

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LES ACTIVITÉS DE GLUTATHION-PEROXYDASE, D'OXYDE NITRIQUE-
OXYDASE ET DE DÉPOLARISATION MEMBRANAIRE DE LA CÉRULOPLASMINE
DANS LA PROTECTION DES CARDIOMYOCYTES CONTRE LE PEROXYDE
D'HYDROGÈNE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
MYLÈNE PARADIS

NOVEMBRE 2010

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 remercie infiniment ma directrice de recherche, D^{re} Joanne Paquin, pour m'avoir confié ce tumultueux projet qui a su nourrir mon avide curiosité scientifique. J'ai beaucoup apprécié son approche pédagogique, son optimisme et son dévouement. Je remercie aussi mon codirecteur, D^r Mircea-Alexandru Mateescu, pour ses conseils judicieux et, bien sûr, pour avoir participé activement à mon intégration dans la communauté scientifique.

J'aimerais remercier D^{re} Janine Mauzeroll, D^r Gwenaël Chamoulaud, D^{re} Isabelle Marcotte, M^e Denis Flipo et M^{me} Jacqueline Hue Tieu, pour leur précieuse aide technique et le partage de leur expertise.

Je tiens à remercier ma prédécesseure, M^e Josianne Gagné, dont la ténacité a permis d'élaborer les techniques expérimentales que j'ai utilisées. Je suis aussi particulièrement reconnaissante envers mes collègues de laboratoire, M^{cs} Frédéric Bouchard et Philippe Ducharme, qui ont instauré une admirable cohésion sociale et fonctionnelle au laboratoire. J'offre un merci spécial à Sharon Harcl pour son précieux soutien moral et ses sages conseils scientifiques.

Certes, je salue la bienveillance des membres de ma famille, Claude et France, Simon et Maryse, qui ont su m'appuyer sans appréhension dans tous mes projets et mes décisions.

Enfin, je remercie le CRSNG pour le généreux financement de mon projet, ainsi que Pharmaqam et la Fondation de l'UQÀM pour m'avoir octroyé des bourses d'études très appréciées.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES VIDÉOS.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
RÉSUMÉ.....	xiii
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.1 Physiologie cardiaque	1
1.1.1 Cœur : pompe musculaire unique	1
1.1.2 Vascularisation du cœur	3
1.1.3 Innervation du cœur	4
1.1.4 Conduction cardiaque.....	5
1.2 Organisation cellulaire cardiaque	7
1.3 Cardiomyocytes	8
1.3.1 Potentiel d'action des cellules pacemaker	9
1.3.2 Potentiel d'action des cardiomyocytes contractiles.....	9
1.3.3 Contraction mécanique du cardiomyocyte	11
1.4 Infarctus du myocarde.....	12
1.4.1 Ischémie.....	13
1.4.2 Reperfusion.....	13
1.5 Stress oxydatif	14
1.5.1 Production d'EOR.....	14

1.5.2	Dommmages cellulaires dus aux EOR.....	15
1.5.3	EOR et infarctus du myocarde.....	17
1.6	Oxyde nitrique (NO \cdot).....	18
1.6.1	Propriétés chimiques du NO \cdot	19
1.6.2	Biogénèse du NO \cdot	22
1.6.3	Fonctions et signalisation cardiovasculaires du NO \cdot	25
1.6.4	Maladies cardiovasculaires et NO \cdot	28
1.6.5	Effets neuronaux du NO \cdot	30
1.6.6	Donneurs de NO \cdot	30
1.7	Céruloplasmine (CP) : structure et expression.....	31
1.7.1	Structure de la CP.....	32
1.7.2	Biosynthèse de la CP.....	34
1.7.3	Catabolisme de la CP.....	35
1.8	Fonctions de la CP.....	36
1.8.1	Ferroydase.....	36
1.8.2	Amine-oydase.....	38
1.8.3	Transport du cuivre.....	39
1.8.4	Action antioxydante.....	40
1.8.5	NO-oydase.....	41
1.8.6	GSH-peroxydase.....	43

1.8.7	Cardioprotection par la CP	44
1.9	Hypothèses et objectifs de recherche	45
CHAPITRE II : THE GLUTATHIONE-ASSISTED SCAVENGING AND NITRIC OXIDE- OXIDASE ACTIVITIES OF CERULOPLASMIN ON THE VIABILITY OF CARDIOMYOCYTES EXPOSED TO HYDROGEN PEROXIDE (Manuscrit accepté pour publication dans le journal <i>Free Radical Biology and Medicine</i>).....		
2.1	Contributions	48
2.2	Introduction	51
2.3	Materials and methods	53
2.4	Results.....	57
2.5	Discussion	62
2.6	Acknowledgments	66
2.7	Abbreviations	66
2.8	References	67
2.9	Figures.....	75
CHAPITRE III : LA CP ET LE POTENTIEL MEMBRANAIRE DANS LA CARDIOPROTECTION.....		
3.1	Stratégies.....	82
3.1.1	Filtration de la CP/KPi sur gel Sephadex G-25	82
3.1.2	Dosage de l'activité amine-oxydase de la CP.....	83
3.1.3	Dosage de l'activité ferroxidase de la CP	85

3.1.4	Microscopie de fluorescence dynamique	86
3.2	Résultats et discussion	88
3.2.1	Liaison du K^+ sur la CP	88
3.2.2	Activité amine-oxydase de la CP augmentée en présence de K^+ vs Na^+	91
3.2.3	Activité ferroxidase de la CP augmentée en présence de K^+ vs Na^+	93
3.2.4	Action indéterminée de la CP sur le potentiel membranaire des cardiomyocytes	94
3.3	Conclusions	100
CHAPITRE IV : CONCLUSION GÉNÉRALE		102
RÉFÉRENCES		103
ANNEXE A : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES RELIÉS À L'ACTIVITÉ S-NITROSANTE DE LA CP		124
ANNEXE B : CULTURE CELLULAIRE ET BIOMATÉRIAU		130

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Schéma anatomique du cœur humain	2
Figure 1.2 Artères coronaires principales	4
Figure 1.3 Contrôle nerveux de la fréquence des contractions cardiaques.....	5
Figure 1.4 Système de conduction électrique cardiaque	6
Figure 1.5 Disques intercalaires.....	7
Figure 1.6 Potentiel d'action des cellules pacemaker	10
Figure 1.7 Potentiel des cellules contractiles cardiaques.....	11
Figure 1.8 Sarcomère des cardiomyocytes	12
Figure 1.9 Blocage d'une artère coronaire et ischémie	13
Figure 1.10 Peroxydation en chaîne des lipides.....	17
Figure 1.11 Mécanisme catalytique des NOSs menant à la formation de NO \cdot	23
Figure 1.12 Activation de la eNOS par la bradykinine	26
Figure 1.13 Structure de différents donneurs de NO \cdot	31
Figure 1.14 Structure de la CP.....	33
Figure 1.15 Compétition de l'activité ferroxidase de la CP avec la réaction de Fenton	37
Figure 1.16 Activité amine-oxydase de la CP	39
Figure 1.17 Schéma hypothétique de la formation de RSNO par la CP.....	41
Figure 1.18 Schéma hypothétique de la formation de NO $_2^-$ par la CP	43
Figure 1.19 Activité GSH-peroxydase de la CP	44
Figure 2.1 Some aspects of NO generation and reaction.....	75

Figure 2.2 Nitrosating activity of CP	76
Figure 2.3 Generation of NO ⁺ equivalents by CP	77
Figure 2.4 Effect of incubation medium on DAN nitrosation	78
Figure 2.5 Assay of GSH-peroxidase activity of CP.....	79
Figure 2.6 CP, NO donors and thiols in H ₂ O ₂ -induced loss of cell viability.....	80
Figure 2.7 Schematical presentation of possible relationships between H ₂ O ₂ , thiols, NO and CP.....	81
Figure 3.1 Spectre d'absorbance du produit d'oxydation de la <i>p</i> -PD	84
Figure 3.2 Structure moléculaire du Fluo-3.....	86
Figure 3.3 Sélection des régions cytoplasmiques d'intérêt.....	88
Figure 3.4 Courbe standard pour le dosage du K ⁺ par spectrométrie d'émission atomique..	89
Figure 3.5 Filtration sur gel de la CP et du K ⁺	90
Figure 3.6 Activité amine-oxydase de la CP dans les tampons KOAc et NaOAc	92
Figure 3.7 Activité amine-oxydase de la CP dans les tampons KPi et NaPi.....	93
Figure 3.8 Activité ferroxidase de la CP dans les tampons KOAc et NaOAc	94
Figure 3.9 Champs optiques contenant les cardiomyocytes étudiés	95
Figure 3.10 Fluctuations de la concentration intracellulaire de Ca ²⁺	97
Figure 3.11 Effet de la CP sur les fluctuations de la concentration intracellulaire de Ca ²⁺ ...	98
Figure 3.12 Accumulation de Ca ²⁺ cytoplasmique et fibrillation chez les cardiomyocytes en milieu hyperkaliémique.....	100

Figure A1 Dégradation de la CysNO, plus rapide en présence de CP	125
Figure A2 Libération variable de NO ⁺ par la SNAP selon le tampon.....	126
Figure A3 Faible libération spontanée de NO ⁺ par le GSNO, comparativement à sa contenance en NO [•]	127
Figure A4 Détection immunohistochimique peu révélatrice des RSNO sur des cardiomyocytes exposés à divers traitements	129
Figure B1 Regroupement des cellules P19 induit par la présence de fibroïne de soie	131
Figure B2 Agrégation des MSC induite par la présence de fibroïne de soie	132
Figure B3 Marquage immunohistochimique de l'actine et de la troponine I cardiaque d'une culture de cardiomyocytes	134

LISTE DES VIDÉOS
CD-ROM

Vidéo 1 Flux calciques dans des cultures de cardiomyocytes à forte densité

Vidéo 2 Flux calciques dans des cultures de cardiomyocytes à faible densité

Vidéo 3 Réaction des cultures de cardiomyocytes à l'ajout de KCl 20 mM, en fluorescence et en visible

Vidéo B1 Cardiomyocytes qui colonisent l'éponge de fibroïne de soie et s'y agrègent

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AMP	adénosine monophosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
ATP7A	ATPase 7A de type P transporteuse de Cu^+
BH4	tétrahydrobioptérine
CaM	calmoduline
CAMKII	protéine-kinase II dépendante de la CaM et du Ca^{2+}
CP	céruloplasmine
CysNO	S-nitrosocystéine
DAN	2,3-diaminonaphthalène
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTPA	acide diéthylène triamine pentaacétique
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i> (facteur endothélial de relaxation)
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EOR	espèce oxygénée réactive
FAD	flavine adénine dinucléotide
Fe^{2+}	ion ferreux
Fe^{3+}	ion ferrique
FITC	fluorescéine isothiocyanate
FMN	flavine mononucléotide
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GSH	glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSSG	glutathion disulfure
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène
HBS/G	<i>HEPES buffer saline with glucose</i> (tampon HEPES salin avec glucose)
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIF-1	facteur-1 induit par l'hypoxie
HOCl	acide hypochloreux
$\text{HOO}\cdot$	radical hydroperoxyl
Hsp	<i>heat shock protein</i> (protéine de choc thermique)
IgG	immunoglobuline G
IP_3	inositol triphosphate
IP_3R	récepteur d'inositol triphosphate
KOAc	acétate de potassium
KPi	phosphate de potassium
MSC	cellule souche mésenchymateuse

NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NaOAc	acétate de sodium
NaPi	phosphate de sodium
NO·	oxyde nitrique
NO ⁻	anion nitroxyl
NO ⁺	cation nitrosonium
NO ₂	dioxyde d'azote
NO ₂ ⁻	nitrite
NO ₃ ⁻	nitrate
NOHLA	N ω -hydroxy-L-arginine
NOS	oxyde nitrique-synthase
·O ₂ ⁻	anion superoxyde
·OH	radical hydroxyle
·OONO	peroxynitrite
PAPA/NO	propylamine-propylamine-NONOate
PKA	protéine-kinase dépendante de l'AMPc
PKC	protéine-kinase C
PKG	protéine-kinase G
<i>p</i> -PD	<i>para</i> -phénylènediamine
R ²	coefficient de corrélation au carré
RB2	récepteur de la bradykinine 2
RSNO	thiol S-nitrosé
RyR	récepteur de la ryanodyne
SERCA	<i>sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i> (Ca ²⁺ -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique)
sGC	guanylate cyclase soluble
SNAP	S-nitroso-N-acétyl-D,L-pénicillamine
TGF- β 1	facteur de croissance transformant β 1
TRITC	tétraméthyl-rhodamine-isothiocyanate
TRPC	<i>transient receptor potential channel</i> (canal à potentiel récepteur transitoire)

RÉSUMÉ

La céruloplasmine (CP) est une protéine à cuivre plasmatique qui constitue, entre autres, un important marqueur de l'inflammation et possède plusieurs propriétés antioxydantes, incluant la capacité à piéger des espèces oxygénées réactives (EOR) et à contrer la génération de $\cdot\text{OH}$ par une activité ferroxidase. Des études antérieures ont aussi attribué à la CP une action protectrice sur un cœur de rat isolé soumis à l'ischémie-reperfusion, mais les mécanismes de cette cardioprotection n'ont pas tous été élucidés.

Dans le passé, une étude a montré une action dépolarisante de la CP sur les membranes de cellules de neuroblastome, impliquant possiblement des canaux à K^+ . Par conséquent, un effet de la CP sur le potentiel d'action et les contractions des cardiomyocytes constitue une hypothèse du mécanisme de cardioprotection par la CP. De plus, la littérature relate deux nouvelles activités enzymatiques de la CP, qui pourraient logiquement contrer les effets délétères du H_2O_2 lors de l'ischémie-reperfusion. Premièrement, la CP exercerait une activité NO-oxydase permettant de former des thiols S-nitrosés (RSNO). Ainsi, la possibilité que la CP protège les thiols de protéines cellulaires par S-nitrosation est envisageable. Deuxièmement, l'activité glutathion(GSH)-peroxydase consommatrice de H_2O_2 de la CP pourrait aussi contribuer à protéger les cellules cardiaques.

Les objectifs de cette étude visaient donc à évaluer, au niveau cellulaire, l'implication des activités dépolarisante, NO-oxydase/RSNO-synthase et GSH-peroxydase de la CP dans la cardioprotection. Des études de microscopie de fluorescence dynamique ont été faites pour déterminer l'effet de la CP sur les contractions des cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture en suivant les influx calciques. Aussi, les activités NO-oxydase/RSNO-synthase et GSH-peroxydase de la CP ont été vérifiées en milieu acellulaire, respectivement par dosage fluorimétrique du NO^+ , par dosage colorimétrique de Griess des RSNO et par dosage colorimétrique du H_2O_2 résiduel. À partir des conditions optimales déterminées en milieu acellulaire, l'effet protecteur des différentes combinaisons de CP avec les molécules potentiellement impliquées (GSH, Cys, $\text{NO}\cdot$) a été analysé par mesure de la viabilité des cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture soumis à un stress oxydatif par le H_2O_2 .

La microscopie de fluorescence dynamique n'a pas permis d'obtenir d'effets reproductibles de la CP sur la contractilité des cardiomyocytes. L'activité NO-oxydase/RSNO-synthase de la CP, ainsi que la capacité de la protéine à diminuer le H_2O_2 en présence de GSH, ont été validées en conditions acellulaires. Cependant, seule la combinaison de la CP avec le GSH a protégé significativement les cardiomyocytes de l'effet létal du H_2O_2 . Ce résultat confère pour la première fois une importance physiologique à la collaboration antioxydante des deux molécules. Le mécanisme cardioprotecteur par la CP et le GSH demeure énigmatique, puisque les dosages acellulaires n'ont pas permis de confirmer l'activité GSH-peroxydase précédemment attribuée à la CP. En effet, une action sacrificielle de la CP pourrait avoir masqué son activité catalytique. Néanmoins, ce mécanisme serait sensible à la présence de $\text{NO}\cdot$, qui diminue la protection offerte par la CP et le GSH. Le $\text{NO}\cdot$ pourrait S-nitroser et inactiver un résidu Cys important dans l'action d'ébouage de la CP envers le H_2O_2 .

Mots clés : Céruloplasmine, oxyde nitrique, stress oxydatif, cardiomyocyte, glutathion

CHAPITRE I : INTRODUCTION

La céruloplasmine (CP), une protéine présente dans le sang, possède des propriétés cardioprotectrices qui pourraient se manifester lors de l'infarctus du myocarde. Pour bien comprendre les hypothèses à propos des mécanismes enzymatiques et cellulaires impliqués dans l'action de la CP, une introduction sur la physiologie et l'organisation cellulaire du cœur sain, les propriétés des cardiomyocytes, l'infarctus du myocarde et le stress oxydatif s'avère indispensable. Plus précisément, ces aspects impliquent l'action biochimique complexe d'une panoplie de molécules. Parmi elles, la CP et l'oxyde nitrique (NO·) se démarquent par leur versatilité et leurs vertus cardioprotectrices qui méritent aussi d'être dépeintes.

1.1 Physiologie cardiaque

Pour que le sang et ses nutriments parviennent aux organes, leur propulsion dans le réseau vasculaire est assurée par la pompe cardiaque, dont la délicate organisation structurale et fonctionnelle est primordiale.

1.1.1 Cœur : pompe musculaire unique

Le cœur contient trois types de tissus spécialisés qui lui permettent de remplir ses fonctions pulsatiles. Le tissu externe, le péricarde, est un mince sac fibreux qui assure des fonctions structurales en enrobant le cœur et la base des vaisseaux sanguins cardiaques. Le fluide péricardique qu'il contient sert de lubrifiant au cœur en perpétuel mouvement. La couche épithéliale interne du péricarde s'appelle l'épicarde et permet la jonction avec le tissu médian, le myocarde. Ce dernier est le plus épais des tissus cardiaques et ses cellules musculaires permettent la contraction, puis la dilatation du cœur. Le tissu interne est l'endocarde, qui entre en contact avec le sang et dont les caractéristiques cellulaires s'apparentent à celles de l'endothélium vasculaire. L'endocarde tapisse les quatre cavités du cœur, alors que la *trabeculae carnae*, une fibre musculaire irrégulière et poreuse, est projetée sur la surface de la lumière ventriculaire (Gagné, 2008). Les côtés gauche et droit du cœur possèdent chacun une oreillette et un ventricule et sont séparés par une cloison myocardique. Le myocarde ventriculaire est d'ailleurs beaucoup plus épais que celui des oreillettes, puisque le ventricule est un point de relais capital dans le parcours sanguin.

D'abord, le sang vicié en provenance des organes parvient à l'oreillette droite du cœur par les veines caves (figure 1.1). La contraction de l'oreillette pousse le sang dans le ventricule droit à travers la valvule tricuspide anti-retour qui s'ouvre au moment propice. La contraction ventriculaire propulse le sang chargé de CO₂ vers les poumons par les artères pulmonaires, à travers la valvule semi-lunaire de l'artère pulmonaire. Suite à son passage dans les poumons, le sang ainsi oxygéné revient au cœur par les veines pulmonaires, entre dans l'oreillette gauche et traverse la valvule mitrale pour se retrouver dans le ventricule gauche. La forte contraction du ventricule gauche expulse du cœur, à travers la valvule aortique, le sang qui emprunte enfin l'aorte et les artères afférentes en direction des organes inassouvis.

