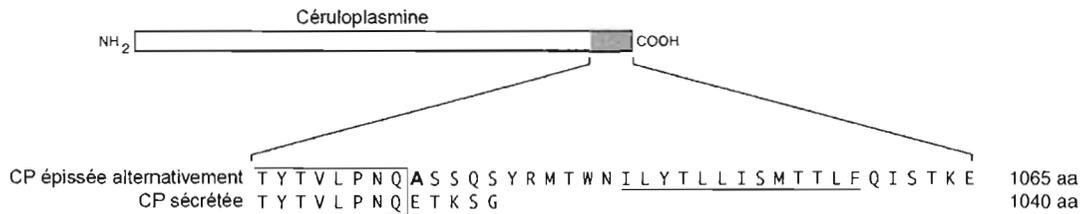


Figure 1.7 Représentation schématique de la séquence C-terminale de la CP selon le patron d'épissage. Les formes sécrétée et alternativement épissée possèdent 8 acides aminés finaux communs (encadrés). Les cinq acides aminés C-terminaux de la forme sécrétée sont remplacés, dans la forme épissée, par une séquence de 30 acides aminés dont une portion hydrophobe (soulignée) constitue le signal pour l'addition de l'ancre GPI (d'après Patel *et al.*, 2000).

1.8.3 Le catabolisme de la CP

La durée de vie de la CP circulante varie selon les espèces, sa demi-vie étant de 5 jours chez l'humain, de 12 heures chez le rat et de 54 heures chez le lapin. C'est essentiellement par le foie que la CP plasmatique est éliminée. Pour être catabolisée, elle se lie d'abord à des récepteurs spécifiques de l'endothélium hépatique, puis est internalisée et excrétée du côté des hépatocytes. Ceux-ci la reconnaissent et la dégradent dans les lysosomes par un mécanisme impliquant des récepteurs des asialoglycoprotéines (Omoto et Tavassoli, 1990). Lorsque la protéine est dégradée, les atomes de cuivre demeurent liés à des peptides qui seront éliminés par les voies biliaires sans être absorbés par l'intestin (Mallet *et al.*, 1982). Le mécanisme du catabolisme de la CP ancrée n'est toutefois pas connu.

1.9 Les fonctions de la CP

Si la CP est généralement connue pour ses fonctions de transporteur de cuivre et d'enzyme ferroxidasique, de nombreuses autres implications physiologiques font d'elle une protéine multifonctionnelle. Des rôles ont été proposés en tenant compte des conditions qui stimulent sa biosynthèse ou de nouvelles activités mises en évidence *in vitro*. Les mécanismes de certaines de ses fonctions demeurent inconnus et les nouvelles études sont souvent contradictoires.

1.9.1 Transport du cuivre

Le cuivre est un oligoélément essentiel à plusieurs systèmes enzymatiques et biologiques comme l'érythropoïèse, la maturation des leucocytes, la contractilité du myocarde, le transport du fer, le métabolisme du glucose et le développement du cerveau (Olivares et Uauy, 1996). Plus de 90 % du cuivre de la circulation est lié à la CP (Kim *et al.*, 2008). La CP joue donc un rôle important dans le transport et la distribution du cuivre aux tissus. Selon différentes hypothèses, le transfert du cuivre aux cellules pourrait se faire par liaison de la CP à la membrane cellulaire (Harris et Percival, 1989), ou encore par une internalisation de la CP chargée en cuivre par endocytose (Omoto et Tavassoli, 1990). Les sites de liaison pour des atomes de cuivre labiles pourraient aussi être impliqués dans la fonction de transporteur. Toutefois, des souris déficientes en CP n'ont pas montré de défaut d'absorption ou de distribution du cuivre, ce qui prouve que d'autres protéines et ligands liant le Cu facilitent sa distribution périphérique. La protéine membranaire Ctr1, par exemple, permet le transport du cuivre réduit à l'intérieur des cellules eucariotes de façon très spécifique (Kim *et al.*, 2008).

1.9.2 Activité ferroxidasique

Par son activité ferroxidasique, la CP (ferro-O₂-oxydoréductase, EC 1.16.3.1) joue un rôle important dans la défense antioxydante et dans le métabolisme du fer. La ferroxidation est l'oxydation de l'ion ferreux (Fe²⁺), très toxique, en ion ferrique (Fe³⁺). En absence de CP, l'oxydation du Fe²⁺ peut se faire par le H₂O₂. Cette réaction, nommée réaction de Fenton, est dommageable car elle produit le radical ·OH au fort potentiel oxydant. La réaction catalysée par la CP, au contraire, produit de l'eau au lieu du radical ·OH et est 10 à 20 fois plus rapide (Gutteridge, 1985). Elle est donc favorisée dans la compétition avec la réaction de Fenton (figure 1.8).

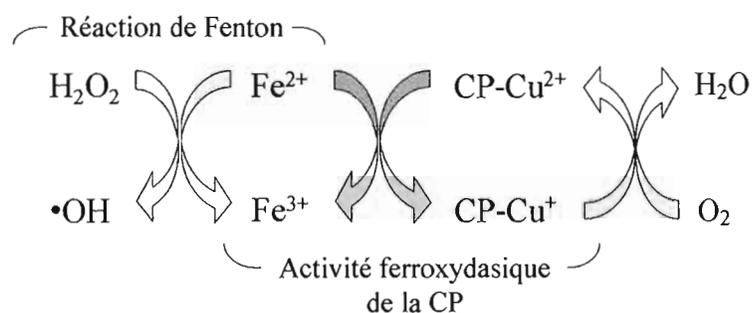


Figure 1.8 Activité ferroxidasique de la CP et compétition avec la réaction de Fenton. En oxydant le Fe^{2+} en Fe^{3+} , la CP réduit le pool de Fe^{2+} et empêche la formation de $\cdot\text{OH}$ par la réaction de Fenton.

La production de Fe^{3+} par la CP est également indispensable au métabolisme du fer, comme l'ont démontré des études récentes (Xu *et al.*, 2004; Ke *et al.*, 2006). Tout comme le cuivre, le fer est essentiel à plusieurs processus biologiques en tant que cofacteur de plusieurs enzymes dont l'hémoglobine, les cytochromes et la ribonucléotide-réductase. Il peut aussi être très toxique. Sous forme libre, il réagit avec l'oxygène moléculaire et produit des EOR comme les radicaux $\cdot\text{O}_2^-$ et $\cdot\text{OH}$. En cas d'accumulation, il peut causer des maladies neurodégénératives, de l'athérosclérose ou des cancers. Une régulation rigoureuse du métabolisme (transport, transfert, séquestration) du fer est donc nécessaire. En 1970, un mécanisme de libération du fer cellulaire impliquant la CP a été proposé. Selon ce mécanisme, le Fe^{2+} présenté à la surface des cellules doit être transformé en Fe^{3+} pour s'incorporer à l'apo-transferrine et former la (holo) transferrine. La CP, tout comme son homologue associée à la membrane des entérocytes du duodénum, l'hephaestine (Hudson *et al.*, 2008), seraient requises pour une transformation maximale (Roeser *et al.*, 1970). En favorisant le transfert du fer dans des protéines comme la transferrine, la CP éviterait les accumulations dommageables d'ions ferreux (Fe^{2+}) libres (Richardson, 1999). Une entrée du fer stimulée par l'activité ferroxidasique de la CP mais indépendante de la transferrine a aussi été démontrée (Mukhopadhyay *et al.*, 1998), et un mécanisme impliquant un transporteur spécifique aux cations trivalents a été proposé (Attieh *et al.*, 1999). Il a aussi été suggéré que la ferritine, une protéine responsable de l'entreposage du fer dans les cellules et dans la circulation, pouvait être chargée en fer par la CP (Van Eden et Aust, 2000).

1.9.3 Activité oxydasique

Outre le fer, plusieurs substrats sont oxydés par la CP, dont les diamines aromatiques, les catécholamines, les aminophénols, les phénothiazolines et les 5-hydroxyindoles. La p-phénylène diamine (pPD), une diamine aromatique, est d'ailleurs utilisée depuis longtemps pour le dosage de l'activité oxydasique *in vitro* (Fox, 2003). Contrairement aux oxydases classiques, la CP libère de l'eau plutôt que du H₂O₂ (figure 1.9).

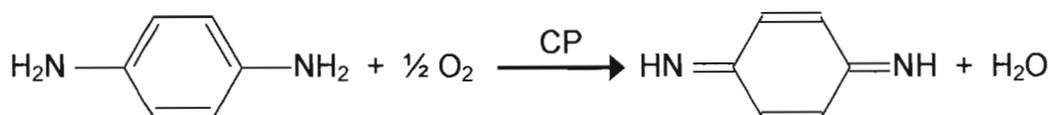


Figure 1.9 Exemple de réaction d'oxydation catalysée par la CP. La CP catalyse l'oxydation de substrat pPD, une diamine aromatique, et produit de l'eau.

La fonction oxydase de la CP lui conférerait un rôle régulateur de certaines amines biogènes comme des hormones et des neurotransmetteurs. En plus de son rôle connu dans la conversion oxydative de la dopamine en mélanine (Rosei et al., 1998), des études réalisées à l'aide de tranquillisants et d'antidépresseurs ont révélé un effet sur l'oxydation de différentes catécholamines (de Mol, 1985). Des sites de liaison potentiels pour ces amines biogènes ont d'ailleurs été identifiés à l'intérieur de la structure protéique de la CP (Zaitsev *et al.*, 1999). La présence de CP dans le cerveau appuie également l'hypothèse d'un rôle dans la régulation de la neurotransmission (Shepherd, 1994).

1.9.4 Propriétés antioxydantes

La CP est reconnue comme un antioxydant circulant très important. Sa compétition avec la réaction de Fenton qui réduit la production de $\cdot\text{OH}$ constitue un mécanisme important de l'action antioxydante (Yamashoji et Kajimoto, 1983). D'autres mécanismes ont été mis en évidence. Ainsi, la CP serait capable de prévenir l'oxydation des lipides en piégeant des EOR comme le $\cdot\text{O}_2^-$ (Goldstein *et al.*, 1979; Marklund, 1986) et le H₂O₂ (Calabrese et Carbonaro, 1986). Par rapport au H₂O₂, un mécanisme impliquant le glutathion sous sa forme réduite a été rapporté, dotant la CP d'une nouvelle activité glutathion peroxydase (Park *et al.*, 1999). La participation du cuivre dans l'activité antioxydante de la CP a été démontrée

(Al-Timimi et Dormandy, 1977). Par contre, une autre étude a montré que le piégeage de plusieurs EOR (radicaux peroxy, $\cdot\text{O}_2^-$ et $\cdot\text{OH}$) par la CP est plus efficace lorsque celle-ci est dénaturée à la chaleur, suggérant une intervention non catalytique (Atanasiu *et al.*, 1998).

Grâce à ses propriétés antioxydantes, la CP joue un rôle critique dans l'inflammation et est même considérée comme une protéine de phase aiguë. Elle est l'un des antioxydants majeurs durant le syndrome de détresse respiratoire adulte, une maladie caractérisée par l'inflammation des poumons (Lykens *et al.*, 1992). Cette fonction pourrait expliquer l'augmentation du contenu en ARNm de la CP dans le tissu pulmonaire suite à une inflammation ou une hyperoxie (Fleming *et al.*, 1991). Des données très récentes ont confirmé l'effet neuroprotecteur de la CP en contexte inflammatoire. Les auteurs ont attribué la protection à une stimulation de la production de molécules pro-inflammatoires par les microglies (Lee *et al.*, 2007) ou à un contrôle de l'homéostasie du fer qui devient critique pour des cellules rendues plus vulnérables (Glezer *et al.*, 2007). Il a d'ailleurs été démontré qu'une plus grande sensibilité au H_2O_2 des neurones de souris CP $-/-$ était corrélée à un plus grand ratio $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, ce qui suggère que la CP protégerait le système nerveux central par son activité ferroxidasique (Patel *et al.*, 2002).

Des données contradictoires attribuent aussi une action pro-oxydante à la CP. Il a été démontré que la CP sécrétée par les cellules monocytiques activées contribue à l'oxydation des lipides. Des facteurs cellulaires, incluant possiblement des EOR, agissent de façon synergique avec la CP et sont essentiels à son activité pro-oxydante (Ehrenwald et Fox, 1996). Le $\cdot\text{O}_2^-$ a par la suite été identifié comme responsable de la production de radicaux libres par le cuivre de la CP (Mukhopadhyay *et al.*, 1996). La même équipe de chercheurs a aussi proposé que l'intégrité structurale est nécessaire à cette activité, mais qu'un atome de cuivre labile et non un atome constitutif serait impliqué dans le mécanisme pro-oxydant (Mukhopadhyay *et al.*, 1997).

1.9.5 Rôles dans le système cardiovasculaire

La première observation d'une augmentation des niveaux de CP sérique dans des conditions de maladies cardiovasculaires remonte aux années 50 et concernait l'infarctus du

myocarde (Adelstein *et al.*, 1956). Depuis, des augmentations de CP sanguine ont été corrélées à différents désordres cardiovasculaires comme l'artériosclérose (Bustamante *et al.*, 1976) et l'angine (Jayakumari *et al.*, 1992). Il est difficile de déterminer si ces observations s'expliquent par la réponse inflammatoire qui accompagne ces maladies. Toutefois, des études de contrôle de cas ont montré qu'une élévation plasmatique de la CP est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires (Reunanen *et al.*, 1992; Mänttari *et al.*, 1994). L'activité pro-oxydante assistée par des EOR dérivées des cellules vasculaires (cellules endothéliales, CMLV, macrophages) pourrait en être la cause (Mukhopadyay *et al.*, 1996).

Malgré tout, l'implication de la CP dans les dommages au cœur n'est pas établie. L'augmentation des niveaux de CP pourrait être interprétée comme une mesure de protection mise en place par l'organisme. Des études ont soulevé la possibilité que les propriétés antioxydantes de la CP seraient bénéfiques dans les cas de maladies cardiovasculaires. L'équipe du Dr Mateescu a montré que la perfusion de cœurs de rat isolés avec la CP pouvait avoir différents effets protecteurs. L'administration de CP réduit notamment les effets délétères des ERO produits par l'électrolyse du tampon de perfusion sur la pression ventriculaire gauche et diastolique, un indice d'insuffisance cardiaque. Les auteurs ont aussi suggéré une réduction des dommages causés aux terminaisons nerveuses sympathiques lors de ces traitements (Chahine *et al.*, 1991 ; Mateescu *et al.*, 1995). Lorsque le cœur isolé est soumis à l'ischémie/reperfusion, la CP produit aussi un effet antiarythmique qui dépend de l'intégrité physique de la protéine (Atanasiu *et al.*, 1995). Les effets contradictoires de la CP sur le cœur pourraient s'expliquer par des différences dans le chargement en cuivre labile de la protéine selon la source animale et la méthode de purification ainsi que dans la durée du stress et du traitement avec la CP. Le degré de contribution de divers types cellulaires dans la réponse du cœur ou de l'organisme pourrait aussi influencer l'effet protecteur ou toxique de la CP.

1.9.6 Rôles dans le métabolisme du NO·

La description d'une interaction entre le cuivre de la CP et le NO· a été faite pour la première fois en 1973 (Wever *et al.*, 1973). Toutefois, l'action catalytique de la CP sur le NO· n'a été clairement démontrée que récemment. La CP a d'abord été proposée comme

générateur de RSNO pour expliquer l'importance de ceux-ci *in vivo* en dépit de la très faible vitesse de leur formation par auto-oxydation. L'équipe du Dr Akaike, qui était à l'origine de cette hypothèse, a révélé une nouvelle fonction de la céruloplasmine : une formation biologiquement significative de RSNO médiée par une réaction d'oxydation du NO \cdot (Inoue *et al.*, 1999). Cette fonction a été mise en évidence en utilisant de petites molécules sulfhydryles comme le GSH et la N-acétyl-cystéine. Les auteurs ont proposé un mécanisme de réaction similaire à celui des actions ferroxidasique et amine-oxydasique de la CP (voir Calabrese *et al.*, 1989). Selon ce mécanisme (figure 1. 10), l'oxydation du NO en NO $^+$ serait d'abord produite par le transfert d'un électron à l'un des atomes de cuivre de type I. Celui-ci transférerait ensuite l'électron à la triade formée des atomes de cuivre de type II et III qui, eux, réduiraient l'oxygène en eau. Le NO $^+$ formé serait capable de S-nitroser les thiols libres comme celui du GSH. Par son activité S-nitrosante, la CP pourrait contribuer aux effets cytoprotecteurs du NO \cdot .

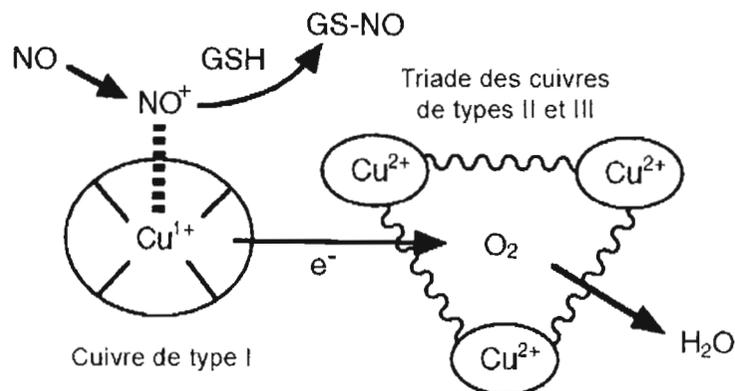


Figure 1.10 Mécanisme hypothétique de la formation de RSNO catalysée par la CP en présence de NO \cdot et de GSH. Le NO \cdot serait oxydé en NO $^+$ par l'atome de cuivre de type I de la CP. Le NO $^+$ formé serait ensuite capable de se lier au groupement thiol du GSH pour former le GSNO. L'électron gagné par l'atome de cuivre de type I serait transféré à la triade d'atomes de cuivre de types II et III, qui réduiraient ultimement l'oxygène en eau (schéma adapté de Inoue *et al.*, 1999).

Sur la base d'une hypothèse semblable, l'équipe du Dr Gladwin a mis en évidence une activité NO-oxydase/nitrite-synthase de la CP (Shiva *et al.*, 2006). La formation de NO $_2^-$ par auto-oxydation du NO \cdot est très lente. D'un point de vue cinétique, cette réaction est

impossible dans le sang puisque l'hémoglobine convertit le $\text{NO}\cdot$ en nitrate à une vitesse beaucoup plus grande. En investiguant l'activité NO-oxydase du plasma, les chercheurs ont déterminé qu'une protéine sérique redox de haut poids moléculaire était responsable de la catalyse rapide de l'oxydation du $\text{NO}\cdot$ en NO^+ , probablement grâce à des ions métalliques (Shiva *et al.*, 2006). Les auteurs ont ainsi été mis sur la piste de la CP et ont démontré de différentes façons que l'activité NO-oxydase du plasma était réduite par la déplétion de la CP. L'étude a aussi montré que la réduction des niveaux de NO_2^- augmentait la susceptibilité à l'infarctus de foies soumis à une ischémie-reperfusion. Le mécanisme d'action proposé est identique à celui de la S-nitrosation, à l'exception d'une réaction du NO^+ avec l'eau plutôt qu'avec le GSH (figure 1. 11).

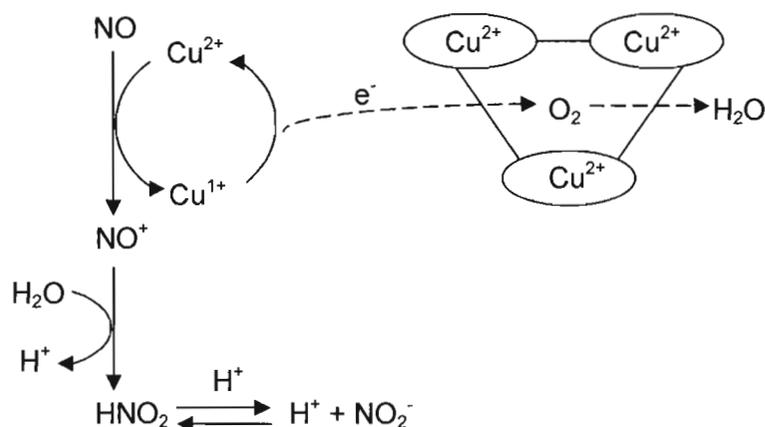


Figure 1.11 Mécanisme hypothétique de l'activité NO-oxydase/nitrite-synthase de la CP. Le $\text{NO}\cdot$ serait oxydé en NO^+ par l'atome de cuivre de type I de la CP. Le NO^+ formé serait ensuite hydraté en acide nitreux (HNO_2), en équilibre avec le NO_2^- . L'électron gagné par l'atome de cuivre de type I serait transféré à la triade d'atomes de cuivre de types II et III, qui réduiraient ultimement l'oxygène en eau (d'après Shiva *et al.*, 2006).

Considérant l'instabilité et la courte demi-vie du $\text{NO}\cdot$, le rôle des dérivés du $\text{NO}\cdot$ *in vivo* suscite beaucoup d'intérêt. Il a été suggéré que les RSNO et les NO_2^- serviraient de réserve bioactive circulante du $\text{NO}\cdot$ intravasculaire. (Gladwin *et al.*, 2000; Stamler *et al.*, 1992). Leurs demi-vies relativement longues prolongeraient la portée et la durée des actions biologiques du $\text{NO}\cdot$ comme la vasodilatation. Par la synthèse de RSNO et de NO_2^- , la CP pourrait donc être impliquée dans la potentialisation de divers effets du $\text{NO}\cdot$.

1.10 Hypothèse de recherche et objectifs

Les niveaux de CP et de NO \cdot dans le cœur sont augmentés dans des conditions génératrices de stress oxydatif comme l'infarctus du myocarde. Des propriétés protectrices ont d'ailleurs été mises en évidence pour ces deux molécules, par plusieurs études. Puisque la CP est maintenant connue pour moduler les niveaux des dérivés du NO \cdot , il devient très intéressant de se pencher sur l'impact de ces actions dans des conditions de stress oxydatif.

L'hypothèse à la base de cette étude est que la CP pourrait protéger le cœur du stress oxydatif en modulant le niveau des dérivés du NO \cdot . La transformation du NO \cdot en des dérivés plus stables, comme les RSNO et les NO $_2^-$ pourrait potentialiser les effets protecteurs du NO \cdot en augmentant sa durée de vie et sa distance d'action. Des études ont postulé des effets cytoprotecteurs des activités S-nitrosylante et nitrite-synthase de la CP mais ce postulat n'a pas été validé expérimentalement.

Le but de cette étude était donc d'évaluer l'effet cytoprotecteur de la combinaison CP + NO \cdot sur des cellules cardiaques soumises à un stress oxydatif *ex vivo* et de déterminer une possible implication d'une activité S-nitrosante et/ou nitrite-synthase de la protéine. Pour ce faire, un modèle de culture de cardiomyocytes de rats nouveau-nés a été soumis à un stress oxydatif généré par l'ajout de H $_2$ O $_2$ au milieu de culture. Le H $_2$ O $_2$ a été choisi comme inducteur de stress oxydatif d'abord parce que sa toxicité peut être contrée par le NO \cdot . L'effet de la CP sur la cytotoxicité du H $_2$ O $_2$ est peu connu mais on sait que des neurones de souris CP $-/-$ sont moins résistants au H $_2$ O $_2$. De plus, les conditions d'exposition au H $_2$ O $_2$ sont aisément contrôlables comparativement à d'autres EOR (e.g. le superoxyde \cdot O $_2^-$). Le propylamine propylamine NONOate (PAPA NONOate) a été utilisé comme donneur de NO \cdot parce que c'est un donneur non sulfhydryl, ne pouvant donc pas être re-S-nitrosé par la CP une fois son NO \cdot libéré. Les activités S-nitrosante et nitrite-synthase de la CP ont d'ailleurs été mises en évidence avec des composés de la même famille, soient le propylamine NONOate (P-NONOate; demi-vie de 2 min) et le diéthylamine NONOate (DEA-NONOate; demi-vie de 5 min), respectivement. D'après certaines expériences, le PAPA NONOate (demi-vie de 15 min) offre plus de protection que le DEA NONOate à des cellules exposées à des peroxydes

(Vidwans *et al.*, 1999; Wink *et al.*, 1995), vraisemblablement grâce à des concentrations de NO \cdot plus persistantes dans le temps. L'effet toxique ou protecteur des traitements a été déterminé par la mesure de la viabilité cellulaire par une coloration au Hoechst 33342 et à l'iodure de propidium. Les différents dérivés du NO \cdot ont été mesurés par le dosage colorimétrique de Griess, par la sonde fluorescente DAN, ou par des adaptations de ces deux méthodes.

L'étude visait les objectifs suivants :

- 1- Mise au point des outils de travail : optimisation et tests d'interférence avec les techniques de dosage des dérivés du NO \cdot .
- 2- Évaluation de l'effet de la CP, du PAPA NONOate et d'une combinaison des deux molécules sur la viabilité des cardiomyocytes traités au H $_2$ O $_2$.
- 3- Évaluation des activités S-nitrosylante et nitrite-synthase de la CP par la mesure des niveaux des différents dérivés du NO \cdot dans les milieux de culture à la fin des traitements cellulaires.
- 4- Comparaison des activités S-nitrosylante et nitrite-synthase de la CP dans des conditions acellulaires.

Les résultats de ce travail pourraient jeter un nouvel éclairage sur le rôle de la CP dans les maladies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde et aider à mieux comprendre son rôle dans le métabolisme du NO \cdot et de ses dérivés. Une meilleure connaissance des mécanismes de défense contre le stress oxydant pourrait aider à freiner la propagation des dommages dus à l'ischémie-reperfusion.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Purification de la CP

La CP a été purifiée du sérum bovin par une méthode de chromatographie d'affinité sur colonne d'aminoéthyl-agarose (AE-agarose) élaborée par l'équipe du Dr Mateescu (Wang *et al.*, 1994).

2.1.1 Synthèse de l'AE-agarose

L'AE-agarose utilisé comme matériel chromatographique est préparé au laboratoire par le traitement de billes d'agarose (Sephacrose[®] CL-6B : Sigma-Aldrich Inc., St-Louis, MO, É.-U.) avec du 1-chloro-2-éthylamine hydrochlorure (Sigma-Aldrich Inc.). Un volume de 100 mL de gel Sepharose CL-6B a d'abord été lavé avec de l'eau distillée par filtration sur un entonnoir Büchner, puis les billes mises en suspension dans un minimum d'eau distillée froide (environ 30 mL). La suspension a été placée sous un agitateur rotatif à hélice et chauffée jusqu'à 70°C. Par la suite, 43 g de chloroéthylamine ont été solubilisés dans un minimum d'eau (5-10 mL), et ont rapidement été ajoutés à l'agarose. Du NaOH 10 N (5-10 mL) a ensuite été ajouté pour ajuster le pH à 10 et le mélange réactionnel a été chauffé pendant 2 heures à 70°C sous agitation continue. Le pH a été fréquemment vérifié durant les 30 premières minutes de réaction et de petites quantités de NaOH ont été ajoutées pour maintenir le pH entre 9 et 10. À la fin de la réaction, le gel a été lavé avec de l'eau jusqu'à ce que le filtrat ait un pH neutre. L'AE-agarose a été resuspendu dans un tampon phosphate de sodium (KPi) 3 mM à pH 7,0 pour une utilisation rapprochée, ou dans de l'éthanol 20% pour une conservation à long terme.

2.1.2 Extraction du sérum de sang bovin

La CP a été obtenue à partir d'environ 10 L de sang de bœuf frais (Boucherie-abattoir Tarte Enr., Marieville, QC, Canada), auquel 1 L de citrate de sodium 2,5% (85 mM citrate trisodique, 71 mM acide citrique et 111 mM dextrose, pH 4,5) a été ajouté dès la collecte

pour empêcher la coagulation. Le transport et la conservation du sang, de même que toutes les manipulations ont été faits à 4°C. Le sang a été réparti en plusieurs bouteilles, puis centrifugé à 3000 g durant 20 min et décanté trois fois afin d'obtenir des surnageants clairs. Ceux-ci, qui contenaient la fraction plasmique, ont ensuite été combinés. Les protéines ont été précipitées au sulfate d'ammonium en deux étapes. Le sulfate d'ammonium (Sigma-Aldrich Inc.) a d'abord été ajouté à la fraction plasmique à 35% de saturation, soit 197 g/L, et le mélange incubé pendant 2h sous une agitation douce. La fraction soluble a été séparée par une centrifugation à 10 000 g durant 20 min. Les surnageants ont de nouveau été combinés, amenés à un pourcentage final de saturation en sulfate d'ammonium de 55% par l'ajout de 120 g/L du sel, et incubés 30 min avec agitation. Après une autre centrifugation de 20 min à 10 000 g, les protéines précipitées dans les culots ont été conservées et solubilisées dans un minimum de tampon KPi 10 mM à pH 7,2 (environ 800 mL). Une dialyse de 20 heures contre 15 L du tampon KPi 10 mM à pH 7,2, avec deux changements de tampon, a été effectuée pour enlever le sulfate d'ammonium. La solution protéique dialysée a été centrifugée une dernière fois durant 20 min à 10 000 g avant la chromatographie.