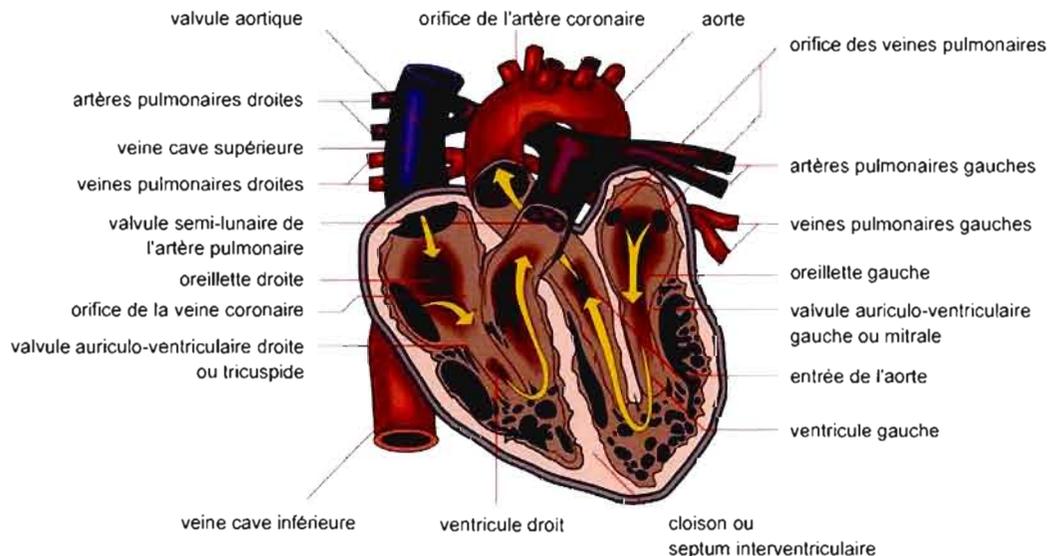


Figure 1.1 Schéma anatomique du cœur humain. Le sang circule selon le sens des flèches dans le cœur, dont les structures principales sont identifiées (d'après Déry, 2005-2009).

La systole est la contraction du muscle cardiaque qui expulse le sang dans la circulation systémique. Elle se situe plus précisément de l'ouverture à la fermeture des valvules aortique et semi-lunaire, dans le cœur gauche et le cœur droit respectivement. La diastole survient entre les systoles et constitue la dilatation des cavités cardiaques qui, par conséquent, se remplissent de sang (Merriam-Webster Inc., 2007).

1.1.2 Vascularisation du cœur

Bien que le cœur prenne en charge l'expédition du sang vers tout l'organisme, il doit aussi s'occuper de son propre apport sanguin. En effet, l'aorte se divise en plusieurs artères, qui incluent les artères coronaires gauche et droite. Chacune de ces artères constitue le tronc d'un des deux arbres vasculaires cardiaques, alors que les branches de ces arbres se divisent en artérioles, en métartérioles et, enfin, en capillaires de 8 à 10 μm . Lors de la systole, les artères subendocardiques sont très comprimées par la forte pression ventriculaire. La circulation sanguine subendocardique est, de ce fait, strictement diastolique. Néanmoins, les artères épicaudiques ne sont pas affectées par la pression ventriculaire et le sang y circule autant lors de la systole que lors de la diastole. Après avoir nourri le muscle cardiaque, le sang emprunte ensuite un réseau de veinules qui convergent vers la veine cave (Little, 1985).

Les artères coronaires sont dites terminales, puisque qu'elles ne sont que très peu redondantes. Cela signifie que chaque fibre musculaire cardiaque n'est irriguée que par un capillaire et, en cas d'obstruction, aucun autre ne peut pallier l'interruption de l'apport sanguin. C'est ce qui rend la santé vasculaire coronarienne si primordiale (Fuster, 2008).

En plus de son réseau artériel arborescent, le cœur est aussi irrigué par une quantité importante de vaisseaux lymphatiques. Ceux-ci dessinent une carte lymphatique qui colonise le myocarde entier en longeant les artères dans le sens de la conduction cardiaque.

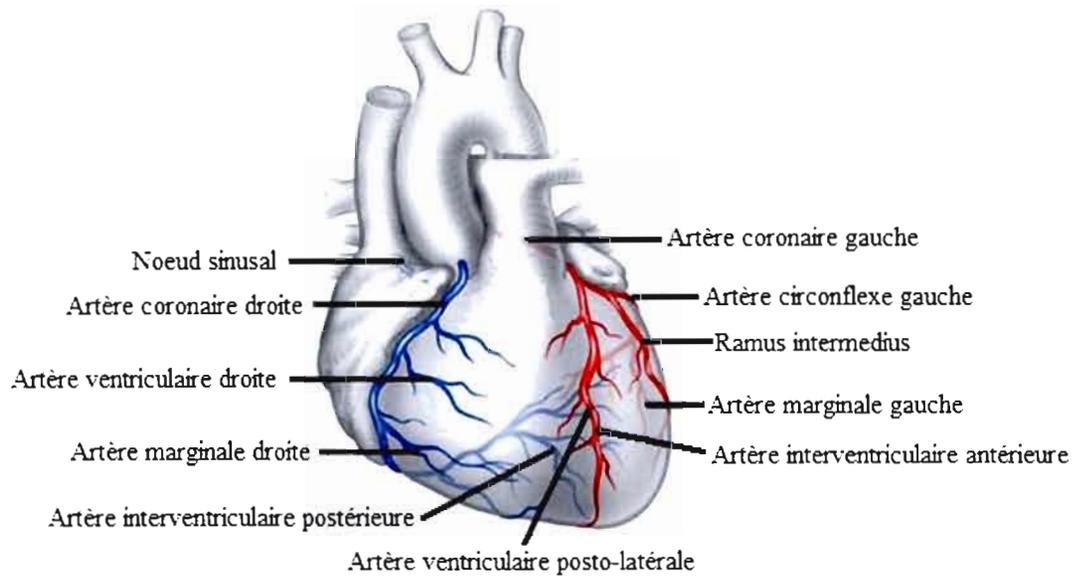


Figure 1.2 Artères coronaires principales. Le cœur est irrigué par deux réseaux arborescents d'artères coronaires ci-haut identifiés (d'après CTSNet, 2008).

1.1.3 Innervation du cœur

Même si le cœur est capable de contractions spontanées, le système nerveux peut intervenir pour modifier la fréquence. D'ailleurs, le cœur ne possède pas qu'un réseau nerveux sensitif, mais est aussi desservi par un enchevêtrement de nerfs moteurs dont les structures nodales cardiaques sont particulièrement pourvues. Effectivement, les terminaisons nerveuses sympathiques qui couvrent le cœur sécrètent de l'adrénaline ou de la noradrénaline (figure 1.3). Les récepteurs adrénergiques β_1 des cellules effectrices cardiaques sont activés et les protéines G qui leur sont couplées stimulent la voie de signalisation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Par conséquent, la fréquence et la vigueur des contractions sont augmentées. Une innervation parasympathique participe aussi au contrôle de la fréquence cardiaque, mais de manière antagoniste au système sympathique. En effet, les branches du nerf vague, qui aboutissent principalement aux oreillettes et aux structures nodales, libèrent de l'acétylcholine. Cette dernière est captée par les récepteurs muscariniques cardiaques (type 2), qui sont couplés à des protéines G inhibitrices de la voie de l'AMPc (Boron et Boulpaep, 2009). De ce fait, la stimulation du nerf vague réduit la fréquence et la

force des contractions. Il est possible d'activer volontairement le nerf vague en adoptant différentes stratégies, telles que la manœuvre de Valsalva (Wong, Taylor et Bailey, 2004), le bâillement ou la toux, pour ralentir la fréquence cardiaque lors d'épisodes tachycardiques (Swanton et Banerjee, 2008).

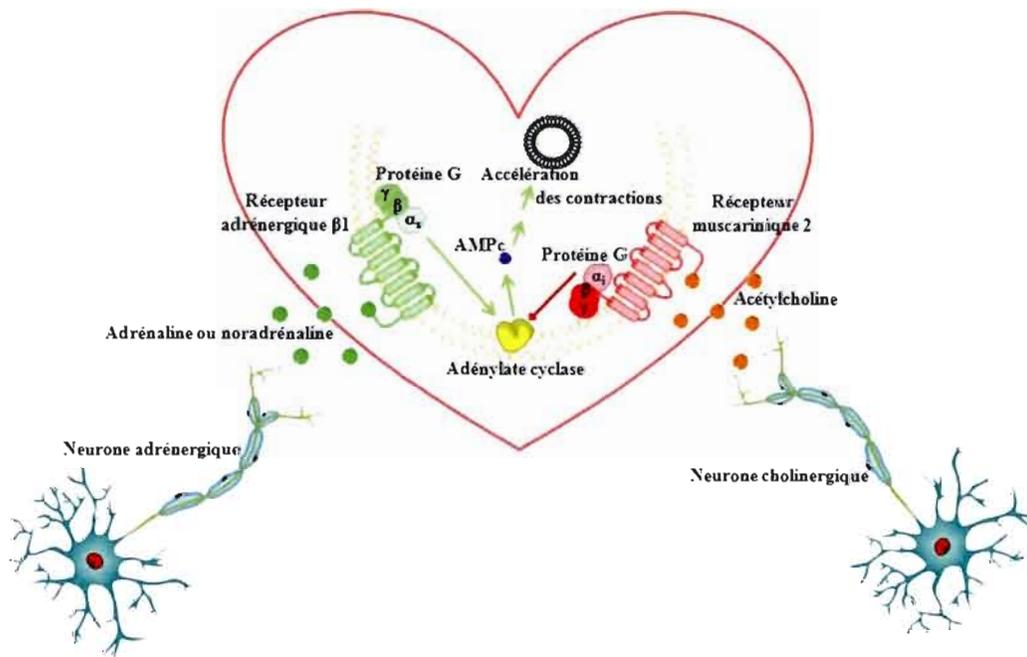


Figure 1.3 Contrôle nerveux de la fréquence des contractions cardiaques. Les nerfs sympathiques sécrètent de l'adrénaline qui active les récepteurs $\beta 1$ et stimule la voie de l'AMPc, ce qui augmente la fréquence contractile cardiaque. Par contre, cette dernière est réduite par l'intervention des nerfs cholinergiques parasympathiques qui activent les récepteurs muscariniques 2 et inhibent la voie de l'AMPc.

1.1.4 Conduction cardiaque

Au repos, en l'absence d'intervention nerveuse, ce sont les cellules pacemaker qui imposent le rythme cardiaque d'environ 70 pulsations par min. Ces cellules, qui se situent dans le nœud sinusal, initient donc le potentiel électrique requis pour la contraction (figure 1.4). Ensuite, la dépolarisation se propage aux cellules voisines, par des jonctions spécifiques appelées disques intercalaires (figure 1.5), jusqu'à gagner les oreillettes entières pour qu'elles se contractent. Simultanément, le courant parvient jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire par

les cellules pacemaker non contractiles du faisceau internodal, constitué de trois voies principales. La conduction dans le nœud auriculo-ventriculaire est environ vingt fois plus lente que dans le faisceau internodal, ce qui permet à la contraction auriculaire d'être complétée avant que la contraction des ventricules soit initiée. Par la suite, le potentiel électrique est transmis aux cellules conductrices spécialisées du faisceau de His, qui se divise en deux branches descendantes. La transmission du potentiel d'action est la plus rapide dans le faisceau de His, soit à une vitesse de 4 m/s. Les branches hissiennes mènent aux fibres de Purkinje, qui se ramifient et propagent finalement le potentiel électrique aux cellules ventriculaires contractiles, pour stimuler la systole ventriculaire (Swanton et Banerjee, 2008).

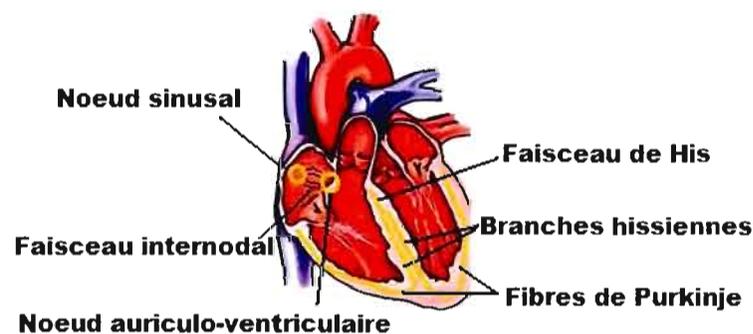


Figure 1.4 Système de conduction électrique cardiaque. Le potentiel d'action est initié au nœud sinusal, parcourt le faisceau internodal pour se propager aux oreillettes et au nœud auriculo-ventriculaire. Ensuite, le courant électrique emprunte le faisceau de His, les branches hissiennes et les fibres de Purkinje, pour enfin se propager dans les ventricules, de bas en haut.

Puisque le signal électrique ne se propage pas directement des oreillettes aux ventricules et que le passage par le faisceau de His est obligatoire, le potentiel d'action se propage de bas en haut dans les ventricules. Ce fait procure un avantage contractile important, puisqu'une contraction ventriculaire débutant par le haut propulserait le sang vers le bas des ventricules au lieu de le propulser directement vers l'artère pulmonaire et l'aorte, qui se connectent dans la partie supérieure du ventricule (figure 1.1).

En situation pathologique, il peut arriver que le nœud sinusal cesse de fonctionner et ne remplisse plus sa fonction pacemaker. Dans un tel cas, ce sont les cellules pacemaker nodales

auriculo-ventriculaires qui imposent leur rythme de 50 battements par min. Dans des circonstances de bloc auriculo-ventriculaire, il y a interruption du signal vers les ventricules et ceux-ci se contractent à leur propre rythme d'environ 30 pulsations par min, alors que les oreillettes maintiennent un pouls de 70 battements par min. Dans ce cas précis, l'implantation d'un pacemaker artificiel s'avère souvent nécessaire (Silverthorn, 2007).

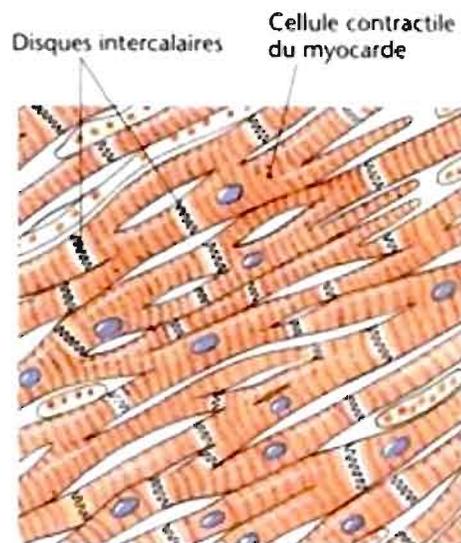


Figure 1.5 Disques intercalaires. La communication du potentiel électrique entre deux cardiomyocytes se fait grâce aux jonctions spécialisées appelées disques intercalaires (d'après Silverthorn, 2007).

1.2 Organisation cellulaire cardiaque

Les cellules musculaires cardiaques, ou cardiomyocytes, appartiennent au type cellulaire cardiaque le plus important en termes de masse, soit environ 90% (Eghbali *et al.*, 1988). Les fibroblastes occupent à eux seuls jusqu'à 95% de la masse non myocytaire du cœur (Eghbali *et al.*, 1989). Leur nombre témoigne de leur rôle prépondérant dans la cohésion de la structure du cœur, par la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire et par soutien mécanique de la charpente du cœur. La matrice extracellulaire du cœur est composée de protéines structurales telles que le collagène et l'élastine, de protéines adhésives comme la laminine, la fibronectine et le collagène de type IV, mais aussi de protéines anti-

adhésives telles que la thrombospondine et l'ostéopondine. Des protéines cartilagineuses hautement glycosylées, les protéoglycanes, font aussi partie de l'amalgame matriciel (Corda, Samuel et Rappaport, 2000). Outre la fonction structurale des fibroblastes, une apparition de caractéristiques myocytaires leur serait induite par la présence du facteur de croissance transformant (TGF)- β 1, ce qui sous-entend un rôle compensatoire de la part des fibroblastes en cas de lésion cardiaque (Eghbali *et al.*, 1991).

Le cœur compte aussi une panoplie d'autres types cellulaires en moins grande quantité, mais dont l'importance des fonctions est indubitable. Parmi ce nombre, il y a les cellules immunitaires qui circulent dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que dans le milieu extracellulaire par diapédèse. Les cellules endothéliales vasculaires tapissent les parois des vaisseaux sanguins pour garantir l'échange optimal de nutriments entre le sang et le tissu, ainsi que pour libérer des facteurs de régulation vasculaire. Les cellules musculaires lisses vasculaires possèdent les propriétés contractiles nécessaires à la modulation de la tension artérielle. Les neurones complètent la composition cellulaire cardiaque et leur fonction n'est pas à négliger (voir section 1.1.3), mais ce sont incontestablement les cardiomyocytes qui personnalisent le tissu cardiaque, en lui procurant une contractilité intrinsèque incomparable.

1.3 Cardiomyocytes

Au stade prénatal, les cardiomyocytes peu différenciés se multiplient par mitose pour augmenter la masse cardiaque. Cependant, après la naissance, les cardiomyocytes perdent leurs propriétés prolifératrices. La croissance cardiaque est alors assurée par une augmentation du volume des cardiomyocytes qui, au fil de leur maturation, développent leur structure caractéristique (Little, 1985). Cette structure particulière des cardiomyocytes leur permet non seulement d'effectuer des contractions, mais aussi de les initier sans la nécessité d'une intervention nerveuse. En effet, les cardiomyocytes pacemaker autorhythmiques enclenchent le potentiel électrique qui se propage ensuite dans les cellules contractiles.

1.3.1 Potentiel d'action des cellules pacemaker

Les cellules pacemaker possèdent un potentiel de « repos » instable, appelé potentiel pacemaker, qui augmente graduellement de -60 mV jusqu'au potentiel membranaire seuil de -40 mV (figure 1.6). C'est cette instabilité qui est responsable de la spontanéité du déclenchement d'un potentiel d'action chez ces cellules particulières. La dépolarisation graduelle est possible grâce à l'existence de canaux If (f pour *funny*), exclusifs aux cellules pacemaker. Ces canaux, perméables au Na^+ et au K^+ , laissent préférentiellement entrer le Na^+ quand le potentiel membranaire est de -60 mV. Leur fermeture, causée par la dépolarisation membranaire, est succédée par l'ouverture de canaux à Ca^{2+} , qui permet d'atteindre le potentiel seuil. Ce dernier ouvre encore plus de canaux à Ca^{2+} et fait entrer une vague massive de ce cation. Le potentiel membranaire atteint alors rapidement son état dépolarisé, à un potentiel d'environ 20 mV. À ce moment, les canaux à Ca^{2+} se ferment et les canaux à K^+ s'ouvrent pour repolariser la membrane par la sortie de K^+ , jusqu'au potentiel initial de -60 mV, auquel les canaux à K^+ se referment (Silverthorn, 2007).

1.3.2 Potentiel d'action des cardiomyocytes contractiles

La dépolarisation des cellules contractiles nécessite la dépolarisation d'une cellule adjacente, ce qui est expliqué par leur potentiel de repos stable de -90 mV (figure 1.7). La provenance d'un courant dépolarisant par les disques intercalaires déclenche l'ouverture des canaux à Na^+ et, par conséquent, la dépolarisation rapide de la membrane jusqu'à un potentiel maximal de 20 mV. Les canaux à Na^+ se referment et la repolarisation est permise par l'ouverture des canaux à K^+ , qui fuit rapidement la cellule. Le potentiel stagne ensuite un certain moment, en raison de la fermeture des canaux à K^+ , simultanée à l'apex de l'ouverture des canaux à Ca^{2+} . Celui-ci entre massivement dans la cellule pour jouer son rôle essentiel au déclenchement mécanique de la contraction, en ayant néanmoins l'effet secondaire de retarder la repolarisation. Enfin, la fermeture des canaux à Ca^{2+} coïncide avec l'ouverture tardive d'autres canaux à K^+ qui complètent la repolarisation par sortie de K^+ .

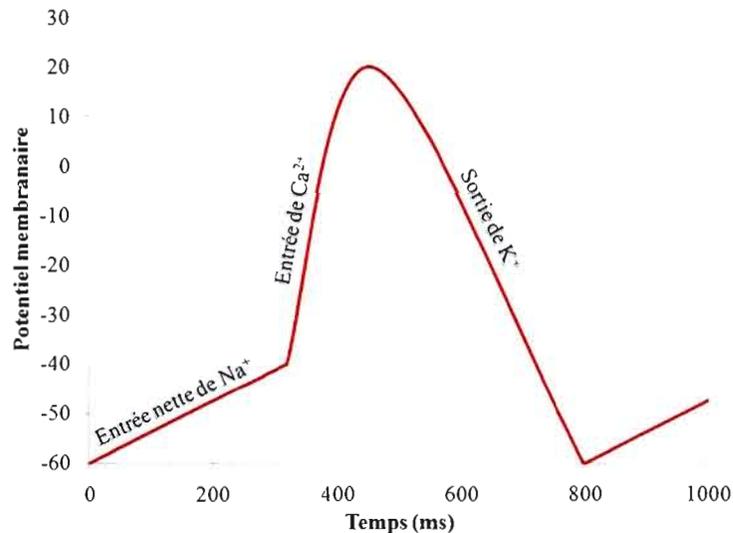


Figure 1.6 Potentiel d'action des cellules pacemaker. Une entrée nette de Na^+ mène graduellement au potentiel seuil, où la dépolarisation est déclenchée par l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, puis la repolarisation est assurée par la sortie de K^+ (d'après Silverthorn, 2007).

Le potentiel d'action des cardiomyocytes est environ cent fois plus long que celui des neurones ou des myocytes squelettiques, soit d'une durée d'au moins 200 ms, grâce à l'intervention particulière des canaux à Ca^{2+} . La contraction cardiaque se synchronise parfaitement avec le potentiel d'action, contrairement à la contraction musculaire squelettique, qui survient plutôt après le bref potentiel d'action. De plus, la période réfractaire absolue des cardiomyocytes coïncide parfaitement avec toute la durée de la contraction, ce qui signifie qu'un second potentiel d'action ne peut survenir avant que la contraction soit achevée. Cela procure au cœur une résistance tétanique, c'est-à-dire que des potentiels d'action ne peuvent s'y additionner pour occasionner des contractions spasmodiques. Cette résistance est garante d'un remplissage adéquat des cavités cardiaques et, par conséquent, d'une bonne propulsion sanguine vers le système vasculaire (Silverthorn, 2007).

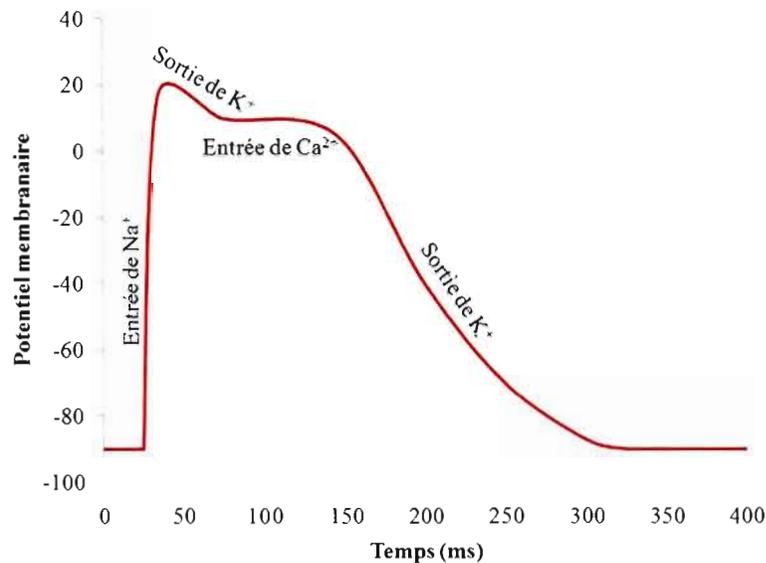


Figure 1.7 Potentiel des cellules contractiles cardiaques. L'entrée de Na^+ cause une rapide dépolarisation. Ensuite, la repolarisation est initiée par la sortie brève de K^+ , alors que le Ca^{2+} entre massivement dans le cytoplasme et retarde la repolarisation. Finalement, le déclenchement tardif d'une sortie de K^+ permet de retrouver le potentiel de repos (d'après Silverthorn, 2007).

1.3.3 Contraction mécanique du cardiomyocyte

La contraction du cardiomyocyte s'opère grâce à l'existence d'une structure interne spécifique appelée sarcomère (figure 1.8). La contraction est initiée par l'entrée cytoplasmique, par des canaux ioniques, d'une quantité massive de Ca^{2+} provenant du milieu extracellulaire, mais aussi du réticulum sarcoplasmique, réservoir interne de Ca^{2+} pour la cellule musculaire. Les cations calciques abondants se lient à la troponine C des innombrables filaments d'actine, ce qui induit un changement de conformation de la troponine I adjacente. La tropomyosine est alors déplacée, ce qui permet à la tête de la myosine d'avancer sur le filament d'actine, en comprimant la titine comme s'il s'agissait d'un ressort. Enfin, la détente du sarcomère est rendue possible par le retour du Ca^{2+} dans les milieux extracellulaire et intrasarcoplasmique, ainsi que par la protéine-kinase G (PKG). Celle-ci phosphoryle et détend la titine en plus de désensibiliser au Ca^{2+} le sarcomère en phosphorylant la troponine I (Kruger *et al.*, 2009 ; Mudd et Kass, 2008).

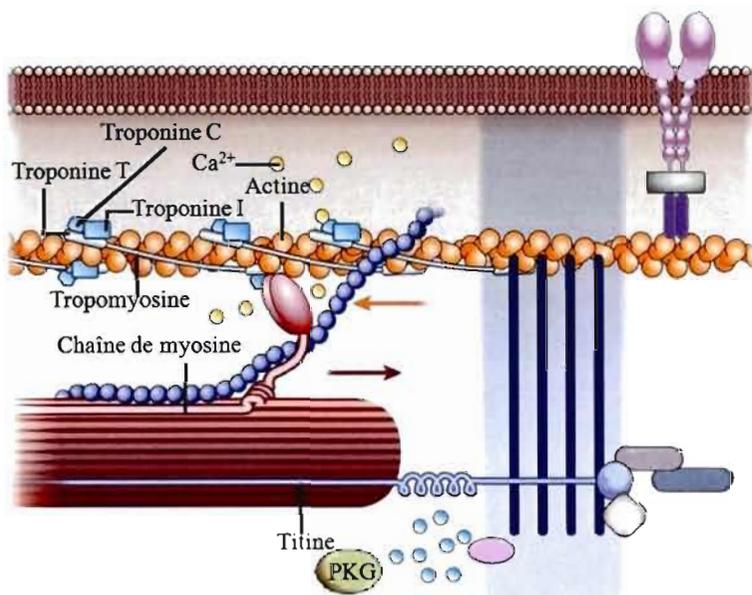


Figure 1.8 Sarcomère des cardiomyocytes. Au sarcomère, le Ca^{2+} initie la contraction en activant le complexe des troponines, qui déplacent la tropomyosine, ce qui permet l'avancement de la tête de la myosine le long du filament d'actine. La titine est alors comprimée tel un ressort et la relaxation du sarcomère s'effectue grâce à la déplétion du Ca^{2+} cytoplasmique et à la PKG qui phosphoryle la titine et la troponine I (d'après Mudd et Kass, 2008).

1.4 Infarctus du myocarde

En 2005 seulement, plus de 17 000 Canadiens sont décédés d'un infarctus du myocarde (Statistique Canada, 2005). Cette statistique accablante, dans un pays aussi industrialisé que le Canada, témoigne de l'occurrence dramatique de cette affection cardiaque, même en cette époque de grands progrès médicaux. Malgré la bonne compréhension générale des mécanismes pathologiques impliqués et le développement de maintes interventions chirurgicales, la mortalité, mais aussi la morbidité affligent encore de trop nombreuses victimes. Le déploiement de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces pourrait s'inspirer des mécanismes œuvrant naturellement pour la protection du myocarde infarci, mais d'abord faut-il élucider ces mécanismes.

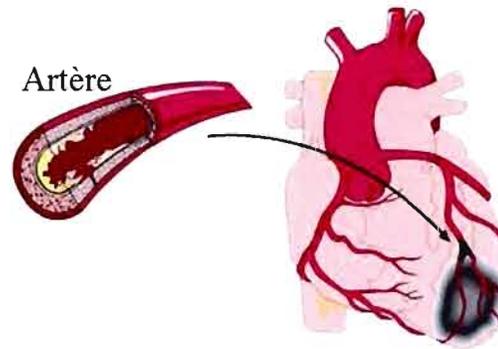


Figure 1.9 Blocage d'une artère coronaire et ischémie. Une plaque athéromateuse obstrue une artère coronaire, ce qui prive de sang et d'oxygène une région du cœur (adapté de HeartPoint, 1997).

1.4.1 Ischémie

L'occurrence d'un infarctus du myocarde nécessite la formation de plaques athéromateuses. Celles-ci se forment par l'accumulation de gras et de leucocytes, rigidifient les parois artérielles et peuvent provoquer une douleur thoracique, l'angine. La rupture éventuellement inévitable de ces plaques cause la libération de substances matricielles vers la lumière vasculaire, où l'accumulation de débris finit par créer un blocage total ou partiel du flux sanguin qui a peine à parvenir au cœur, avide d'oxygène (figure 1.9). La situation dans laquelle un tissu n'est pas desservi par un apport sanguin suffisant se nomme ischémie et provoque chez le tissu une carence en oxygène, appelée hypoxie. Ce manque d'oxygène ne tarde pas à endommager les cardiomyocytes que l'artère cesse de desservir. En cas d'infarctus léthal, le cœur entre dans un état de fibrillation, c'est-à-dire que le cœur bat de manière rapide, irrégulière et non synchronisée. Dans le cas d'un infarctus non léthal, l'ischémie est suivie d'une reperfusion.

1.4.2 Reperfusion

Suite au détachement de la plaque d'athérosclérose obstructive, le cœur retrouve sa perfusion originale. Cependant, le cœur a tendance à cicatrifier au lieu de se régénérer. La cicatrisation rigidifie le tissu qui se trouve alors brimé dans ses mouvements. L'organisme a la fâcheuse habitude de compenser pour la faiblesse des contractions en augmentant la masse

cardiaque, ce qui crée l'hypertrophie et très souvent une insuffisance cardiaque (Mudd et Kass, 2008). Outre cette incapacité du cœur à se régénérer, la réponse immunitaire et la soudaine surabondance d'oxygène qui se manifestent à la reperfusion nuisent beaucoup au rétablissement des cardiomyocytes, par la création d'un stress oxydatif ravageur.

1.5 Stress oxydatif

La communauté scientifique attribue de plus en plus de responsabilité au stress oxydatif dans les différentes pathologies, incluant le Parkinson, l'Alzheimer et l'infarctus du myocarde. De ce fait, la société est de plus en plus sensibilisée à l'importance d'intégrer la consommation d'aliments antioxydants à son mode de vie contemporain (Béliveau et Gingras, 2005). Bien que le stress oxydatif puisse affliger pratiquement tous les types cellulaires, le cœur est un tissu qui lui est particulièrement vulnérable. Aussi, plusieurs types cellulaires peuvent produire une panoplie d'espèces oxygénées réactives (EOR) différentes dont chacune possède une action destructrice particulière.

1.5.1 Production d'EOR

En conditions normales, la production d'EOR est modeste et leur action destructrice est neutralisée par la présence d'antioxydants naturels. En situation inflammatoire, les cellules immunitaires libèrent des EOR en grande quantité pour attaquer les potentiels agents pathogènes environnants. Les principales EOR œuvrant dans les processus physiologiques normaux sont l'anion superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le $\text{NO}\cdot$.

Le $\cdot\text{O}_2^-$ est produit par la respiration cellulaire, alors que la chaîne mitochondriale de transport d'électron génère un électron libre qui se laisse attirer par l'électronégativité d'une molécule de O_2 . Ce transfert d'électron survient plus particulièrement au niveau des complexes I et III de la chaîne de transport, impliquant notamment la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH)-déshydrogénase (Muller *et al.*, 2008) et la coenzyme Q (Han, Williams et Cadenas, 2001 ; Muller, Liu et Van Remmen, 2004). D'ailleurs, un dysfonctionnement de ces complexes a été observé dans la substance noire des cerveaux des patients atteints de Parkinson, maladie caractérisée par un stress oxydatif important (Varghese *et al.*, 2009).

Dans les microsomes, les électrons libres provenant du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) font une escale sur l'hème du cytochrome P-450 pour s'ajouter à une molécule de O_2 . De manière plus marquée, la membrane des phagosomes des leucocytes exhibe généreusement la NADPH-oxydase, qui décerne un électron supplémentaire au O_2 pour le transformer en $\cdot O_2^-$ réactif (Bellavite, 1988 ; Bellavite *et al.*, 1988 ; Segal et Abo, 1993). D'ailleurs, cette réactivité rend le $\cdot O_2^-$ très toxique pour la cellule. Une enzyme, la superoxyde-dismutase, le convertit en H_2O_2 , un précurseur d'EOR tout aussi préoccupant.

En effet, le H_2O_2 peut générer le radical hydroxyle ($\cdot OH$), plus particulièrement en présence de certains métaux comme le cuivre et le fer. Le H_2O_2 et le $\cdot O_2^-$ sont les deux EOR issues de la dégradation des purines par la xanthine-oxydase, entre autre dans les cellules endothéliales vasculaires (Hille et Massey, 1981). Le $\cdot O_2^-$ peut être lui-même transformé en H_2O_2 par la superoxyde-dismutase et ainsi favoriser la conversion du H_2O_2 en $\cdot OH$, donc tous les systèmes de production du $\cdot O_2^-$ constituent en quelque sorte une source de $\cdot OH$. Certains leucocytes, les neutrophiles, relâchent la myéloperoxydase, une enzyme qui catalyse la réaction entre le H_2O_2 et l'ion chlorure pour former l'acide hypochloreux (HOCl), un oxydant très fort (Heinecke *et al.*, 1993 ; Segal, 1989).

Le $NO\cdot$ est une EOR qui occupe des fonctions importantes dans la signalisation cellulaire. Malgré tout, le $NO\cdot$, qui est produit par les NO-synthases de divers types cellulaires, peut réagir spontanément avec le $\cdot O_2^-$ pour former le peroxynitrite ($\cdot OONO$) (Ischiropoulos, Zhu et Beckman, 1992 ; Ischiropoulos *et al.*, 1992 ; Koppenol *et al.*, 1992). Celui-ci possède la capacité d'oxyder dramatiquement nombre de substrats (Huie et Padmaja, 1993), comme ce sera décrit plus loin (voir chapitre 1.6.1) dans de plus amples détails.

1.5.2 Dommages cellulaires dus aux EOR

Le $\cdot O_2^-$ attaque plusieurs composantes cellulaires, ce qui occasionne de fâcheuses conséquences. D'abord, il est solidaire envers son partenaire d'oxydation, le H_2O_2 , en se liant au Fe(III) de la catalase, ce qui ralentit le mécanisme de destruction du H_2O_2 . Le $\cdot O_2^-$ inhibe aussi la glutathion-peroxydase, dont le rôle consiste à dégrader le H_2O_2 intracellulaire. Le $\cdot O_2^-$ peut initier l'oxydation de plusieurs autres enzymes, mais aussi des lipides membranaires. Il

est difficile de déterminer si les nombreux dommages qu'on croit être causés par le $\cdot\text{O}_2^-$ ne seraient pas véritablement attribuables à son produit de protonation, le $\text{HOO}\cdot$. Bien que la protonation soit défavorisée à pH physiologique, il est tout de même possible que l'infime quantité de $\text{HOO}\cdot$ suffise à créer de graves dommages. De plus, le pH inférieur à 5 localisé à la membrane des macrophages permet la génération d'une quantité non négligeable d'espèces $\text{HOO}\cdot$ qui traversent aisément les membranes des cellules adjacentes pour les attaquer (Halliwell et Gutteridge, 2007). Néanmoins, ces espèces chimiques mènent très souvent à la formation de $\cdot\text{OH}$, qui est l'EOB la plus souvent accusée de vandalisme oxydatif.

La peroxydation des lipides est un des dommages importants causés par le $\cdot\text{OH}$, qui pénètre facilement les membranes sous sa forme H_2O_2 . La plupart du temps, c'est le $\cdot\text{OH}$ qui initie le processus en subtilisant un hydrogène radicalaire sur la chaîne alkyle des acides gras, particulièrement lorsqu'ils comportent des insaturations stabilisantes pour le carbone radicalaire ainsi formé (figure 1.10). Celui-ci se joint à du O_2 pour former un radical peroxy, à même la chaîne alkyle. Ce radical enlève ensuite un hydrogène radicalaire à un acide gras voisin, ce qui enclenche une chaîne perpétuelle de peroxydation le long de la membrane (Halliwell et Gutteridge, 2007). Les conséquences de cette peroxydation amplifiée comprennent une désorganisation des lipides de la membrane, notamment en altérant les acides gras polyinsaturés, ainsi qu'en perturbant la fluidité et la perméabilité membranaires. De plus, la peroxydation en chaîne promeut l'attaque des protéines membranaires (par exemple, les canaux ioniques) et cytosoliques, par oxydation, désamination, décarboxylation, réticulation et formation irréversible de ponts disulfures (Gagné, 2008 ; Rice-Evans et Bruckdorfer, 1995). En plus de tous ces dégâts, le $\cdot\text{OH}$ perturbe particulièrement les cardiomyocytes en affectant les échanges ioniques transmembranaires (Cerbai *et al.*, 1991 ; Tarr et Valenzano, 1991), ce qui altère directement la durée et l'efficacité contractile de leurs potentiels d'action (Sato et Matsui, 1997).

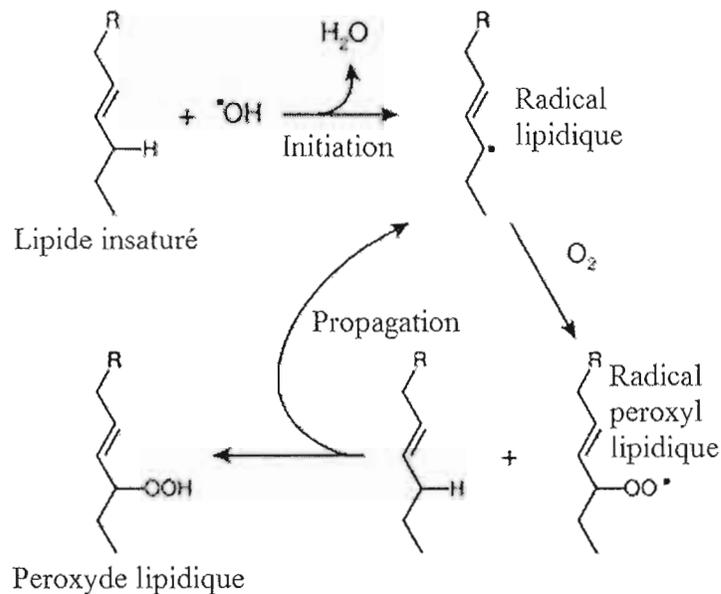


Figure 1.10 Peroxydation en chaîne des lipides. Le $\cdot\text{OH}$ arrache un hydrogène radicalaire à un carbone en α d'une insaturation d'un acide gras. Le O_2 se joint au carbone radicalaire formé, ce qui génère un radical peroxy. Celui-ci subtilise l'hydrogène radicalaire d'une autre chaîne d'acide gras, ce qui propage la peroxydation en plus de former un peroxyde lipidique (inspirée de Halliwell et Gutteridge, 2007).

1.5.3 EOR et infarctus du myocarde

Les EOR jouent un rôle primordial dans la gravité de l'infarctus du myocarde. En effet, la lésion créée par l'ischémie mène à une vive réaction inflammatoire de la part de l'organisme et la reperfusion apporte une quantité massive de leucocytes qui libèrent *in situ* des EOR destructrices destinées à des agents pathogènes fictifs. Les dommages créés par les EOR augmentent l'ampleur de la lésion qui, par conséquent, attire encore plus de leucocytes. De plus, les préjudices dont sont victimes les cellules et les métalloprotéines les amènent à libérer des ions métalliques oxydants, qui empirent le phénomène.