2.1.3 Chromatographie d'affinité de la CP sur AE-agarose

Une colonne de 30 mm de diamètre a été remplie avec 35 mL de gel d'AE-agarose tassé, et équilibrée avec 10 volumes du tampon KPi 10 mM à pH 7,2. La solution protéique dialysée a été déposée sur cette colonne pendant la nuit, à l'aide d'une pompe péristaltique Watson-Marlow 202 (Watson-Marlow Bredel Pumps Ltd, Cornwall, Angleterre) en circuit fermé à un débit de 120 mL/h. La colonne a ensuite été lavée avec 10 volumes de tampon KPi 20 mM à pH 7,2. L'élution a été faite par du tampon KPi 200 mM à pH 7,2, et la récolte de fractions de 1 mL a débuté dès l'ajout de ce tampon. La CP retenue par le gel était visible par sa coloration bleue caractéristique et lors de l'élution, une bande de couleur plus intense s'est formée et est descendue le long de la colonne. L'étape de l'élution s'est donc poursuivie jusqu'à la sortie de cette bande. L'absorbance des fractions récoltées a été mesurée et celles dont le ratio A_{610}/A_{280} était supérieur à 0,04 ont été combinées. L'absorbance à 610 nm est due à l'atome de cuivre de type I de la CP, tandis que l'absorbance à 280 nm est due à sa nature protéique. Un ratio supérieur à 0,04 est considéré comme caractéristique d'une enzyme pure et homogène (Wang *et al.*, 1994). La solution de

CP pure obtenue par la combinaison de ces fractions a été diluée deux fois avec de l'eau pour réduire la concentration en KPi à 100 mM. Elle a finalement été concentrée par centrifugation sur filtre Amicon® Ultra (Millipore Corp., Bedford, MA, É.-U.), pour une concentration finale entre 10 et 15 mg/mL. Cette concentration a été déterminée plus exactement par le dosage des protéines par la méthode de Bradford (voir section 2.5.2). La pureté de la CP a aussi été confirmée par électrophorèse dénaturante sur un gel de 10% de polyacrylamide (SDS-PAGE) suivie d'une coloration au nitrate d'argent (figure 2.1).

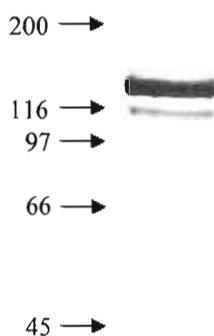


Figure 2.1 Analyse protéique de la CP purifiée. L'extrait protéique de sang bovin a été dialysé a été purifié par chromatographie d'affinité sur AE-agarose. La CP retenue par la colonne a été éluée et les fractions d'éluion combinées. La solution stock de CP ainsi obtenue a été analysée par SDS-PAGE, à raison de 1 µg de CP par puits, et les protéines du gel ont été colorées au nitrate d'argent. À gauche sont indiqués les poids moléculaire (kDa) de protéines étalons. Les deux bandes de plus de 100 kDa correspondent à la chaîne polypeptidique intacte de la CP mais comportent des niveaux différents de glycosylation selon les travaux d'Aouffen *et al.*, 2001.

2.1.4 Dosage de l'activité oxydasique de la CP

L'activité enzymatique de la CP a été déterminée par la méthode d'Osaki et al. (1966) avec quelques modifications. Plus précisément, l'activité oxydasique de la CP a été évaluée par spectrophotométrie en mesurant l'oxydation du substrat pPD (Sigma-Aldrich Inc.). Le substrat pPD a donc été ajouté à une solution de CP dans du tampon KPi à pH 7,2 dans des puits de microplaque de 96 puits (Sarstedt, Inc., Newton, NC, É.-U.), les concentrations

finales étant de 10 mM de pPD, 75 µg/mL de CP et 50 mM de KPi, pour un volume final de 200 µL. La formation du produit coloré a été suivie par la lecture de l'absorbance à 560 nm en mode cinétique (lecteur THERMO max™ : Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, É.-U.), dès l'ajout du substrat pPD, pendant 1h30. Dans ces conditions, l'absorbance augmente de façon linéaire pendant tout le test. La vitesse de réaction a été calculée par le logiciel Softmax Pro® v.5.0.1 (Molecular Devices Corp.) et est définie comme l'augmentation de l'absorbance (Δ mOD) par minute.

2.2 Culture et traitement des cardiomyocytes de rats nouveau-nés

2.2.1 Isolement des cellules

Les cardiomyocytes de rats nouveau-nés ont été isolés à l'aide de la trousse Worthington (Neonatal Cardiomyocyte Isolation System : Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, É.-U.), selon les recommandations du fabricant. Chaque isolement a été fait à partir d'une portée de 12 à 18 rats Sprague-Dawley (Charles River Canada Inc., St-Constant, QC, Canada) de 3 jours. Toutes les manipulations avec les rats et les cellules ont été faites en conditions stériles. Les rats ont été sacrifiés par décapitation, conformément aux normes établies par le comité institutionnel pour la protection des animaux (CIPA). Les cœurs ont été prélevés et la partie supérieure de chacun, contenant les oreillettes et les vaisseaux, a été coupée pour ne garder que les ventricules. Ceux-ci ont été coupés en trois ou quatre morceaux, lavés dans le Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) sans calcium et sans magnésium à pH 7,4 froid, et transférés dans un tube de 50 mL. Après l'ajout de la trypsine purifiée fournie avec la trousse, les morceaux de cœurs ont été incubés pendant environ 18 heures à 4°C, avec une agitation douce. La digestion a été arrêtée avec l'inhibiteur de trypsine de soya et le tube a été réchauffé à 37°C durant une dizaine de minutes. La collagénase de la trousse a été reconstituée dans le milieu Leibovitz L-15 à pH 7,4 à 37°C, et ajoutée au tube pour une digestion d'environ 40 min à 37°C avec agitation douce. Les cellules ont ensuite été dissociées mécaniquement, en créant un tourbillon dans le tube par une série d'aspirations et d'expulsions du milieu, et le surnageant a été filtré sur un tamis à cellules dans un nouveau tube. Les morceaux restants ont été soumis à une autre série d'aspirations/expulsions avec du nouveau milieu Leibovitz L-15, et le surnageant a été filtré

dans le même tube. Après avoir reposé à température ambiante pendant environ 45 min, avec une ou deux agitations par inversion, la suspension cellulaire a été centrifugée 5 min à faible vitesse (environ 100 g). Les culots de cellules ont été resuspendus dans du milieu DM + FBS composé de D-MEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium high glucose : Gibco™, Invitrogen Corp., Grand Island, NY, É.-U.) supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS, d'origine canadienne : Gibco™, Invitrogen Corp.) et de 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine (Gibco™, Invitrogen Corp.), à 37°C. Cette suspension a été soumise à deux pré-ensemencements de 30 min dans 3 ou 4 pétris tissulaires de 100 mm (Sarstedt Inc.) pour enlever la majorité des fibroblastes. Les cellules non adhérentes ont de nouveau été centrifugées, resuspendues dans le DM + FBS, et ensemencées (jour 0) dans des plaques de culture tissulaire de 12 puits Costar® (Corning Inc., Corning, NY, É.-U.) à une densité de $0,1 \times 10^6$ cellules/cm². Après 24 heures de culture (jour 1), les cellules non adhérentes ont été enlevées par un lavage au DM avec une agitation vigoureuse et du nouveau milieu DM + FBS a été ajouté.

2.2.2 Culture et traitement des cardiomyocytes

Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ et toutes les solutions utilisées ont été stérilisées et réchauffées à 37°C. Des milieux de trois différentes compositions ont été testés pour l'incubation du jour 1 au jour 6. Le premier était le milieu DM + FBS utilisé pour l'ensemencement. Les deux autres milieux, exempts de sérum, étaient composés de milieu D-MEM/F-12 (HyQ® DME/F-12 1:1 : HyClone®, Logan, UT, É.-U.) supplémenté en divers nutriments et antibiotiques (DM/F12 suppl.), incluant des acides aminés non essentiels 1X dans du MEM (Sigma-Aldrich Inc.), des acides aminés 1X dans du MEM (Sigma-Aldrich Inc.), des vitamines 1X dans du MEM (Sigma-Aldrich Inc.), 6,25 µg/mL d'insuline bovine (Sigma-Aldrich Inc.), 6,25 µg/mL de transferrine humaine (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne) chargée en fer, 6,25 ng/mL de sélénite de sodium (Sigma-Aldrich Inc.), 80 µg/mL de chlorure de calcium (Anachemia Ltd, Montréal, Qc, Canada), 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine. Du BSA (albumine sérique bovine fraction V ; Bio Basic Inc., Markham, ON, Canada), à une concentration de 1%, a aussi été ajouté à l'un des milieux sans sérum (DM/F12 suppl. + BSA). La prolifération des fibroblastes contaminants a été inhibée par l'ajout de 20 µM d'Ara-C

(cytosine- β -D-arabinofuranoside hydrochlorure ; Sigma-Aldrich Inc.) aux milieux pour l'incubation à partir du jour 1. Les traitements, tous de 24 heures, ont été administrés en jour 4, en duplicata. Le H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène : EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Allemagne) a été utilisé pour induire un stress oxydatif aux cardiomyocytes. Le PAPA NONOate (3-(2-Hydroxy-2-nitroso-1-propylhydrazino)-1-propanamine : Sigma-Aldrich Inc.), utilisé comme donneur de $NO\cdot$, a la particularité de libérer deux équivalents de NO (sous forme $NO\cdot$ ou NO^+). Le H_2O_2 , la CP et le PAPA NONOate ont été ajoutés dans du nouveau milieu de culture après un lavage au DM, et les cellules ont été retournées à l'incubateur. Les analyses ont donc été faites au jour 5.

2.2.3 Mesure de la viabilité par coloration au Hoechst et à l'iodure de propidium

À la fin des traitements, 30 $\mu g/mL$ de Hoechst 33342 (bisbenzimidazole H 33342 trihydrochlorure : Sigma-Aldrich Inc.) ont été ajoutés au milieu de culture des cardiomyocytes. Après environ 10 min d'incubation à 37°C, le milieu a été changé pour du DM/F12 contenant 20 $\mu g/mL$ d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich Inc.). L'observation des cellules au microscope à fluorescence a ensuite été faite le plus rapidement possible. Deux champs par puits ont été photographiés, pour un total de quatre photos par traitement pour chaque préparation cellulaire. Celles-ci ont été prises à un grossissement de 100X, et montraient en moyenne environ 200 cellules chacune. Les photos ont toutes été traitées de façon identique à l'aide du logiciel Adobe® Photoshop® v5.0.2, pour faciliter les comptes cellulaires. Le Hoechst 33342 est une sonde biologique lipophile qui s'intercale entre les bases de l'ADN dans les régions A-T. Lorsqu'il est excité par la lumière UV (max. à 355 nm), il émet de la fluorescence bleue (max. 460 nm). Il est donc capable de traverser la membrane cellulaire pour se lier à l'ADN, et permet ainsi de visualiser le noyau de toutes les cellules. L'iodure de propidium est aussi un colorant de l'ADN (ex. max. 493 nm, ém. max. 630 nm) mais, contrairement au Hoechst, il est incapable de traverser la membrane et peut seulement colorer le noyau des cellules dont la membrane a été altérée, c'est-à-dire des cellules nécrotiques. Sur les photos, les cellules dont le noyau était rouge ont donc été comptées comme étant des cellules nécrotiques. Les noyaux de couleur bleue, mais condensés, fragmentés ou faisant partie d'une cellule de forme arrondie ont été associés aux cellules apoptotiques. Finalement, les cellules demeurées étalées ayant un noyau bleu non

fragmenté ont été comptées comme étant vivantes. Des exemples de ces profils de coloration sont montrés dans la figure 2.2.

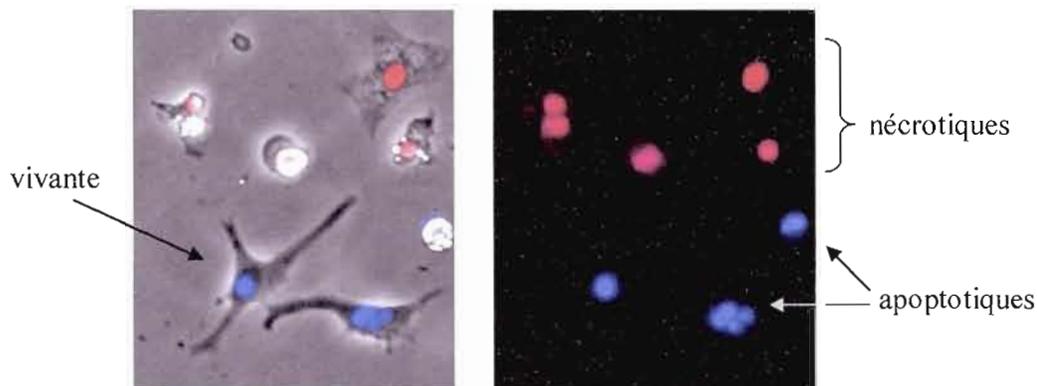


Figure 2.2 Interprétation de photos de cardiomyocytes colorés au Hoechst et à l'iodure de propidium. La photo de gauche superpose la lumière visible et la fluorescence et la photo de droite montre les mêmes cellules en fluorescence seulement. Les cellules nécrotiques ont un noyau rouge. Les cellules apoptotiques ont un noyau bleu, mais condensé, fragmenté ou associé à une forme de cellule arrondie. Finalement, les cellules vivantes ont une forme étalée et un noyau bleu non fragmenté.

2.3 Électrophorèse et détection de la CP

2.3.1 Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les échantillons de 0,2 μg de CP soumis à l'électrophorèse ont été préparés dans le tampon d'échantillon de Laemmli composé de 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% v/v glycérol, 2% p/v sodium dodécylsulfate (SDS), 5% v/v β -mercaptoéthanol et 6,25% p/v bleu de bromophénol (Laemmli, 1970). Une solution de marqueurs de poids moléculaire a également été préparée (Broadrange : Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, É.-U.) pour la calibration des gels. Tous les échantillons et marqueurs ont été bouillis pendant 5 min avant d'être déposés sur des gels de 10 % d'acrylamide de 1 mm d'épaisseur. La migration a été faite dans un appareil Mini-Protean® (Bio-Rad Laboratories Inc.) à 150 V jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol hors du gel (environ 60 min). Les gels ont ensuite été colorés au nitrate d'argent ou analysés par électrotransfert et immunobuvardage.

2.3.2 Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent est une méthode très sensible permettant de détecter des quantités de protéines de l'ordre du nanogramme. La coloration des gels d'électrophorèse a été réalisée à l'aide de la trousse SilverSNAP[®] Stain Kit II (MJS Biolynx Inc., Brockville, ON, Canada), selon les recommandations du fabricant et avec de l'eau nanopure. Les gels ont d'abord été lavés dans l'eau et fixés dans une solution d'éthanol 30% et d'acide acétique 10%, par deux incubations de 15 min. Après un lavage dans l'éthanol 10%, puis dans l'eau, les gels ont été incubés pendant une minute avec la solution de sensibilisation, et de nouveau lavés à l'eau. Ils ont ensuite été incubés dans la solution de coloration pendant 30 min, rincés brièvement à l'eau et incubés immédiatement avec la solution de développement pour faire apparaître les bandes de protéines. Cette dernière solution a été remplacée par une solution d'arrêt, de 5% d'acide acétique, dès que l'intensité des bandes était satisfaisante. Les gels ainsi colorés ont été numérisés par le scanner ChemiImager[™] 5000 (Alpha Innotech[®], San Leandro, CA, É.-U.).

2.3.3 Électrotransfert en mode semi-sec

Les gels d'électrophorèse destinés à l'immunobuvardage ont d'abord été transférés sur des membranes de PVDF (fluorure de polyvinylidène) PolyScreen[®] (PerkinElmer[™] Life Sciences Inc., Boston, MA, É.-U.) à l'aide du système d'électrotransfert Trans-Blot[®] SD Semi-Dry (Bio-Rad Laboratories Inc.). Ont été déposés, dans l'ordre, du papier buvard humidifié, les membranes activées une minute dans le méthanol et équilibrées 15 min dans le tampon de transfert, les gels équilibrés 5 min dans le même tampon et d'autre papier buvard. Le tampon de transfert était composé de 10 mM de base TRIS, de 96 mM de glycine et 20% de méthanol. Le transfert a été effectué à 15 V pendant 30 min.

2.3.4 Immunobuvardage de type western

Après le transfert, les membranes de PVDF ont été incubées pendant 18 heures à 4°C avec agitation douce dans le tampon de blocage fait de lait écrémé en poudre (Carnation) 3% p/v dans du tampon TBS-Tw (TRIS-HCl 50 mM, pH 7,6, contenant 150 mM de NaCl et 0,1% v/v de Tween-20). Quatre lavages de 15 min chacun dans le TBS-Tw ont ensuite été effectués. Les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps primaire polyclonal de

lapin anti-CP humaine (Dako Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) dilué à 1/2000 dans le TBS-Tw + 3% p/v de BSA + 0,01% p/v d'azoture de sodium pendant 1 heure à température ambiante. Après un autre lavage, les membranes ont été incubées une autre heure avec un anticorps secondaire, soit un IgG de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à une peroxydase (POD ; Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Mississauga, ON, Canada) et dilué à 1/10 000 dans le tampon de blocage. Un dernier lavage a été fait, et les complexes antigènes-anticorps ont été détectés par l'ajout d'un substrat chimioluminescent de la peroxydase (Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate : Millipore Corp., Billerica, MA, É.-U.). Les membranes ont été incubées 1 minute avec le substrat, puis exposées à un film Fuji Medical X-ray (Fuji Photo Film®, Tokyo, Japon). Les films ont été développés par le processeur Mini-Medical (AFP Imaging Corp., Elmsford, NY, É.-U.), et numérisés par scanner.

2.4 Dosage des dérivés du NO

2.4.1 S-nitrosation du BSA

La nitrosation du BSA a été faite par une solution acidifiée équimolaire de nitrite de sodium (NaNO_2). Un volume de 8 μL de DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique : Sigma-Aldrich Inc.) à 25 mM a d'abord été ajouté à 1 mL de BSA 1,6 mM dans l'eau pour chélater les traces de métaux contaminants qui pourraient dénitrer les RSNO. Un mL de NaNO_2 1,6 mM dans du HCl 1 M a ensuite été ajouté au BSA, en agitant la solution pour prévenir l'agrégation. Le mélange a été incubé 30 min à température ambiante avec agitation et à l'abri de la lumière. La solution a ensuite été neutralisée et diluée. Pour ce faire, de petits volumes de NaOH 1 M ont été ajoutés et le pH vérifié, jusqu'à un total d'environ 1 mL de NaOH et un pH entre 5 et 7. Le volume a ensuite été complété à 3,2 mL avec de l'eau. La solution ainsi obtenue contenait 500 μM de BSA-S-nitrosé (BSA-S-NO) dans l'eau avec 0,1 mM de DTPA. Cette solution a été protégée de la lumière pendant toute son utilisation. De plus, une solution fraîche a été préparée chaque jour pour éviter les problèmes d'analyse dus à la perte de stabilité du BSA-S-NO avec le temps.

2.4.2 Dosage de Griess

La détection colorimétrique des NO_2^- par les réactifs de Griess est la méthode de mesure la plus simple et, pour cette raison, la plus utilisée. La réaction de Griess, qui a été rapportée pour la première fois en 1879 (Griess, 1879), est une réaction de diazotation en deux étapes. Le N_2O_3 généré par l'acidification du NO_2^- est un dérivé du $\text{NO}\cdot$ ayant un grand potentiel nitrosant. Il réagit avec le sulfanilamide pour produire un ion diazonium qui permet le couplage au N-(1-naphtyl)éthylènediamine dihydrochlorure (NEDD), comme l'illustre la figure 2.3. Le produit azo ainsi formé est un chromophore stable qui absorbe fortement à 543 nm. L'absorbance est donc linéairement proportionnelle à la quantité de NO_2^- dans l'échantillon.

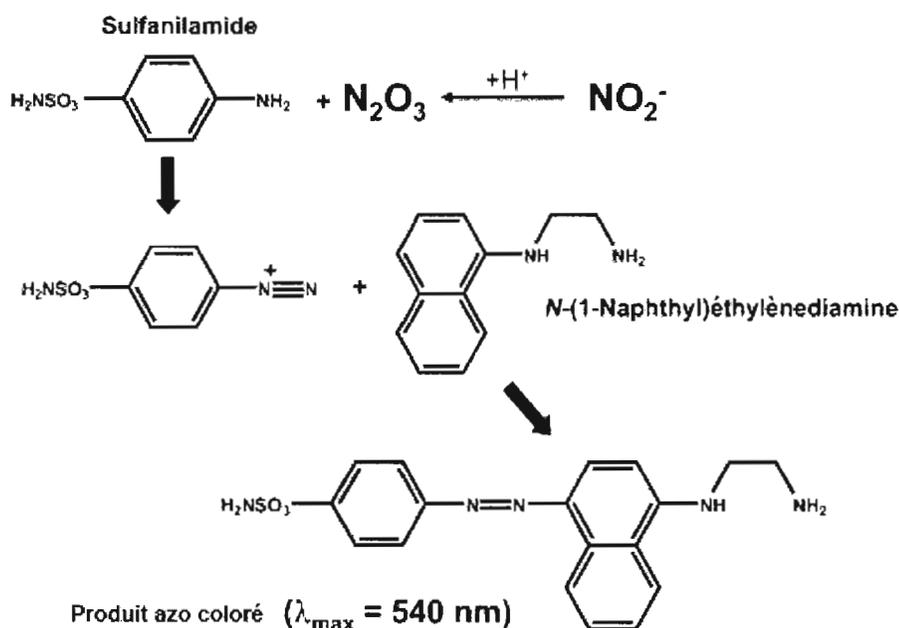


Figure 2.3 Détection des NO_2^- par les réactifs de Griess. L'agent nitrosant N_2O_3 généré par l'acidification de l'ion NO_2^- réagit avec le sulfanilamide pour produire un dérivé diazonium. Celui-ci réagit avec le NEDD pour donner un produit azo coloré qui absorbe fortement à 540 nm (d'après Tarpey *et al.*, 2004).

La méthode de dosage des NO_2^- de Miranda *et al.* (2001) a servi de protocole de départ pour l'optimisation du dosage de Griess. La solution de 2% (116 mM) de sulfanilamide dans

le HCl 5% (1,37 M) a été préparée par une solubilisation de 0,8 g de sulfanilamide (Sigma-Aldrich Inc.) dans 5,4 mL de HCl concentré (37%), puis par l'ajout d'eau jusqu'à un volume de 40 mL. La solution de 0,1% (3,8 mM) de NEDD a été obtenue par la solubilisation de 0,04 g de NEDD (Sigma-Aldrich Inc.) dans 40 mL d'eau. Ces solutions sont stables pendant quelques mois. Selon le protocole de départ, le sulfanilamide et le NEDD ont été mélangés à volumes égaux et ajoutés immédiatement aux échantillons. Un volume de 50 μ L du mélange de réactifs a été ajouté à 100 μ L d'échantillon et 50 μ L d'eau dans une microplaque de 96 puits. La microplaque a été incubée 30 min à 37°C, et les lectures d'absorbance ont été faites à 560 nm. Chaque valeur d'absorbance a été corrigée par un blanc fait avec de l'eau ou avec le tampon de l'échantillon.

Les NO_3^- ont aussi été dosés par la réaction de Griess. Pour ce faire, les NO_2^- des échantillons ont d'abord été éliminés par une incubation avec une solution d'acide sulfamique (Sigma-Aldrich Inc.) dans l'eau, plusieurs concentrations et temps ayant été testés. Les NO_3^- ont par la suite été convertis en NO_2^- par réduction. Parmi les différents agents réducteurs possibles (cadmium, vanadium, nitrate-réductase bactérienne), le vanadium (III) a été choisi pour sa plus grande simplicité d'utilisation, sa moins grande toxicité et l'absence d'interférence avec la réaction de Griess. Une solution saturée de VCl_3 (Sigma-Aldrich Inc.) a été préparée à 10 mg/mL dans du HCl 0,5 M, d'après Miranda *et al.* (2001). L'excès de solide a été éliminé à l'aide d'un filtre de porosité de 0,22 μ m. La solution de VCl_3 est sensible à l'oxydation et a donc été protégée de la lumière et préparée fraîchement à chaque jour. Pour le dosage des NO_3^- , la solution de VCl_3 à différentes concentrations a été ajoutée aux échantillons juste avant ou en même temps que les réactifs de Griess.

La détection des groupements RSNO des thiols et protéines S-nitrosés a été faite par la réaction de Saville (Saville, 1958). Celle-ci implique le déplacement du NO^+ par des sels de mercure. Ce NO^+ , ou des intermédiaires formés spontanément, peuvent ensuite être détectés par les réactifs de Griess. Pour le dosage des RSNO, une solution de HgCl_2 (Sigma-Aldrich Inc.) a donc été préparée à 400 μ M dans l'eau et ajoutée aux échantillons à différentes concentrations avant ou en même temps que les réactifs de Griess. La solution de HgCl_2 a été protégée de la lumière et préparée fraîchement chaque jour.

Les protocoles des dosages des dérivés du $\text{NO}\cdot$ par la réaction de Griess décrits ici sont ceux qui ont servi de point de départ à l'optimisation (voir chapitre III : Résultats). Les dérivés du $\text{NO}\cdot$ dans les milieux de culture cellulaire et dans les études de l'activité de la CP ont été dosés selon les conditions optimisées qui sont résumées dans le tableau 3.1 (chapitre III : Résultats).

2.4.3 Dosage avec le 2,3-diaminonaphtalène (DAN)

Des méthodes fluorimétriques, comme celle du DAN, ont été développées pour augmenter la sensibilité de la détection des NO_2^- . Le DAN est un composé diamino aromatique, relativement non fluorescent, qui détecte les NO_2^- par une réaction semblable à celle de Griess. Tel qu'illustré par la figure 2.4, il réagit avec les dérivés nitrosants générés par l'acidification du NO_2^- , pour former un produit hautement fluorescent, le 2,3-naphtotriazole (NAT).

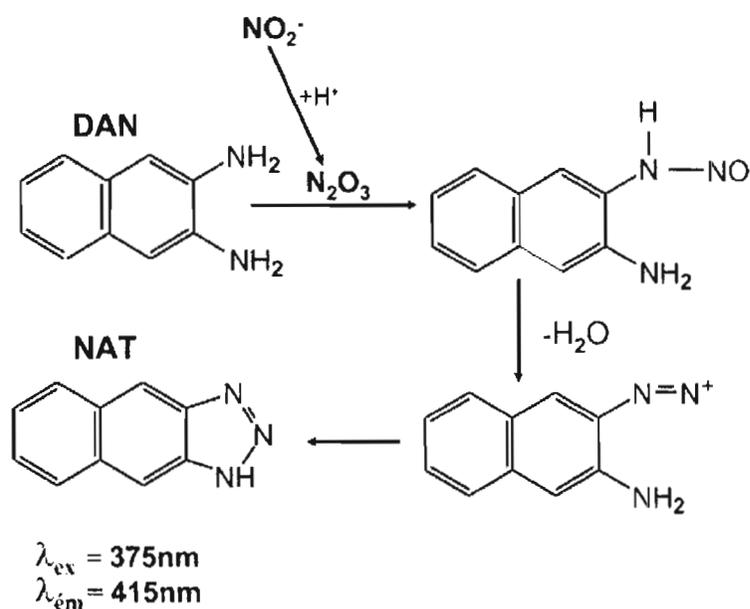


Figure 2.4 Détection des NO_2^- par la sonde fluorimétrique DAN. L'agent nitrosant N_2O_3 généré par l'acidification des NO_2^- réagit avec le DAN pour donner le produit NAT hautement fluorescent (d'après Tarpey *et al.*, 2004).

Le protocole de départ pour l'optimisation du dosage des NO_2^- par le DAN était basé sur la méthode de Misko *et al.* (1993). Le DAN a d'abord été solubilisé dans le HCl 1 M, puis

dilué dans l'eau de façon à obtenir la concentration désirée. Cette solution a été protégée de la lumière et préparée fraîchement juste avant le test. La solution de DAN a été ajoutée à 100 μL d'échantillon dans le tampon phosphate salin (PBS), dans une microplaque de 96 puits de polystyrène blanc Costar[®] (Corning Inc.). Les concentrations finales étaient de 25 μM de DAN et de 0,05 M de HCl. Les réactions ont été incubées 10 min à température ambiante et à la noirceur, puis arrêtées par l'ajout de 0,17 M (final) de NaOH. Les lectures de fluorescence ont été faites à 355 nm d'excitation et 460 nm d'émission, et corrigées par un blanc de PBS. Tout comme le dosage de Griess, le dosage par le DAN a été soumis à une optimisation. Les conditions optimisées sont également décrites dans le tableau 3.1.