Également, la rareté du glucose et de l'oxygène que crée l'ischémie favorise la dégradation du glycogène et la respiration cellulaire anaérobie, en plus de créer une accumulation tissulaire d'acide lactique. Quand l'ischémie dure relativement longtemps, ces mécanismes compensatoires échouent à maintenir l'équilibre adéquat entre l'adénosine

triphosphate (ATP), réserve énergétique, et l'AMP, qui devient surabondante. La dégradation de l'AMP provoque ensuite une accumulation d'hypoxanthine dans les cellules endothéliales vasculaires. Succédant à l'ischémie, la reperfusion apporte l'oxygène nécessaire à l'oxydation de l'hypoxanthine par la xanthine-oxydase, dans une réaction qui libère beaucoup d'EOR (McCord, 1988). Ces EOR s'additionnent à celles produites par les cellules immunitaires. Somme toute, l'intention salvatrice de la réponse de l'organisme à l'ischémie est supplantée par les ultimes conséquences annihilatrices du stress oxydatif.

1.6 Oxyde nitrique (NO·)

Bien que Joseph Priestley ait découvert l'existence du NO· gazeux vers 1770 (Gibbs, 1965), ce n'est qu'en 1977 que son rôle biologique a été suggéré pour la première fois. Même si la nitroglycérine est utilisée depuis 1876 pour traiter l'angine (Marsh et Marsh, 2000), il a fallu attendre l'année 1977 pour qu'un produit instable de sa dégradation, le NO·, soit proposé par l'équipe du Dr Murad comme étant l'espèce chimique responsable dans l'effet vasodilatateur de la nitroglycérine, par stimulation de la guanylate-cyclase soluble (sGC) (Katsuki *et al.*, 1977). En 1980, la participation nécessaire de l'endothélium pour la vasorelaxation a été démontrée par les équipes des Drs Furchgott et Ignarro, sous-entendant l'existence d'un facteur endothélial de relaxation (EDRF) (Furchgott et Zawadzki, 1980 ; Gruetter *et al.*, 1980). Puis, en 1987, les groupes des Drs Ignarro et Moncada ont révélé que l'EDRF et le NO· étaient en réalité la même molécule (Ignarro *et al.*, 1987 ; Palmer, Ferrige et Moncada, 1987). Depuis, des milliers de publications ont déferlé dans le monde scientifique pour attribuer sans cesse de nouveaux rôles biologiques au NO·, dont l'importance physiologique est de plus en plus reconnue. Comme preuve de cette reconnaissance, le journal Science a proclamé le NO· molécule de l'année en 1992 (Koshland, 1992) et une société du NO· a été fondée, en plus qu'un journal éponyme du NO· ait été créé. De manière encore plus éloquente, le prix Nobel de physiologie ou médecine a été décerné en 1998 aux Drs Murad, Furchgott et Ignarro pour leur brillante et surprenante découverte (Loscalzo et Vita, 2000). Il est fascinant qu'une molécule hétérodiatomique tel le NO· détienne aujourd'hui un si vaste répertoire de fonctions biologiques connues. Le NO· doit cette

versatilité à ses propriétés chimiques uniques qui stimulent plusieurs types cellulaires, dans maints aspects de leur signalisation.

1.6.1 Propriétés chimiques du NO·

Le NO· a été connu pour la première fois comme l'un des gaz à l'origine de la pollution atmosphérique et des pluies acides causées par les rejets industriels. En effet, son statut de radical libre lui confère une réactivité dans l'air, où le contact du NO· avec le O₂ et la vapeur d'eau forme l'acide nitrique, qui acidifie les pluies (Girard, 2005). De plus, le NO· participe à la destruction de la couche d'ozone en réagissant avec elle pour former des nitrates et du O₂ (Fontijn, 1985).

Le NO· possède aussi la capacité de se dissoudre dans l'eau, à une concentration maximale de 1,9 mM/atm (Dean et Lange, 1985). La solubilité du NO· autorise sa présence en milieu physiologique, où la complexité de son comportement s'accroît, étant donnée la présence d'une grande variété de molécules. Contrairement aux autres radicaux libres, le NO· possède une réactivité peu agressive. Il est d'ailleurs possible pour le NO· de parcourir une relativement grande distance en milieu aqueux sans nécessairement s'engager dans une réaction, contrairement au ·O₂⁻ et au ·OH. Sa demi-vie *in vivo* est d'environ 10 secondes (Moncada, Palmer et Higgs, 1991) et sa vitesse de diffusion s'apparente à 50 μm/s (Pryor *et al.*, 1997).

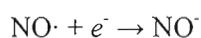
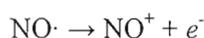
En milieu aqueux, comme mentionné précédemment (chapitre 1.5.1), le NO· réagit avec le ·O₂⁻ pour produire du ⁻OONO, dont le pKa est de 6,8. Le ⁻OONO est particulièrement stable en milieu alcalin, mais sa protonation en milieu acide déstabilise la molécule et favorise l'isomérisation en nitrate (NO₃⁻) :



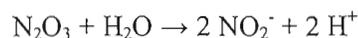
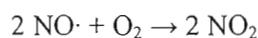
La formation de ⁻OONO en milieu physiologique occasionne non seulement la diminution de la concentration de NO· bioactif, mais aussi l'oxydation d'une panoplie de molécules biologiquement importantes. Par exemple, le ⁻OONO peut ajouter un groupement nitro sur le cycle aromatique des tyrosines des protéines. Cette addition s'effectue en *ortho* du

groupement phénol de la tyrosine, qui devient phénolate à cause de la nouvelle présence stabilisante du groupement nitro. En plus d'ainsi attaquer les protéines, cette réaction produit du H_2O_2 , qui participe activement au stress oxydatif (Pryor *et al.*, 1997).

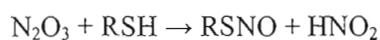
Outre la formation de ${}^-\text{OONO}$, la plupart des réactions auxquelles prend part le $\text{NO}\cdot$ en milieu aqueux sont attribuables aux différentes espèces sous la forme desquelles peut se présenter $\text{NO}\cdot$. Le $\text{NO}\cdot$ peut être oxydé ou réduit pour former respectivement le cation nitrosonium (NO^+) ou l'anion nitroxyl (NO^-) :



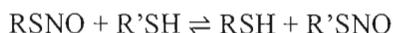
La susceptibilité du $\text{NO}\cdot$ à s'oxyder est imputable au caractère antiliant de sa plus haute orbitale moléculaire occupée (Loscalzo et Vita, 2000). La réaction avec le O_2 permet d'ailleurs au $\text{NO}\cdot$ d'atteindre des niveaux d'oxydation supérieurs, pouvant mener à la formation de l'espèce nitrosante N_2O_3 ou, ultimement, de nitrites (NO_2^-) (Loscalzo et Vita, 2000) :



Cependant, la vitesse de conversion du N_2O_3 en NO_2^- est très lente, ce qui donne le temps au N_2O_3 de nitroser ses substrats. En écrivant le N_2O_3 sous la forme ${}^\delta\text{-OON-NO}^{\delta+}$, il est plus facile de comprendre son mécanisme de nitrosation. En effet, un substrat nucléophile, par exemple le soufre d'un thiol, s'empare du NO^+ pour n'y laisser que le NO_2^- (Loscalzo et Vita, 2000) et former un thiol nitrosé (RSNO) :



La réaction du N_2O_3 avec le groupement thiol du glutathion (GSH), molécule très abondante dans le cytoplasme, est jusqu'à dix fois plus rapide qu'avec l'eau et survient profusément en milieu physiologique (Kharitonov, Sundquist et Sharma, 1995). Cette réaction de S-nitrosation peut aussi se produire sur les résidus de cystéine (Cys) des protéines, en guise de modification post-transcriptionnelle (Stamler *et al.*, 1992). D'ailleurs, la plus grande réserve physiologique de $NO\cdot$ est l'albumine S-nitrosée (Stamler *et al.*, 1992) qui constitue le meilleur moyen de transport du $NO\cdot$ dans la circulation systémique. Le groupement NO^+ peut aussi être échangé entre les thiols (trans-S-nitrosation), quelle que soit leur taille (Hogg, 1999 ; Scharfstein *et al.*, 1994) :



Par exemple, l'albumine S-nitrosée peut transférer son groupement $NO\cdot$ sur une Cys libre ou sur le GSH et vice versa, pour former la S-nitrosocystéine (CysNO) ou le S-nitrosoglutathion (GSNO). De plus, en conditions anaérobies et plus particulièrement en milieu alcalin, le $NO\cdot$ peut réagir avec les petits thiols pour créer des liens disulfures entre eux :



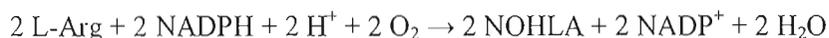
Dans le cas des résidus Cys des protéines, les conditions anaérobies mènent plutôt à la formation d'acide sulfénique (RSOH) (DeMaster *et al.*, 1995). Des études montrent aussi que le $NO\cdot$ peut se lier au Fe(III) libre ou au Fe(III) d'un hème pour former un complexe favorisant la nitrosation d'un nucléophile comme un thiolate (Bertini, 1994) :



De plus, le $NO\cdot$ peut aussi bien se lier fortement au Fe(II) pour former un complexe où tant l'un que l'autre partage un électron. Cette rétrodonation s'effectue entre les orbitales d du métal et les orbitales antiliantes du $NO\cdot$ (Traylor et Sharma, 1992).

1.6.2 Biogénèse du NO·

La présence physiologique du NO· est due à l'existence des trois isoformes de l'enzyme NO-synthase (NOS). En effet, les NOSs catalysent la formation du NO· et d'un sous-produit, la L-citrulline, à partir de l'acide aminé L-arginine (L-Arg), de NADPH, de O₂ et de H⁺, en passant par l'intermédiaire N ω -hydroxy-L-arginine (NOHLA) :



Les NOSs sont composées de deux monomères identiques dont chacun possède une masse qui varie de 130 à 160 kDa selon l'isoforme impliquée (Forstermann *et al.*, 1994). Chaque monomère est constitué de deux domaines. Du côté C-terminal, un domaine réductase arrache un électron au NADPH et, du côté N-terminal, un domaine oxygénase transforme la L-Arg en L-citrulline (figure 1.11). Le domaine réductase fixe aussi des cofacteurs dérivés de la vitamine B₂, la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN) (Stuehr, 1997), qui servent à transporter l'électron provenant du NADPH. Entre les deux domaines, s'insère la calmoduline (CaM) couplée au Ca²⁺, qui permet le transfert électronique vers le domaine oxygénase (Bredt et Snyder, 1990 ; Yui *et al.*, 1991). Le groupement thiolate d'un résidu Cys du domaine oxygénase fixe un groupement prosthétique contenant du Fe²⁺, la protoporphyrine IX (Masters *et al.*, 1996). Le cofacteur tétrahydrobioptérine (BH4) se fixe aussi au domaine oxygénase, près du site de liaison à la L-Arg (Reif *et al.*, 1999). Ces deux ligands font partie intégrante du site actif permettant la réaction d'oxygénation de la L-Arg et, par conséquent, participent à la formation du NO·. Les NOSs possèdent aussi un domaine PDZ qui permet des interactions protéiques spécifiques, dont certaines participent au contrôle de l'activité des NOSs (Loscalzo et Vita, 2000), comme par exemple la calvéoline, la protéine chaperon Hsp90 et la protéine inhibitrice des NOS (Alderton, Cooper et Knowles, 2001). L'homodimérisation est absolument nécessaire à l'activité des NOSs et requiert la présence de BH4, de Fe²⁺ et du substrat L-Arg, alors qu'elle est favorisée par la présence de Zn²⁺ dans le domaine oxygénase (Zhou et Zhu, 2009).

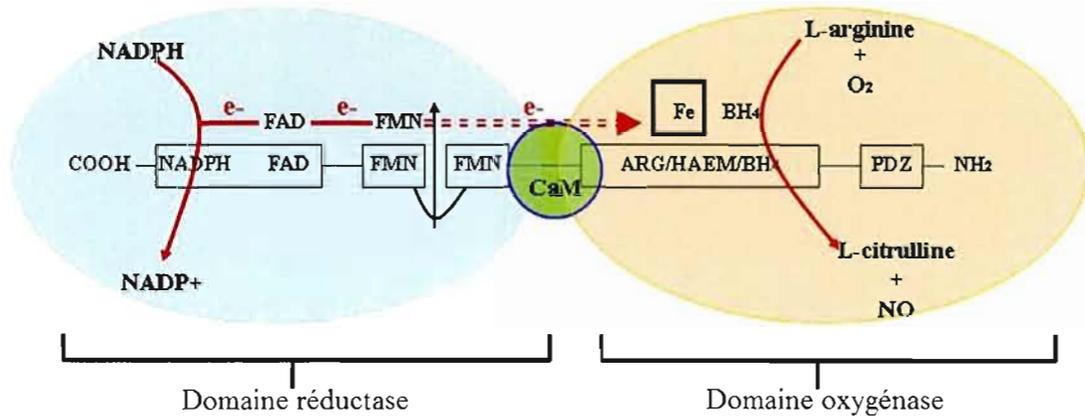


Figure 1.11 Mécanisme catalytique des NOS menant à la formation de NO•. Un électron est arraché du NADPH par le domaine réductase de la NOS et est acheminé au domaine oxygénase par l'intermédiaire de la FAD, de la FMN et de la CaM. Le domaine oxygénase de la NOS, qui inclut un domaine PDZ d'interaction protéique, utilise alors cet électron pour transformer la L-arginine en L-citrulline, avec l'aide du Fe^{2+} et de la BH_4 (d'après Zhou et Zhu, 2009).

Les différentes isoenzymes nNOS (NOS1), iNOS (NOS2) et eNOS (NOS3) ont été nommées initialement d'après les sites de leur découverte, soient le tissu neuronal, les macrophages immunoactivés et les cellules endothéliales respectivement. Le mécanisme catalytique reste identique d'une isoenzyme à l'autre. Cependant, les différentes isoformes de NOS ne sont pas toujours exprimées dans les mêmes types cellulaires et il existe des différences majeures dans le mécanisme de leur régulation (Loscalzo et Vita, 2000).

La nNOS est exprimée constitutivement dans les cellules neuronales du cerveau (Bredt et Snyder, 1990 ; Mayer, John et Bohme, 1990 ; Schmidt *et al.*, 1991), d'où son nom, mais aussi dans une grande variété de tissus et cellules, incluant la moelle épinière (Dun *et al.*, 1992), les ganglions sympathiques (Sheng *et al.*, 1993), les glandes surrénales (Dun *et al.*, 1993), les nerfs périphériques incluant ceux du cœur (Hassall *et al.*, 1992 ; Saffrey *et al.*, 1992 ; Sheng *et al.*, 1992), les endothéliums pulmonaire, utérin et gastrique (Schmidt *et al.*, 1992), la *macula densa* rénale (Schmidt *et al.*, 1992), l'îlot de Langerhans (Schmidt *et al.*, 1992), les mastocytes (Chen et Popel, 2007) et même les muscles squelettiques (Nakane *et al.*, 1993). De manière très intéressante, la nNOS est aussi exprimée dans les cardiomyocytes

et se localise dans le réticulum sarcoplasmique (Wang *et al.*, 2008). La nNOS est soluble et son activité est régulée par les influx calciques qui déterminent l'affinité de la CaM pour la nNOS (Zhou et Zhu, 2009). L'atteinte de l'activité maximale de la NOS requiert des concentrations cytoplasmiques de Ca^{2+} d'au moins 500 nM (Forstermann *et al.*, 1990). La phosphorylation par la protéine-kinase II dépendante de la CaM et du Ca^{2+} (CAMKII), la protéine-kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et la protéine-kinase C (PKC) peut réguler négativement la nNOS (Forstermann *et al.*, 1994). Cette phosphorylation se fait sur la sérine 847 de la nNOS, et empêche la CAMKII d'activer l'enzyme. La phosphatase 1 interviendrait cependant pour contrer cette phosphorylation et donc pour empêcher l'inhibition de la nNOS par les kinases (Zhou et Zhu, 2009).

L'expression de la iNOS n'est pas constitutive comme celle de la nNOS, mais plutôt induite par différents signaux extracellulaires. En effet, son expression est induite par un mélange de cytokines (Forstermann *et al.*, 1994 ; Geller et Billiar, 1998) et peut être régulée par différents facteurs de transcription, incluant le facteur-1 induit par l'hypoxie (HIF-1), qui augmente son expression (Kleinert *et al.*, 2004). Comme la nNOS, la iNOS est soluble, mais son activité n'est pas régulée par les influx calciques. En effet, la CaM a une si grande affinité pour la iNOS qu'elle s'y lie indépendamment de la concentration de calcium (Yui *et al.*, 1991). L'induction de son expression se produit dans la plupart des cellules de l'organisme, selon leur niveau d'exposition au cocktail de cytokines. De même, les cellules immunitaires et les tissus en situation d'inflammation sont particulièrement propices à l'expression de la iNOS (Forstermann *et al.*, 1994). Par exemple, en cas d'infarctus, les cardiomyocytes (Radi et Murad, 2009) autant que les cellules endothéliales ou vasculaires, ainsi que les cellules immunitaires dépêchées sur les lieux sont susceptibles d'exprimer cette forme de NOS.

Comme la nNOS, la eNOS est exprimée constitutivement et son activation est régulée par les influx calciques. Cependant, c'est la seule isoforme qui est à 90% insoluble en milieu aqueux (Forstermann *et al.*, 1991), grâce à son acylation post-traductionnelle. En effet, la eNOS subit la palmitoylation sur ses Cys 15 et 26 et la myristoylation de sa glycine N-terminale (Loscalzo et Vita, 2000). Exprimée majoritairement dans les cellules endothéliales,

mais aussi dans les cardiomyocytes, la eNOS a pour localisation subcellulaire les cavéoles (*caveola intracellularis*), c'est-à-dire les invaginations formées dans la membrane plasmique, mais aussi les membranes golgiennes (Loscalzo et Vita, 2000 ; Wang *et al.*, 2008).

1.6.3 Fonctions et signalisation cardiovasculaires du NO \cdot

Les premières cellules qui ont été révélées sécrétrices de NO \cdot sont les cellules endothéliales vasculaires, qui sont d'ailleurs majoritairement responsables de la présence de NO \cdot dans le sang. En effet, cette production sert au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire en relaxant tant les cellules du muscle vasculaire lisse que les cardiomyocytes. La production de NO \cdot par les cellules endothéliales des organes érectiles (clitoris et pénis) est régulée à la hausse par la libération nerveuse parasympathique d'acétylcholine. Dans le cas des autres endothéliums vasculaires, cette régulation est plutôt assurée par l'hormone paracrine bradykinine (Silverthorn, 2007). Cette dernière stimule la libération de la sous-unité α des protéines G $_i$ et G $_q$ couplées au récepteur de la bradykinine 2 (RB2). Apparemment, la sous-unité α_i se lie à la protéine Src qui peut ensuite activer la kinase Akt, alors que cette dernière active finalement la eNOS par phosphorylation de sa sérine 1177 (Cicarelli *et al.*, 2007). À cela s'ajoute la mise en évidence d'une interaction directe de la eNOS avec le RB2. En fait, cette interaction inhibe la eNOS et la liaison de la bradykinine à son récepteur permet de lever cette inhibition, en plus d'empêcher l'interaction inhibitrice avec la calvéoline (Venema, 2002) (figure 1.12). D'ailleurs, c'est la protéine de choc thermique Hsp90 qui s'immisce entre la eNOS et la calvéoline pour empêcher l'inhibition. Cette intervention de la Hsp90 est rendue possible suite à la stimulation de RB2, puisque cette dernière provoque la phosphorylation des tyrosines de la Hsp90, nécessaire à son action. La Hsp90 servirait aussi de protéine d'échafaudage pour recruter la kinase Akt qui active la eNOS (Fontana *et al.*, 2002).