2.5 Déplétion de la CP dans les échantillons

2.5.1 Précipitation de la CP par l'AE-agarose

Pour chaque échantillon qui devait être déplété en CP, une mini-colonne d'AE-agarose a été préparée à partir d'un eppendorf troué et bouché par un papier-filtre. Un volume d'AE-agarose équivalent à 300 μL de lit de gel a d'abord été transféré dans chacune de ces mini-colonnes. Le surnageant en a été expulsé en exerçant une pression dans l'eppendorf à l'aide d'une seringue, et remplacé par 500 μL d'échantillon. Les eppendorfs ont ensuite été agités pendant 30 min à 4°C. Les échantillons ont été expulsés par pression et soumis à une ou deux autres précipitations dans de nouvelles mini-colonnes d'AE-agarose. Pour vérifier l'efficacité de la technique, un échantillon de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CP a subi trois précipitations, et des aliquotes de 10 μL ont été prélevées avant le traitement et après chaque précipitation. Les protéines résiduelles ont été mesurées par le dosage de Bradford et un pourcentage a été calculé par rapport à l'absorbance avant le traitement.

2.5.2 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le réactif de Bradford (Bradford, 1976) concentré (Bio-Rad Protein Assay : Bio-Rad Laboratories Inc.) a préalablement été dilué 5 fois dans de l'eau. Chaque aliquote de 10 μL d'échantillon a été déposée dans un puits d'une microplaque 96 puits, et 200 μL du réactif dilué ont été ajoutés. Après 10 min d'incubation à température ambiante, des lectures d'absorbance ont été faites à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Mise au point des dosages des dérivés du NO \cdot

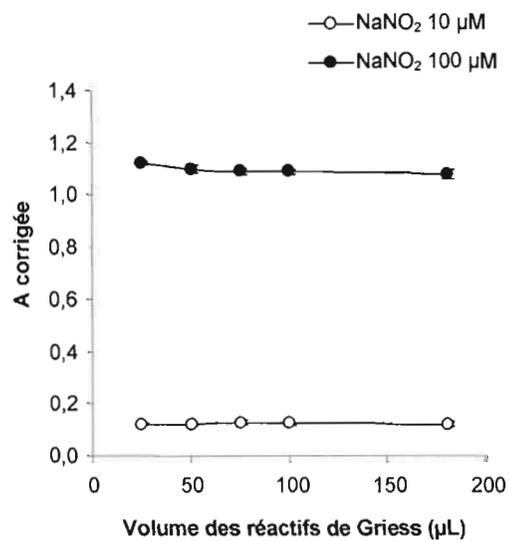
3.1.1 Optimisation du dosage de Griess

Le dosage des NO $_2^-$ par la méthode Griess a été optimisé en faisant varier l'un après l'autre chaque paramètre d'un protocole de départ. Les différents tests d'optimisation ont été faits sur deux concentrations d'une solution standard de NaNO $_2$ dans le PBS, soit 10 μ M et 100 μ M. On s'assure ainsi que le dosage est approprié pour les plus faibles et pour les plus fortes concentrations qu'on s'attend à doser dans les prochaines expériences. Les tests d'optimisation ont donc fait varier la quantité de chacun des réactifs de Griess, soient le NEDD, le sulfanilamide et le HCl, tout en gardant la concentration de NaNO $_2$ constante. Puisque l'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de NO $_2^-$, on considère que le maximum atteint à chaque test correspond au maximum de sensibilité.

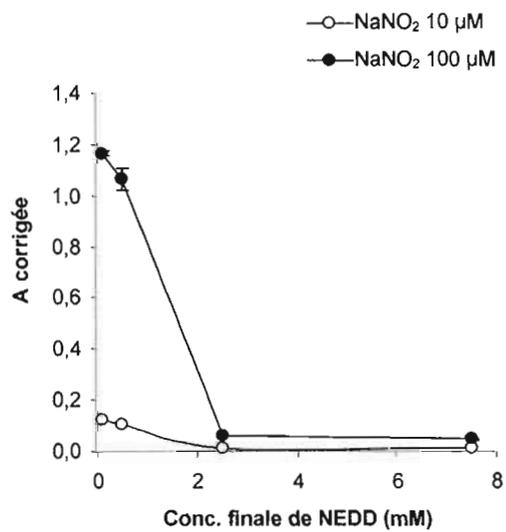
On a d'abord préparé un mélange de 58 mM de sulfanilamide et de 1,9 mM de NEDD dans le HCl 0,685 M. Le protocole de départ comportait l'ajout de 50 μ L de ce mélange dans un volume final de 200 μ L. Différents volumes de ce mélange ont été testés pour l'optimisation du dosage du NaNO $_2$. La concentration de chacun des réactifs variait, mais le ratio entre eux était constant. La figure 3.1A montre que la quantité des réactifs de Griess n'est pas critique dans le dosage de Griess, puisqu'il n'y a ni augmentation, ni diminution de l'absorbance. Cela signifie que tous les volumes ajoutés amènent un excès de réactifs par rapport au NaNO $_2$, et qu'il n'est pas utile d'augmenter ce volume pour améliorer la sensibilité du dosage.

La sensibilité peut toutefois être influencée par les proportions des réactifs entre eux. On a donc conservé les concentrations finales de sulfanilamide et de HCl du protocole de départ, soient 15 mM et 0,17 M respectivement, et on a fait varier la concentration de NEDD. Celle-ci était de 0,47 mM dans le protocole de départ. La figure 3.1B montre que l'absorbance

A



B



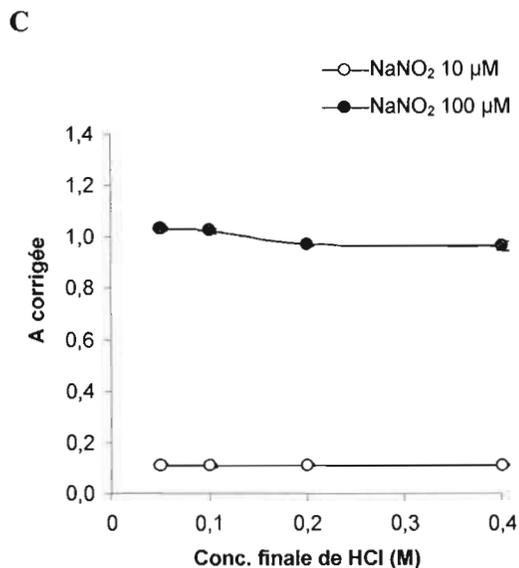


Figure 3.1 Optimisation du dosage des NO₂⁻ par la méthode de Griess. Les réactifs de Griess ont été ajoutés à une solution de PBS contenant une faible ou une forte concentration de NaNO₂ dans un volume final de 200 µL. Après 30 min d'incubation à 37°C, l'absorbance a été mesurée à 560 nm. (A) Le dosage a été fait par différents volumes d'une solution combinant le NEDD 1,9 mM, le sulfanilamide 58 mM et le HCl 0,685 M. (B) Le dosage a été fait à différentes concentrations de NEDD, en gardant les concentrations de sulfanilamide et de HCl fixes à 15 mM et 0,17 M respectivement. (C) Le dosage a été fait à différentes concentrations de HCl, en gardant les concentrations de NEDD et de sulfanilamide finales fixes à 0,24 mM et 15 mM respectivement. Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata ± écart moyen, et chacune a été corrigée par un blanc sans NaNO₂.

chute drastiquement si on augmente cette concentration, mais qu'on peut augmenter légèrement la sensibilité du dosage en diminuant le NEDD. Par prudence, on ne diminuera pas la concentration de NEDD au minimum car les échantillons des prochaines expériences pourraient contenir des substances qui risquent d'interférer avec le dosage si l'excès des réactifs n'est pas assez grand. On a donc réduit la concentration de NEDD de moitié, pour arriver à une concentration finale de 0,24 mM, ce qui est tout de même acceptable selon le graphique.

En gardant les concentrations optimales de NEDD et de sulfanilamide fixes, on a finalement fait varier la concentration de HCl. Comme le montre la figure 3.1C, ce paramètre a peu d'effet sur l'absorbance. On conservera donc une concentration de HCl finale de 0,17 M dans les dosages.

3.1.2 Adaptation du dosage de Griess aux NO_3^- et aux RSNO

L'acide sulfamique est utilisé pour éliminer les NO_2^- avant le dosage des autres dérivés du NO , et sa concentration devait être ajustée. En effet, si la quantité est trop faible, l'élimination sera incomplète et le dosage surévaluera les autres dérivés. Si, au contraire, la quantité est trop grande, les NO_3^- et les RSNO seront éliminés dès leur conversion en NO_2^- ou en NO^+ , et leur dosage sera sous-évalué. La figure 3.2A montre l'efficacité d'élimination d'une très grande concentration de NaNO_2 (200 μM) par différentes concentrations d'acide sulfamique. Cette élimination est importante dès la plus faible concentration de réactif (2 mM), mais est complète à partir de 30 mM. Selon la figure 3.2B, l'élimination prend tout de même un certain temps. Elle est complète après 10 min, autant pour une petite que pour une grande concentration de NaNO_2 .

La détection des NO_3^- et des RSNO par le dosage de Griess a été optimisée en faisant varier les différents paramètres de leur conversion en NO_2^- ou en NO^+ . La détection de ces produits a été faite selon les conditions optimales déterminées précédemment. Tout d'abord, différents volumes d'une solution de VCl_3 10 mg/mL dans le HCl 0,5 M ont été ajoutés à une solution standard de NaNO_3 pour réduire les NO_3^- en NO_2^- . Dans ce dosage, illustré par la figure 3.3A, l'absorbance maximale est atteinte par 50 μL de la solution, ce qui correspond

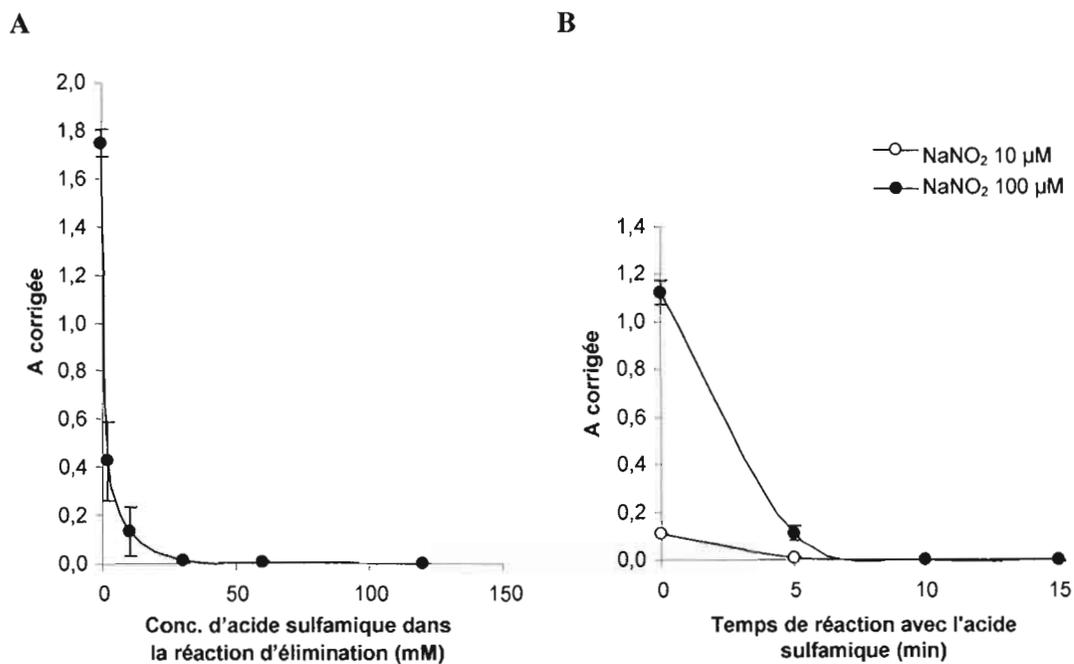


Figure 3.2 Élimination des NO_2^- par l'acide sulfamique. Une solution de NaNO_2 dans le PBS a été traitée avec une solution d'acide sulfamique dans l'eau pour éliminer les NO_2^- , et les NO_2^- résiduels ont été dosés par la réaction de Griess précédemment optimisée. (A) Le traitement d'élimination a été fait par différentes concentrations d'acide sulfamique pendant 10 min sur une solution de NaNO_2 à 200 μM . (B) Le traitement à l'acide sulfamique 30 mM a été fait pendant des temps variables sur une faible ou une forte concentration de NaNO_2 . Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata \pm écart moyen, et chacune a été corrigée par un blanc sans NaNO_2 .

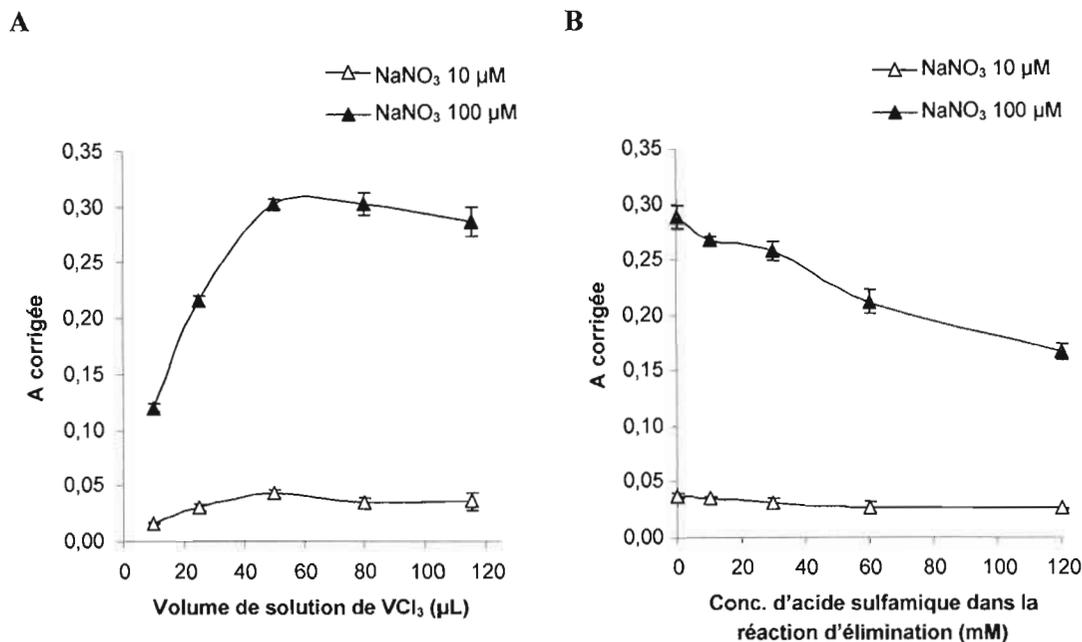


Figure 3.3 Optimisation du dosage des NO_3^- par la méthode de Griess. Une solution de $NaNO_3$ dans le PBS, à faible ou à forte concentration, a été traitée avec une solution de VCl_3 10 mg/mL dans le HCl 0,5 M pour convertir les NO_3^- en NO_2^- . Les NO_2^- ainsi formés ont immédiatement été mesurés par le dosage de Griess optimisé, dans un volume final de 200 μL . (A) Différents volumes de la solution de VCl_3 ont été ajoutés au $NaNO_3$. (B) Le $NaNO_3$ a été traité avec différentes concentrations d'acide sulfamique 10 min avant l'ajout de 50 μL de VCl_3 (2,5 mg/mL final). Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata \pm écart moyen, et chacune a été corrigée par un blanc sans $NaNO_3$.

à une concentration finale de 2,5 mg/mL en VCl_3 . La concentration finale en HCl apportée par la solution de VCl_3 est de 0,13 M de HCl, ce qui donne un total de 0,3 M si on l'additionne aux 0,17 M de HCl apportés par les réactifs de Griess. Comme il a déjà été montré (figure 3.1C), une variation de la quantité de HCl n'influence pas le dosage de Griess, même à cette concentration. L'augmentation de la détection de NO_3^- provient donc d'une meilleure conversion en NO_2^- par le VCl_3 . Pour s'assurer que l'acide sulfamique n'interfère pas avec la détection des NO_3^- , le dosage a ensuite été fait après un traitement du $NaNO_3$ avec différentes concentrations d'acide sulfamique. La figure 3.3B révèle que l'acide sulfamique à 30 mM cause une faible diminution de l'absorbance, d'environ 10%. La détection demeure quand même assez grande pour servir aux études. Les dosages des NO_3^- pourront donc être effectués après un traitement à l'acide sulfamique 30 mM.

L'optimisation du dosage des RSNO a été réalisée à l'aide d'une solution de BSA S-nitrosé, préparée la journée-même. Le BSA-S-NO a donc été dénitrosé par du $HgCl_2$ à différentes concentrations avant le dosage du NO^+ ainsi libéré. Comme le montre la figure 3.4A, l'absorbance augmente avec la quantité de $HgCl_2$, jusqu'à un plateau qui représente une saturation. Ce plateau est d'ailleurs atteint plus rapidement avec le BSA-S-NO 10 μM qu'avec le BSA-S-NO 100 μM . Il faudra tout de même utiliser le $HgCl_2$ à 100 μM pour s'assurer de dénitroser tous les RSNO dans les échantillons. La dénitrosation par le $HgCl_2$ ne nécessite pas une étape préalable au dosage, comme le démontre la figure 3.4B. L'absorbance n'augmente pas si le traitement au $HgCl_2$ dure plus de 0 min. Elle diminue même un peu, ce qui pourrait être dû à une perte du NO^+ libéré par une diffusion ou une transformation avant la capture par les réactifs de Griess. Enfin, un test a été réalisé pour vérifier la compatibilité du dosage avec l'acide sulfamique. La solution de BSA-S-NO préparée à partir de BSA et de $NaNO_2$ contient toujours une certaine quantité de NO_2^- libres résiduels. Ceux-ci deviennent des contaminants qui interfèrent avec le dosage des RSNO. La méthode de dosage habituelle mesure donc les NO_2^- libres sans ajouter de $HgCl_2$, et soustrait cette valeur du dosage avec le $HgCl_2$ pour obtenir la mesure des RSNO seulement. L'alternative qui consiste à éliminer les NO_2^- libres par l'acide sulfamique offre l'avantage d'un dosage direct, qui nécessite moins d'échantillons et réduit l'erreur. La figure 3.4C est une comparaison des deux méthodes. Le BSA-S-NO à petite et à grande concentration a été

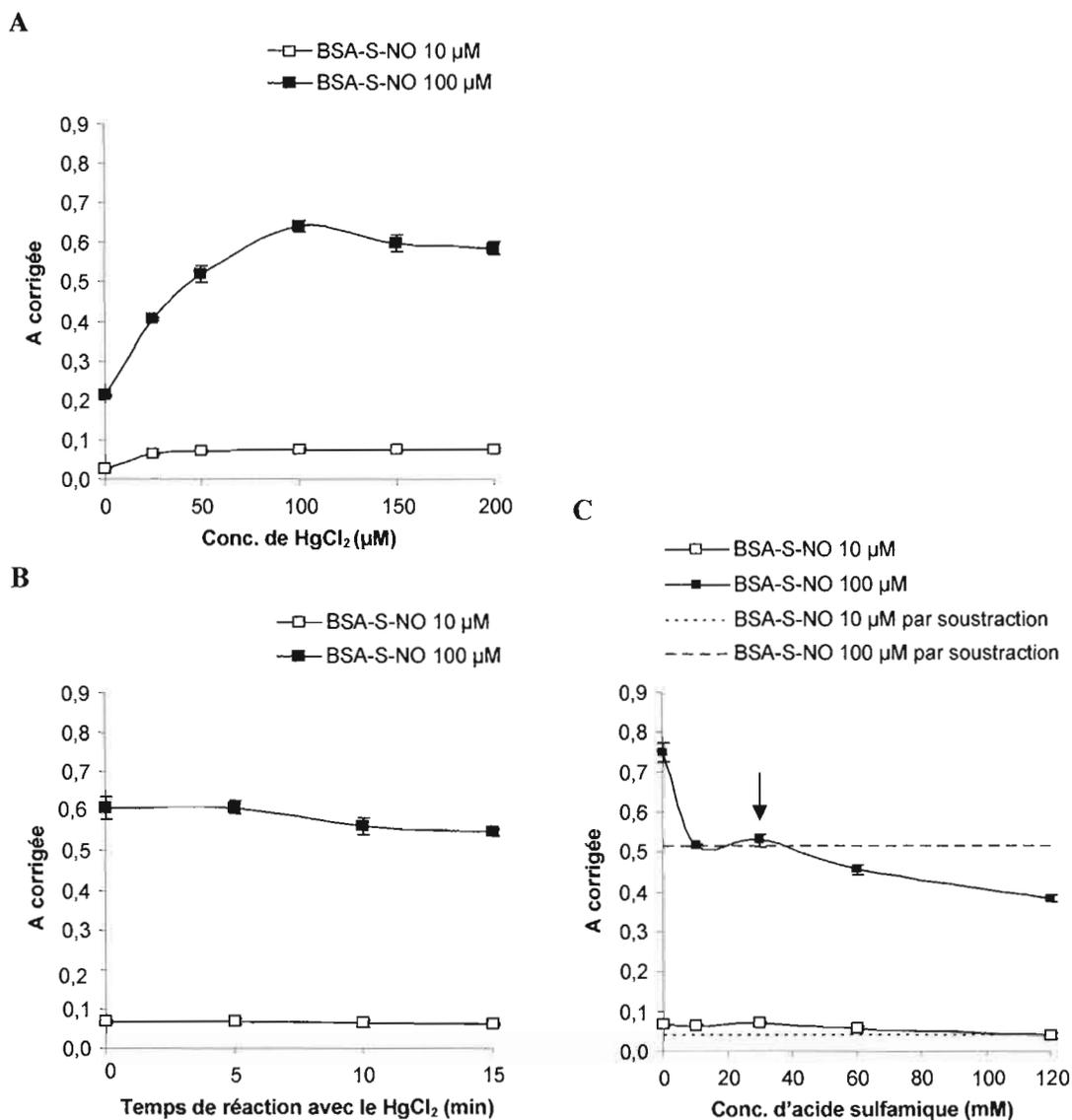


Figure 3.4 Optimisation du dosage des RSNO par la méthode de Griess. Une solution de BSA-S-NO fraîchement préparée dans le PBS, à faible ou à forte concentration, a été traitée avec une solution de HgCl₂ dans l'eau pour dénitrer le BSA. Le NO[•] ainsi libéré a été mesuré par le dosage de Griess optimisé. (A) Différentes concentrations de HgCl₂ ont été ajoutées au BSA-S-NO 10 min avant le dosage de Griess. (B) Le BSA-S-NO a été traité avec 100 μM de HgCl₂ pendant des temps variables avant le dosage de Griess. (C) Le BSA-S-NO a été traité avec différentes concentrations d'acide sulfamique 10 min avant l'ajout de 100 μM de HgCl₂ et des réactifs de Griess. Les courbes ainsi générées sont comparées avec une valeur d'absorbance obtenue par la méthode de soustraction (voir texte) et la flèche indique la concentration retenue. Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata ± écart moyen, et chacune a été corrigée par un blanc sans BSA-S-NO.

dosé après un traitement avec différentes concentrations d'acide sulfamique. Chaque courbe est comparée avec la valeur obtenue par la méthode de soustraction. Le graphique confirme que le traitement avec 30 mM d'acide sulfamique (montré par une flèche) est efficace puisqu'il offre un dosage équivalent à l'autre méthode.

Pour comparer la détection des NO_2^- , des NO_3^- et des RSNO, des solutions de NaNO_2 , de NaNO_3 et de BSA-S-NO de même concentration ont été dosées en même temps par les méthodes optimisées respectives. L'absorbance a été lue en mode cinétique pendant 1h30 à partir de l'ajout des réactifs de Griess. La figure 3.5 illustre le développement de la coloration des trois dosages en fonction du temps. On remarque d'abord que les NO_2^- génèrent une absorbance beaucoup plus grande que les autres dérivés du NO, même s'ils sont tous à la même concentration. La conversion des NO_3^- et des RSNO en NO_2^- ou en NO^+ est donc incomplète, ce qui n'empêche pas la détection. La coloration dans le dosage des NO_2^- est pleinement développée après environ 10 min, puis demeure stable pendant tout le test. Pour ce qui est des RSNO, la coloration prend environ 17 min à se développer, mais demeure également stable par la suite. Pour simplifier les manipulations, les lectures d'absorbance de ces deux dosages seront faites en même temps, soit 30 min après l'ajout des réactifs de Griess. Les NO_3^- , par contre, sont détectés beaucoup plus lentement par les réactifs de Griess. L'absorbance sera donc mesurée après une incubation plus longue dans leur cas, c'est-à-dire après 1h30. Des périodes d'incubation encore plus longues pourraient être plus efficaces, mais auraient grandement allongé la procédure. L'utilisation de courbes d'étalonnage à chaque étude permet de corriger pour les développements de coloration incomplets. Les procédures optimisées sont résumées dans le tableau 3.1 (sections « Prétraitement » et « Dosage de Griess »).

3.1.3 Optimisation du dosage au DAN

Le dosage des NO_2^- a aussi été fait et optimisé avec la sonde fluorescente DAN. La réaction du NaNO_2 , à deux concentrations, avec le DAN 25 μM (final) dans le HCl 0,05 M (final) a d'abord été arrêtée à différents temps par l'ajout d'un excès de NaOH. Le test est représenté à la figure 3.6A. Pour le NaNO_2 100 μM , l'absorbance semble augmenter avec le temps au-delà de 10 min, tandis qu'à 10 μM , elle diminue à partir de ce temps. Il est

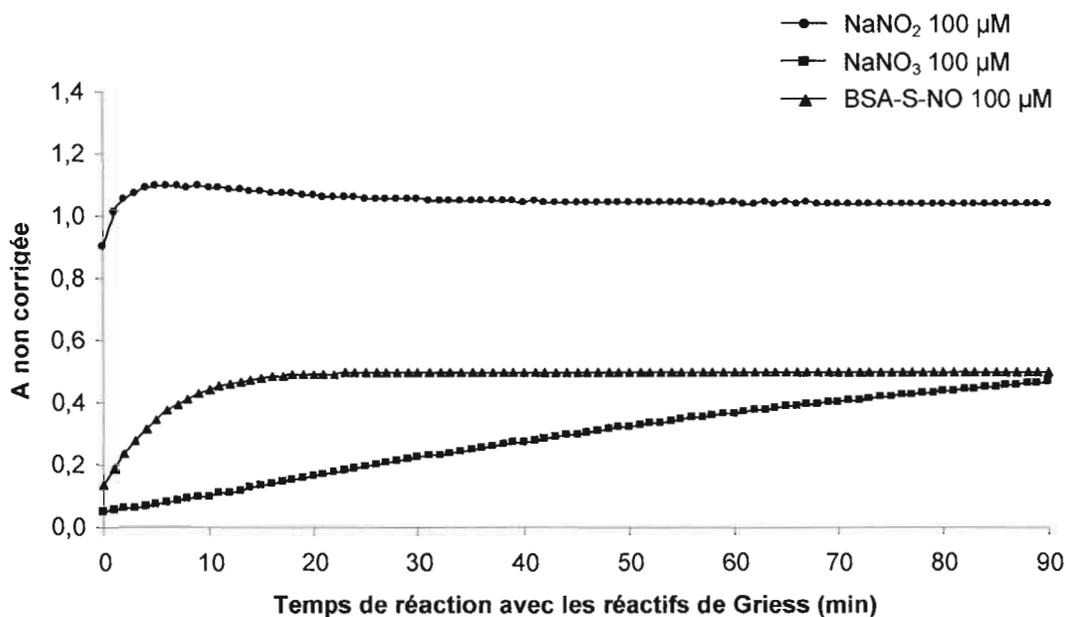


Figure 3.5 Cinétique de la réaction de Griess dans les différents dosages. Les NO_2^- , les NO_3^- et les RSNO ont été mesurés dans des solutions de NaNO_2 , de NaNO_3 ou de BSA-S-NO fraîchement préparé, toutes à 100 μM dans le PBS. Le dosage de chaque espèce a été fait par la méthode de Griess selon les protocoles optimisés (tableau 3.1). Les lectures d'absorbance ont été faites en mode cinétique sur 1h30 à partir de l'ajout des réactifs de Griess. Le graphique est représentatif de triplicatas.