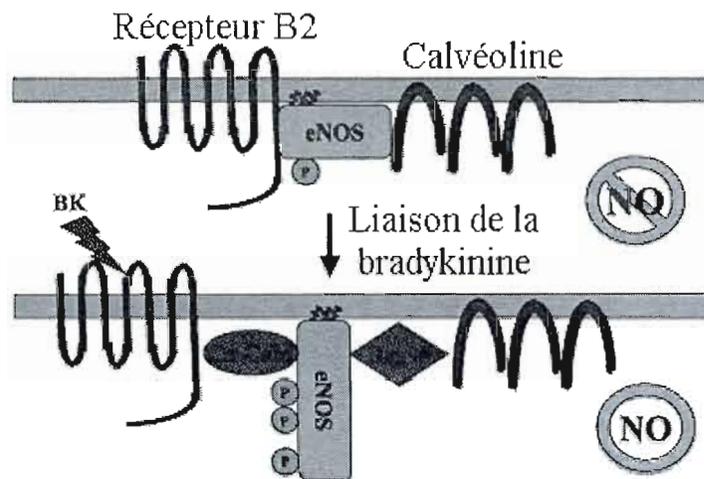


Figure 1.12 Activation de la eNOS par la bradykinine. Sous sa forme passive, le récepteur de la bradykinine B2 inhibe la eNOS en s'y liant directement, comme le fait aussi la calvéoline. L'activation du récepteur par son ligand lève les deux inhibitions, en se dissociant de la eNOS et en activant la Hsp90, qui s'immisce entre la eNOS et la calvéoline (d'après Venema, 2002). BK = Bradykinine.

Une fois sa synthèse réalisée, le $\text{NO}\cdot$ active la voie de signalisation la plus reconnue comme étant impliquée dans la relaxation des cellules musculaires lisses ou cardiaques, soit la voie de la PKG. Effectivement, le $\text{NO}\cdot$ entre dans les myocytes par simple diffusion et y active la sGC. Le mécanisme d'activation implique un groupement prosthétique de la sGC contenant un Fe(II) lié à une histidine (His). Il a été établi que le $\text{NO}\cdot$ s'y lie de manière à former le complexe His-Fe(II)-NO et que cette liaison provoque un changement conformationnel de la sGC pour ainsi multiplier par au moins 200 l'activité de son site catalytique (Koesling *et al.*, 2004). Cependant, ce mécanisme classique d'activation enzymatique a récemment été remis en question et deux étapes dépendantes du $\text{NO}\cdot$ sont maintenant soupçonnées d'activer la sGC. Selon cette hypothèse, appuyée par des études spectrales, la liaison d'une seule molécule de $\text{NO}\cdot$ ne créerait qu'une forme partiellement active de l'enzyme (Russwurm et Koesling, 2004). La liaison d'une deuxième molécule de $\text{NO}\cdot$ sur la sGC serait nécessaire pour passer à un intermédiaire conduisant à la forme complètement active de la sGC, en rompant la liaison entre l'His et le Fe(II) (Koesling *et al.*, 2004). Le site exact de liaison de la deuxième molécule de $\text{NO}\cdot$ n'est toujours pas connu,

alors que les résultats d'études ne permettent pas encore de distinguer s'il s'agit du Fe(II) ou d'un acide aminé de la sGC (Poulos, 2006).

La sGC ainsi activée par le NO· catalyse la conversion de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui active la PKG (Mudd et Kass, 2008). Il est à noter que la PKG existe sous deux isoformes, dont la PKG I avec deux variantes d'épissage, soit α et β (Scholten, Aye et Heck, 2008). Les cellules vasculaires non utérines et les cardiomyocytes n'expriment que la PKG I α (Burley, Ferdinandy et Baxter, 2007) et c'est donc cette forme qui agit dans le système cardiovasculaire. Elle y phosphoryle la titine et la troponine I des sarcomères pour ainsi permettre leur relaxation (Gonzalez *et al.*, 2008 ; Kruger *et al.*, 2009 ; Mudd et Kass, 2008) (figure 1.8). La voie GMPc/PKG stimulée par le NO· possède un rôle régulateur en amont (Kuchan et Frangos, 1993), mais aussi en aval (Hunter *et al.*, 2009) de l'endothéline-1, dans l'une des voies de signalisation vasoconstrictrices les plus importantes.

La régulation des canaux et influx ioniques, plus particulièrement ceux du Ca²⁺, est un autre moyen par lequel la PKG participe à la relaxation musculaire cardiovasculaire. En effet, la phosphorylation par la voie de PKG de canaux calciques situés sur les membranes sarcomérique et cytosolique provoque une baisse globale de la concentration de Ca²⁺ dans le cytoplasme (Loscalzo et Vita, 2000). Par exemple, la voie de PKG induit la phosphorylation du canal calcique SERCA (Ca²⁺-ATPase du réticulum sarco/endoplasmique). Cet état hautement phosphorylé permet au SERCA d'amplifier le transport actif de Ca²⁺ du cytoplasme vers le réticulum sarcoplasmique (Cohen *et al.*, 1999). De plus, il est connu que les canaux calciques voltage-dépendants de type L sont inhibés par la voie de PKG, ce qui réduit l'entrée cytoplasmique de Ca²⁺ provenant du milieu extracellulaire (Jiang *et al.*, 2000). Aussi, il semble que le canal calcique récepteur d'inositol triphosphate (IP₃R) soit inhibé par une phosphorylation dépendante de PKG, ce qui empêche la sortie du Ca²⁺ sarcoplasmique vers le cytoplasme (Murthy et Zhou, 2003). Il serait aussi possible que le mécanisme passe par l'inhibition de protéines G_{αq} activatrices de la phospholipase C, ayant indirectement pour effet de réduire la production d'inositol triphosphate (IP₃) (Huang *et al.*, 2007). Dernièrement, il a été démontré que le NO· inhibe certains types de canaux TRPC (canaux à

potentiel récepteur transitoire) perméables aux cations. Cette inhibition impliquerait la phosphorylation des canaux TRPC par la PKG et participerait au processus de relaxation en empêchant l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire vers le cytoplasme (Chen *et al.*, 2009).

La production de $\text{NO}\cdot$ peut aussi réguler plusieurs protéines directement, sans l'intermédiaire de la voie GMPc/PKG, par nitrosation. Plus particulièrement, le $\text{NO}\cdot$ est capable d'inhiber certains canaux calciques voltage-dépendants de type L par S-nitrosation (Poteser *et al.*, 2001). De même, il inhibe aussi le récepteur de la ryanodyne (RyR), ce qui empêche la sortie cytoplasmique du Ca^{2+} entreposé dans le réticulum sarcoplasmique. Le mécanisme de cette inhibition implique la translocation de la nNOS vers le réticulum sarcoplasmique, qui colocalise avec RyR et permet ainsi une S-nitrosation personnalisée *in situ* (Gonzalez *et al.*, 2007). De plus, il semblerait que des S-nitrosations modifient les influx potassiques des cardiomyocytes (Bai *et al.*, 2004), en agissant plus particulièrement sur les canaux potassiques calcium-dépendants (Bolotina *et al.*, 1994). Cependant, ce serait la voie GMPc/PKG qui régulerait les canaux potassiques voltage-dépendants des cellules musculaires lisses vasculaires (Carrier *et al.*, 1997). Néanmoins, il existe une certaine controverse quant au rôle que le $\text{NO}\cdot$ joue dans la régulation de tous ces canaux. Certains chercheurs clament un effet totalement inverse à ceux mentionnés ci-haut, alors que l'action du $\text{NO}\cdot$ pourrait varier selon sa concentration et selon l'environnement physicochimique provisoire (Hare, 2003). D'ailleurs, l'effet bénéfique relaxant du $\text{NO}\cdot$ peut céder sa place à un effet destructeur lorsqu'il se retrouve en des quantités qui dépassent les concentrations physiologiques, en nitrosant anarchiquement les protéines ou en formant du $\cdot\text{OONO}$ (Gagné, 2008).

1.6.4 Maladies cardiovasculaires et $\text{NO}\cdot$

Les propriétés vasodilatatrices et cardiorelaxantes du $\text{NO}\cdot$ révélées dans les dernières décennies justifient aujourd'hui l'emploi, depuis le XIX^e siècle, de la nitroglycérine comme traitement contre l'angine (Marsh et Marsh, 2000). Néanmoins, il est désormais possible d'attribuer d'autres effets cardiovasculaires potentiellement thérapeutiques au $\text{NO}\cdot$. Son effet vasodilatateur constitue évidemment une arme contre l'obstruction des artères, mais son

action sur les plaquettes et sur l'adhésion des leucocytes étoffe davantage cet arsenal. En effet, le $\text{NO}\cdot$ inhibe l'agrégation des plaquettes (Koo *et al.*, 2009 ; Mendes-Ribeiro *et al.*, 2009), pour ainsi limiter leur contribution obstructive en situation d'athérosclérose. Cet effet impliquerait tant la voie de la GMPc que la S-nitrosation des protéines plaquettaires (Irwin, Roberts et Naseem, 2009). Aussi, l'adhésion des leucocytes est inhibée par le $\text{NO}\cdot$ et la voie de la GMPc (Canalli *et al.*, 2008 ; Klink *et al.*, 2007), ce qui empêche leur agrégation, mais surtout leur apport d'EOR au site d'obstruction et au cœur infarci. De plus, le $\text{NO}\cdot$ S-nitrose des protéines des macrophages et des neutrophiles, ce qui contribue à son effet anti-inflammatoire (Lim *et al.*, 2008 ; Thom *et al.*, 2008).

Aussi, le $\text{NO}\cdot$ empêcherait l'hypertrophie, principale cause et conséquence de l'insuffisance cardiaque. Le cœur est qualifié d'hypertrophique lorsqu'il subit un remodelage dû à une condition pathologique (Mudd et Kass, 2008). Ce remodelage résulte d'une hyperproduction de protéines matricielles, telles que le collagène, par les fibroblastes cardiaques, ce qui amplifie la taille et la rigidité du tissu (Gagné, 2008). Les mécanismes anti-hypertrophiques sont encore méconnus, mais pourraient impliquer la voie de la GMPc (Westermann *et al.*, 2009) et l'homéostasie des structures d'actine (Hunter *et al.*, 2009).

En addition, le $\text{NO}\cdot$ est considéré comme une molécule protectrice en situation d'ischémie-reperfusion, dans différents types cellulaires, par sa promotion relaxante de la voie de la GMPc (Cottart *et al.*, 2003 ; Korkmaz *et al.*, 2009) et par son action anti-apoptotique (Borutaite *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2004). Étant donnée la forte présence d'EOR dans le cœur ischémique reperfusé, les cellules cardiaques sont victimes d'une grande induction de l'apoptose, ce qui confère une importance capitale à l'intervention anti-apoptotique du $\text{NO}\cdot$. D'autres études ajoutent la S-nitrosation des protéines cellulaires aux mécanismes anti-apoptotiques (Prime *et al.*, 2009), notamment par la S-nitrosation inhibitrice de la caspase-3 (Calvert et Lefer, 2009). De plus, la protection des cellules du cœur infarci passerait aussi directement par une protection contre le H_2O_2 et son dérivé $\cdot\text{OH}$. En effet, il semble qu'à des concentrations spécifiques, le $\text{NO}\cdot$ puisse interrompre la chaîne de peroxydation des lipides (figure 1.10) en réagissant avec les radicaux lipidiques (Kelley *et al.*, 1999).

1.6.5 Effets neuronaux du NO \cdot

Maintenant que le NO \cdot prend davantage de place dans la recherche biochimique, la découverte d'une panoplie de nouvelles fonctions lui confère un statut de messager physiologique à l'échelle de l'organisme entier. Le NO \cdot promeut la survie neuronale en se révélant nécessaire à l'action du facteur de croissance neuronal (Akassoglou, 2005). En plus d'agir sur les canaux ioniques des cellules musculaires lisses et cardiaques, le NO \cdot influence aussi ceux des neurones. En effet, la modulation des canaux ioniques neuronaux par le NO \cdot fait aussi de lui un important régulateur de nociception (Hernandez-Pacheco *et al.*, 2008). Entre autres, le NO \cdot participerait à créer la sensation de douleur due à l'acidose tissulaire, en agissant sur les canaux ioniques sensibles à l'acide (Cadiou *et al.*, 2007). Une action sur les canaux potassiques sensibles à l'ATP participerait aussi à générer une sensation de douleur, plus particulièrement en cas de dommages aux nerfs (Kawano *et al.*, 2009). De plus, le NO \cdot activerait la cyclo-oxygénase, une enzyme inflammatoire de premier plan (Miclescu et Gordh, 2009). Le NO \cdot pourrait également contrôler la libération synaptique de neurotransmetteurs, par la voie de la GMPc (Tegenge, Stern et Bicker, 2009) ou par S-nitrosation de récepteurs (Selvakumar, Haganir et Snyder, 2009). Des études montrent aussi une intervention du NO \cdot dans l'innervation cardiaque. Néanmoins, autant une stimulation qu'une inhibition peut être induite dans les nerfs sympathiques ou parasympathiques cardiaques, selon la source de NO \cdot et la localisation subcellulaire des NOS (Danson *et al.*, 2009).

1.6.6 Donneurs de NO \cdot

La découverte de nouvelles fonctions au potentiel thérapeutique du NO \cdot a poussé l'ingénierie chimique à développer des molécules donneuses de NO \cdot . Ces nouvelles molécules permettent de contrôler la libération du NO \cdot , ce qui offre des avantages marqués en recherche. Il existe des transporteurs biogènes de NO \cdot , tels que l'albumine sérique (Stamler *et al.*, 1992), le GSH et la Cys, dont le soufre est le site de fixation du NO \cdot . (figure 1.13). D'ailleurs, des études ont montré que la Cys pouvait non seulement servir à augmenter la biodisponibilité du NO \cdot , mais aussi à le faire traverser dans le tissu cardiaque (Hogg *et al.*, 2007).

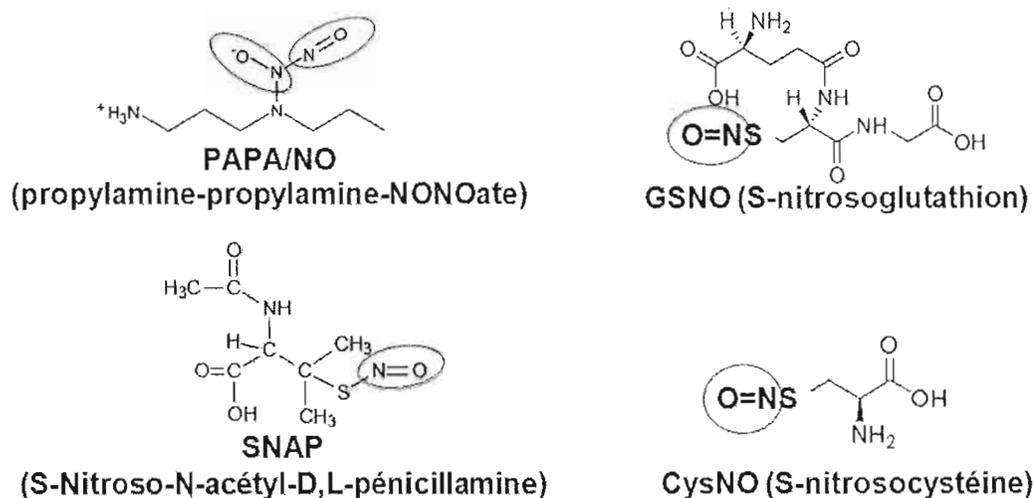


Figure 1.13 Structure de différents donneurs de NO \cdot . Le PAPA/NO est un donneur non-sulfhydryle synthétique de deux équivalents de NO \cdot et le SNAP est un donneur sulfhydryle synthétique d'un équivalent de NO \cdot , alors que le GSNO et la CysNO sont des donneurs sulfhydryles biogènes d'un équivalent de NO \cdot .

Pour ce qui est des donneurs synthétiques, il en existe maintenant une panoplie, dont la S-nitroso-N-acétyl-D,L-pénicillamine (SNAP) et le propylamine-propylamine-NONOate (PAPA/NO) (figure 1.13). La SNAP est un donneur de type sulfhydryle libérant graduellement un équivalent de NO \cdot par molécule (Singh *et al.*, 1996). Le donneur non-sulfhydryle PAPA/NO libère, aussi de manière graduelle, deux équivalents de NO \cdot par molécule. D'ailleurs, il existe plusieurs autres donneurs de type NONOate, dont chacun libère le NO \cdot à un rythme qui lui est propre (Keefer *et al.*, 1996). La dissolution en milieu aqueux de ces donneurs synthétiques est nécessaire à la libération contrôlée du NO \cdot , ce qui fait d'eux une source pratique de NO \cdot . En recherche, ces composés imitent la relâche graduelle de NO \cdot qui se produit *in vivo* et sont plus faciles d'utilisation que le NO \cdot gazeux.

1.7 Céruloplasmine (CP) : structure et expression

La CP est une protéine plasmatique caractérisée pour la première fois en 1948 (Shreffler *et al.*, 1967) par Carl Bertolt Laurell, qui a été fasciné par son intense et particulière couleur bleue (Gitlin, 1999). D'ailleurs, c'est cette couleur bleue qui lui a inspiré le nom de la CP (en latin, *cerulo* signifie « bleu ciel »). Au fil du temps, le nom officiel de la

CP est devenu ferroxidase, en référence à son rôle le plus reconnu. Pourtant, cette appellation réduit la CP à un rôle qui ne représente qu'une partie de ses caractéristiques structurales et fonctionnelles uniques, dont certaines restent encore à élucider.

1.7.1 Structure de la CP

La CP humaine est une protéine de 132 kDa protégée face à la dégradation par une forte glycosylation post-traductionnelle, qui lui assure donc une longue durée de vie plasmatique (Morell *et al.*, 1968). Néanmoins, la CP peut arborer un patron de glycosylation hétérogène (Park *et al.*, 2009). La structure primaire de la protéine humaine, sous sa forme libre plasmatique, comprend 1046 acides aminés qui totalisent, à eux seuls, une masse de 125 kDa (Takahashi, Ortel et Putnam, 1984). Cependant, la CP peut être fragmentée *in vivo* par des protéases, pour former couramment des segments de 116 et 19 kDa (Fox, Mukhopadhyay et Ehrenwald, 1995) (figure 1.14 A). Il est connu que la séquence primaire de la CP est très conservée entre les espèces de mammifères. Par exemple, le logiciel BLAST permet d'aligner les séquences de CP humaine et bovine par la méthode d'ajustement compositionnel de matrices d'acides aminés (NCBI, 2009 ; Yu, Wootton et Altschul, 2003). Selon cette méthode, les séquences de CP de l'humain et du bœuf partagent 85% d'acides aminés identiques, alors que 92% des résidus alignés ont un score de substitution positif (NCBI, 2009), c'est-à-dire qu'ils ont été changés pour des acides aminés aux propriétés physicochimiques semblables.

La structure tridimensionnelle de la CP a été déterminée par diffractométrie de rayons X (Zaitseva *et al.*, 1996). Elle révèle une protéine plutôt globulaire étant maintenue par cinq ponts disulfures (Takahashi, Ortel et Putnam, 1984) et contenant six domaines (figure 1.14 B) d'une ressemblance mutuelle (Fox, Mukhopadhyay et Ehrenwald, 1995). Les domaines adjacents sont reliés par des boucles et chacun forme un cylindre de feuillets β (figure 1.14 C). Les domaines pairs se disposent en un genre de trépied, tout comme le font les domaines impairs. Les deux trépieds s'emboîtent de manière à pointer en direction inverse et à former trois pseudo-axes de symétrie (Zaitseva *et al.*, 1996).