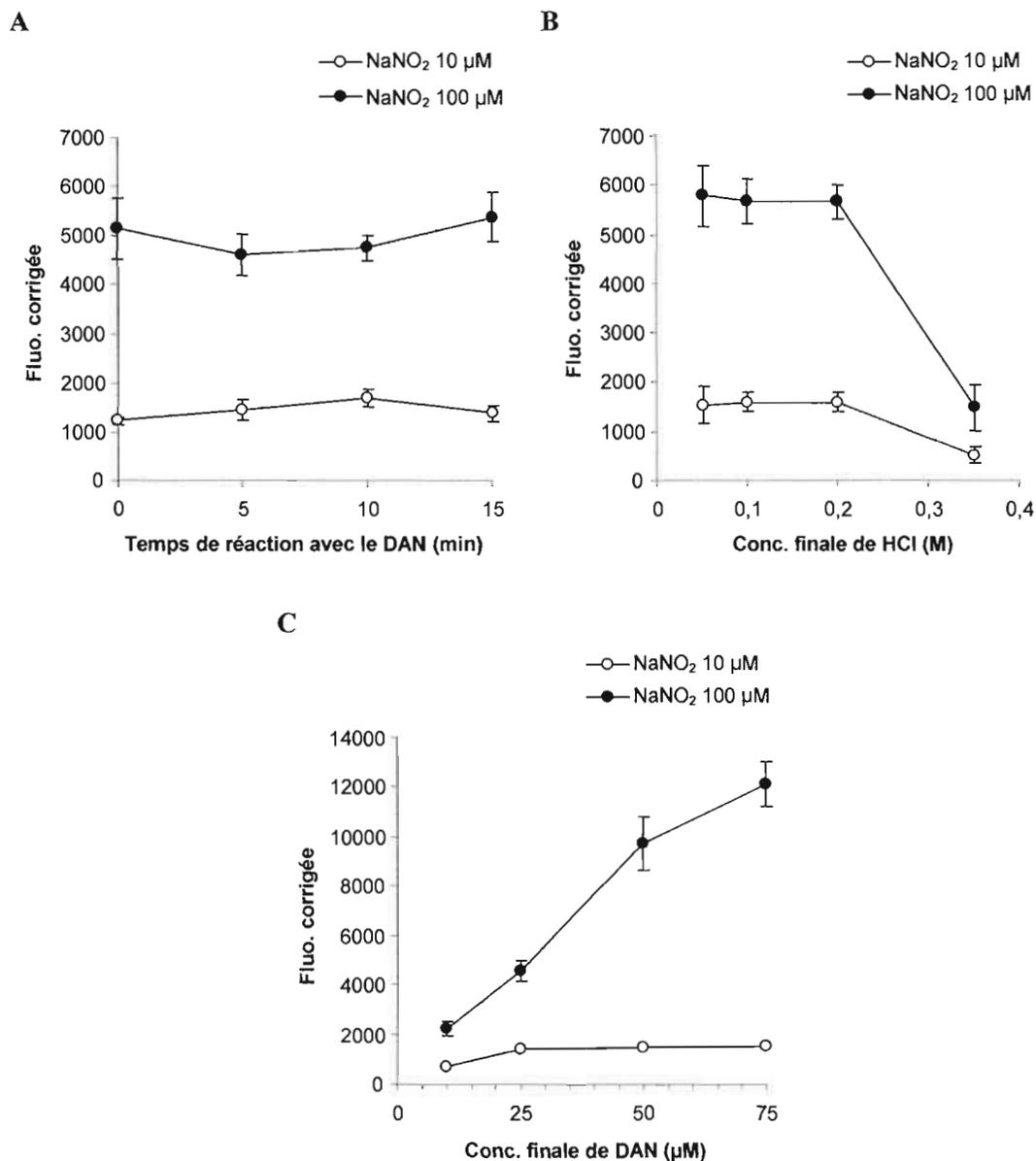


Figure 3.6 Optimisation du dosage des NO₂⁻ avec le DAN. Une solution de DAN dans le HCl a été ajoutée à une solution de PBS contenant une faible ou une forte concentration de NaNO₂. Après un certain temps, la réaction a été arrêtée par l'ajout de NaOH 0,2 M, et la fluorescence a été mesurée (excitation 355 nm, émission 460 nm). (A) La réaction avec 25 µM final de DAN dans 0,05 M final de HCl a été arrêtée à différents temps par l'ajout de NaOH. (B) La réaction avec 25 µM final de DAN et différentes concentrations de HCl a été arrêtée après 10 min. (C) La réaction avec différentes concentrations de DAN dans 0,05 M final de HCl a aussi été arrêtée après 10 min. Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata ± écart moyen, et chacune a été corrigée par un blanc sans NaNO₂.

donc préférable d'arrêter la réaction à 10 min exactement pour obtenir un bon dosage des faibles et des fortes concentrations. La concentration de HCl a ensuite été modifiée, tout en conservant la concentration de DAN à 25 μM et le temps de réaction optimal de 10 min. Tel qu'illustré par la figure 3.6B, la concentration de HCl est suffisante à 0,05 M et peut être augmentée jusqu'à 0,2 M sans affecter le dosage, mais ne doit pas dépasser cette limite. On peut calculer que pour le dosage des NO_3^- , l'ajout de VCl_3 dans le HCl entraînera une augmentation de 0,13 M de HCl, pour un total de 0,18 M. Cette concentration est à l'intérieur des limites et ne causera pas de problèmes dans le dosage. La réaction par différentes concentrations de DAN a finalement été testée. La figure 3.6C révèle que les 25 μM du protocole de départ sont insuffisants pour les grandes concentrations de NO_2^- et que le dosage peut être grandement amélioré en augmentant la quantité de DAN. Une concentration de 70 μM de DAN a été arrêtée pour les prochaines études. À cette concentration, la valeur de la fluorescence est directement proportionnelle à la concentration de NO_2^- (fluo. = 12000 pour 100 μM et 1200 pour 10 μM). Les paramètres optimisés pour le dosage au DAN sont résumés dans le tableau 3.1.

3.1.4 Effet de différents milieux sur les courbes d'étalonnage des dérivés du $\text{NO}\cdot$

Des courbes d'étalonnage ont été établies pour tester l'effet de différents milieux sur les dosages optimisés des NO_2^- , NO_3^- et RSNO dans des solutions de NaNO_2 , de NaNO_3 et de BSA-S-NO. Les dosages optimisés (tableau 3.1) serviront à calculer les concentrations des dérivés du $\text{NO}\cdot$ dans des échantillons inconnus, comme les milieux de culture des cardiomyocytes. C'est pourquoi les dilutions ont été faites dans le milieu de culture, en plus du PBS. Le dosage des NO_2^- par la méthode de Griess (figure 3.7A) donne des courbes presque identiques dans les deux milieux. Quoique ces courbes soient plutôt linéaires dans l'ensemble, la linéarité est la meilleure entre 0 et 100 μM , probablement à cause d'une saturation des réactifs si on dépasse cet intervalle. Le dosage est toutefois très sensible et permet une bonne mesure de concentrations aussi petites que 2 μM de NO_2^- dans un échantillon de 100 μL , ce qui correspond à 0,2 nmol. Les courbes du dosage des NO_3^- (figure 3.7B) sont quant à elles linéaires jusqu'à 200 μM , mais celle du milieu de culture n'atteint pas les mêmes absorbances que celle du PBS. Le milieu de culture présente donc une légère interférence avec le dosage, et il sera alors très important, pour calculer une concentration

Tableau 3.1 Protocoles optimisés pour les dosages des dérivés du NO_x.

NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	RSNO	Solution	Volume	Concentration initiale	Concentration finale
+	+	+	Échantillon	100 µL	n/a	n/a
Prétraitement						
-	+	+	Acide sulfamique / eau	10 µL	330 mM	30 mM
n/a	10	10	min. incubation à température ambiante (110 µL total)			
+	-	-	Eau	60 µL	n/a	n/a
-	+	-	VCl ₃ / HCl	50 µL	10 mg/mL / HCl 0,5 M	2,5 mg/mL / HCl 0,125 M
-	-	+	HgCl ₂ / eau	50 µL	400 µM	100 µM
Dosage de Griess						
+	+	+	NEDD / eau	20 µL	2,4 mM	0,24 mM
+	+	+	Sulfanilamide / HCl	20 µL	150 mM / HCl 1,7 M	15 mM / HCl 0,17 M
30	90	30	min. incubation à 37°C, lectures d'absorbance à 560 nm (200 µL total)			
Dosage au DAN						
+	+	+	DAN / HCl	40 µL	350 µM / HCl 0,25 M	70 µM / HCl 0,05 M
10	10	10	min. incubation à température ambiante (200 µL total)			
+	+	+	NaOH	40 µL	1,2 M	0,2 M
lectures de fluorescence à ex. 355 nm, ém. 460 nm (240 µL total)						

Chaque étape des dosages des NO₂⁻, des NO₃⁻ et des RSNO par la réaction de Griess ou par le DAN a été optimisée. Les protocoles ont été élaborés de façon à permettre la comparaison des NO₂⁻, des NO₃⁻ et des RSNO d'un même échantillon. n/a. : ne s'applique pas.

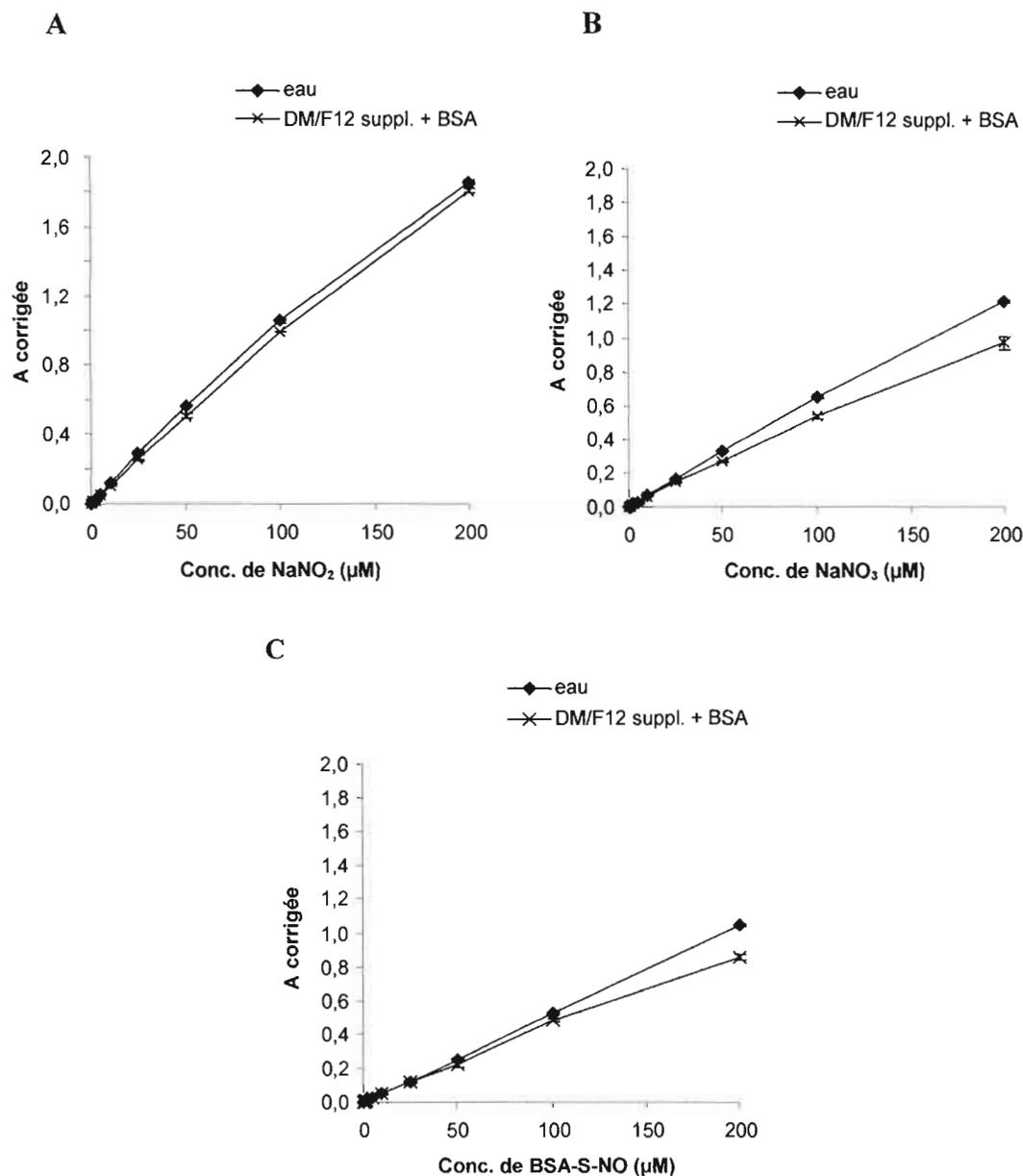


Figure 3.7 Courbes d'étalonnage des dosages de Griess dans différents milieux. Des courbes d'étalonnage pour les dosages des NO₂⁻, NO₃⁻ et RSNO ont été établies à partir de dilutions successives de NaNO₂, de NaNO₃ et de BSA-S-NO fraîchement préparé, dans l'eau ou dans le milieu de culture (DM/F12 suppl. + BSA). Les dosages de Griess ont été faits dans les conditions optimales décrites dans le tableau 3.1. Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata ± écart moyen, et chacune a été corrigée par un blanc sans NaNO₂, NaNO₃ ou BSA-S-NO.

inconnue, d'utiliser une courbe d'étalonnage fabriquée dans le même milieu que l'échantillon. Une faible interférence est également détectée dans le dosage des RSNO (figure 3.7C), en particulier au-delà de 100 μM de BSA-S-NO. De façon générale, les dosages par la réaction de Griess sont donc adéquats pour doser entre 2 et 100 μM de NO^+ .

Contrairement à ce qui est observé avec les dosages de Griess, le milieu de culture interfère de façon importante avec la détection par le DAN, comme le montre la courbe d'étalonnage des NO_2^- (figure 3.8A). Le BSA a déjà été rapporté comme interférant dans le dosage fluorimétrique DAN (Misko *et al.*, 1993). Les raisons n'ont pas été explicitées mais le BSA pourrait compétitionner avec le DAN pour l'interaction avec l'espèce nitrosante N_2O_3 formée à partir du NO_2^- en milieu acide. À première vue, il est étonnant que cette interférence du BSA ne soit pas observée avec le Griess. Les concentrations de HCl différentes utilisées dans les deux dosages pourraient fournir une explication. Le HCl, moins concentré dans le dosage DAN que dans le dosage Griess, pourrait ne pas affecter la conformation du BSA requise pour l'interaction avec le N_2O_3 . Pour les deux courbes DAN de la figure 3.8A, la linéarité est assez bonne jusqu'à 100 μM , mais est meilleure entre 0 et 50 μM . La portée du dosage avec le DAN est apparemment moins grande que celle du dosage de Griess mais suffisante pour les concentrations de NO_2^- susceptibles d'être rencontrées physiologiquement. De plus grandes quantités de DAN seraient nécessaires pour étendre le dosage à de plus hautes concentrations de NO_2^- . La sensibilité du dosage DAN est un peu plus grande que celle du Griess, permettant la détection de 0,5 μM de NaNO_2 , soit 0,05 nmol, à condition que ce soit dans le PBS. Dans le milieu de culture, à cause de plus grands écarts, la sensibilité est équivalente à celle du dosage de Griess. Le dosage DAN a aussi été appliqué à des solutions de NaNO_3 et de BSA-S-NO prétraitées respectivement avec le VCl_3 et le HgCl_2 selon ce qui est décrit dans le tableau 3.1 (section "prétraitement"). Contrairement au Griess, le DAN ne détecte pas du tout les NO_3^- (figure 3.8B), et très peu les RSNO (figure 3.8C), aussi bien dans l'eau que dans le milieu de culture. On peut supposer que les 10 min de réaction avec la sonde fluorescente ne sont pas suffisantes pour achever la conversion par le VCl_3 ou le HgCl_2 . Les deux étapes ne peuvent toutefois pas être séparées. En effet, le DAN doit être présent pour lier le NO^+ dès la conversion et ainsi empêcher sa diffusion dans l'air ou sa transformation en d'autres dérivés. D'autres tests d'optimisation, par exemple du pH du

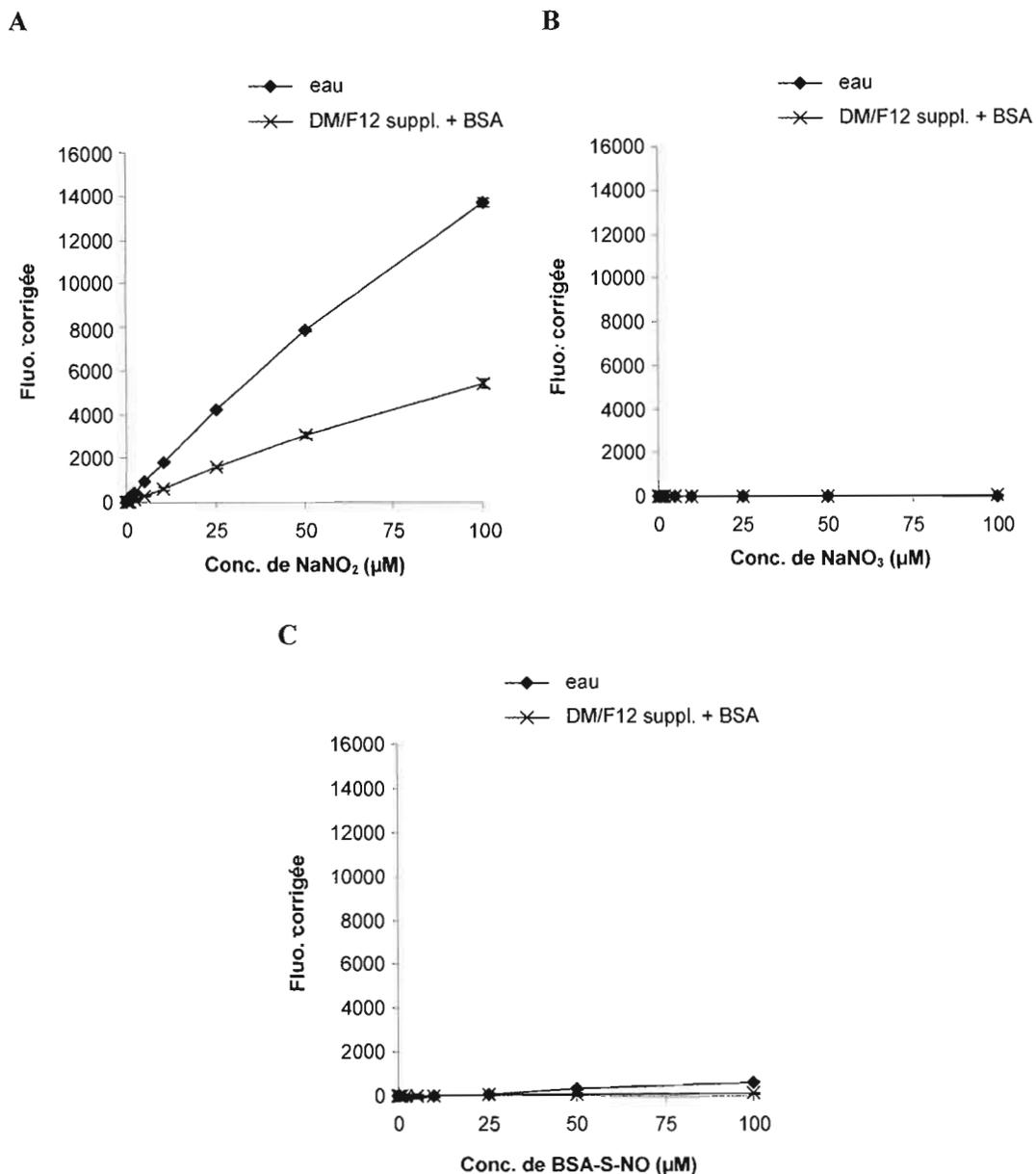


Figure 3.8 Courbes d'étalonnage des dosages au DAN dans différents milieux. Des courbes d'étalonnage pour les dosages des NO₂⁻, NO₃⁻ et RSNO ont été établies à partir de dilutions successives de NaNO₂, de NaNO₃ et de BSA-S-NO fraîchement préparé, dans l'eau ou dans le milieu de culture (DM/F12 suppl. + BSA). Les dosages avec le DAN ont été faits dans les conditions optimales décrites dans le tableau 3.1. Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata ± écart moyen, et chacune a été corrigée par un blanc sans NaNO₂, NaNO₃ ou BSA-S-NO.

mélange réactionnel avant et après l'arrêt de la réaction, auraient pu améliorer la détection des dérivés NO_3^- et RSNO par la sonde DAN. Ces tests n'ont toutefois pas été réalisés puisque nous avons choisi de poursuivre les études avec le dosage de Griess, un peu moins sensible mais non affecté par le milieu de culture.

3.1.5 Interférence de la CP

Une grande partie des expériences qui suivront consistera à évaluer l'action potentielle de la CP sur le $\text{NO}\cdot$. En fait, tout le travail d'optimisation des dosages des dérivés du $\text{NO}\cdot$ qui précède avait pour but de rendre cette évaluation la plus sensible possible. Il est maintenant important de s'assurer que la CP, qui sera présente dans les milieux de culture, ne causera pas d'interférence dans les dosages. Pour ce faire, il faut évidemment comparer les dosages des dérivés du $\text{NO}\cdot$ en présence et en absence de CP, mais il faut également tenir compte de l'action potentielle de la CP sur ces dérivés, qu'on ne connaît pas encore. Une méthode de déplétion de la CP par des précipitations à l'AE-agarose a donc été élaborée. Un dosage des protéines par la méthode de Bradford a montré que deux précipitations successives étaient suffisantes pour enlever environ 98% de CP dans un échantillon en contenant 600 $\mu\text{g/mL}$ (figure 3.9). Cette concentration de CP était la plus haute concentration utilisée avec les cardiomyocytes.

L'étude de l'interférence de la CP dans le dosage des dérivés du $\text{NO}\cdot$ a donc été réalisée avant et après deux précipitations de la protéine avec l'AE-agarose. Pour réduire le nombre d'échantillons à traiter, et alléger la procédure, c'est un mélange de NaNO_2 , de NaNO_3 et de GSNO (comme RSNO) qui a été utilisé. Les NO_2^- , les NO_3^- et les RSNO ont été dosés séparément (figure 3.10A à C). On note tout d'abord que, même sans CP, la précipitation diminue de manière importante la quantité des dérivés du $\text{NO}\cdot$ résiduels. Cela vient du fait que le gel d'AE-agarose contient un certain volume de tampon qui dilue l'échantillon à chaque précipitation. On peut tout de même comparer l'allure des courbes, qui, elle, révèle l'effet de la CP. Le niveau de NO_2^- diminue faiblement en présence de CP (de 10%), mais revient à la normale lorsqu'on enlève celle-ci. Les RSNO se comportent sensiblement de la même façon. La CP cause donc une faible interférence au niveau de la détection des NO_2^- et des RSNO, qui n'empêchera pas les dosages, mais dont il faudra tenir compte lors de

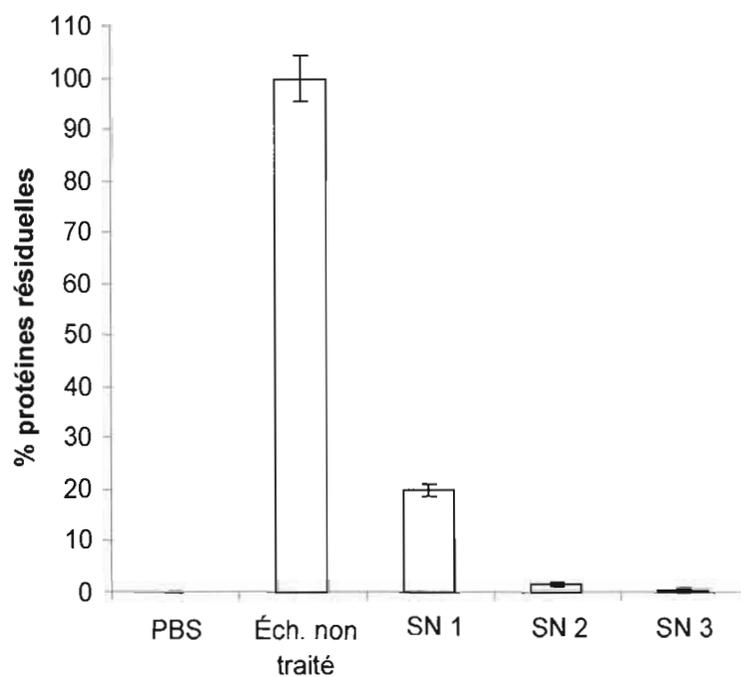


Figure 3.9 Précipitation de la CP par l'AE-agarose. Un échantillon de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CP dans le PBS a subi 3 précipitations consécutives avec de l'AE-agarose. Des aliquotes de l'échantillon non traité et des surnageants (SN) obtenus après chaque précipitation (1 à 3) ont été dosés pour leur contenu en protéines résiduelles par la méthode de Bradford. Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata \pm écart moyen.

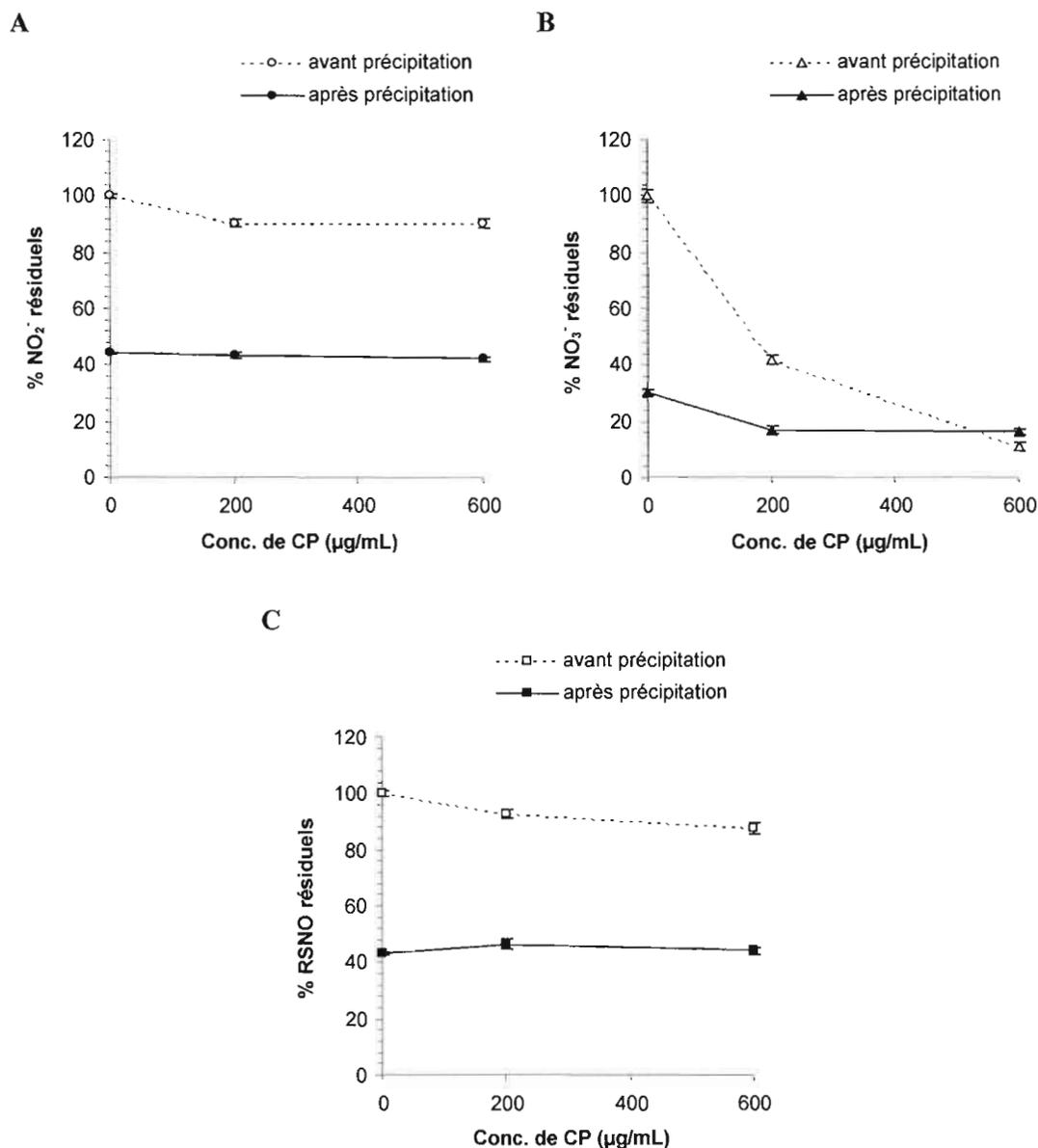


Figure 3.10 Interférence de la CP dans le dosage des dérivés du NO \cdot . La CP à 0, 200 ou 600 µg/mL a été ajoutée à un mélange de NaNO₂, de NaNO₃ et de GSNO à 100 µM chacun. La moitié de chaque échantillon a été conservée à 4°C jusqu'aux dosages, et l'autre moitié a subi deux précipitations de la CP à l'AE-agarose. Les NO₂⁻ (A), les NO₃⁻ (B) et les RSNO (C) de chaque échantillon ont été mesurés séparément par les dosages de Griess optimisés. Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata ± écart moyen, et chacune a été corrigée par un blanc sans NaNO₂, NaNO₃ ou GSNO. Les graphiques sont représentatifs de deux études indépendantes.

l'interprétation des résultats. Pour ce qui est des NO_3^- , l'interférence est beaucoup plus grande. La quantité de NO_3^- chute drastiquement en présence de CP (de 58%), mais seulement faiblement si on l'enlève (de 13%). La faible diminution de la détection des NO_3^- dans ce dernier cas pourrait d'ailleurs être causée par la portion minimale de CP qui n'a pas été enlevée par l'AE-agarose. Le dosage des NO_3^- en présence de CP ne serait donc possible que si la CP était complètement retirée des échantillons biologiques au préalable. Toutefois, dans les prochaines expériences, on s'intéressera surtout aux niveaux de NO_2^- et de RSNO puisque qu'il n'y a pas de NO_3^- générés à des niveaux détectables dans les milieux de culture cellulaire (non montré).