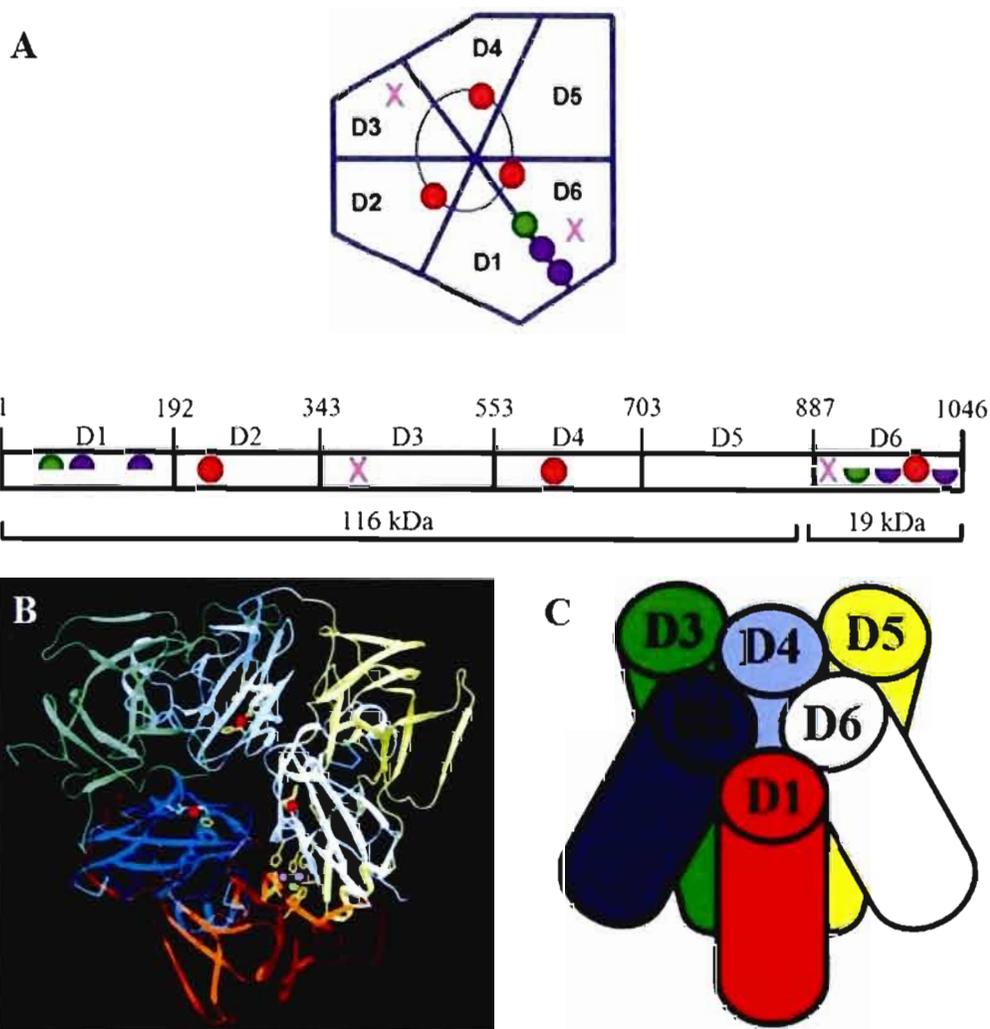


Figure 1.14 Structure de la CP. **A** La disposition des Cu^{2+} dans les six domaines (D1-D6) et dans la séquence en acides aminés (1-1046) de la CP est représentée. Les cercles en rouge, vert et mauve représentent respectivement les Cu^{2+} de types I, II et III. La présence de demi-cercles dans les domaines 1 et 6 signifie une contribution partielle à la création d'un site de liaison pour un Cu^{2+} , alors que les X correspondent aux sites de liaison de Cu^{2+} labiles (d'après Gagné, 2008). **B** La diffractométrie de rayons X révèle une protéine globulaire comprenant six domaines semblables représentés par différentes couleurs : rouge (D1), bleu (D2), vert (D3), bleu pâle (D4), jaune (D5) et blanc (D6). Les Cu^{2+} de types I, II et III sont coordonnés de manière permanente à des His de la CP représentées par des pentacycles jaunes. **C** Les six domaines de la CP forment chacun un cylindre de feuillets β et se disposent en des trépieds de domaines pairs et impairs qui s'enchevêtrent (d'après Zaitseva *et al.*, 1996).

En tant que métalloprotéine, la CP séquestre six Cu^{2+} de différents types (figures 1.14 A et B). Les domaines pairs contiennent chacun un Cu^{2+} de type I, tenu en place par deux His, une Cys et une leucine (Leu) ou méthionine (Met). Cet arrangement des Cu^{2+} de type I leur permet d'absorber la lumière à une longueur d'onde (λ) de 610 nm et de conférer à la CP sa couleur bleue. À la jonction des domaines 1 et 6, se situent trois Cu^{2+} dont deux de type II et un seul de type III, qui forment le centre cuivrique trinuéaire. Les Cu^{2+} de type II et III sont coordonnés avec deux et trois His respectivement (Bento *et al.*, 2007). Dans le cas du type III, un atome électronégatif (N ou O) contribue aussi à la stabilité de la coordination, laquelle permet l'absorption de la lumière à 330 nm (Fox, Mukhopadhyay et Ehrenwald, 1995 ; Zaitseva *et al.*, 1996). En plus des six Cu^{2+} permanents, deux sites de liaison de Cu^{2+} labiles existent sur la CP et affichent un taux d'occupation de 50% (Bento *et al.*, 2007 ; Maltais, 2001) (figure 1.14 A).

Récemment, il a été démontré que la CP ne lie pas seulement le Cu^{2+} , mais aussi le Na^+ et le Ca^{2+} . En effet, il y a un site de liaison du Ca^{2+} sur la partie externe du domaine 1. La coordination est possible grâce à deux résidus d'aspartate (Asp), une lysine (Lys) et une glutamine (Gln), ainsi que deux molécules d'eau. Quant au Na^+ , il peut se lier à trois endroits établis aux boucles protubérantes inter-domaines de la CP. Les Na^+ se lient à des groupements carboxyles du squelette peptidique de divers résidus ainsi qu'à des molécules d'eau. La liaison du Na^+ servirait essentiellement à maintenir la structure tridimensionnelle de la CP (Bento *et al.*, 2007). Étrangement, la liaison du K^+ à la CP n'a pas été étudiée par diffractométrie de rayons X, malgré l'influence reconnue du K^+ sur les systèmes enzymatiques en général (Page et Di Cera, 2006).

1.7.2 Biosynthèse de la CP

La CP est synthétisée en majeure partie par les cellules hépatiques, mais la rate, les leucocytes, les poumons, les testicules, le placenta, les glandes mammaires, les reins et le cerveau ont aussi été rapportés comme lieux de synthèse (Gagné, 2008 ; Healy et Tipton, 2007). Le gène codant pour la CP se situe au locus chromosomique 3q25-q24 et contient vingt exons qui englobent environ soixante-cinq kilobases d'acide désoxyribonucléique

(ADN). D'abord, la CP est synthétisée sous la forme d'apoCP, pas encore chargée en cuivre. Le chargement en cuivre permet de former l'holoCP, qui est ensuite larguée dans la circulation sanguine, où sa concentration se situe normalement autour de 300 µg/mL (Healy et Tipton, 2007). Cette concentration plasmatique de la CP peut doubler (Banford *et al.*, 1982), voire même tripler, en situation d'inflammation (Healy et Tipton, 2007). Par exemple, en cas d'arthrite rhumatoïde, elle peut atteindre 900 µg/mL (Maltais, 2001). D'autres états inflammatoires promeuvent la hausse de la concentration plasmatique de la CP (Cousins, 1985), comme le cancer (Kotrikadze *et al.*, 2008), la grossesse (Ulutas *et al.*, 2009), la pré-éclampsie (Guller *et al.*, 2008), les maladies inflammatoires chroniques (Karabudak *et al.*, 2008), les lésions tissulaires (Auer *et al.*, 1989), le développement (Fitch, Song et Levenson, 1999), l'exercice physique (Romeo *et al.*, 2008) et l'infarctus (Brunetti *et al.*, 2008). Plus précisément, il semble que l'œstrogène et certaines cytokines puissent réguler à la hausse l'expression de la CP (Fox *et al.*, 2000).

Mise à part la forme soluble de la CP, il existe, dans certains tissus, une forme modifiée par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ce groupement permet d'ancrer la CP à la surface cellulaire. La CP soluble et la CP-GPI sont obtenues de l'épissage alternatif d'un même gène (Healy et Tipton, 2007). Parmi les types cellulaires exprimant la CP-GPI, figurent les cellules testiculaires de Sertoli (Fortna, Watson et Nyquist, 1999) et les astrocytes (Patel et David, 1997). La CP-GPI partage une structure et des fonctions fortement similaires avec l'héphaestine, qui possède cependant une portion peptidique transmembranaire (Griffiths, Mauk et MacGillivray, 2005).

1.7.3 Catabolisme de la CP

L'état hautement glycosylé de la CP lui procure une demi-vie de 5 jours dans le plasma humain. L'incorporation des Cu^{2+} est également très importante dans la stabilité de la CP (Hellman *et al.*, 2002), puisque l'apoCP, qui constitue environ 10% de la CP circulante, ne survit que 5,5 heures dans le sang (Healy et Tipton, 2007). Il semble que la présence des Cu^{2+} permette de relâcher la structure de la CP, ce qui lui confère apparemment une résistance au clivage tryptique (Hellman *et al.*, 2002).

La dégradation de la CP s'effectue plutôt dans le foie, où elle est captée par les récepteurs de l'endothélium hépatique et se voit démunie des groupements d'acide sialique qui terminent ses chaînes d'oligosaccharides. La CP est ensuite reconnue par les récepteurs d'asialoglycoprotéines présents dans les hépatocytes, internalisée dans les cellules par endocytose et digérée dans les lysosomes. Lorsque la CP est détruite, ses Cu^{2+} sont excrétés dans la bile, comme les Cu^{2+} libres plasmatiques. La formation de complexes avec des sels biliaires empêche les Cu^{2+} excrétés d'être réabsorbés en parcourant la lumière intestinale. C'est donc la défécation qui permet l'élimination définitive du cuivre de l'organisme, alors qu'un apport alimentaire quotidien est nécessaire au maintien de l'homéostasie cuivrique plasmatique (van den Berghe et Klomp, 2009).

1.8 Fonctions de la CP

Bien que la CP soit particulièrement reconnue pour son rôle dans l'oxydation du fer, d'où son appellation officielle de ferroxidase, elle a d'autres fonctions dont les mécanismes ou les impacts physiologiques sont souvent méconnus. En effet, la CP oxyde des amines et agit dans le système nerveux. Elle aurait aussi un rôle dans le transport du cuivre. De plus, considérée comme une importante protéine marqueuse d'inflammation, elle peut capturer des EOR, ce qui contribue à son action antioxydante. Enfin, plus récemment, des études ont attribué à la CP la faculté de réagir avec le $\text{NO}\cdot$ et le GSH, ce qui pourrait compléter l'activité ferroxidase et le piégeage d'EOR dans l'action cardioprotectrice de la CP.

1.8.1 Ferroxidase

Le fer est un oligoélément de première importance dans l'organisme. Son incorporation dans le groupement prosthétique de l'hémoglobine, protéine essentielle à la livraison du O_2 à l'échelle de l'organisme, n'est qu'un des nombreux exemples de la nécessité du fer pour les activités biologiques vitales. Cependant, pour être efficace, le fer doit être soumis à tout un système de régulation rigoureux. D'abord, l'ion ferrique (Fe^{3+}) est la seule espèce à pouvoir être transportée par la transferrine (Anderson et Vulpe, 2009), alors que l'ion ferreux (Fe^{2+}) est l'espèce qui sert à lier le O_2 à l'hémoglobine (Wilson et Reeder, 2008). Cependant, sous sa forme libre, le Fe^{2+} est hautement toxique. En effet, il est oxydé

en Fe^{3+} par le H_2O_2 pour former du $\cdot\text{OH}$ et du $\cdot\text{OH}$, une EOR dévastatrice (Kruszewski, 2003). Il s'agit de la réaction de Fenton, chimiquement décrite pour la première fois dans les années 1930 (Koppenol, 2001).

Heureusement, la CP fait compétition à la réaction de Fenton en oxydant dix fois plus rapidement le Fe^{2+} en Fe^{3+} par réduction d'un de ses Cu^{2+} en Cu^+ (figure 1.15). Le retour à l'état Cu^{2+} s'effectue simplement par transfert d'un électron au O_2 , ce qui libère des molécules d'eau tout à fait inoffensives (Osaki et Walaas, 1967). Il semble que les Cu^{2+} qui permettent l'oxydation du Fe^{2+} soient ceux de type I des domaines 4 et 6 (Brown, Stenberg et Mauk, 2002), alors que le O_2 est plutôt capté par le centre trinuécléaire cuivrique des domaines 1 et 6 (Inoue *et al.*, 1999). Par cette activité ferroxidase, la CP favorise aussi l'incorporation du fer dans la transferrine, qui le distribue dans tout l'organisme et dont l'affinité pour le fer est spécifique à l'espèce Fe^{3+} (Healy et Tipton, 2007). De cette manière, la CP est essentielle à la répartition adéquate du fer dans l'organisme, en plus de contrer la formation d'EOR ravageuses.

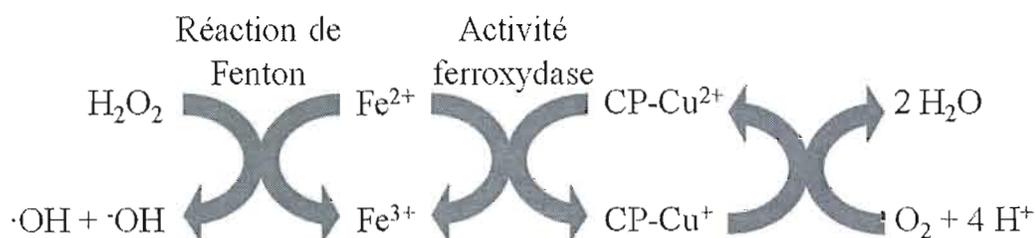


Figure 1.15 Compétition de l'activité ferroxidase de la CP avec la réaction de Fenton. L'activité ferroxidase de la CP diminue la quantité de Fe^{2+} disponible pour la réaction de Fenton, ce qui remplace la génération d'une EOR dangereuse ($\cdot\text{OH}$) par celle de molécules d'eau.

De plus, la CP-GPI, comme son homologue héphaestine, se situe près de la ferroportine, qui expulse le fer hors de la cellule sous forme de Fe^{2+} (Jeong et David, 2003). Grâce à cette colocalisation membranaire, la CP peut rapidement oxyder le Fe^{2+} sortant pour le charger directement dans la transferrine sous forme de Fe^{3+} , diminuant ainsi la quantité de

Fe^{2+} libre en circulation (Kim, Nevitt et Thiele, 2008). Cela réduit donc les risques oxydatifs reliés à la réaction de Fenton.

La CP circulante permettrait aussi l'entreposage du fer, en chargeant la ferritine, ce qui évite les dépôts ferreux (Van Eden et Aust, 2000). D'ailleurs, il a été démontré qu'une absence de CP provoque des troubles oxydatifs importants et des dysfonctionnements du système nerveux central, en grande partie reliés à la défectuosité du métabolisme du fer et à la formation de dépôts de fer (Anderson et Vulpe, 2009). Les désordres du métabolisme du fer causés par l'acéruplasminémie peuvent occasionner des problèmes dans plusieurs types tissulaires, comme le foie, le pancréas (Di Raimondo *et al.*, 2008), le cerveau, ainsi que la rétine (Hellman *et al.*, 2000). Un manque de CP pourrait aussi être impliqué dans le développement du diabète (Di Raimondo *et al.*, 2008), du Parkinson (Bharucha *et al.*, 2008) et de l'Alzheimer (Capo *et al.*, 2008 ; Klevay, 2008). D'ailleurs, une étude récente démontre que le H_2O_2 induit la dégradation de l'acide ribonucléique messenger (ARNm) de la CP dans les astrocytes (Tapryal *et al.*, 2009). Le H_2O_2 régulerait donc à la baisse l'expression de la CP, pour ainsi exagérer la production d'EOR par la réaction de Fenton dans les maladies neurodégénératives.

1.8.2 Amine-oxydase

Même si le Fe^{2+} constitue le substrat préférentiel de la CP, celle-ci exerce aussi une activité oxydase sur certaines amines. La CP oxyde effectivement des amines directement liées à un cycle aromatique. La *para*-phénylènediamine (*p*-PD) est le substrat le plus utilisé pour mesurer l'activité amine-oxydase de la CP *in vitro*, car son oxydation génère un produit coloré qui absorbe à une λ de 530 nm (Fox, 2003 ; Gagné, 2008 ; Healy et Tipton, 2007 ; Sokolov *et al.*, 2009). Le Cu^{2+} de type I du domaine 4 de la CP constituerait le centre du site actif de l'activité amine-oxydase (Brown, Stenberg et Mauk, 2002). À la différence des oxydases ordinaires, la CP possède l'énorme avantage de générer de l'eau au lieu du H_2O_2 comme sous-produit d'oxydation (figure 1.16).

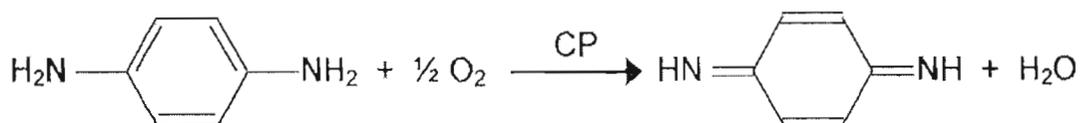


Figure 1.16 **Activité amine-oxydase de la CP.** La CP a la capacité d'oxyder certaines amines aromatiques, telles que la *p*-PD, en générant collatéralement une molécule d'eau inoffensive (d'après Gagné, 2008).

En plus d'amines synthétiques comme la *p*-PD, la CP oxyde aussi des amines biogènes, notamment l'adrénaline, la dopamine et la sérotonine (Sokolov *et al.*, 2009). Cela suggère une action régulatrice de la CP sur les neurotransmetteurs, s'ajoutant ainsi à la régulation métabolique du fer pour justifier la présence de CP dans le cerveau. D'ailleurs, l'implication de la CP dans le système nerveux se présente sous de plus en plus d'aspects. La CP pourrait même contribuer à l'organisation nerveuse, lors du développement, en régulant le positionnement ou la migration des neurones par un mécanisme encore sous étude (Ducharme, 2007 ; Ducharme *et al.*, 2010 ; Maltais *et al.*, 2003).

1.8.3 Transport du cuivre

Le cuivre possède d'importantes fonctions cellulaires, notamment en étant impliqué dans l'érythropoïèse, la maturation des leucocytes, la contractilité du myocarde, le transport du fer, le métabolisme du glucose et le développement du cerveau (Gagné, 2008). Il a été montré que 90% du cuivre de l'organisme se trouve lié à la CP, ce qui sous-entend un rôle de transporteur de cuivre à la protéine circulante. Cependant, dans les cas d'acéruplasminémie, aucun trouble d'absorption ou de distribution de cuivre n'a été rapporté. Cela suggère que le rôle de la CP dans la distribution du cuivre n'est pas si important (Kim, Nevitt et Thiele, 2008), même si certaines études proposent que l'endocytose de la CP puisse être responsable de l'entrée cytoplasmique du cuivre (Gagné, 2008). Néanmoins, l'acéruplasminémie provoque une hausse de la concentration de cuivre libre dans le plasma. Le cuivre libre a tendance à favoriser la génération d'EOR, ce qui explique en partie le stress oxydatif qui persiste chez les individus n'exprimant pas la CP (Kim, Nevitt et Thiele, 2008). D'autre part, il pourrait y avoir des mécanismes compensatoires de transport de cuivre dans des conditions d'insuffisance en CP. Par exemple, la protéine la plus abondante dans la circulation sanguine,

l'albumine, est reconnue comme un important transporteur de cuivre (van den Berghe et Klomp, 2009).

L'entrée cytoplasmique du cuivre serait principalement assurée par un transporteur transmembranaire de cuivre, le Ctr1. Celui-ci est situé à proximité d'une métalloréductase membranaire qui s'occupe de réduire le Cu^{2+} en Cu^+ , pour lequel le Ctr1 possède une très forte affinité. Le cuivre peut alors être assigné aux enzymes cellulaires qui le requièrent. Jusqu'à ce jour, aucune étude ne semble s'être penchée sur une interaction possible de la CP avec le Ctr1. Le cuivre peut aussi être exporté dans la circulation sanguine par l'ATP7A (ATPase 7A de type P transporteuse de Cu^+) (Kim, Nevitt et Thiele, 2008).