3.2 Tests de viabilité sur les cardiomyocytes de rats nouveau-nés

3.2.1 Culture des cardiomyocytes dans différents milieux

Tout comme les méthodes de dosage des dérivés du $\text{NO}\cdot$, les conditions de culture des cardiomyocytes ont dû être ajustées. Les cardiomyocytes de rats nouveau-nés doivent d'abord êtreensemencés dans un milieu très riche, comme le DM + FBS, pour favoriser leur adhésion. Par la suite, le milieu peut être changé pour une culture à plus long terme. Les cardiomyocytes ont donc été cultivés dans différents milieux pendant 5 jours post-adhésion pour déterminer celui qui leur conférait la meilleure viabilité. La coloration au Hoechst et à l'iodure de propidium (figure 3.11) a révélé que si la culture était poursuivie dans le milieu DM + FBS, la viabilité était de 37% seulement. Il était donc souhaitable de trouver un milieu mieux adapté. Deux milieux sans sérum ont été testés. Tous deux étaient composés de D-MEM/F-12 supplémenté d'acides aminés, de vitamines, d'insuline-transferrine-sélénite (ITS) et de calcium (DM/F12 suppl.), et l'un d'eux contenait en plus 1% de BSA (DM/F12 suppl. + BSA). La viabilité s'est avérée meilleure dans les milieux sans sérum sans BSA et avec BSA, atteignant 51% et 76% respectivement. Le milieu de culture sélectionné pour les tests de toxicité/protection subséquents fut donc le DM/F12 suppl. + BSA. La raison de ces différences de viabilité pourrait être liée à la qualité d'adhésion des cellules. Comme le montrent les photos en fluorescence (figure 3.11), les cardiomyocytes cultivés dans le milieu avec FBS présentent un aspect très étiré, avec plusieurs prolongements, tandis que les cellules

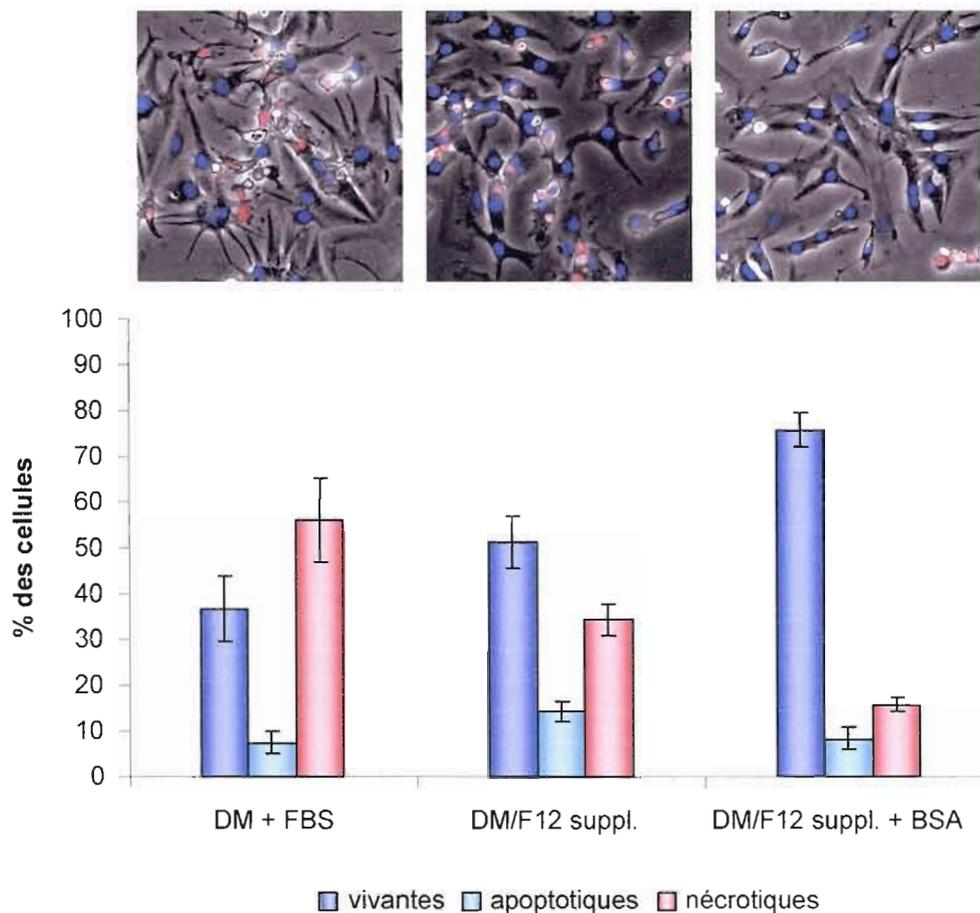


Figure 3.11 Viabilité des cardiomyocytes de rats nouveau-nés cultivés dans différents milieux. Vingt-quatre heures après l'ensemencement dans le milieu DM + FBS, les cellules ont été lavées et le milieu de culture a été changé pour du nouveau DM + FBS, du DM/F12 suppl. ou du DM/F12 suppl. + BSA. Les milieux ont été changés à nouveau après 3 jours. La viabilité a été mesurée au jour 5 (i.e. 24 h après le changement de milieu) par coloration au Hoechst 33342 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et à l'iodure de propidium 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Chaque valeur représente la moyenne du compte cellulaire \pm écart moyen de quatre photos montrant environ 200 cellules chacune. Le graphique est représentatif de trois études indépendantes. Les photos en fluorescence montrent des zones représentatives des cellules cultivées dans chacun des milieux.

cultivées dans les milieux sans sérum sont plus compactes. Le FBS semble provoquer un trop grand étalement des cellules, qui s'aminciraient, et deviendraient plus fragiles.

3.2.2 Sensibilité des cardiomyocytes au H_2O_2

Les tests de toxicité et de protection sont faits au jour 4, un moment où les cardiomyocytes sont bien adhérents au support, et leur viabilité encore au maximum. La viabilité est mesurée 24 heures après l'ajout des traitements pour bien détecter la mortalité cellulaire aux faibles concentrations de H_2O_2 utilisées. Les cardiomyocytes ont d'abord été traités par différentes concentrations de H_2O_2 pour évaluer leur sensibilité. La figure 3.12 montre un pourcentage de viabilité presque constant entre 0 et 20 μM de H_2O_2 , qui chute de moitié à 40 μM et qui devient très faible à partir de 70 μM . Les photos en fluorescence illustrent bien cette décroissance. Les cellules à noyau bleu, en majorité à 0 μM de H_2O_2 , sont presque au même nombre que les cellules à noyau rouge à 40 μM , et deviennent très rares à 70 μM . On remarque que l'apoptose est à peu près nulle à toutes les concentrations de H_2O_2 , un fait constant dans tous les tests de viabilité (non montré). Le pourcentage de cellules en nécrose est donc inversement proportionnel au pourcentage de cellules vivantes. C'est pourquoi les prochains graphiques montreront seulement le pourcentage de cellules vivantes.

3.2.3 Effets de la CP et du $NO\cdot$ sur les cardiomyocytes

L'effet protecteur de la CP a été évalué par rapport à un stress oxydatif généré par le H_2O_2 à 40 μM . Cette concentration de H_2O_2 a été choisie car elle causait la nécrose des cellules de façon appréciable mais pas complète, permettant ainsi de mettre en évidence autant un effet protecteur qu'une augmentation de la toxicité. La figure 3.13A montre que la CP seule a peu d'effet sur les cellules à 200 $\mu g/mL$, mais qu'elle a un faible effet toxique à 600 $\mu g/mL$, tuant environ 10% d'entre elles. Lorsqu'on l'ajoute au H_2O_2 , la CP augmente la toxicité de façon importante. Elle diminue la viabilité d'environ 25% à 200 $\mu g/mL$ et de presque 50% à 600 $\mu g/mL$, par rapport au H_2O_2 seul. La CP seule ne protège donc pas les cardiomyocytes du H_2O_2 , mais rend plutôt celui-ci encore plus toxique.

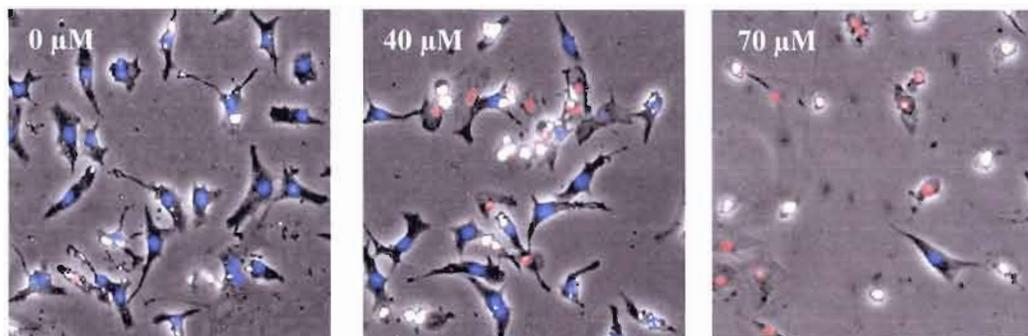
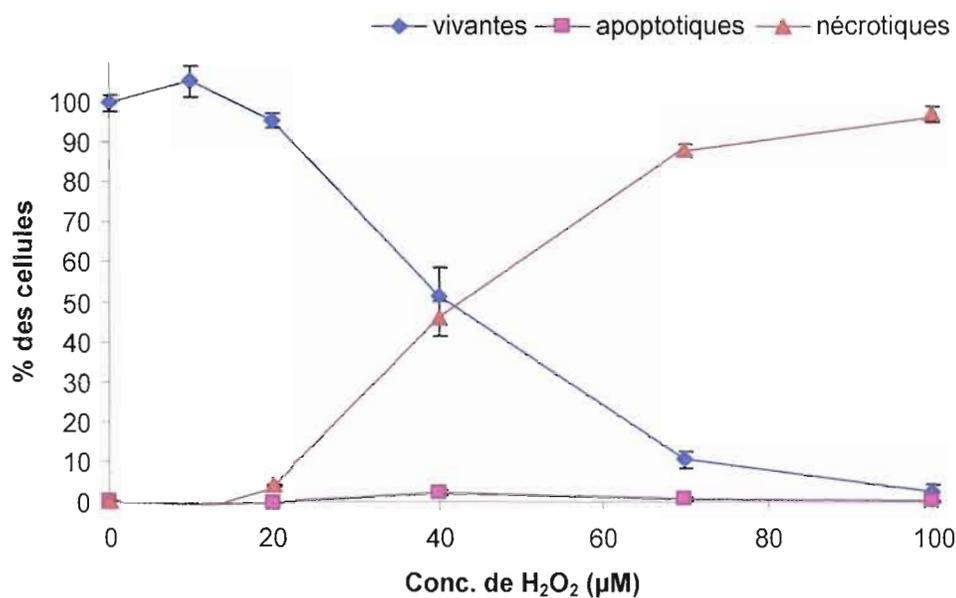


Figure 3.12 Sensibilité des cardiomyocytes de rats nouveau-nés au H₂O₂. Au jour 4, des cellules cultivées dans le milieu DM/F12 suppl. + BSA ont été lavées et incubées dans du nouveau milieu contenant du H₂O₂ à différentes concentrations. La viabilité a été mesurée après 24 heures par coloration au Hoechst 33342 et à l'iodure de propidium. Chaque valeur représente la moyenne du compte cellulaire ± écart moyen de quatre photos montrant environ 200 cellules chacune. Le graphique est représentatif de quatre études indépendantes. Les photos en fluorescence montrent des zones représentatives des cellules traitées au H₂O₂ 0, 40 et 70 μM.

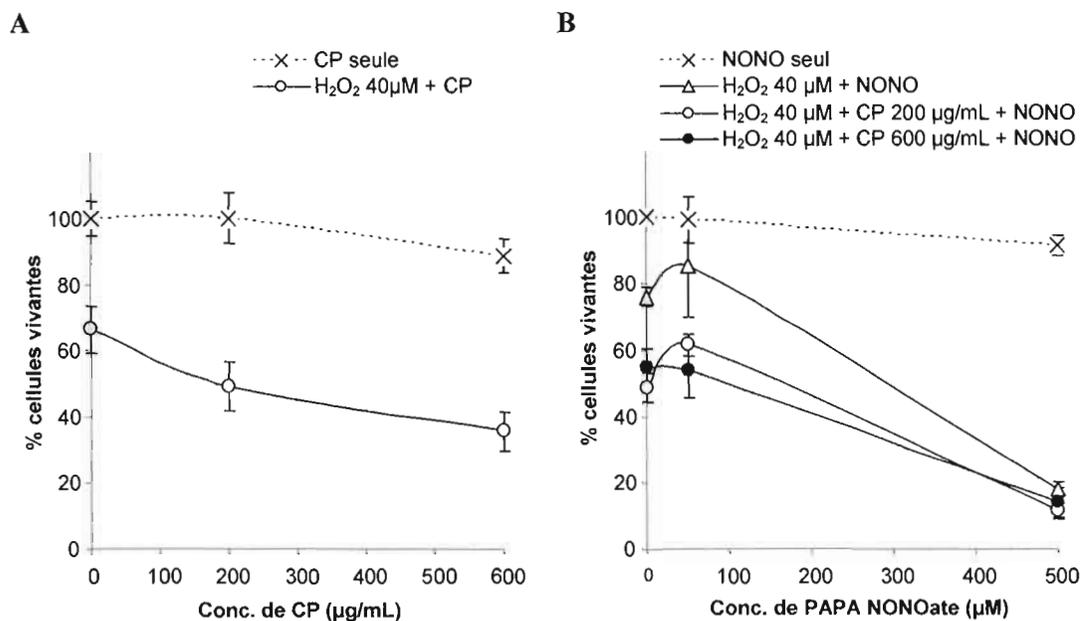


Figure 3.13 Évaluation de la protection des cardiomyocytes par la CP et le NO[•] contre le H₂O₂. Des cellules cultivées dans le milieu DM/F12 suppl. + BSA ont été lavées et incubées 24 heures en présence (A) de combinaisons de CP et de H₂O₂ ou (B) de CP, de H₂O₂ et de PAPA NONOate (NONO). La viabilité a été mesurée à la fin du traitement, par coloration au Hoechst 33342 et à l'iodure de propidium. Chaque valeur représente la moyenne du compte cellulaire ± écart moyen de quatre photos montrant environ 200 cellules chacune. Le graphique A est représentatif de trois études indépendantes et le graphique B, excepté les données de la courbe H₂O₂ + NONO + CP 600 µg/mL, est représentatif de deux études indépendantes.

Selon notre hypothèse, la CP pourrait offrir une protection si on la combine au $\text{NO}\cdot$. Le test de protection a donc été répété en ajoutant un donneur de $\text{NO}\cdot$, le PAPA NONOate, à deux différentes concentrations. Le PAPA NONOate, seul, n'a pas d'effet sur les cardiomyocytes à 50 μM , mais tue environ 10% des cellules à 500 μM , comme le montre la figure 3.13B. Si on l'ajoute au H_2O_2 , il a un léger effet protecteur à 50 μM , en augmentant la viabilité d'environ 10%, mais devient toxique à 500 μM , diminuant la viabilité de près de 60%. Il produit un effet semblable lorsqu'on l'ajoute au $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CP}$ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puisque la courbe a la même allure, excepté que la viabilité est plus faible dès le départ. Avec le $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CP}$ 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, il n'y a pas de protection visible, mais il serait nécessaire de répéter l'étude pour conclure sur ce point. En résumé, l'étude montre que le $\text{NO}\cdot$ à faible concentration est capable de protéger les cardiomyocytes du H_2O_2 , mais que cette protection n'est pas renforcée par la CP. L'hypothèse n'est donc pas confirmée.

3.3 Évaluation des changements dans les milieux de culture lors des traitements cellulaires

3.3.1 Intégrité physique et fonctionnelle de la CP à la fin des traitements

Des analyses ont été faites pour savoir si des changements avaient eu lieu dans les milieux de culture au cours des traitements. L'intégrité de la CP a d'abord été vérifiée dans des échantillons de milieux prélevés à la fin des traitements. La figure 3.14A montre un buvardage d'immunodétection de la CP dans ces échantillons. Pour chaque condition, les deux bandes protéiques caractéristiques de la CP à 132 kDa sont détectées, sauf pour le traitement témoin dans lequel aucune CP n'avait été ajoutée. Aucun fragment n'est visible et l'intensité des bandes originales apparaît constante dans tous les puits. L'activité oxydasique de la CP des mêmes échantillons a aussi été dosée. La figure 3.14B révèle que la CP a perdu environ 20% de son activité oxydasique par rapport à la CP de référence fraîche, ce qui est normal vu l'incubation de 24 heures à 37°C. Par contre, et c'est ce qui importe ici, l'activité ne varie pratiquement pas d'un traitement à l'autre. Donc ni le H_2O_2 ni le $\text{NO}\cdot$ n'ont altéré l'intégrité de la CP, pas plus sur le plan physique que fonctionnel.

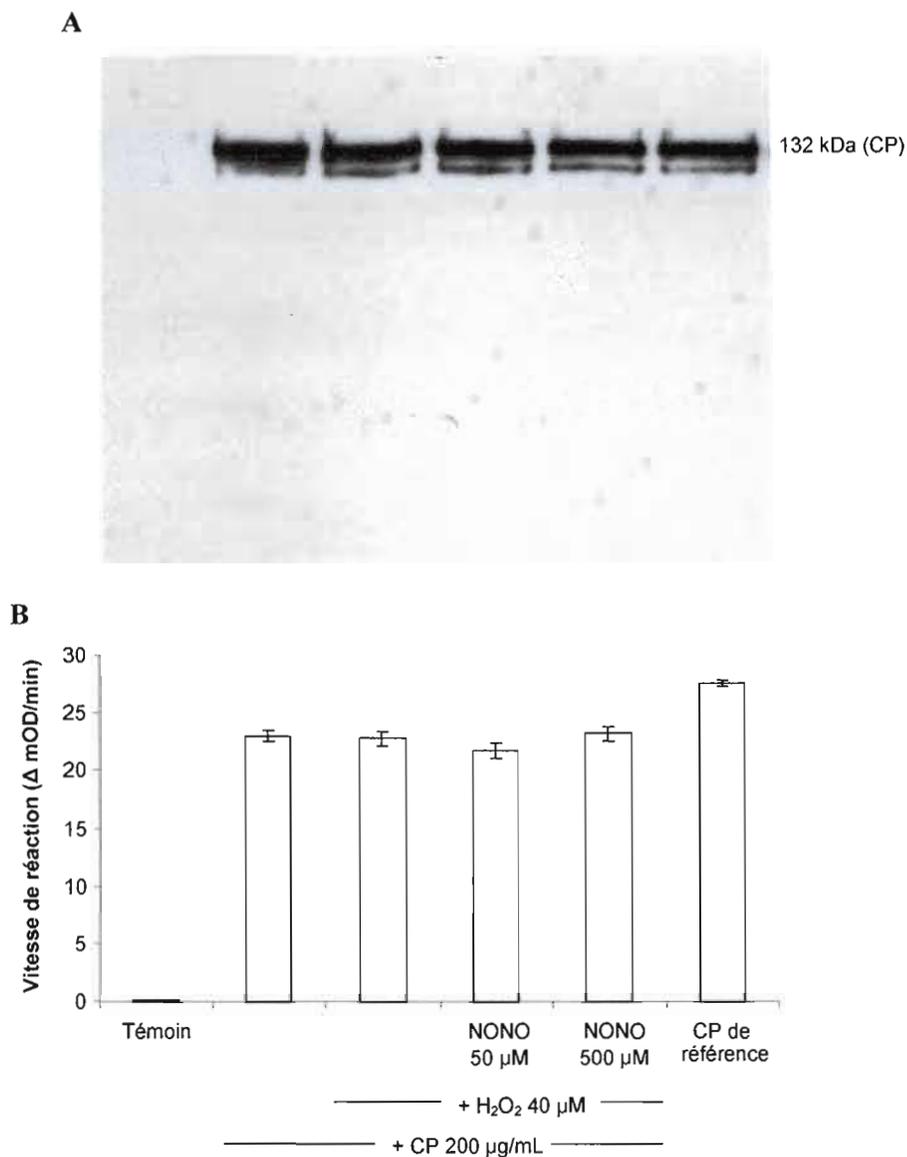


Figure 3.14 Confirmation de l'intégrité physique et fonctionnelle de la CP dans les traitements cellulaires. Les milieux de culture des cardiomyocytes non traités (témoin) et traités à la CP \pm H₂O₂ \pm PAPA NONOate (NONO) ont été prélevés à la fin des 24 heures de traitement. (A) Des aliquotes d'égal volume ont été analysées par SDS-PAGE et buvardage Western. (B) D'autres aliquotes des mêmes milieux ont été analysées par dosage oxydasique avec le substrat pPD. Dans les deux tests, les échantillons de CP incubée avec les cellules ont été comparés avec la préparation-mère de CP (CP de référence) fraîchement décongelée et mise en solution dans du DM/F12 suppl. + BSA. Chaque valeur de vitesse représente la moyenne d'un triplicata \pm écart moyen. Les figures A et B sont représentatives de deux et trois études indépendantes, respectivement.

3.3.2 Dosage des dérivés du NO \cdot dans les milieux à la fin des traitements

Les dérivés du NO \cdot ont aussi été dosés dans les milieux de culture à la fin des traitements, pour connaître l'impact de la CP sur leur formation. D'après la figure 3.15A, le PAPA NONOate 50 μ M a généré environ 30 μ M de NO $_2^-$, et le H $_2$ O $_2$ et la CP ont eu peu d'impact sur ces niveaux. Beaucoup de NO \cdot a donc été perdu puisque 50 μ M de PAPA NONOate peut libérer 100 μ M de NO \cdot , et que peu ou pas de RSNO ont été formés (figure 3.15B). Il est possible qu'une incubation de 24 heures ait été trop longue pour permettre de constater une action de la CP sur le NO \cdot dans les milieux. Cette action aurait pu se produire au début de l'incubation et les produits auraient pu par la suite soit se dégrader, soit interagir avec ou être captés par les cellules. Nous avons donc réalisé une série d'études de l'action de la CP sur la formation de dérivés du NO \cdot dans des temps courts et dans des milieux en absence de cellules.

3.4 Étude de l'action de la CP sur les dérivés du NO \cdot en conditions acellulaires

3.4.1 Effet de la CP sur la détection du NO \cdot libéré par le PAPA NONOate

Nous avons d'abord voulu déterminer la capacité de la CP d'interagir avec le NO au fur et à mesure que ce dernier (sous forme NO \cdot ou NO $^+$) était libéré par le PAPA NONOate. Pour suivre la libération du NO en temps réel, il fallait éviter les conditions acides qui amènent le PAPA NONOate à libérer instantanément tout son NO. Un tel suivi est possible puisque le NO est généré spontanément par le PAPA NONOate et ne nécessite pas une décomposition par l'acide, comme dans le cas du NaNO $_2$. Le suivi a été fait par la méthode du DAN en conditions de pH neutre, lequel donnait de meilleurs résultats dans ces conditions que la méthode de Griess (non montré). Le graphique 3.16A représente la cinétique de détection du NO par le DAN, qui est elle-même directement reliée à la libération du NO par le PAPA NONOate. On peut d'abord remarquer que la détection du NO a atteint son maximum au bout de 2 heures, ce qui indique que le PAPA NONOate a libéré tout son NO après ce temps. La demi-vie de libération du NO, telle que déterminée avec le DAN, est de 20 min, ce qui se rapproche beaucoup de la valeur attendue. En effet, la demi-vie du PAPA NONOate à 37°C dans un tampon phosphate à un pH de 7,4 est de 15 min (Hrabie *et al.*, 1993). On remarque ensuite que la CP diminue la quantité maximale de NO détecté

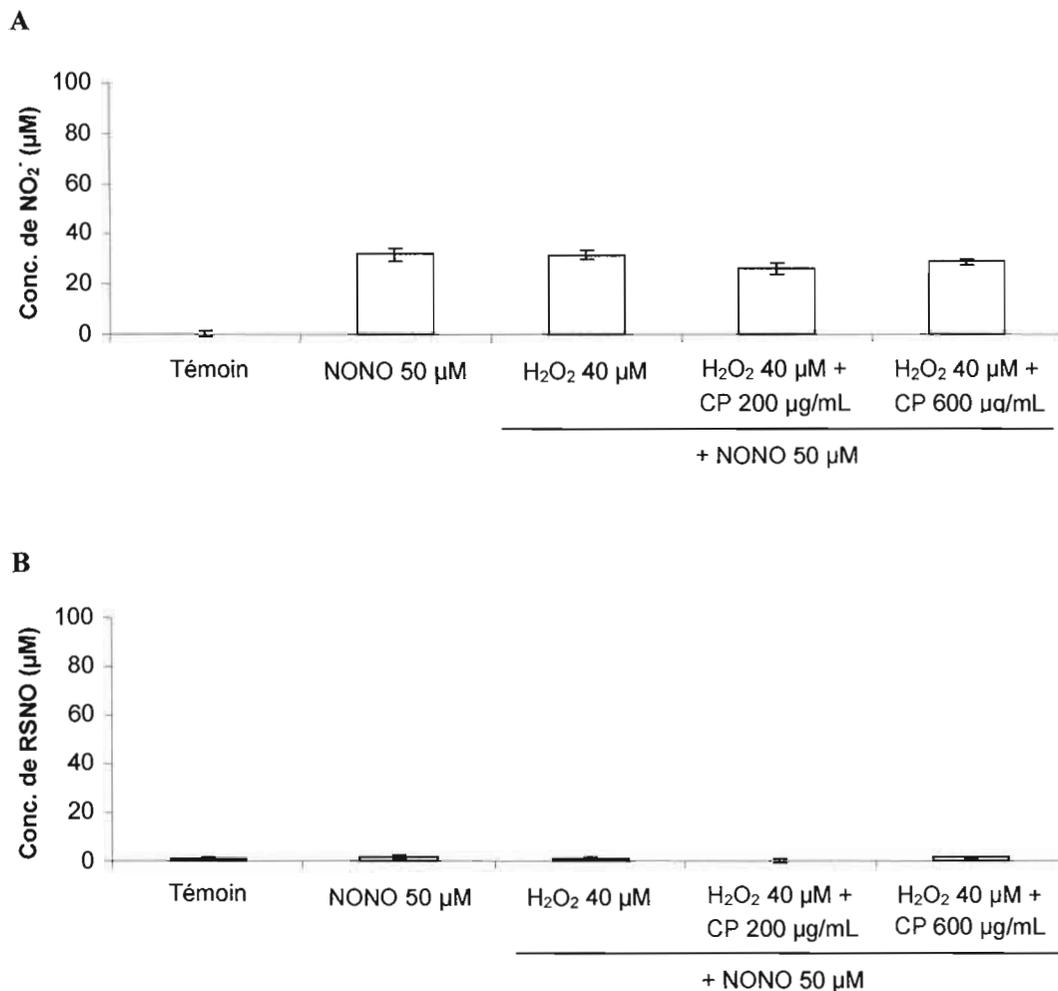


Figure 3.15 Dosage des différents dérivés du NO[•] dans les milieux de culture après les traitements cellulaires. Les milieux de culture des cardiomyocytes non traités (témoin) et traités au H₂O₂ ± CP ± PAPA NONOate (NONO) ont été prélevés à la fin des 24 heures d'incubation. Des aliquotes ont été analysées immédiatement par les dosages de Griess optimisés pour les NO₂⁻ (A), et pour les RSNO (B). Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata ± écart moyen. Les résultats sont représentatifs de deux études indépendantes.

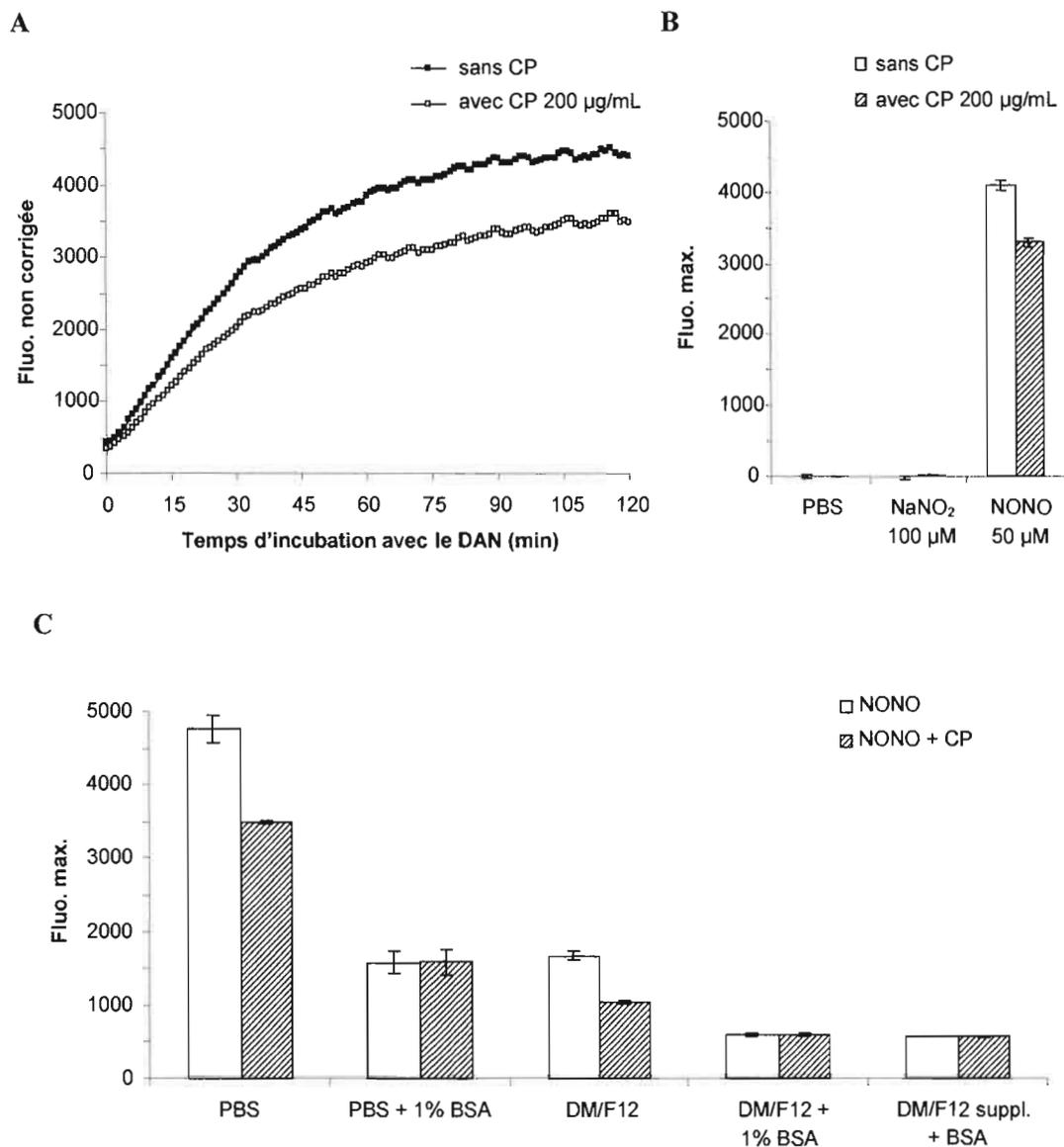


Figure 3.16 Effet de la CP sur la libération du NO· par le PAPA NONOate. Le NO· libéré spontanément par 50 µM de PAPA NONOate dans le PBS, en absence et en présence de CP 200 µg/mL, a été mesuré par la fluorescence (excitation 355 nm, émission 460 nm) produite par un dosage au DAN en conditions neutres. (A) La fluorescence a été lue en mode cinétique pendant 2 heures dès l'ajout du PAPA NONOate. (B) Après 2 heures de réaction, la fluorescence maximale générée par le PAPA NONOate (NONO) ± CP est comparée avec celles générées par le PBS seul et par le PBS contenant du NaNO₂. (C) La fluorescence maximale générée par le PAPA NONOate ± CP est aussi mesurée dans différents milieux. La figure A est représentative de trois essais. Chaque valeur des figures B et C représente la moyenne d'un triplicata ± écart moyen et les résultats sont représentatifs de deux études indépendantes.

sans affecter le temps de demi-vie de la libération du NO. Cette observation est rapportée dans un graphique des fluorescences maximales, lues après 2 heures (figure 3.16B). Le graphique montre aussi que le DAN ne détecte que le NO, et pas les NO₂⁻, lorsque les mesures sont effectuées à pH neutre.

La capacité de la CP d'interagir avec le NO· est donc confirmée. Elle le capte probablement, et le transforme peut-être en un dérivé. Le test a été répété dans différents milieux pour savoir dans quelle mesure la CP a pu interagir avec le NO· lors des traitements cellulaires. La diminution de la fluorescence par la CP, qui est visible dans le PBS, l'est aussi dans le DM/F12, quoique la fluorescence de base soit moins grande dans ce milieu. Toutefois, dans les deux cas, si on ajoute des composés comme le BSA, la fluorescence est fortement réduite et la CP ne produit aucun effet. Ainsi, il semblerait que le BSA inhibe l'action de la CP, peut-être en captant le NO· plus rapidement que la CP.

3.4.2 Effets à court terme de la CP sur la génération de dérivés du NO·

Dans le but d'en savoir plus sur la capture et la transformation du NO· par la CP, des études ont été faites sur les niveaux des dérivés du NO· générés par le PAPA NONOate en présence et en absence de CP et cela, dans des temps plus courts que ceux utilisés avec les cellules. Le PAPA NONOate a aussi été incubé dans différents milieux pendant 1h45 avant les dosages. Cette période de temps correspond à 7 fois le temps de demi-vie du PAPA NONOate (15 min), et permet ainsi une libération presque complète du NO·. La figure 3.17A montre que le niveau de NO₂⁻ générés par le PAPA NONOate dans le PBS diminue avec l'ajout de CP. Lorsque du BSA est ajouté au milieu, par contre, moins de NO₂⁻ sont générés, et la diminution par la CP n'est plus visible. Il se produit la même chose dans le DM/F12 (figure 3.17B). Le dosage des RSNO apporte des explications sur ce phénomène. Dans le PBS (figure 3.17C) comme dans le DM/F12 (figure 3.17D), la CP provoque une formation de RSNO tandis que l'ajout de BSA au milieu permet la formation d'une certaine quantité de RSNO de base. Ces derniers ne sont pas augmentés par la CP. En absence de BSA, la CP semble donc diminuer la transformation du NO· en NO₂⁻ en favorisant plutôt la formation de RSNO. Le BSA aurait un effet semblable et entrerait en compétition avec la CP. En absence de CP (0 µg/mL), le BSA ajouté au PBS ou au DM/F12 diminue lui aussi la formation de

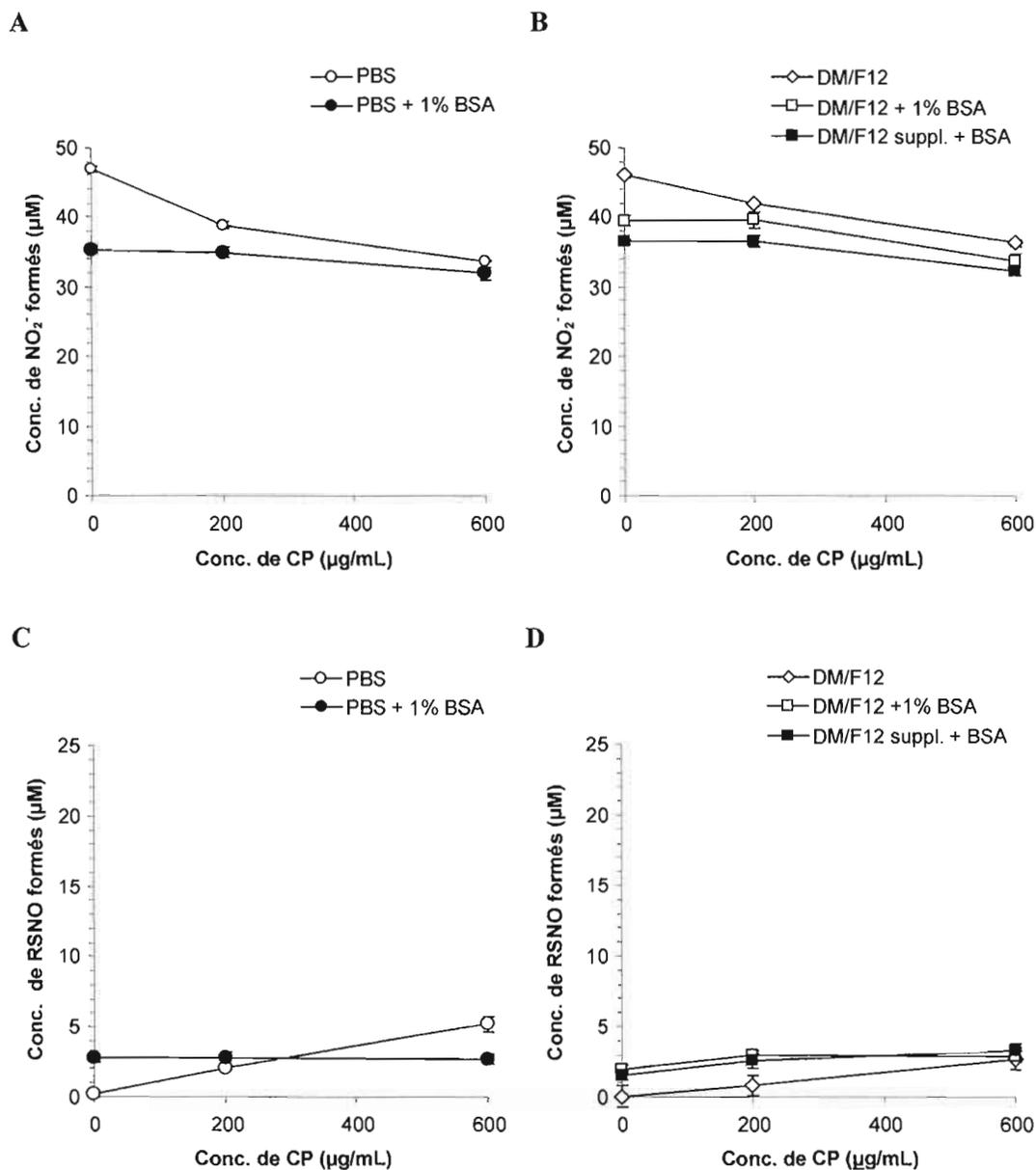


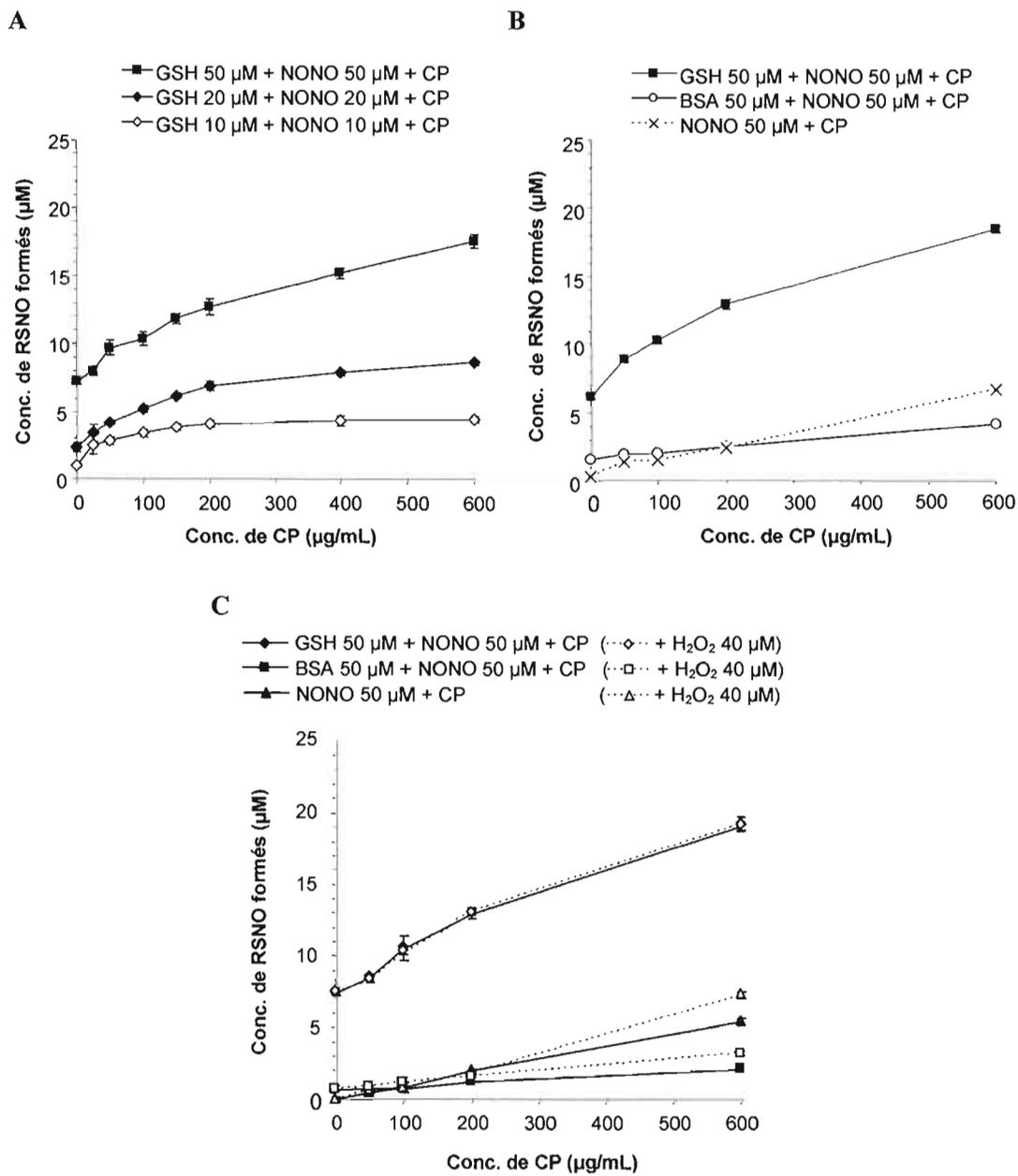
Figure 3.17 Dosage de Griess des dérivés du $\text{NO}\cdot$ générés par le PAPA NONOate dans différents milieux après un temps court. Le PAPA NONOate $50\ \mu\text{M}$ a été incubé à 37°C durant 1h45 dans différents milieux en absence ou en présence de CP. Les réactions ont ensuite été analysées par les dosages de Griess optimisés pour les NO_2^- (A, B), et pour les RSNO (C, D). Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata \pm écart moyen et chacune a été corrigée par un blanc sans PAPA NONOate. Les résultats sont représentatifs de deux études indépendantes.

NO_2^- et augmente la formation de RSNO. Notons que, pour la CP comme pour le BSA, la formation de RSNO dans le tampon PBS se fait vraisemblablement par une réaction d'« auto-nitrosation » puisque aucun autre substrat n'est présent. Par contre, sur une base molaire, la CP est beaucoup plus efficace que le BSA à capturer le $\text{NO}\cdot$ et à le transformer en RSNO. Ainsi, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1,5 μM) de CP dans le PBS génère environ 1,8 μM de RSNO détectable en absence de BSA alors que 1% (150 μM) de BSA dans le même tampon génère environ 2,6 μM de RSNO en absence de CP. Cependant, il est aussi possible que le BSA capture efficacement le $\text{NO}\cdot$ mais le relâche peu en présence de HgCl_2 . Cela expliquerait que nous n'ayons pas observé des concentrations de RSNO additives en combinant la CP et le BSA.

3.5 Étude de l'activité S-nitrosante de la CP dans différentes conditions

La formation de RSNO par la CP a été plus largement investiguée. L'activité S-nitrosante de la CP sur le GSH, qui a été démontrée dans la littérature (Inoue *et al.*, 1999), a d'abord été confirmée. La CP augmente la formation de RSNO après 30 min d'incubation avec un mélange de GSH et de PAPA NONOate équimolaire, comme le démontre la figure 3.18A. Les différentes concentrations de GSH et de PAPA NONOate produisent une certaine quantité de RSNO, même sans ajout de CP. On désigne cette réaction spontanée comme la S-nitrosation de base. Cependant, pour chaque courbe, la quantité de RSNO formés augmente avec l'ajout de concentrations croissantes de CP. Un plateau est même atteint à 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CP avec 10 μM de réactifs, ce qui signifie que la réaction est complète dans ces conditions. Une réaction complète avec les concentrations de réactifs supérieures nécessiterait plus de CP, ou encore un temps de réaction plus long.

La figure 3.18B compare la réaction de S-nitrosation par la CP sur le GSH et sur le BSA utilisés à la même concentration. On peut constater que la réaction de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CP avec 50 μM de GSH a généré 18 μM de RSNO. Si l'on soustrait la concentration de RSNO formés en absence de CP (i.e. 6 μM), on trouve que l'addition de la CP a contribué pour 12 μM de RSNO. Avec le BSA, une protéine possédant une cystéine nitrosable (Stamler *et al.*, 1992), il se produit une faible S-nitrosation de base, de 2 μM . Toutefois, dans le cas du BSA, la CP n'augmente que très légèrement la quantité de RSNO formés, d'un maximum de 3 μM .



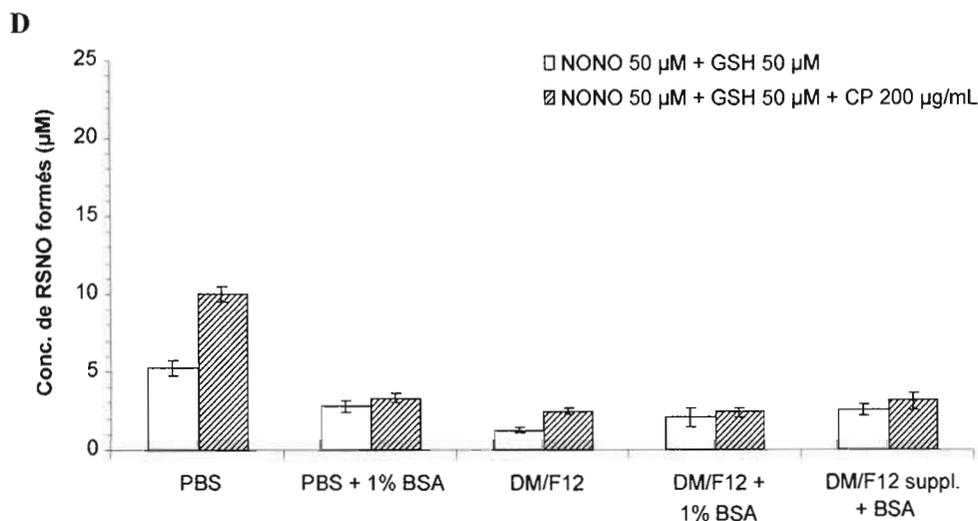


Figure 3.18 Évaluation de l'activité S-nitrosante de la CP. La CP a été ajoutée à un mélange contenant des concentrations équimolaires d'un substrat sulfhydryl (GSH ou BSA) et de PAPA NONOate (NONO) dans le PBS et, après 30 min d'incubation à 37°C, les RSNO formés ont été mesurés par le dosage de Griess optimisé. (A) Différentes concentrations de CP ont été ajoutées à différentes quantités du mélange de GSH et de PAPA NONOate. (B) Le GSH a été comparé avec le BSA, ainsi qu'avec l'absence de substrat, dans la même réaction et (C) ces réactions ont été évaluées en présence de H₂O₂. (D) La réaction en absence ou en présence de CP a été évaluée avec le GSH dans différents milieux. Chaque valeur représente la moyenne d'un triplicata ± écart moyen. Les figures A, B et C sont représentatives de deux études indépendantes, et la figure D de trois études.

Ces réactions ont été comparées avec une réaction sans ajout de substrat sulfhydryl, c'est-à-dire en présence de PAPA NONOate et de CP seulement. Comme vu précédemment (figure 3.17D), la CP produit toujours une S-nitrosation dans ces conditions. Cette réaction d'« auto-nitrosation » de la CP, qui a formé un maximum de 6 μM de RSNO, est de moindre importance que la réaction avec le GSH et ne remet donc pas en question la S-nitrosation du GSH par la CP. Elle est toutefois plus importante que la S-nitrosation en présence de BSA. Cette dernière information suggère que le BSA est non seulement un mauvais substrat pour la S-nitrosation par la CP, mais qu'il serait même un inhibiteur de l'« auto-nitrosation » de la CP.

Il devenait donc pertinent d'évaluer l'activité S-nitrosante de la CP dans le milieu de culture des cardiomyocytes. Celui-ci contient du BSA à 1%, ce qui est égal à 150 μM . C'est trois fois plus que dans le test précédent et on peut donc s'attendre à une forte inhibition. Effectivement, comme le montre la figure 3.18D, l'augmentation de la formation de RSNO par la CP en présence de GSH et de PAPA NONOate, visible dans le PBS, est abolie dans le PBS + 1% BSA. La S-nitrosation de base du GSH (i.e. sans CP) est aussi réduite. Dans le DM/F12, les niveaux de RSNO de base sont inférieurs à ceux observés dans le PBS, ce qui peut être causé par des substances interférentes du milieu. Une formation de RSNO accrue par la CP est tout de même détectable. L'ajout de BSA abolit ici aussi l'action de la CP. Cette dernière étude confirme donc que le BSA est un inhibiteur de la S-nitrosation de substrats sulfhydryls par la CP. Cela pourrait expliquer l'absence de S-nitrosation dans les milieux de culture qui contenaient du BSA. Le H_2O_2 , qui était aussi présent dans ces milieux, n'inhibe pas la S-nitrosation comme le montre la figure 3.18C.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La CP est une protéine multifonctionnelle dont les rôles physiologiques ne sont pas bien compris. Les études qui ont été menées sur ses actions *in vivo* peuvent être contradictoires, spécialement en ce qui a trait à ses propriétés antioxydantes et cardioprotectrices. Récemment, la formation de S-nitrosothiols et la synthèse de NO_2^- à partir du $\text{NO}\cdot$ ont été ajoutées à la liste des réactions catalysées par la CP (Inoue *et al.*, 1999; Shiva *et al.*, 2006). Les chercheurs ont suggéré que ces activités enzymatiques pourraient contribuer aux effets cytoprotecteurs du $\text{NO}\cdot$, en particulier dans des conditions de stress oxydatif, mais n'ont pas évalué leurs hypothèses expérimentalement. La présente étude a donc tenté de révéler l'impact de la CP sur la réponse de cellules cardiaques au stress oxydatif et de mettre en évidence l'implication d'une modulation du métabolisme du $\text{NO}\cdot$ dans son action. Les résultats, qui vont à l'encontre de l'hypothèse de départ, ont montré que :

- 1- La CP, en absence comme en présence de $\text{NO}\cdot$, ne protège pas les cardiomyocytes du stress oxydatif généré par le H_2O_2 , et cette absence de protection n'est pas due à une perte d'intégrité de la CP.
- 2- Conformément à la littérature (Rauen *et al.*, 2007a et 2007b), le $\text{NO}\cdot$ à faible concentration exerce une certaine protection contre le H_2O_2 , mais en intensifie la toxicité à forte concentration.
- 3- La CP possède une activité S-nitrosante sur le GSH comparable à celle rapportée dans la littérature (Inoue *et al.*, 1999).
- 4- En absence de substrat thiol, la CP favorise l'« auto-nitrosation » plutôt que la synthèse de NO_2^- .
- 5- L'albumine sérique inhibe l'activité S-nitrosante de la CP.

4.1 Culture et traitement des cardiomyocytes de rats nouveau-nés

Différents milieux de culture ont été comparés du point de vue de la viabilité des cardiomyocytes. Le milieu a été changé après la période d'adhésion des cellules (24h) et la mesure de la viabilité par la coloration au Hoechst et à l'iodure de propidium a été faite après 5 jours de culture dans les nouveaux milieux, c'est-à-dire au jour 6. Cette période de temps étant supérieure à la durée des traitements, on s'assure ainsi d'être en conditions de viabilité optimale durant les traitements.

L'augmentation du taux de mortalité des cardiomyocytes cultivés en présence de sérum pourrait être en lien avec une hypertrophie, comme le suggèrent les photos de la figure 3.11. On peut constater que les cellules présentent en effet une morphologie différente en présence de sérum. Elles possèdent plusieurs prolongements, sont très étirées et ont une plus grande surface totale. Elles semblent aussi plus plates, ce qui indique une plus grande adhésion au support. Il est connu que l'hypertrophie des cardiomyocytes peut être contrôlée par des facteurs régulateurs et hormonaux contenus dans le sérum. Ces facteurs comprennent les facteurs de croissance fibroblastiques acide (aFGF) et basique (bFGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de nécrose tumoral- α (TNF α), le facteur de croissance transformant- β 1 (TGF β 1) ainsi que des catécholamines comme la norépinéphrine et des analogues comme l'isoprotérénol (Simpson *et al.*, 1982; Long *et al.*, 1991). De hauts niveaux de catécholamines peuvent d'ailleurs causer la nécrose myocardiale (Cohen, 1974). D'autre part, l'ajout de sérum favorise la prolifération des cellules cardiaques non-myocytes comme les fibroblastes. Une synthèse accrue de facteurs de croissance par ce dernier type cellulaire peut aussi contribuer à l'hypertrophie des cardiomyocytes (LaFramboise *et al.*, 2007). L'hypertrophie des cardiomyocytes est une réponse compensatoire à la perte de cellules dans le myocarde qui implique la modification du programme génétique. Le métabolisme des cellules peut être dérégulé, ce qui pourrait expliquer une moins grande résistance. *In vivo*, l'hypertrophie ne conduit pas directement à la mort des cardiomyocytes. Dans une culture en monocouche sur un support solide, par contre, les effets peuvent être différents. On peut penser que l'étirement des cellules et

l'augmentation de l'adhésion à un support rigide peut nuire à la contractilité. La membrane cellulaire peut aussi être fragilisée.

Le milieu sans sérum avec BSA a été choisi pour la culture des cellules parce qu'il était celui qui procurait la meilleure viabilité. Le milieu a toutefois dû être supplémenté en divers éléments essentiels qui sont normalement apportés par le sérum, comme les acides aminés et les vitamines. De la transferrine et de l'insuline ont été ajoutés car il est connu que ces éléments améliorent la survie des cardiomyocytes cultivés en absence de sérum, tout en minimisant l'hypertrophie (Simpson *et al.*, 1982). Dans ce milieu, les cellules conservent environ 75% de leur viabilité au jour 6. Dans les tests de toxicité/protection, les résultats ont été corrigés pour rapporter le taux de viabilité du témoin à 100%.

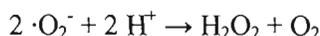
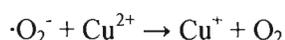
Les traitements au H_2O_2 ont été faits dans ce milieu plutôt que dans le PBS pour deux raisons. La première est que le PBS ne permet pas les traitements de longue durée puisqu'il est trop pauvre et fait décoller les cardiomyocytes. La deuxième raison est que le milieu de culture permet de tenir compte de divers éléments du sang capables de traverser la barrière endothéliale et pouvant affecter l'effet des traitements, comme l'albumine, la transferrine, le glucose, les acides aminés et les vitamines antioxydantes. De cette façon, les tests représentent mieux les phénomènes relatifs au stress oxydatif *in vivo*. Un milieu riche peut avoir un effet protecteur contre le stress oxydatif en absorbant ou détoxifiant certaines EOR. Il faut donc ajuster les doses d'agent stressant selon le milieu, ainsi que la durée du traitement. Les concentrations de H_2O_2 générées *in vivo* sont de l'ordre du nanomolaire ou du micromolaire (Halliwell et Gutteridge, 1988). Plus précisément, une concentration d'environ 50 μM a été mesurée dans le tissu myocardial canin (Saitoh *et al.*, 2006) à l'aide d'une électrode à H_2O_2 . D'autre part, des concentrations millimolaires de cet agent ont été rapportées comme causant des torts à la CP par perte de l'activité oxydasique, fragmentation et/ou réticulation (Aouffen *et al.*, 2004), ce que les basses concentrations permettaient d'éviter (démonstré à la figure 3.14). Le stress au H_2O_2 a donc été fait à basse concentration (40 μM) dans cette étude, mais pendant un temps relativement long (24 heures). Dans ces conditions, le taux de mortalité cellulaire montrait une dépendance non linéaire à la dose de H_2O_2 (figure 3.12). La viabilité était stable jusqu'à 20 μM puis chutait rapidement pour

devenir presque nulle à partir de 70-80 μM . En comparaison avec d'autres études, les concentrations de H_2O_2 nécessaires pour induire la mort des cellules dans nos expériences sont plutôt faibles, ce qui est probablement dû à la longue exposition. D'ailleurs, un autre groupe a rapporté que des cardiomyocytes de rats nouveau-nés traités au H_2O_2 100 μM pendant 0 à 72 heures atteignaient un maximum de mortalité d'environ 90% à partir de 24 heures (Zhang *et al.*, 2001).

La viabilité a été mesurée 24 heures après les traitements pour s'assurer que le programme d'apoptose soit complété et facilement distinguable. Pourtant, très peu d'apoptose a été observée dans nos tests. Environ 8% d'apoptose a été détectée dans les cultures de cardiomyocytes en milieu DM/F12 suppl. + BSA au jour 4 (figure 3.11) et pourrait être attribuée à des cellules qui ont été endommagées durant l'isolement et n'ont pas pu survivre longtemps. Lorsque traitées au H_2O_2 , le taux d'apoptose des cellules n'augmente pas. Il est possible mais incertain que le H_2O_2 ait tué les cardiomyocytes seulement par nécrose. D'abord, les concentrations de H_2O_2 qui ont été utilisées ne sont pas particulièrement élevées. De plus, la littérature a souvent rapporté que le H_2O_2 cause l'apoptose des cardiomyocytes de rats nouveau-nés. Dans l'une de ces études, l'apoptose des cellules a été visualisée par la condensation et la fragmentation de la chromatine colorée au DAPI, selon le même principe que notre coloration au Hoechst, mais les comptes cellulaires ont été effectués au maximum 11 heures après le début du traitement (Yaniv *et al.*, 2005). En comparaison, notre traitement de 24 heures est très long. L'apoptose aurait été en phase tardive à la fin de la période d'incubation et aurait pu être confondue avec la nécrose. Cela expliquerait l'absence d'apoptose dans nos expériences sans rien enlever à la pertinence des résultats. Notre but étant d'évaluer la résultante des traitements au niveau de la viabilité, il n'était pas nécessaire de bien différencier l'apoptose de la nécrose. Pour des études ultérieures, par contre, il serait utile de déterminer le type de mort cellulaire en cause en administrant des traitements plus courts ou en utilisant des méthodes complémentaires de détection de l'apoptose comme la mesure de l'activité des caspases.