1.8.4 Action antioxydante

Depuis longtemps, la médecine se sert abondamment de la CP comme marqueur de phase aiguë de l'inflammation. La forte présence plasmatique de la CP en situation inflammatoire constitue un indice de son rôle antioxydant. Avant que des études au sujet de l'acéruplasminémie soient réalisées, rien n'indiquait avec certitude si le rôle global de la CP était pro ou antioxydant. La CP possède probablement un mélange de propriétés contradictoires en matière d'oxydation, alors que le côté antioxydant semble prédominer (Gagné, 2008).

L'activité ferroxidase de la CP lui confère un rôle antioxydant, par compétition avec la réaction de Fenton (Rathore *et al.*, 2008). Un tout autre mécanisme contribue également à la notoriété de la CP comme agent antioxydant circulant. En effet, plusieurs études ont rapporté une capacité de la CP à capturer directement les EOR, comme le $\cdot\text{OH}$ et le $\cdot\text{O}_2^-$, par liaison à ses Cu^{2+} , ce qui prévient l'oxydation des lipides et des protéines (Al-Timimi et Dormandy, 1977 ; Atanasiu *et al.*, 1998 ; Calabrese et Carbonaro, 1986 ; Goldstein *et al.*, 1979). Par contre, d'autres stipulent que la CP soit dégradée par les EOR et que la libération de ses ions de cuivre aggrave les conséquences du stress oxydatif (Choi *et al.*, 2000 ; Kim, Park et Park, 2000). Pourtant, cette idée ne concorde pas avec l'incontestable augmentation du stress oxydatif en situation d'acéruplasminémie (Anderson et Vulpe, 2009). Il faut dire que des

concentrations très élevées de H_2O_2 ont été utilisées pour obtenir une dégradation de la CP et une libération de son cuivre (Choi *et al.*, 2000).

1.8.5 NO-oxydase

Il y a une trentaine d'années déjà, une étude prouvait la liaison du $\text{NO}\cdot$ aux cuivres de types I de la CP (Wever, van Leeuwen et van Gelder, 1973). Cependant, à cette époque où les fonctions biologiques du $\text{NO}\cdot$ étaient encore méconnues, personne ne s'est intéressé à attribuer un rôle à cette interaction. Il y a une décennie, il a été montré que la CP catalyse la formation de RSNO *in vitro*, possiblement en oxydant le $\text{NO}\cdot$ en NO^+ (Inoue *et al.*, 1999). Il a été postulé que le mécanisme de cette réaction puisse être similaire à celui de l'activité ferroxidase de la CP. Selon cette idée, le $\text{NO}\cdot$ se lierait à un Cu^{2+} de type I, pour lui léguer un électron. Celui-ci serait ensuite transféré à une molécule de O_2 , retenue par la triade des Cu^{2+} de type II et III des domaines 1 et 6 de la CP (figure 1.17).

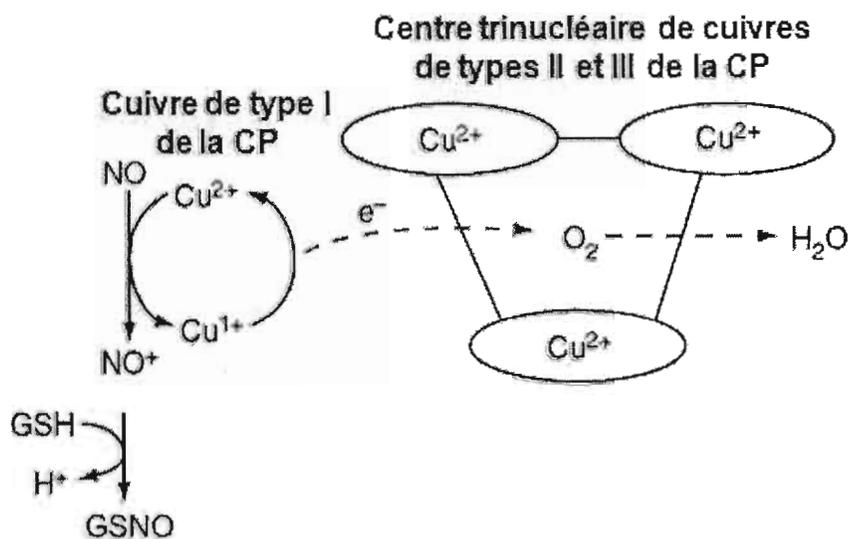


Figure 1.17 Schéma hypothétique de la formation de RSNO par la CP. Un Cu^{2+} de type I de la CP dépourvoit le $\text{NO}\cdot$ d'un électron pour ensuite le transférer au O_2 qui, retenu par le centre trinucléaire cuivrique de la CP, recrute des ions H^+ pour enfin libérer une molécule d'eau. Le NO^+ formé par cette activité NO-oxydase de la CP S-nitroserait alors des thiols comme le GSH (d'après Inoue *et al.*, 1999 ; Shiva *et al.*, 2006).

Il est envisageable que cette activité NO-oxydase de la CP puisse participer à la S-nitrosation régulatrice de canaux ioniques (Bai *et al.*, 2004 ; Bolotina *et al.*, 1994 ; Gonzalez *et al.*, 2007 ; Gonzalez *et al.*, 2008 ; Poteser *et al.*, 2001 ; Selvakumar, Haganir et Snyder, 2009), ainsi que de protéines impliquées dans l'inflammation (Lim *et al.*, 2008 ; Thom *et al.*, 2008) ou l'apoptose (Calvert et Lefer, 2009). Des études *in vitro* montrent aussi que la S-nitrosation de petits thiols extracellulaires tels que le GSH et la Cys puisse être impliquée dans le transport du NO \cdot vers l'intérieur de la cellule et dans la transnitrosation des protéines intracellulaires (Broniowska, Zhang et Hogg, 2006 ; Hogg *et al.*, 2007 ; Romero et Bizzozero, 2006 ; Zhang et Hogg, 2005), en plus de prolonger l'effet du NO \cdot (Alencar *et al.*, 2003). La CP, par son activité NO-oxydase, jouerait alors un rôle prépondérant dans le métabolisme du NO \cdot . Par contre, l'étude de Shiva *et al.* (2006) rapporte que l'activité NO-oxydase de la CP favoriserait davantage la formation de NO $_2^-$ que de RSNO dans le plasma. Le mécanisme de formation de NO $_2^-$ serait similaire à celui de la formation de RSNO, à l'exception que le NO $^+$ réagirait avec une molécule d'eau au lieu d'un thiol (figure 1.18). Aussi bien en générant du NO $_2^-$ que des RSNO, l'activité NO-oxydase de la CP lui conférerait une action cytoprotectrice par la création de réserves de NO \cdot et le prolongement de la durée de vie physiologique du NO \cdot . En effet, autant les RSNO que les NO $_2^-$ ont été décrits comme des molécules augmentant la durée de biodisponibilité du NO \cdot (Gladwin *et al.*, 2000 ; Shiva *et al.*, 2006 ; Stamler *et al.*, 1992).

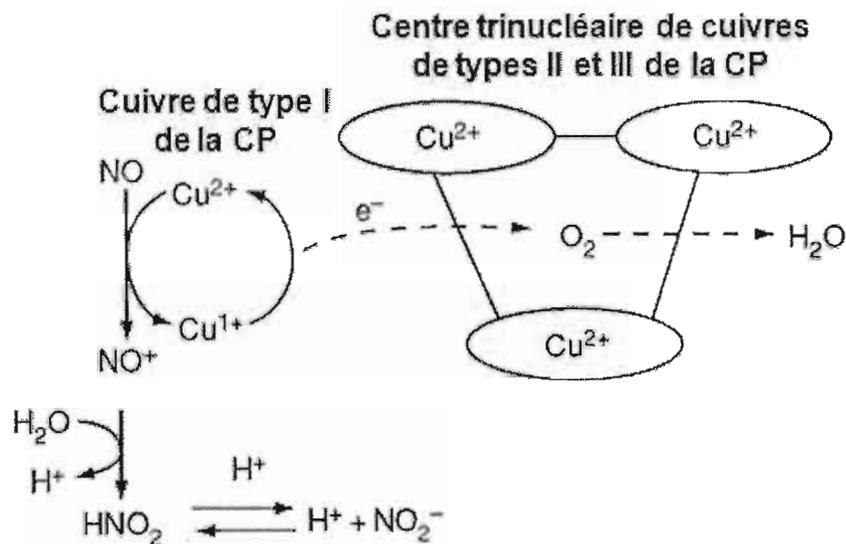


Figure 1.18 Schéma hypothétique de la formation de NO_2^- par la CP. Un Cu^{2+} de type I de la CP dépourvoit le NO d'un électron pour ensuite le transférer au O_2 qui, retenu par le centre trinuécléaire cuivrique de la CP, recrute des ions H^+ pour enfin libérer une molécule d'eau. Le NO^+ formé par cette activité NO-oxydase de la CP réagirait alors avec une molécule d'eau pour former du NO_2^- (d'après Shiva *et al.*, 2006).

1.8.6 GSH-péroxydase

Le GSH est un abondant antioxydant cellulaire, dont la conversion en disulfure (GSSG), assurée intracellulairement par la GSH-péroxydase, consomme le H_2O_2 . Des études ont montré que la CP comportait une telle activité, ce qui suggère qu'elle pourrait constituer l'équivalent de la GSH-péroxydase en milieu extracellulaire (figure 1.19) (Kim et Park, 1998 ; Kim *et al.*, 1998 ; Park *et al.*, 1999). La découverte de cette nouvelle activité ajoute un autre mécanisme pouvant expliquer les propriétés antioxydantes de la CP. Il semble que le site actif de l'activité GSH-péroxydase de la CP soit différent de son site d'oxydase et implique la Cys 699 (Cha et Kim, 1999). Il s'agirait de la première activité de la CP qui n'implique pas ses ions Cu^{2+} .



Figure 1.19 Activité GSH-peroxydase de la CP. La GSH-peroxydase convertit le H_2O_2 en eau par la transformation du GSH en GSSG, dans le cytosol. La CP assurerait cette fonction dans le milieu extracellulaire.

1.8.7 Cardioprotection par la CP

La hausse de la concentration de CP dans le plasma dans les maladies cardiaques a été remarquée il y a longtemps, notamment dans l'infarctus (Adelstein, Coombs et Vallee, 1956), l'artériosclérose (Bustamante *et al.*, 1976) et l'angine (Jayakumari *et al.*, 1992). Puisque ces pathologies comportent une phase inflammatoire, le dilemme s'est posé quant à la signification de la présence de CP. Néanmoins, bon nombre d'études ont attribué cette présence à une réponse protectrice pour l'organisme, plutôt qu'à un rôle pro-inflammatoire de la CP. En effet, il semble que la CP, par ses propriétés antioxydantes bien connues, réduise les dommages cardiaques causés par la génération d'EOR (Atanasiu *et al.*, 1998 ; Dumoulin *et al.*, 1996). Aussi, l'administration de CP à un cœur isolé soumis à l'ischémie-reperfusion prévient la fibrillation ischémique. Les auteurs suggèrent un effet comparable aux médicaments antiarythmiques de classe III, lesquels visent les canaux potassiques des cellules cardiaques (Atanasiu *et al.*, 1995 ; Atanasiu *et al.*, 1996). Cette hypothèse découle de l'observation d'un prolongement de la période réfractaire effective du tissu cardiaque en présence de CP.

Il y a de fortes chances que les propriétés antioxydantes de la CP soient impliquées dans son action cardioprotectrice, puisque l'état pathologique de l'infarctus du myocarde implique un grand stress oxydatif. De plus, l'hypothèse de régulation des influx potassiques est surprenante, mais tout à fait plausible, en sachant que la CP puisse posséder un effet sur le potentiel membranaire des cellules de neuroblastome (Wang *et al.*, 1995). Malgré tout, aucune étude à l'échelle cellulaire n'a encore été réalisée pour évaluer l'implication des différentes activités de la CP dans la cardioprotection.

1.9 Hypothèses et objectifs de recherche

La CP, le NO \cdot et le GSH possèdent tous des propriétés au potentiel cardioprotecteur en cas d'ischémie-reperfusion. L'ensemble des mécanismes responsables de cette cardioprotection par la CP reste encore mal défini, d'où la pertinence d'émettre et de vérifier deux hypothèses pour ces mécanismes.

Hypothèse 1 : Puisque les EOR sont abondantes lors de la reperfusion, les propriétés antioxydantes de la CP ont de fortes chances d'être responsables de la cardioprotection. Néanmoins, nul ne sait plus précisément lesquels des mécanismes antioxydants sont pertinents pour la cardioprotection. En effet, outre la simple capture des EOR et l'activité ferroxidase, **l'activité NO-oxydase/RSNO-synthase ou l'activité GSH-peroxydase de la CP** pourraient aussi intervenir dans la protection.

Tout d'abord, il est essentiel de confirmer ces activités de la CP par des dosages en milieu acellulaire. En effet, l'activité NO-oxydase peut être mesurée par un dosage des espèces NO $^+$ en présence du fluorogène 2,3-diaminonaphthalène (DAN), quand différentes molécules donneuses de NO \cdot sont exposées à la CP. Aussi, le potentiel S-nitrosant découlant de cette activité NO-oxydase peut être dosé en milieu acellulaire par la méthode colorimétrique de Griess, après que les donneurs de NO \cdot soient exposés à la CP et à un thiol, plus particulièrement le GSH. Finalement, l'activité GSH-peroxydase peut être analysée par le dosage colorimétrique du H $_2$ O $_2$ résiduel dans un milieu réactionnel contenant de la CP, du GSH et du H $_2$ O $_2$.

Il est connu que le NO \cdot régule la contractilité cardiaque autant par la voie de la GMPc que par S-nitrosation de canaux. Puisque la CP possède une activité NO-oxydase qui promeut la formation de RSNO, il est possible qu'une combinaison de CP et de NO \cdot protège le cœur infarci. Effectivement, il se peut que la CP provoque la S-nitrosation régulatrice de protéines et canaux ioniques pour ainsi favoriser la survie et la contractilité cardiaque. De plus, l'interposition d'un groupement NO sur les thiols des protéines cellulaires pourrait empêcher leur oxydation dramatique par le H $_2$ O $_2$. Par conséquent, la S-nitrosation des protéines cellulaires, induite par la CP, pourrait les protéger d'une oxydation irréversible (conversion

des Cys en acide sulfonique ou sulfonique ; formation de ponts disulfures). Aussi, il se pourrait que l'effet S-nitrosant de la CP envers les petits thiols, comme le GSH et la Cys, puisse promouvoir l'entrée cellulaire du NO \cdot et prolonger sa biodisponibilité. À propos, la combinaison de CP et de GSH pourrait induire une cardioprotection liée à l'activité GSH-peroxydase de la CP, puisque cette activité consommerait le H $_2$ O $_2$ dévastateur.

Pour vérifier la première hypothèse au niveau cellulaire, des dosages de la viabilité des cardiomyocytes de rats nouveau-nés exposés à différents traitements peuvent être effectués. Les molécules au potentiel protecteur, c'est-à-dire la CP, le GSH, la Cys et le NO \cdot , peuvent être ajoutées à un milieu de culture contenant du H $_2$ O $_2$, comme générateur de stress oxydatif. De cette manière, des comparaisons de la viabilité peuvent permettre de déterminer si les diverses combinaisons de molécules protègent les cardiomyocytes de l'effet létal apporté par le H $_2$ O $_2$.

Hypothèse 2 : Certains indices laissent présager qu'un **effet régulateur des flux ioniques membranaires par la CP** puisse être impliqué. Un moyen de vérifier cette deuxième hypothèse, au niveau cellulaire, est de suivre au fil du temps les battements des cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture, par l'intermédiaire des fluctuations calciques. En fait, il existe une sonde, le Fluo-3, qui entre dans les cellules et dont l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la concentration cytoplasmique de Ca $^{2+}$. Puisque les cardiomyocytes battent spontanément, il est alors possible de suivre leurs contractions par microscopie de fluorescence et d'ajouter la CP pour vérifier son effet sur les battements.

L'**objectif principal** de ce projet de maîtrise était donc de déterminer, au niveau cellulaire, des mécanismes de cardioprotection par la CP. Dans cette optique, les **objectifs plus spécifiques**, ont été les suivants :

- 1- Confirmer les activités NO-oxydase, RSNO-synthase et GSH-peroxydase de la CP en milieu acellulaire, respectivement par dosage fluorimétrique du NO $^+$, par dosage colorimétrique de Griess des RSNO et par dosage colorimétrique du H $_2$ O $_2$ résiduel. Cette confirmation est d'autant plus nécessaire que la CP utilisée pour les expériences

est d'origine bovine, alors que ces activités ont été mises en évidence avec de la CP humaine.

- 2- Analyser l'effet protecteur des différentes combinaisons de CP avec les molécules potentiellement impliquées (GSH, Cys, NO \cdot) sur la viabilité des cardiomyocytes de rats nouveau-nés soumis à un stress oxydatif par le H $_2$ O $_2$.
- 3- Déterminer l'ampleur de l'interaction du K $^+$ avec la CP par filtration sur gel et dosage de l'activité oxydase, pour ensuite évaluer l'effet de la CP sur les contractions des cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture, en suivant les influx calciques par microscopie de fluorescence dynamique.

Les objectifs 1 et 2 ont inspiré les études décrites au chapitre II sous la forme d'un manuscrit, accepté pour publication dans le journal *Free Radical Biology and Medicine*. Quant aux études faites dans le cadre de l'objectif 3, elles sont présentées et analysées dans le chapitre III. Le chapitre IV est une conclusion générale qui résume les points forts de l'ensemble du travail.

CHAPITRE II : THE GLUTATHIONE-ASSISTED SCAVENGING AND NITRIC OXIDE-
OXIDASE ACTIVITIES OF CERULOPLASMIN ON THE VIABILITY OF
CARDIOMYOCYTES EXPOSED TO HYDROGEN PEROXIDE
(Manuscrit accepté pour publication dans le journal *Free Radical Biology and Medicine*)

2.1 Contributions

La contribution des deux premières auteures du manuscrit, toutes deux étudiantes à la maîtrise, a été jugée d'une importance équivalente. Plus précisément, les figures 3 à 6 proviennent directement des résultats des expériences effectuées par Mylène Paradis. Cette dernière a aussi participé à la mise au point des techniques de dosage du NO^+ , du H_2O_2 et de la viabilité cellulaire, puis à la rédaction de l'article. Josianne Gagné a généré les résultats présentés à la figure 2, en plus de s'être impliquée dans l'initiation du projet et dans la mise au point de plusieurs techniques (culture de cardiomyocytes et techniques de dosage du NO^+ , des RSNO et des NO_2^-). Le manuscrit a été incorporé au mémoire de Mylène Paradis, car l'étude a été menée à terme alors que Josianne Gagné avait déjà publié son mémoire.

**The nitric oxide-oxidase and putative glutathione-peroxidase activities of ceruloplasmin on
the viability of cardiomyocytes exposed to hydrogen peroxide**

Mylène Paradis¹, Josianne Gagné¹, Mircea-Alexandru Mateescu, Joanne Paquin²

Département de chimie et de biochimie and Centre BioMed, Université du Québec à
Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montreal (Quebec) H3C 3P8, Canada

¹These authors equally contributed to the work.