4.2 Absence de protection par la CP

La CP n'a montré aucun effet protecteur contre le H₂O₂, mais plutôt une augmentation de la toxicité (figure 3.13A). La CP seule ne diminue la viabilité que faiblement et seulement à forte concentration. Toutefois, un effet toxique est particulièrement remarquable si on ajoute la CP, à faible ou à forte concentration, au H₂O₂. L'augmentation de la toxicité du H₂O₂ par l'ajout de CP est bien plus importante que la toxicité de la CP seule, ce qui démontre que les deux molécules ont un effet synergique. Nos résultats appuieraient donc l'hypothèse d'un rôle de la CP dans le développement de maladies cardiovasculaires. Selon les études du groupe du Dr Fox, la CP à 100 µg/mL incubée 20 ou 24 heures avec des lipoprotéines aurait une activité pro-oxydante sur celles-ci (Mukhopadhyay *et al.*, 1997; Ehrenwald et Fox, 1996). Il a été démontré que des protéines et des composants du milieu de culture pouvaient bloquer cette activité (Mukhopadhyay *et al.*, 1996), ce qui expliquerait la faible toxicité de la CP seule dans notre milieu de culture. Par contre, d'après la même étude, le pouvoir oxydant serait restauré par l'ajout de générateurs de ·O₂⁻, comme des cellules endothéliales ou des CMLV. Un mécanisme impliquant la réduction d'un atome de cuivre par le ·O₂⁻ a été proposé pour expliquer cet effet. Une réaction de type Haber-Weiss entre le H₂O₂ formé subséquentement et le cuivre réduit produirait le ·OH (Burkitt, 2001) :



Dans nos expériences, la potentialisation des effets toxiques du H₂O₂ par la CP pourrait être due à une génération de ·OH, celui-ci étant un oxydant beaucoup plus puissant. L'atome de cuivre responsable de cette réaction doit toutefois avoir été réduit au préalable. Or, il se trouve que les cardiomyocytes, comme toutes les cellules, produisent eux-mêmes une certaine quantité de ·O₂⁻ par leurs membranes mitochondriales (Turrens et Boveris, 1980). Le ·O₂⁻ endogène produit par les cardiomyocytes peut avoir été suffisant pour réduire le cuivre de la CP et le rendre capable de produire du ·OH suite à l'ajout de H₂O₂ exogène, expliquant l'effet cytotoxique montré par nos résultats.

Les premières démonstrations de l'activité oxydante de la CP ont utilisé de la CP humaine et ont montré que seule la CP intacte peut oxyder les lipides (Mukhopadyay *et al.*, 1997). L'intégrité de la structure de la protéine déterminerait même son effet pro-oxydant plutôt qu'anti-oxydant. Son clivage en des fragments de 115 et 19 kDa ou encore la perte d'un atome de cuivre labile bloque son activité oxydante (Ehrenwald *et al.*, 1994). Dans le présent travail, la CP utilisée était d'origine bovine. Son intégrité structurale et fonctionnelle a été confirmée (figure 3.14) par l'immunobuvardage et le dosage oxydasique, et l'incubation avec les cardiomyocytes, le H₂O₂ et le NO· ne l'ont pas altérée. Nous ne savons pas dans quelle mesure la CP bovine comporte des atomes de cuivre labiles. Aussi, de futures expériences pourraient inclure le traitement de la CP bovine avec le chélateur Chelex-100, qui enlève seulement les atomes de cuivre labiles de la CP humaine. La CP ainsi traitée pourrait être utilisée avec des cardiomyocytes exposés au H₂O₂ et au NO·. À l'instar de la CP humaine, le Chelex-100 pourrait faire perdre à la CP bovine son action cytotoxique en présence de H₂O₂.

4.3 Protection par le NO·

Contrairement à la CP, le NO· a pu protéger les cellules du H₂O₂, à condition d'être ajouté en petite quantité (figure 3.13B). Ce résultat corrobore les observations du groupe du Dr Rauen (2007b), selon lesquelles l'effet global du NO· sur la toxicité du H₂O₂ serait dépendant des concentrations relatives des deux molécules. Le H₂O₂ peut être réduit par les ions de Fe²⁺ présents dans le milieu D-MEM/F-12, selon la réaction de Fenton, et générer le ·OH. De faibles niveaux de NO· sont capables d'inhiber la peroxydation de lipides par le ·OH. De fortes concentrations de NO·, par contre, permettent une action intensifiée du H₂O₂ et cela pourrait être dû à la capacité de ces concentrations à inhiber certaines enzymes de défense antioxydante (Rauen *et al.*, 2007a).

Le NO· à faible concentration montre aussi une légère protection contre une combinaison de H₂O₂ et de CP 200 µg/mL. À plus forte concentration de CP, l'effet protecteur du NO· est moins sûr. Selon l'hypothèse mentionnée précédemment, la CP à forte concentration

augmenterait la production de $\cdot\text{OH}$ à partir du H_2O_2 . Dans une telle abondance de radicaux libres, il serait tout à fait probable que le $\text{NO}\cdot$ ne soit plus suffisant pour stopper les multiples réactions de peroxydation. Cette hypothèse reste tout de même à vérifier.

Selon les résultats, le $\text{NO}\cdot$ à faible concentration protège du H_2O_2 , tandis que la CP amplifie sa toxicité. Leurs deux actions semblent indépendantes. Le dosage des différents dérivés du $\text{NO}\cdot$ dans les milieux cellulaires à la fin des traitements (figure 3.15) ne montre d'ailleurs pratiquement pas de variations dans aucune des conditions. La CP n'a donc pas transformé le $\text{NO}\cdot$ en RSNO ni en NO_2^- dans le milieu de culture, ou bien les produits de son action ont été dégradés ou transformés durant la longue période d'incubation. Une autre possibilité est que la CP a généré des RSNO cellulaires. Des tests préliminaires d'immunobuvardage Western et d'immunocytochimie pour la détection de protéines cellulaires S-nitrosées ont été tentés avec un anticorps anti-cys-S-NO développé par le groupe du Dr Ischiropoulos (Gow *et al.*, 2004). Ces tests n'ont pas réussi à montrer une augmentation de protéines ainsi modifiées (non montré). Cependant, plusieurs difficultés techniques ont été rencontrées avec cet anticorps et doivent être résolues avant de tirer des conclusions fermes. Il est aussi possible que seulement un tout petit nombre de protéines cellulaires soient S-nitrosées, ce qui serait difficile à mettre en évidence. Notons que l'équipe de la Dre Calabrese a rapporté une S-nitrosation de la eNOS de cellules endothéliales exposées à la CP (Bianchini *et al.*, 1999) et que le mécanisme de cette action de la CP est encore peu compris.

4.4 Activité S-nitrosante versus activité nitrite-synthase

La CP a bel et bien une action sur le $\text{NO}\cdot$ en conditions acellulaires. Le dosage du $\text{NO}\cdot$ libéré par le PAPA NONOate en présence de CP a d'abord montré que celle-ci diminuait la quantité de $\text{NO}\cdot$ détecté (figure 3.16A et B). Cette diminution peut être interprétée comme une capture du $\text{NO}\cdot$ ou une transformation en un dérivé. Le dosage des dérivés du $\text{NO}\cdot$ en présence de CP (figure 3.17) a clarifié ce point. Après une période de temps courte (1 h 45), la CP avait diminué la formation des NO_2^- , tout en augmentant la formation des RSNO. L'activité S-nitrosante a donc été favorisée par rapport à l'activité nitrite-synthase.

Le groupe du Dr Gladwin a rapporté le contraire (Shiva *et al.*, 2006). Selon ces auteurs, le NO^+ formé par la CP réagirait préférentiellement avec l'eau (pour former des NO_2^-) plutôt qu'avec des thiols (pour former des RSNO). L'activité nitrite-synthase a été mise en évidence en utilisant du plasma ou du PBS à 50% hématocrite. La balance redox de cet environnement et la présence de co-facteurs potentiels dans ce milieu constituent des conditions différentes des nôtres. Une autre différence est la demi-vie des donneurs de $\text{NO}\cdot$ et la durée d'exposition. Dans les tampons aqueux, comme le PBS, les nitrites se forment par une réaction d'auto-oxydation à une faible vitesse. La demi-vie de la réaction à des concentrations de $\text{NO}\cdot$ et de O_2 physiologiques est de l'ordre des 30 min (Shiva *et al.*, 2006). Il est possible qu'après 1 h 45, la formation de NO_2^- par auto-oxydation du $\text{NO}\cdot$ ait été complète. Dans ce cas, la CP, malgré son accélération probable de la réaction, n'aurait pas augmenté la concentration finale de NO_2^- . Il faudrait donc doser les NO_2^- plus tôt pour déterminer le rôle de la CP sur leur formation.

La S-nitrosation du glutathion par la CP que nous avons démontrée est comparable à celle rapportée dans la littérature. Selon l'étude du groupe du Dr Akaike, la formation de GSNO à partir de 10 μM de GSH et 10 μM de P-NONOate (un donneur de $\text{NO}\cdot$ semblable au PAPA NONOate) atteint un maximum de 6 μM à 264 $\mu\text{g/mL}$ de CP (Inoue *et al.*, 1999). De manière similaire, nos résultats montrent une formation maximale de 3 μM de GSNO par 200 $\mu\text{g/mL}$ de CP dans des conditions semblables (figure 3.18A). La faible différence entre les deux valeurs peut être attribuée à une méthode de dosage différente et à une concentration très près, dans notre cas, de la limite de détection. Des valeurs plus sûres ont été obtenues par l'augmentation des concentrations de substrats, nous permettant de mieux étudier l'activité S-nitrosante de la CP.

4.5 « Auto-nitrosation » de la CP

La comparaison de la S-nitrosation de différents substrats par la CP a révélé des résultats surprenants (figure 3.18B). D'abord, en absence de substrat, c'est-à-dire lorsque la CP est incubée avec le PAPA NONOate dans le PBS, il y a nitrosation. Le seul candidat possible à cette nitrosation est la CP elle-même, ce qui porte à croire que la CP est capable de s'« auto-

nitroser ». Ce fait est nouveau et apparemment contraire aux résultats d'autres groupes de chercheurs. Dans d'autres expériences, la S-nitrosation de la cystéine libre de la CP par du $\text{NO}\cdot$ gazeux en présence d'oxygène ou par trans-nitrosation ne se faisait pas (Capelli-Bigazzi *et al.*, 1997). Ce résultat a été expliqué par une mauvaise accessibilité au thiol et par la supposition que la cystéine en question, de par son pK_a , ne serait pas particulièrement réactive. Ces suppositions n'ont pourtant pas été prouvées. De plus, il est possible qu'en conditions très oxygénées, comme dans ces dernières expériences, le NO^+ formé par la CP réagisse avec l'oxygène plus rapidement qu'avec les cystéines. Dans notre étude, tout comme dans celle du Dr Akaike, les tampons n'étaient pas oxygénés, ce qui pourrait expliquer l'occurrence de réactions de S-nitrosation. L'influence de l'oxygène sur l'action de la CP sur le $\text{NO}\cdot$ devra donc être prise en considération pour en comprendre les effets *in vivo*.

L'interaction bien connue entre le $\text{NO}\cdot$ et les protéines à cuivre (Leeuwen *et al.*, 1975; Musci *et al.*, 1991) pourrait aussi expliquer notre observation d'une « auto-nitrosation » de la CP. La formation de complexes $\text{Cu}^{1+}\text{-NO}^{1+}$ est possible sur les atomes de cuivre de type I ou III (Gorren *et al.*, 1987). Il reste toutefois à déterminer si des complexes de ce genre sont résistants à l'acide sulfamique. Dans le cas contraire, ils ne seraient pas détectés par notre méthode de dosage des RSNO.

4.6 Inhibition de l'activité S-nitrosante de la CP par le BSA

Autre fait intéressant révélé par la figure 3.18B, le BSA est non seulement un mauvais substrat à la S-nitrosation par la CP, mais aussi un inhibiteur de la réaction d'auto-nitrosation. Cette inhibition a d'ailleurs été montrée par les dosages comparatifs dans différents milieux de la libération du $\text{NO}\cdot$ (figure 3.16C), de la génération de ses dérivés (figure 3.17) et de la S-nitrosation (figure 3.18C). Dans les trois expériences, l'action de la CP sur le $\text{NO}\cdot$ était réduite totalement par le BSA et en partie par le milieu D-MEM/F-12. Le milieu de culture des cardiomyocytes, fait à base de D-MEM/F-12 et de BSA, inhibe donc les interactions entre la CP et le $\text{NO}\cdot$, comme c'était le cas dans le dosage des dérivés du $\text{NO}\cdot$ après les traitements cellulaires (figure 3.15). Il était alors impossible de mettre en évidence un effet protecteur accru du $\text{NO}\cdot$ en le combinant à la CP dans nos conditions de culture avec BSA. Des études

additionnelles pourraient être réalisées avec des cultures de cardiomyocytes exposés pour un court temps au H_2O_2 dans un tampon salin libre de molécules interférentes. La formation d'un complexe $\text{Cu}^{1+}\text{-NO}^{1+}$ sur la CP pourrait peut-être diminuer la génération de $\cdot\text{OH}$ catalysée par ce même atome de cuivre en présence de H_2O_2 (équations de la section 4.2).

Comme l'a démontré l'équipe du Dr Fox, des composants du milieu de culture inhibent l'activité oxydante de la CP par un mécanisme de chélation du cuivre (Mukhopadhyay *et al.*, 1996). Il peut s'agir, par exemple, d'acides aminés comme l'histidine, qui sont aussi présents dans le D-MEM/F-12. De plus, des composés comme la L-cystéine et des sels de fer peuvent lier le $\text{NO}\cdot$ et l'empêcher de réagir avec la CP.

La forte inhibition du BSA est plus difficile à expliquer. Le BSA est S-nitrosé sur sa cystéine libre, la Cys-34, principalement grâce à un pKa anormalement bas (Stamler *et al.*, 1992). C'est à cause de cette réactivité envers le $\text{NO}\cdot$ que l'albumine sérique a d'abord été considérée comme un réservoir pour le $\text{NO}\cdot$ produit par les cellules endothéliales. Un autre type d'interaction qui a été proposé par la suite contribue à cette fonction de réservoir. En effet, l'albumine sérique, par son noyau hydrophobe, serait l'absorbant majeur du $\text{NO}\cdot$ libre (Rafikova *et al.*, 2002). Les auteurs ont démontré une catalyse de la formation de l'intermédiaire nitrosant N_2O_3 par le noyau hydrophobe de l'albumine. Puisque le $\text{NO}\cdot$ et le O_2 ont une meilleure solubilité dans les solvants hydrophobes que dans l'eau, ils peuvent être séquestrés de la phase aqueuse environnante par des régions de grande hydrophobicité, comme dans le noyau de l'albumine. L'augmentation des concentrations locales de $\text{NO}\cdot$ et de O_2 qui en résulte accélère l'oxydation du $\text{NO}\cdot$ et la formation de N_2O_3 (Nedospasov *et al.*, 2000). En conditions anaérobiques, la formation de N_2O_3 ne se ferait pas, mais la séquestration de $\text{NO}\cdot$ pourrait quand même avoir des effets. Ainsi, il a été démontré que le BSA « vide » est un vasoconstricteur car il séquestre le $\text{NO}\cdot$ libre circulant, tandis que le BSA « plein » n'a pas d'effet. Le BSA agirait comme un micelle et sa capacité de concentration du $\text{NO}\cdot$ a été évaluée à 120 fois. L'absorption du $\text{NO}\cdot$ par le BSA aurait même une action de réservoir plus importante que sa S-nitrosation (Rafikova *et al.*, 2002).

Il est donc plausible que le BSA ait inhibé l'action de la CP sur le NO· dans nos expériences en séquestrant la majeure partie du NO·. Nos tampons et milieux étant peu oxygénés, le NO· n'aurait pas produit de N₂O₃, et aucune action oxydante n'aurait eu lieu. Le BSA aurait simplement eu un effet de compartimentation du NO·, empêchant celui-ci d'être en contact avec la CP. La protection par le NO· n'a toutefois pas été empêchée, ce qui montre que le NO· séquestré conserverait un certain pouvoir d'action, peut-être par une relâche de NO· durant la longue période d'incubation des cellules (24 h). Selon un des mécanismes de protection proposés (Kelley *et al.*, 1999), le NO· protégerait les lipides de la peroxydation par le ·OH en se combinant aux intermédiaires radicalaires. Il est possible que le ·OH lui-même, ou certains intermédiaires solubles, aient été compartimentés avec le NO· dans le noyau du BSA. Il est aussi possible que des interactions hydrophobes entre le BSA et les membranes cellulaires aient favorisé le contact entre le NO· et les lipides exposés à la peroxydation. Il serait alors intéressant de comparer l'efficacité cytoprotectrice du NO· en présence et en absence de BSA.

CONCLUSION

La CP et le $\text{NO}\cdot$ sont deux agents biologiques multifonctionnels dont tous les rôles ne sont pas bien connus. En ce qui a trait à leur implication dans le système cardio-vasculaire, leurs actions sont particulièrement controversées. L'hypothèse qui a servi de point de départ à cette étude était basée sur des arguments en faveur d'actions protectrices de la CP et du $\text{NO}\cdot$ contre le stress oxydatif généré par des affections comme l'ischémie-reperfusion. Les nouvelles activités S-nitrosante et nitrite-synthase de la CP suggéraient que les deux molécules pouvaient avoir un effet synergique dans de telles conditions. Les résultats de l'évaluation de la protection d'une combinaison de CP et de $\text{NO}\cdot$ contre le générateur de stress oxydatif H_2O_2 n'ont toutefois pas été dans ce sens.

Conformément aux observations de différents groupes, le $\text{NO}\cdot$ a montré un effet protecteur contre le H_2O_2 , à condition d'être en petite quantité. Les mécanismes de cette protection ne sont pas connus. Il est envisagé que cette protection puisse se faire par l'inhibition de la peroxydation des lipides ou encore par une inhibition de la réaction de Fenton. La CP seule a augmenté plutôt que diminué l'effet cytotoxique du H_2O_2 dans les cultures de cardiomyocytes. En se référant aux travaux du groupe du Dr Fox qui ont mis en évidence une action pro-oxydante de la CP, nos résultats ont identifié une autre condition de stress oxydatif dans laquelle la CP aurait un effet délétère. Ils indiqueraient que l'action protectrice de la CP sur le cœur isolé soumis à l'ischémie-reperfusion ne porterait pas sur l'agent oxydant H_2O_2 . D'autre part, la CP n'a pas augmenté l'action cytoprotectrice du $\text{NO}\cdot$.

Les résultats des expériences en conditions acellulaires, par contre, ont montré que la CP a un effet sur le métabolisme du $\text{NO}\cdot$ dans le PBS. Elle serait capable, par l'oxydation du $\text{NO}\cdot$ en NO^+ , de favoriser la synthèse de RSNO par rapport à la synthèse de NO_2^- . La prépondérance de réactions de S-nitrosation dans nos expériences pourrait également être liée à une faible oxygénation des tampons. La S-nitrosation du GSH par la CP qui a été étudiée est comparable à celle du groupe du Dr Akaike. Un fait nouveau a cependant été révélé : la CP est capable de s' « auto-nitroser ». Pour l'instant, ce phénomène ne peut être expliqué

avec certitude, mais pourrait impliquer la S-nitrosation d'une cystéine libre ou encore la formation d'un complexe $\text{Cu}^{1+}\text{-NO}^{1+}$.

Le D-MEM/F-12 et le BSA du milieu de culture des cardiomyocytes inhibent les interactions entre la CP et le $\text{NO}\cdot$. Le fort effet inhibiteur du BSA a été attribué à une compartimentation du $\text{NO}\cdot$ dans son noyau hydrophobe. Cette inhibition pourrait avoir empêché de vérifier l'effet synergique toxique ou protecteur de la CP et du $\text{NO}\cdot$ sur les cardiomyocytes.

Cette étude a peut-être soulevé plus de questions qu'elle n'a apporté de réponses. Son intérêt consiste surtout en l'apport de nouvelles hypothèses et d'outils de travail appropriés. Ainsi, les travaux qui ont été présentés pourraient être à la base d'études portant sur l'activité pro-oxydante de la CP en lien avec le superoxyde produit par les cardiomyocytes. De plus, il sera important de mieux comprendre l'action de la CP sur les dérivés du $\text{NO}\cdot$, *in vitro* et *in vivo*, par l'étude de l'influence de l'oxygène, de l'inhibition par le BSA et du mécanisme de l'« auto-nitrosation ». Il pourrait aussi être intéressant d'investiguer le rôle du BSA dans l'effet protecteur du $\text{NO}\cdot$. Enfin, une meilleure appréciation de l'importance de la CP et du $\text{NO}\cdot$ sur la cardioprotection pourrait être réalisée en soumettant des cultures de cardiomyocytes à des conditions d'hypoxie-réoxygénation plus représentatives du stress oxydatif généré par l'ischémie-reperfusion.

BIBLIOGRAPHIE

- Acosta, A. G., Vermolen, J. V., Andara, C. V., Pirela, V. B. et Arias, F. B. 2006. « Mecanismos moleculares de la disfunción endotelial : de la síntesis a la acción del óxido nítrico ». *Arch Venez Farmacología Terapéutica* 25 : 54-9.
- Adelstein, S. J., Coombs, T. L. et Vallée, B. L. 1956. « Metalloenzymes and myocardial infarction. I. The relation between serum copper and ceruloplasmin and its catalytic activity ». *N Engl J Med* 255 : 105-9.
- Akiyama, K., Kimura, A., Suzuki, H., Takeyama, Y., Gluckman, T. L., Terhakopian, A., Katagiri, T., Suh, K. Y., Roseto, J. et Bing, R. J. 1998. « Production of oxidative products of nitric oxide in infarcted human heart. ». *J Am Coll Cardiol* 32 : 373-9.
- Aldred, A. R., Grimes, A., Schreiber, G. et Mercer, J. F. 1987. « Rat ceruloplasmin. Molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta, and testis ». *J Biol Chem* 262 : 2875-8.
- Al-Timimi, D. J. et Dormandy, T. L. 1977. « The inhibition of lipid autoxidation by human caeruloplasmin ». *Biochem J* 168 : 283-8.
- Aouffen, M., Paquin, J., De Grandpré, E., Nadeau, R. et Mateescu, M. A. 2001. « Deglycosylated ceruloplasmin maintains its enzymatic, antioxidant, cardioprotective, and neuronoprotective properties ». *Biochem Cell Biol* 79 : 489-97.
- Aouffen, M., Paquin, J., Furtos, A., Waldron, K. C. et Mateescu, M. A. 2004. « Oxidative aggregation of ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide is prevented by pyruvate ». *Free Radic Res* 38 : 19-26.
- Ashley, E. A., Sears, C. E., Bryant, S. M., Watkins, H. C. et Casadei, B. 2002. « Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes ». *Circulation* 105 : 3011-6.
- Atanasiu, R., Dumoulin, M. J., Chahine, R., Mateescu, M. A. et Nadeau, R. 1995. « Antiarrhythmic effects of ceruloplasmin during reperfusion in the ischemic isolated rat heart ». *Can J Physiol Pharmacol* 73 : 1253-61.
- Atanasiu, R. L., Stea, D., Mateescu, M.A., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Maupoil, V., Nadeau, R. et Rochette, L. 1998. « Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties ». *Mol Cell Biochem* 189 : 127-35.
- Attieh, Z. K., Mukhopadhyay, C. K., Seshadri, V., Tripoulas, N. A. et Fox, P. L. 1999. « Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism ». *J Biol Chem* 274 : 1116-23.
- Bellavite, P. 1988. « The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes ». *Free Radical Biol Med* 4 : 225-61.
- Bianchini, A., Musci, G. et Calabrese, L. 1999. « Inhibition of endothelial nitric-oxide synthase by ceruloplasmin ». *J Biol Chem* 274 : 20265-70.
- Boivin, S., Aouffen, M., Fournier, A. et Mateescu, M. A. 2001. « Molecular characterization of human and bovine ceruloplasmin using MALDI-TOF mass spectrometry ». *Biochem Biophys Res Commun* 288 : 1006-10.
- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. et Cohen, R. A. 1994. « Nitric oxide directly activates calcium-dependant potassium channels in vascular smooth muscle ». *Nature* 368 : 850-853.

- Bradford, M. 1976. « A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding ». *Anal Biochem* 72 : 248-254.
- Braunwald, E. et Bristow, M. R. 2000. « Congestive heart failure : fifty years of progress ». *Circulation* 102 : IV14-23.
- Burkitt, M. J. 2001. « A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin ». *Arch Biochem Biophys* 394 : 117-35.
- Bustamante, J. B., Mateo, M. C., Fernandez, J., de Quiros, B. et Manchado, O. O. 1976. « Zinc, copper and ceruloplasmin in arteriosclerosis ». *Biomedicine* 25 : 244-5.
- Calabrese, L., Capuozzo, E., Galtieri, A. et Bellocco, E. 1983. « Sheep ceruloplasmin: isolation and characterization ». *Mol Cell Biochem* 51 : 129-32.
- Calabrese, L. et Carbonaro, M. 1986. « An e.p.r. study of the non-equivalence of the copper sites of caeruloplasmin ». *Biochem J* 238 : 291-5.
- Calabrese, L., Carbonaro, M. et Musci, G. 1989. « Presence of coupled trinuclear copper cluster in mammalian ceruloplasmin is essential for efficient electron transfer to oxygen ». *J Biol Chem* 264 : 6183-7.
- Campbell, D. L., Stamler, J. S. et Strauss, H. C. 1996. « Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols ». *J Gen Physiol* 108 : 277-93.
- Cappelli-Bigazzi, M., Ambrosio, G., Musci, G., Battaglia, C., Bonaccorsi di Patti, M. C., Golino, P., Ragni, M., Chiariello, M. et Calabrese, L. 1997. « Ceruloplasmin impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta ». *Am J Physiol* 273 : H2843-9.
- Carrier, G. O., Fuchs, L. C., Winecoff, A. P. Giulumian, A. d. et White, R. E. 1997. « Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels ». *Am J Physiol* 273 : H76-84.
- Cerbai, E., Ambrosio, G., Porciatti, F., Chiariello, M., Giotti, M. et Mugelli, A. 1991. « Cellular electrophysiological basis for oxygen radical-induced arrhythmias. A patch clamp study in guinea pig ventricular myocytes ». *Circulation* 84 : 1773-82.
- Chahine, R., Mateescu, M. A., Roger, S., Yamaguchi, N., de Champlain, J. et Nadeau, R. 1991. « Protective effects of ceruloplasmin against electrolysis-induced oxygen free radicals in rat heart ». *Can J Physiol Pharmacol* 69 : 1459-64.
- Cohen, J. 1974. « Role of endocrine factors in the pathogenesis of cardiac hypertrophy ». *Circ Res* 35 : suppl II:49-57.
- Corde, S., Samuel, J.-L. et Rappaport, L. 2000. « Extracellular matrix and growth factors during heart growth ». *Heart Failure Review* 5 : 119-130.
- Cosby, K., Partovi, K. S., Crawford, J. H., Patel, R. P., Reiter, C. D., Martyr, S., Yang, B. K., Waclawiw, M. A., Zalos, G., Xu, X., Huang, K. T., Shields, H., Kim-Shapiro, D. B., Schechter, A. N., Cannon, R. O. 3rd et Gladwin, M. T. 2003. « Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation ». *Nat Med* 9 : 1498-505.
- Cottart, C. H., Nivet-Antoine, V., Do, L., Al-Massarani, G., Descamps, G., Xavier-Galen, F. et Clot, J. P. 2003. « Hepatic cytoprotection by nitric oxide and the cGMP pathway after ischaemia-reperfusion in the rat ». *Nitric Oxide* 9 : 57-63.

- Cousins, R. J. 1985. « Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin ». *Physiol Rev* 65 : 238-309.
- Danson, E. J., Zhang, Y. H., Sears, C. E., Edwards, A. R., Casadei, B. et Paterson, D. J. 2005. « Disruption of inhibitory G-proteins mediates a reduction in atrial beta-adrenergic signaling by enhancing eNOS expression ». *Cardiovasc Res* 67 : 613-23.
- De Mol, N. J. 1985. « Interaction of phenothiazine drugs with human ceruloplasmin. Relation between activation of catecholamine neurotransmitter oxidation and electron donating ability of phenothiazine drugs ». *Biochem Pharmacol* 34 : 2605-9.
- Déry, B. © 2005-2007. « Le cœur ». dans Le Dictionnaire Visuel, http://www.infovisual.info/index_fr.html.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. et Zeiher, A. M. 1997a. « Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases ». *J Exp Med* 185 : 601-7.
- Dimmeler, S. et Zeiher, A. M. 1997b. « Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide ». *Nitric Oxide* 1 : 275-81.
- Draijer, R., Atsma, D. E., van der Laarse, A. et van Hinsbergh, V. W. 1995. « cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells ». *Circ Res* 76 : 199-208.
- Duranski, M. R., Greer, J. J., Dejam, A., Jaganmohan, S., Hogg, N., Langston, W., Patel, R. P., Yet, S. F., Wang, X., Kevil, C. G., Gladwin, M. T. et Lefer, D.J. 2005. « Cytoprotective effects of nitrite during *in vivo* ischemia-reperfusion of the heart and liver ». *J Clin Invest* 115 : 1232-40.
- Dwulet, F. E. et Putnam, F. W. 1981. « Internal duplication and evolution of human ceruloplasmin ». *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 2805-9.
- Ehrenwald, E., Chisolm, G. M. et Fox, P. L. 1994. « Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein ». *J Clin Invest* 93 : 1493-501.
- Ehrenwald, E. et Fox, P. L. 1996. « Role of endogenous ceruloplasmin in low density lipoprotein oxidation by human U937 monocytic cells ». *J Clin Invest* 97 : 884-90.
- Elvan, A., Rubart, M. et Zipes, D. P. 1997. « NO modulates autonomic effects on sinus discharge rate and AV nodal conduction in open-chest dogs ». *Am J Physiol* 272 : H263-71.
- Engel, F. B. 2005. « Cardiomyocyte proliferation – a platform for mammalian cardiac repair ». *Cell Cycle* 4 : e91-4.
- Esposito, G., Rapacciuolo, A., Naga Prasad, S. V., Takaoka, H., Thomas, S. A., Kosh, W. J. et Rockman, H. A. 2002. « Genetic alterations that inhibit *in vivo* pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress ». *Circulation* 105 : 85-92.
- Estrada, C., Gómez, C., Martín-Nieto, J., De Frutos, T., Jiménez, A. et Villalobo, A. 1997. « Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase ». *Biochem J* 326 : 369-76.
- Evans, G. W. 1973. « Copper homeostasis in the mammalian system ». *Physiol Rev* 53 : 535-70.

- Fleming, R. E., Whitman, I. P. et Gitlin, J. D. 1991. « Induction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hyperoxia ». *Am J Physiol* 260 : L68-74.
- Fliss, H. et Gattinger, D. 1996. « Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium ». *Circ Res* 79 : 949-56.
- Flögel, U., Decking, U. K., Gödecke, A. et Schrader, J. 1999. « Contribution of NO to ischemia-reperfusion injury in the saline-perfused heart: a study in endothelial NO synthase knockout mice ». *J Mol Cell Cardiol* 31 : 827-36.
- Fortna, R. R., Watson, H. A. et Nyquist, S. E. 1999. « Glycosyl phosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is expressed by rat Sertoli cells and is concentrated in detergent-insoluble membrane fractions ». *Biol Reprod* 61 : 1042-9.
- Fox, P. L., Mukhopadhyay, C. et Ehrenwald, E. 1995. « Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin ». *Life Sci* 56 : 1749-58.
- Fox, P. L. 2003. « The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship ». *Biometals* 16 : 9-40.
- Furchgott, R. F. et Zawadzki, J. V. 1980. « The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine ». *Nature* 288 : 373-6.
- Furchgott, R. F. 2005. « Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide ». *Biosci Rep* 19 : 235-51.
- Garg, U. C. et Hassid, A. 1989. « Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells ». *J Clin Invest* 83 : 1774-7.
- Garg, S., Narula, J. et Chandrashekar, Y. 2005. « Apoptosis and heart failure relevance and therapeutic target ». *J Moll Cell Cardiol* 38 : 73-9.
- Gladwin, M. T., Shelhamer, J. H., Schechter, A. N., Pease-Fye, M. E., Waclawiw, M. A., Panza, J. A., Ognibene, F. P. et Cannon, R. O. 3rd. 2000. « Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans ». *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 11482-7.
- Glezer, I., Chernomoretz, A., David, S., Plante, M. M. et Rivest, S. 2007. « Genes involved in the balance between neuronal survival and death during inflammation ». *PLoS ONE* 2 : e310.
- Goldstein, I. M., Kaplan, H. B., Edelson, H. S. et Weissmann, G. 1979. « Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals ». *J Biol Chem* 254 : 4040-5.
- Goldstein, I. M., Kaplan, H. B., Edelson, H. S. et Weissmann, G. 1982. « Ceruloplasmin: an acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals ». *Ann N Y Acad Sci* 389 : 368-79.
- Gorren, A. C., de Boer, E. et Wever, R. 1987. « The reaction of nitric oxide with copper proteins and the photodissociation of copper-NO complexes ». *Biochim Biophys Acta* 916 : 38-47.
- Gow, A. J., Davis, C. W., Munson, D. et Ischiropoulos, H. « Immunohistochemical detection of S-nitrosylated proteins ». *Methods Mol Biol* 279 : 167-72.
- Griess, J. P. 1879. « Bemerkungen zu der abhandlung der H. H. Weselsky und Benedikt – Über einige azoverbindungen ». *Ber Deutch Chem Ges* 12 : 426-8.
- Guittet, O., Ducastel, B., Salem, J. S., Henry, Y., Rubin, H., Lemaire, G. et Lepoivre, M. 1998. « Differential sensitivity of the tyrosyl radical of mouse ribonucleotide reductase to nitric oxide and peroxynitrite ». *J Biol Chem* 273 : 22136-44.

- Gutteridge, J. M. 1985. « Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities ». *Chem Biol Interact* 56 : 113-20.
- Haffner, C., Jarchau, T., Reinhard, M., Hoppe, J., Lohmann, S. M. et Walter, U. 1995. « Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein ». *VASP. EMBO J* 14 : 19-27.
- Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. 1988. *Free radicals in biology and medicine*. 2^e éd., Oxford, Clarendon Press.
- Harris, E. D. et Percival, S. S. 1989. « Copper transport: insights into a ceruloplasmin-based delivery system ». *Adv Exp Med Biol* 258 : 95-102.
- Hogg, N., Struck, A., Goss, S. P., Santanam, N., Joseph, J., Parthasarathy, S. et Kalyanaraman, B. 1995. « Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric-oxide donors ». *J Lipid Res* 36 : 1756-62.
- Hogg, N. 1999. « The kinetics of S-transnitrosation - a reversible second-order reaction ». *Anal Biochem* 272 : 257-62.
- Holmberg, C. G. et Laurell, C. B. 1948. « Investigations in serum copper II. Isolation of the copper containing protein, and description of its properties ». *Acta Chem Scand* 2 : 550-6.
- Hrabie, J. A., Klose, J. R., Wink, D. A. et Keefer, L. K. 1993. « New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines ». *J Org Chem* 58 : 1472-1476.
- Hudson, D. M., Krisinger, M. J., Griffiths, T. A. et Macgillivray, R. T. 2008. « Neither human hephaestin nor ceruloplasmin forms a stable complex with transferrin ». *J Cell Biochem*. 103 : 1849-55.
- Inoue, K., Akaike, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Sawa, T., Otagiri, M., Suzuki, S., Yoshimura, T. et Maeda, H. 1999. « Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism *in vivo* ». *J Biol Chem* 274 : 27069-75.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L. et Beckman, J. S. 1992. « Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide ». *Arch Biochem Biophys* 298 : 446-51.
- Jaeger, J. L., Shimizu, N. et Gitlin, J. D. 1991. « Tissue-specific ceruloplasmin gene expression in the mammary gland ». *Biochem J* 280 : 671-7.
- Jayakumari, N., Ambikakumari, V., Balakrishnan, K. G. et Iyer, K. S. 1992. « Antioxidant status in relation to free radical production during stable and unstable anginal syndromes ». *Atherosclerosis* 94 : 183-90.
- Jones, S. P., Greer, J. J., Kakkar, A. K., Ware, P. D., Turnage, R. H., Hicks, M., van Haperen, R., de Crom, R., Kawashima, S., Yokoyama, M. et Lefer, D. J. 2004. « Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury ». *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 : H276-82.
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A. et Sonnenblick, E. H. 1996. « Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats ». *Lab Invest* 74 : 86-107.
- Kanner, J., Harel, S. et Granit, R. 1992. « Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin ». *Lipids* 27 : 46-9.
- Kapadia, S., Lee, J., Torre-Amione, G., Birsdall, H. H., Ma, T. S. et Mann, D.L. 1995. « Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration ». *J Clin Invest* 96 : 1042-52.

- Ke, Y., Ho, K., Du, J., Zhu, L., Xu, Y., Wang, Q., Wang, C. Y., Li, L., Ge, X., Chang, Y. et Qian, Z. M. 2006. « Role of soluble ceruloplasmin in iron uptake by midbrain and hippocampus neurons ». *J Cell Biochem* 98 : 912-9.
- Kelley, E. E., Wagner, B. A., Buettner, G. R. et Burns, C. P. 1999. « Nitric oxide inhibits iron-induced lipid peroxidation in HL-60 cells ». *Arch Biochem Biophys* 370 : 97-104.
- Kharitonov, V. G., Sundquist, A. R. et Sharma, V. S. 1995. « Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen ». *J Biol Chem* 270 : 28158-164.
- Kim, J. S., Ohshima, S., Pediaditakis, P. et Lemasters, J. J. 2004. « Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition- and pH-dependent cell death after reperfusion ». *Free Radic Biol Med* 37 : 1943-50.
- Kim, B.-E., Nevitt, T. et Thielel, D. J. 2008. « Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation ». *Nature Chemical Biology* 4 : 176-185.
- Kotamraju, S., Tampo, Y., Keszler, A., Chitambar, C. R., Joseph, J., Haas, A. L. et Kalyanaraman, B. 2003. « Nitric oxide inhibits H₂O₂-induced transferrin receptor dependent apoptosis in endothelial cells: Role of ubiquitin-proteasome pathway ». *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 10653-8.
- Kuchan, M. J. et Frangos, J. A. 1993. « Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells ». *Am J Physiol* 264 : H150-6.
- Kunapuli, S. P., Singh, H., Singh, P. et Kumar, A. 1987. « Ceruloplasmin gene expression in human cancer cells ». *Life Sci* 40 : 2225-8.
- Kunapuli, S., Rosanio, S. et Schwarz, E. R. 2006. « How do cardiomyocytes die? – apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes ». *Journal of Cardiac Failure* 12 : 381-91.
- Laemmli, U. K. 1970. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ». *Nature* 227 : 680-5.
- LaFramboise, W. A., Scalise, D., Stoodley, P., Graner, S. R., Guthrie, R. D., Magovern, J. A. et Becich, M. J. 2007. « Cardiac fibroblasts influence cardiomyocyte phenotype in vitro ». *Am J Physiol Cell Physiol* 292 : C1799-808.
- Lee, K. H., Yun, S. J., Nam, K. N., Gho, Y. S. et Lee, E. H. 2007. « Activation of microglial cells by ceruloplasmin ». *Brain Res* 1171 : 1-8.
- Leeuwen, F. X., Wever, R., Gelder, B. F., Avigliano, L. et Mondovi, B. 1975. « The interaction of nitric oxide with ascorbate oxidase ». *Biochim Biophys Acta* 403 : 285-91.
- Lieberman, E. H., O'Neill, S. et Mendelsohn, M. E. 1991. « S-nitrosocysteine inhibition of human platelet secretion is correlated with increases in platelet cGMP levels ». *Circ Res* 68 : 1722-8.
- Linder, M. C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R. et Lomeli, N. 1998. « Copper transport ». *Am J Clin Nutr* 67 : 965S-971S.
- Little, R.C., 1985. Physiology of the heart and circulation, 3e éd. Chicago, Year Book Medical Publishers, Inc.
- Liu, L. et Stamler, J. S. 1999. « NO: an inhibitor of cell death ». *Cell Death Differ* 6 : 937-42.
- Lockhart, P. J. et Mercer, J. F. 1999. « Cloning and expression analysis of the sheep ceruloplasmin cDNA ». *Gene* 236 : 251-7.

- Loh, S. H., Jin, J. S., Tsai, C. S., Chao, C. M., Tsai, Y., Chen, W. H., Cheng, T. H., Chuang, C. C. et Lin, C. I. 2003. « Possible underlying mechanism for hydrogen peroxide-induced electromechanical suppression in human atrial myocardium ». *J Pharm Sci* 91 : 53-60.
- Long, C. S., Henrich, C. J. et Simpson, P. C. 1991. « A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes ». *Cell Regul* 2 : 1081-95.
- Loscalzo, J. et Vita, J. A. (éds.) 2000. *Nitric oxide and the cardiovascular system*, coll. Contemporary cardiology, Totowa, Humana Press.
- Louro, M. O., Cocho, J. A., Mera, A. et Tutor, J. C. 2000. « Immunochemical and enzymatic study of ceruloplasmin in rheumatoid arthritis ». *J Trace Elem Med Biol* 14 : 174-8.
- Lucchesi, B. R. 1990. « Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury ». *Annu Rev Physiol* 52 : 561-76.
- Lykens, M. G., Davis, W. B. et Pacht, E. R. 1992. « Antioxidant activity of bronchoalveolar lavage fluid in the adult respiratory distress syndrome ». *Am J Physiol* 262 : L169-75.
- Maejima, Y., Adachi, S., Morikawa, K., Ito, H. et Isobe, M. 2005. « Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation ». *J Mol Cell Cardiol* 38 : 163-74.
- Mallet, B., Romette, J. et Di Costanzo, J. D. 1982. « Copper pathology ». *Nouv Presse Med* 11 : 271-4.
- Mänttari, M., Manninen, V., Huttunen, J. K., Palosuo, T., Ehnholm, C., Heinonen, O. P. et Frick, M. H. 1994. « Serum ferritin and ceruloplasmin as coronary risk factors ». *Eur Heart J* 15 : 1599-603.
- Marklund, S. L. 1986. « Ceruloplasmin, extracellular-superoxide dismutase, and scavenging of superoxide anion radicals ». *J Free Radic Biol Med* 2 : 255-60.
- Martínez-Ruiz, A. et Lamas, S. 2004. « S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction ». *Cardiovasc Res* 62 : 43-52.
- Mateescu, M. A., Chahine, R., Roger, S., Atanasiu, R., Yamaguchi, N., Lalumière, G. et Nadeau, R. 1995. « Protection of myocardial tissue against deleterious effects of oxygen free radicals by ceruloplasmin ». *Arzneimittelforschung* 45 : 476-80.
- Mayumi, T., Schiller, H. J., Miyachi, M. et Buckley, G. B. 1993. « Clinical application of free radical ablation for the prevention of reperfusion injury ». chap. dans Yagi, K. (éd.) *Active oxygens, lipid peroxides and antioxidants*, Boca Raton, CRC Press, p. 173-87.
- McCord, J. M. 1988. « Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook ». *Free Radical Biol Med* 4 : 9-14.
- Mehra, V. C., Ramgolam, V. S. et Bender, J. R. 2005. « Cytokines and cardiovascular disease ». *J Leuk Bio* 78 : 805-18.
- Méry, P. F., Pavoine, C., Belhassen, L., Pecker, F. et Fischmeister, R. 1993. « Nitric oxide regulates cardiac Ca^{2+} current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation ». *J Biol Chem* 268 : 26286-95.
- Messerschmidt, A. et Huber, R. 1990. « The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships ». *Eur J Biochem* 187 : 341-52.

- Miranda, K. M., Espey, M. G. et Wink, D. A. 2001. « A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite ». *Nitric oxide : Biology and Chemistry* 5 : 62-71.
- Misko, T. P., Schilling, R. J., Salvemini, D., Moore, W. M. et Currie, M. G. 1993. « A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples ». *Anal Biochem* 214 : 11-6.
- Mohr, S., Stamler, J. S. et Brüne, B. 1996. « Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment ». *J Biol Chem* 271 : 4209-14.
- Moncada, S., Palmer, R. M. et Higgs, E. A. 1991. « Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology ». *Pharm Rev* 43 : 109-142.
- Moncada, S. et Erusalimsky, J. D. 2002. « Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? ». *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 : 214-20.
- Morell, A. G., Irvine, R. A., Sternlieb, I., Scheinberg, I. H. et Ashwell, G. 1968. « Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin *in vivo* ». *J Biol Chem* 243 : 155-9.
- Mukhopadhyay, C. K., Ehrenwald, E., Fox, P. L. et coll. 1996. « Ceruloplasmin enhances smooth muscle cell- and endothelial cell-mediated low density lipoprotein oxidation by a superoxide-dependent mechanism ». *J Biol Chem* 271 : 14773-8.
- Mukhopadhyay, C. K., Mazumder, B., Lindley, P. F. et Fox, P. L. 1997. « Identification of the prooxidant site of human ceruloplasmin: a model for oxidative damage by copper bound to protein surfaces ». *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 11546-51.
- Mukhopadhyay, C. K., Attieh, Z. K. et Fox, P. L. 1998. « Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake ». *Science* 279 : 714-7.
- Murad, F., Mittal, C. K., Arnold, W. P., Katsuki, S. et Kimura, H. 1978. « Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin ». *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9 : 145-58.
- Musci, G., Di Marco, S., Bonaccorsi di Patti, M. C. et Calabrese, L. 1991. « Interaction of nitric oxide with ceruloplasmin lacking an EPR-detectable type 2 copper ». *Biochemistry* 30 : 9866-72.
- Narula, J., Haider, N., Virmani, R., DiSalvo, T. G., Kolodgie F. D., Hajjar, R. J., Schmidt, U., Semigran, M. J., Dec, G. W. et Khaw, B.A. 1996. « Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure ». *N Eng J Med* 335 : 1182-9.
- Nathan, C. et Xie, Q. W. 1994. « Regulation of biosynthesis of nitric oxide ». *J Biol Chem* 269 : 13725-8.
- Nedospasov, A., Rafikov, R., Beda, N. et Nudler, E. 2000. « An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation ». *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 13543-8.
- Nishio, E., Fukushima, K., Shiozaki, M. et Watanabe, Y. 1996. « Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism ». *Biochem Biophys Res Commun* 221 : 163-8.
- Noiri, E., Hu, Y., Bahou, W. F., Keese, C. R., Giaever, I. et Goligorsky, M. S. 1997. « Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells ». *J Biol Chem* 272 : 1747-52.
- Olivares, M. et Uauy, R. 1996. « Copper as an essential nutrient ». *Am J Clin Nutr* 63 : 791S-6S

- Omoto, E. et Tavassoli, M. 1990. « Purification and partial characterization of ceruloplasmin receptors from rat liver endothelium ». *Arch Biochem Biophys* 282 : 34-8.
- Osaki, S., Johnson, D.A., et Frieden, E. 1966. « The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum ». *J Biol Chem* 241 : 2746-51.
- Papapetropoulos, A., García-Cardena, G., Madri, J. A. et Sessa, W. C. 1997. « Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells ». *J Clin Invest* 100 : 3131-9.
- Park, Y. S., Suzuki, K., Taniguchi, N. et Gutteridge, J. M. 1999. « Glutathione peroxidase-like activity of caeruloplasmin as an important lung antioxidant ». *FEBS Lett* 458 : 133-6.
- Patel, B. N. et David, S. 1997. « A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes ». *J Biol Chem* 272 : 20185-90.
- Patel, B. N., Dunn, R. J. et David, S. 2000. « Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain ». *J Biol Chem* 275 : 4305-10.
- Patel, B. N., Dunn, R. J., Jeong, S. Y., Zhu, Q., Julien, J. P. et David, S. 2002. « Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury ». *J Neurosci* 22 : 6578-86.
- Paton, J. F., Kasparov, S. et Paterson, D. J. 2002. « Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity ». *Trends Neurosci* 25 : 626-31.
- Rabkin, S. W. et Kong, J. Y. 2000. « Nitroprusside induces cardiomyocyte death: interaction with hydrogen peroxide ». *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 : H3089-100.
- Rafikova, O., Rafikov, R. et Nudler, E. 2002. « Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control ». *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 5913-8.
- Rauen, U., Li, T., Ioannidis, I., et de Groot, H. 2007a. « Nitric oxide increases toxicity of hydrogen peroxide against rat liver endothelial cells and hepatocytes by inhibition of hydrogen peroxide degradation ». *Am J Physiol Cell Physiol* 292 : C1440-9.
- Rauen, U., Li, T. et de Groot, H. 2007b. « Inhibitory and enhancing effects of NO on H₂O₂ toxicity: dependence on the concentrations of NO and H₂O₂ ». *Free Radic Res* 41 : 402-12.
- Reunanen, A., Knekt, P. et Aaran, R. K. 1992. « Serum ceruloplasmin level and the risk of myocardial infarction and stroke ». *Am J Epidemiol* 136 : 1082-90.
- Rice-Evans, C. et Bruckdorfer, K. R. (éds.) 1995. Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. coll. Portland Press Research Monograph VII, Londres, Portland Press.
- Richardson, D. R. 1999. « Role of ceruloplasmin and ascorbate in cellular iron release ». *J Lab Clin Med* 134 : 454-65.
- Roberts, W. C. 1997. « Effects of lipid lowering on coronary plaque and coronary events ». *Am J Cardiol* 80 : H8-9.
- Roeser, H. P., Lee, G. R., Nacht, S. et Cartwright, G. E. 1970 « The role of ceruloplasmin in iron metabolism ». *J Clin Invest* 49 : 2408-17.
- Rosei, M. A., Foppoli, C., Wang, X. T., Coccia, R. et Mateescu, M. A. 1998. « Production of melanins by ceruloplasmin ». *Pigment Cell Res* 11 : 98-102.

- Rössig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A. M., Mülsch, A. et Dimmeler, S. 1999. « Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation *in vivo* ». *J Biol Chem* 274 : 6823-6.
- Rydén, L. 1988. « Evolution of blue copper proteins ». *Prog Clin Biol Res* 274 : 349-66.
- Saitoh, S., Zhang, C., Tune, J. D., Potter, B., Kiyooka, T., Rogers, P. A., Knudson, J. D., Dick, G. M., Swafford, A. et Chilian, W. M. 2006. « Hydrogen peroxide: a feed-forward dilator that couples myocardial metabolism to coronary blood flow ». *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 2614-21.
- Satoh, H. et Matsui, K. 1997. « Electrical and mechanical modulations by oxygen-derived free-radical generating systems in guinea-pig heart muscles ». *J Pharm Pharmacol* 49 : 505-10.
- Saville, B. 1958 « A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols ». *Analyst* 83 : 670-2.
- Schaub, M. C., Hefti, M. A., Harder, B. A. et Eppenberger, H. M. 1997. « Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes ». *J Mol Med* 75 : 901-20.
- Schulz, R. et Wambolt, R. 1995. « Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury ». *Cardiovasc Res* 30 : 432-9.
- Segal, A. W. et Abo, A. 1993. « The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes ». *Trends Biochem Sci* 18 : 43-7.
- Shepherd, G. M. 1994. *Neurobiology*, New York, Oxford University Press, Inc.
- Shiva, S., Wang, X., Ringwood, L. A., Xu, X., Yuditskaya, S., Annavajhala, V., Miyajima, H., Hogg, N., Harris, Z. L. et Gladwin, M. T. 2006. « Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis ». *Nat Chem Biol* 2 : 486-93.
- Sievi, E., Lähteenmäki, T. A., Alanko, J., Vuorinen, P. et Vapaatalo, H. 1997. « Nitric oxide as a regulator of prostacyclin synthesis in cultured rat heart endothelial cells ». *Arzneimittelforschung* 47 : 1093-8.
- Simpson, P., McGrath, A. et Savion, S. 1982. « Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines ». *Circ Res* 51 : 787-801.
- Stamler, J. S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D. I., Keaney, J., Vita, J., Singel, D., Valeri, C. R. et Loscalzo, J. 1992. « Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin ». *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 7674-7.
- Sterin-Borda, L., Echagüe, A. V., Leiros, C. P., Genaro, A. et Borda, E. 1995. « Endogenous nitric oxide signalling system and the cardiac muscarinic acetylcholine receptor-inotropic response ». *Br J Pharmacol* 115 : 1525-31.
- Sterin-Borda, L., Genaro, A., Perez Leiros, C., Cremaschi, G., Vila Echagüe, A. et Borda, E. 1998. « Role of nitric oxide in cardiac beta-adrenoceptor-inotropic response ». *Cell Signal* 10 : 253-7.
- Takahashi, N., Ortel, T. L. et Putnam, F. W. 1984. « Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule ». *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 390-4.

- Takizawa, T., Gu, M., Chobanian, A. V. et Brecher, P. 1997. « Effect of Nitric Oxide on DNA Replication Induced by Angiotensin II in Rat Cardiac Fibroblasts ». *Hypertension* 30 : 1035-40.
- Takuma, K., Phuagphong, P., Lee, E., Enomoto, R., Mori, K., Baba, A. et Matsuda, T. 2002. « The nitric oxide donor NOC12 protects cultured astrocytes against apoptosis via a cGMP-dependent mechanism ». *Jpn J Pharmacol* 89 : 64-71.
- Tarpey, M. M., Wink, D. A. et Grisham, M. B. 2004. « Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations ». *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286 : R431-44.
- Tarr, M. et Valenzano, D. P. 1991. « Modification of cardiac ionic currents by photosensitizer-generated reactive oxygen species ». *J Mol Cell Cardiol* 23 : 639-49.
- Thomson, C. B. 1995. « Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease ». *Science* 267 : 1456-62.
- Turrens, J. F. et Boveris, A. 1980. « Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria ». *Biochem J* 191 : 421-7.
- Van Eden, M. E. et Aust, S. D. 2000. « Intact human ceruloplasmin is required for the incorporation of iron into human ferritin ». *Arch Biochem Biophys* 381 : 119-26.
- Vidwans, A. S., Kim, S., Coffin, D. O., Wink, D. A. et Hewett, S. J. 1999. « Analysis of the neuroprotective effects of various nitric oxide donor compounds in murine mixed cortical cell culture ». *J Neurochem.* 72 : 1843-52.
- Volk, T., Ioannidis, I., Hensel, M., de Groot, H. et Kox, W. J. 1995. « Endothelial damage induced by nitric oxide: synergism with reactive oxygen species ». *Biochem Biophys Res Commun* 213 : 196-203.
- Volk, T., Mäding, K., Hensel, M. et Kox, W. J. 1997. « Nitric oxide induces transient Ca²⁺ changes in endothelial cells independent of cGMP ». *J Cell Physiol* 172 : 296-305.
- Wang, X. T., Dumoulin, M.J., Befani, O., Mondovi, B. et Mateescu, M. A. 1994. « Joint chromatographic purification of bovine serum ceruloplasmin and amineoxidase ». *Prep Biochem* 24 : 237-50.
- Webb, A., Bond, R., McLean, P., Uppal, R., Benjamin, N. et Ahluwalia, A. 2004. « Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage ». *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 13683-8.
- Wever, R., van Leeuwen, F. X. et van Gelder, B. F. 1973. « The reaction of nitric oxide with ceruloplasmin ». *Biochim Biophys Acta* 302 : 236-9.
- Wink, D. A., Cook, J. A., Krishna, M. C., Hanbauer, I., DeGraff, W., Gamson, J. et Mitchell, J. B. 1995. « Nitric oxide protects against alkyl peroxide-mediated cytotoxicity: further insights into the role nitric oxide plays in oxidative stress ». *Arch Biochem Biophys* 319 : 402-7.
- Wu, H. M., Huang, Q., Yuan, Y. et Granger, H.J. 1996. « VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules ». *Am J Physiol* 271 : H2735-9.
- Xu, L., Eu, J. P., Meissner, G. et Stamler, J. S. 1998. « Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation ». *Science* 279 : 234-7.
- Xu, X., Pin, S., Gathinji, M., Fuchs, R. et Harris, Z. L. 2004. « Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis ». *Ann N Y Acad Sci* 1012 : 299-305.

- Yamashoji, S. et Kajimoto, G. 1983. « Antioxidant effect of caeruloplasmin on microsomal lipid peroxidation ». *FEBS Lett* 152 : 168-70.
- Yang, F., Naylor, S. L., Lum, J. B., Cutshaw, S., McCombs, J. L., Naberhaus, K. H., McGill, J. R., Adrian, G. S., Moore, C. M., Barnett, D. R. et Bowman, B. H. 1986. « Characterization, mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene ». *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 3257-61.
- Yaniv, G., Shilkrot, M., Larisch, S. et Binah, O. 2005. « Hydrogen peroxide predisposes neonatal rat ventricular myocytes to Fas-mediated apoptosis ». *Biochem Biophys Res Commun* 336 : 740-6.
- Zaitsev, V. N., Zaitseva, I., Papiz, M. et Lindley, P. F. 1999. « An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma ». *J Biol Inorg Chem* 4 : 579-87.
- Zaitseva, I., Zaitsev, V. N., Card, G., Moshkov, K., Bax, B., Ralph, A. et Lindley, P. F. 1996. « The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centers ». *J Natl Cancer Inst* 69 : 475-82.
- Zhang, X., Azhar, G., Nagano, K. et Wei, J. Y. 2001. « Differential vulnerability to oxidative stress in rat cardiac myocytes versus fibroblasts ». *J Am Coll Cardiol* 38(7) : 2055-62.
- Zhao, Z., Francis, C. E., Welch, G., Loscalzo, J. et Ravid, K. 1997. « Reduced glutathione prevents nitric oxide-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells ». *Biochim Biophys Acta* 1359 : 143-52.