²Corresponding author : Dr. Joanne Paquin
Département de chimie et de biochimie
Université du Québec à Montréal
C.P. 8888, Succ. Centre-ville
Montréal (Québec) H3C 3P8, CANADA
Phone : (514) 987-3000, ext. 4990
Fax : (514) 987-4054
E-mail : paquin.joanne@uqam.ca

Abstract

Ceruloplasmin (CP), a ferroxidase (EC 1.16.3.1) and a scavenger of reactive oxygen species, is an important extracellular antioxidant. Bovine CP indeed protects the isolated heart in ischemia-reperfusion conditions. Human CP has been shown to also exhibit, *in vitro*, glutathione (GSH)-peroxidase and nitric oxide (NO)-oxidase/S-nitrosating activities. The present work tested, with bovine CP, the hypothesis that both activities could provide cytoprotection in oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H_2O_2), the former activity by consuming H_2O_2 and the latter by shielding thiols from irreversible oxidation. In acellular assays, bovine CP stimulated the generation of the nitrosating NO^+ species from the NO-donors propylamine-propylamine-NONOate (PAPA/NO), S-nitroso-N-acetyl-penicillamine and S-nitroso-glutathione. This NO-oxidase activity S-nitrosated GSH as well as CP itself, and was not affected by H_2O_2 . In contrast to human CP, bovine CP consumed H_2O_2 in an additive rather than synergistic manner in the presence of GSH. A non-enzymatic scavenging of H_2O_2 could have masked the GSH-peroxidase activity. Cytoprotection was evaluated using neonatal rat cardiomyocytes. CP and PAPA/NO were not protective against the H_2O_2 -induced loss of viability. Differently, GSH provided a slight protection that increased more-than-additively in the presence of CP. This increase was cancelled by PAPA/NO. The CP's putative GSH-peroxidase activity can thus provide cytoprotection but is possibly affected by the S-nitrosation of a catalytically important cysteine residue.

Keywords

Copper proteins, oxidase/ferroxidase, antioxidant, oxidative stress, cardioprotection, neonatal cardiomyocyte culture, S-nitrosation/S-nitrosylation.

2.2 Introduction

The infarcted heart suffers not only from hypoxia associated to ischemia, but also and to a great extent from the damages caused by reactive oxygen species (ROS) induced by reperfusion (Penna *et al.*, 2009). One of those ROS is the hydrogen peroxide (H_2O_2), which provokes cellular injuries, including the oxidation of redox sensitive cysteinyl thiols in proteins (Adimora, Jones and Kemp, 2010 ; Dalle-Donne *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2005).

Nitric oxide (NO) has been reported to lack in ischemia-reperfusion, and administration of NO in this situation has been shown to be cardioprotective (Wang *et al.*, 2005 ; Bell, Maddock and Yellon, 2003 ; Jones and Bolli, 2006 ; Schulz, Kelm and Heusch, 2004 ; Cohn, Yang and Downey, 2006). The NO can act through the cGMP pathway stimulation, but also through cGMP-independent mechanisms. In particular, NO can S-nitrosate specific Cys residues of target proteins to modulate their activity. For example, the S-nitrosation of a catalytically important Cys in caspase-3 inhibits its proapoptotic function, whereas S-nitrosated L-type calcium channel is activated (Sun, Steenbergen and Murphy, 2006 ; Loscalzo and Vita, 2000). NO can also S-nitrosate small free thiols such as glutathione (GSH) and Cys. In oxidative conditions, S-nitrosation is a reversible modification viewed as being able to protect protein cysteinyl thiols against unwanted and possibly irreversible oxidation into sulfenic, sulfinic and sulfonic acids and intra/intermolecular disulfide bonds (Adimora, Jones and Kemp, 2010 ; Dalle-Donne *et al.*, 2007 ; Sun, Steenbergen and Murphy, 2006). The NO radical is a poor S-nitrosating agent. However, this ability is optimized upon its conversion into the S-nitrosating form NO^+ or its equivalents, such as N_2O_3 ($\delta^-OON-NO\delta^+$) (Loscalzo and Vita, 2000).

As an abundant cellular antioxidant, GSH, like its precursors, has protective action in oxidative stress conditions, including cardiac ischemia-reperfusion (Inserre *et al.*, 2000 ; Haramaki *et al.*, 1998 ; Lim *et al.*, 2009 ; Klatt and Lamas, 2000). In cells, GSH is oxidized to the GSSG disulfide by the action of GSH-peroxidase (EC 1.11.1.9) through a mechanism that consumes H_2O_2 (Lim *et al.*, 2009). In its S-nitrosated form, S-nitroso-glutathione

(GSNO), GSH could act as a transporter and a stable reservoir of NO (Romero and Bizzozero, 2006), as does Cys (Zhang and Hogg, 2005).

Ceruloplasmin (CP) is a multifunctional plasma copper protein that has been shown to provide protection to isolated rat hearts submitted to ischemia-reperfusion (Chahine *et al.*, 1991 ; Atanasiu *et al.*, 1995). The cardioprotection is probably due to the ability of CP to scavenge oxygen radicals (Goldstein *et al.*, 1982 ; Marklund, 1986 ; Atanasiu *et al.*, 1998), and to its ferroxidase activity (EC 1.16.3.1) which, by converting Fe^{2+} to Fe^{3+} , prevents the Fe^{2+} -mediated formation of deleterious hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) (Gutteridge, 1978). More recently, *in vitro* (acellular) experiments showed new activities for the human CP. The first one is a NO-oxidase activity coupled to a S-nitrosating activity that permits the S-nitrosation of small thiols (Inoue *et al.*, 1999). In the absence of thiols, this activity would rather generate nitrite (NO_2 -synthase activity) (Shiva *et al.*, 2006). The S-nitrosating and NO_2 -synthase mechanism was postulated to involve the formation of a NO^+ intermediate (Inoue *et al.*, 1999 ; Shiva *et al.*, 2006). CP would also possess a GSH-peroxidase activity that consumes H_2O_2 to form GSSG, and would therefore complement, extracellularly, the work of intracellular GSH-peroxidase (Kim and Park, 1998 ; Park *et al.*, 1999 ; Cha and Kim, 1999). The S-nitrosating and GSH-peroxidase activities of CP were hypothesized to provide cytoprotection *in vivo*, under oxidative stress conditions, plausibly by capping redox sensitive thiols and by scavenging H_2O_2 . Considering that this hypothesis has little been investigated, the objective of this study was to evaluate the capacity of CP to preserve the viability of cultured cardiomyocytes submitted to an oxidative stress induced by H_2O_2 . CP, NO donors and the biologically-relevant free thiols, GSH and Cys, were present alone or in combination during the stress. Bovine CP was used for this investigation. Prior to the cell studies, the CP ability to generate NO^+ equivalents and S-nitrosated species (RSNO) and to scavenge H_2O_2 in the presence of GSH, was also analyzed *in vitro*.

2.3 Materials and methods

Materials

Bovine serum albumin (BSA), glutathione (GSH), S-nitroso-GSH (GSNO), S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP), sulfamic acid, sulfanilamide, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride (NEDD) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), and 2,3-diaminonaphthalene (DAN) from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Stock 500 mM DAN solutions were prepared in dimethylsulfoxide. Cayman Chemical (Ann Harbor, MI, USA) was the source of 3-(2-hydroxy-2-nitroso-1-propylhydrazino)-1-propanamine, also named propylamine-propylamine-NONOate (PAPA/NO). Solutions of GSNO and PAPA/NO were prepared in the test buffer immediately before use and kept on ice. Cys solutions were freshly obtained by dissolution of L-cysteine-hydrochloride (Sigma-Aldrich) in the test buffer, followed by neutralization with sodium hydroxide. CysNO was prepared immediately before use by reacting 100 mM L-cysteine-hydrochloride with equimolar sodium nitrite in water; the resulting solution was neutralized with sodium hydroxide and cooled on ice. The nitrosation of Cys was measured by absorbance at 334 nm using $900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ as the extinction coefficient (Cook *et al.*, 1996). Fetal bovine serum (FBS) was from PAA Laboratories (Rexdale, ON, Canada) while the other cell culture products (media, antibiotics, vitamins, amino acids, human transferrin, bovine insulin, sodium selenite and cytosine- β -D-arabinofuranoside) were from Sigma-Aldrich, Invitrogen or Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada). All other chemicals were of reagent grade.

Purification of CP

CP was purified from bovine plasma by fractionated precipitation with ammonium sulfate followed by chromatography on aminoethyl-agarose (Wang *et al.*, 1994 ; Mateescu *et al.*, 1999). This protocol results in pure CP preparations as verified by $A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ values greater than 0.04 and by electrophoretic homogeneity under native and denaturing conditions

(Wang *et al.*, 1994 ; Mateescu *et al.*, 1999). CP was stored in 30 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 (about 20 mg protein/mL) at -20°C.

Generation and assay of RSNO and nitrites

The capacity of CP to generate RSNO was tested by reacting different concentrations of CP and GSH with 50 μ M PAPA/NO, for 30 min, at 37°C, in phosphate buffer saline (PBS: 136.75 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 8.10 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4). In some experiments, H_2O_2 was also present (25 μ M final concentration). RSNO were then assayed in an optimized adaptation of Saville and Griess protocols (Tarpey, Wink and Grisham, 2004 ; Miranda, Espey and Wink, 2001 ; Saville, 1958). Aliquots (100 μ L) of the reaction media were placed in wells of 96 well-microplates, and incubated for 10 min, at 25°C, with 10 μ L of 330 mM sulfamic acid (in water). Subsequently, 20 μ L of 2.4 mM NEDD (in water), 20 μ L of 150 mM sulfanilamide (in 1.7 M HCl) and 50 μ L of 400 μ M HgCl_2 (in water) were added, and the incubation was continued for 30 min, at 37°C. Sulfamic acid eliminates nitrite ions NO_2^- (which otherwise react with the Griess reagents sulfanilamide and NEDD), and the mercury salt denitrosates RSNO. The released nitroso groups (NO^+ equivalents) form an azo compound upon reaction with the Griess reagents in acidic conditions (Tarpey, Wink and Grisham, 2004). The azo compound was analysed spectrophotometrically at 560 nm with a ThermoMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). In some experiments, nitrite ions were also measured. This was done using the RSNO assay, except that sulfamic acid and HgCl_2 were replaced by equal volumes of water. Conditions for the nitrite and RSNO assays have been optimized stepwisely, using various concentrations of NaNO_2 and of freshly prepared S-nitroso-BSA (Meyer *et al.*, 1994).

Generation and assay of NO^+ equivalents

The DAN probe reacts with NO^+ in neutral conditions to form the fluorescent 2,3-naphthyltriazole (NAT) (Tarpey, Wink and Grisham, 2004), thus allowing the continuous monitoring of NO^+ generation. The generation and assay of NO^+ (done in a final volume of 200 μ L per well of 96-well microplates) were carried out in HEPES buffer saline (HBS: 15

mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) supplemented with 11 mM glucose (HBS/G) and containing 250 μM DAN. The samples contained either one or more of these substances: CP (200 or 600 μg/mL), GSH (50 or 200 μM), Cys (50 or 200 μM). These substances were replaced by equal volumes of HBS/G in the control. Reactions were initiated by the addition of NO donor (50 μM PAPA/NO, or 200 μM of either GSNO, CysNO or SNAP), and followed by fluorescence (λ_{ex} 355 nm, λ_{em} 460 nm) for up to 3 h, at 37°C, using an Infinite M200 microplate reader (Tecan, Durham, NC, USA). In some experiments, H₂O₂ was added with the NO donor to a final concentration of 25 μM. Nitrites gave no fluorescence signal in the neutral pH conditions of the assay.

Assay of GSH-peroxidase assay of CP

GSH (500 μM) and H₂O₂ (500 μM) were incubated at 37°C, for up to 1 h 45 min, in HBS/G containing different concentrations of CP. The reaction volume was 120 μL. The enzymatic reaction was stopped with 40 μL of 62.5% trichloroacetic acid to precipitate CP, and the resulting solution was centrifuged. Residual peroxide was measured spectrophotometrically at 480 nm after reacting 100 μL of the supernatant with 20 μL of 20 mM ferrous ammonium sulfate and 20 μL of 2.5 M potassium thiocyanate (Kim and Park, 1998 ; Hildebrandt *et al.*, 1978). Readings at time zero were used as blanks. Some experiments were also done using GSH and H₂O₂ at 200 μM each. Calibration curves were built with known concentrations of H₂O₂ in HBS/G.

Cardiomyocyte culture and treatment

Cardiomyocytes were isolated from 2 day-old neonatal Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, QC, Canada), using the Worthington Neonatal Cardiomyocyte Isolation System kit (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) following manufacturer's instructions. Housing, handling and euthanasia of the animals were in strict accordance with the rules of the Canadian Council for Animal Care, and were approved by the Institutional Animal Protection Committee. About twelve hearts were collected per cardiomyocyte preparation. The cardiac ventricles were dissected out, cut into pieces, and incubated with

trypsin (final concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$) in pH 7.4, magnesium- and calcium-free Hank's balanced salt solution (provided in the kit), for 18 h at 4°C. Trypsinolysis was stopped by adding soybean trypsin inhibitor, and incubation continued for 45 min, at 37°C, in the presence of collagenase (final concentration of 93.75 U/mL) in Leibovitz L-15 medium (provided in the kit). The resulting hydrolyzate was filtered to remove cell clumps, and depleted in fibroblasts by two 35 min-preplatings, at 37°C, in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) containing 10% FBS. The non-adhered cardiomyocyte suspension was centrifuged, resuspended in DMEM + 10% FBS, seeded in 12-well plates at an approximate density of 1.3×10^5 cells/cm², and incubated for 24 h, at 37°C, in an atmosphere of 5% CO₂. The spent medium was replaced by serum-free DMEM/F12 medium supplemented with 1% BSA, 1X vitamins (Sigma-Aldrich), 1X non-essential amino acids (Sigma-Aldrich), 0.5X essential amino acids (Sigma-Aldrich), 6.25 $\mu\text{g/mL}$ insulin, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ transferrin, 6.25 ng/mL sodium selenite, 80 $\mu\text{g/mL}$ CaCl₂, 50 U/mL penicillin, 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin and 20 μM cytosine- β -D-arabinofuranoside. Culture was resumed for 3 days in this new medium. Cells were carefully rinsed and subjected to different treatments. They were incubated for 1 h 45 min, at 37°C, in an atmosphere of 5% CO₂, in HBS/G containing no agent or one or more of the treating agents (H₂O₂, CP, GSH, Cys, NO donors) at the concentrations indicated in the figure legends. H₂O₂ and NO donors were added last. The final volume was 500 μL . At the end of treatments, cells were assayed for residual viability.

MTT assay of cell viability

Cardiomyocyte viability was assessed by their metabolic activity using MTT (Mosmann, 1983). After treatments, cell cultures were rinsed with HBS/G and incubated during 3 h, at 37°C and 5% CO₂, in HBS/G containing 5 mg/mL MTT. This solution was removed, and the formazan product extracted in 200 μL DMSO and determined by absorbance at 560 nm. Results were expressed as percentages of untreated cultures.

Protein assay

Protein contents were determined by a Bradford microprocedure using BSA as the standard (Bradford, 1976)

Statistics

Cardiomyocyte viability results were analyzed for statistical significance with Student's *t*-test using the JMP IN 4.0.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and the significance value was set at $p \leq 0.05$.

2.4 Results

Acellular analysis of NO-oxidase/S-nitrosating activity of CP

The NO-oxidase activity of human CP is capable of generating RSNO from small RSH (S-nitrosating activity) (Inoue *et al.*, 1999) or nitrite from H₂O (nitrite-synthase activity) (Shiva *et al.*, 2006) (figure 2.1). This oxidase activity of CP has been demonstrated *in vitro* with NO donors of the NONOate type, such as propylamine-NONOate (PA/NO) and diethylamine-NONOate (DEA/NO) (Inoue *et al.*, 1999 ; Shiva *et al.*, 2006), which release two molecules of NO per molecule of donor. In the present study, we used PAPA/NO as current NONOate in cell culture experiments since it rapidly starts releasing NO (within minutes) as do PA/NO and DEA/NO but maintains sustained NO levels for a longer time than the two other donors (Hrabie *et al.*, 1993). PAPA/NO was thus correspondingly used to analyse the NO-oxidase/S-nitrosating activity of bovine CP *in vitro*. The production of RSNO from GSH in the presence of CP was analysed by the Griess assay. Three concentrations of GSH (10, 20 and 50 μ M) were submitted to equimolar PAPA/NO and increasing concentrations of CP, in PBS (figure 2.2A). In absence of CP, there was basal RSNO formation due to spontaneous S-nitrosation of GSH in contact with PAPA/NO. The RSNO formation increased with CP concentration, in accordance with the S-nitrosating potential of CP reported by Inoue *et al.* (1999) under almost identical conditions. However, CP also formed RSNO in the absence of GSH, indicating a self-S-nitrosation (figure 2.2B). It can be estimated that 1.4 ± 0.1 (means \pm SEM) Cys residues per CP molecule were modified by self-

nitrosation, assuming the molecular weight of 125 kDa determined for bovine CP by mass spectrometry (Boivin *et al.*, 2001). Subtracting self-S-nitrosation from total S-nitrosation in tests combining CP and GSH generated a delta curve corresponding to GSNO formation (figure 2.2B). The GSNO level was increased by CP and began to plateau at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of bovine CP, similarly to results obtained with the human CP (Inoue *et al.*, 1999). Substrates of the S-nitrosating activity of CP were thus Cys residues in CP itself and in GSH molecules. Because 25 μM H_2O_2 was used to stress cells in cytoprotection experiments, we analysed effect of this oxidant on the S-nitrosating properties of CP and found no inhibitory effect (figure 2.2C). The NO-oxidase activity of human CP was reported to generate nitrite (Shiva *et al.*, 2006). In contrast, in an incubation that lasted 1 h 45 min to allow the complete degradation of PAPA/NO (half-life of 15 min; (Hrabie *et al.*, 1993)), bovine CP diminished the spontaneous nitrite generation while undergoing self-S-nitrosation (figure 2.2D). It is not known to which extent the CP source or the experimental procedures can explain the different behaviour of human and bovine CP.

Having established the NO-oxidase/S-nitrosating activity of bovine CP, the next step was to investigate the hypothesis of Inoue *et al.* (1999) suggesting that the mechanism of this activity involves NO^+ formation. The NO^+ species, captured by the DAN acceptor (figure 2.1), was continuously monitored by fluorescence. These experiments were done in HBS/G, first because this buffer was used with cells, secondly because it allows to compare different NO donors including CysNO, stable in HBS/G but completely unstable in PBS (as revealed by spectrophotometric measurements, not shown). Figure 2.3A shows that a basal level of NO^+ species was generated from PAPA/NO in the absence of CP. Here, it is important to note that sodium nitrite did not generate any NO^+ nor interfere with the dosage (not shown), so the NO^+ detected was not due to nitrite formation. Interestingly, 200 and 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP increased the NO^+ production from PAPA/NO, in a concentration-dependent manner. Some saturation of the effect began to appear above 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CP doubled the amount of NO^+ compared to the spontaneous decomposition of the NO donor. Considering that each mole of PAPA/NO can release two moles of NO, this observation indicates a slower spontaneous release of one of the NO groups. The NO-oxidase activity of CP was also tested

with sulfhydryl NO donors. CP increased the NO^+ production from SNAP, which exhibited a spontaneous decomposition profile comparable to that of PAPA/NO (albeit slightly faster) (figure 2.3B). In contrast to SNAP, GSNO, a physiologically relevant NO donor, did not generate much NO^+ by itself (figure 2.3C), in agreement with its known resistance to decomposition (Krezel and Bal, 2004). CP clearly stimulated GSNO decomposition. Surprisingly, CP apparently exerted no NO-oxidase activity with the CysNO donor, it even decreased the NO^+ detected from the spontaneous release by CysNO (figure 2.3D). CP had probably not enough time to manifest its NO-oxidase activity on CysNO due to instantaneous decomposition of this NO donor in the presence of DAN. The decreasing effect of CP on NO^+ level here was likely due to the self-nitrosation revealed by the results of figure 2.2. This self-nitrosation also occurred with other NO donors. Indeed, CP decreased fluorescence during the first minutes of SNAP and GSNO decomposition (Figs 3B and 3C). This initial decreasing effect was also observed with PAPA/NO but to a smaller extent. Although fluorescence tracings started at lower values in the presence of CP due to self-nitrosation, CP increased the initial rate of NO^+ production from each of these three NO donors (figure 2.3G). Nitrosation of small thiols shown by the Griess assay can also be appraised by the DAN assay. Figure 2.3E shows decreased nitrosation of DAN when GSH was present during PAPA/NO decomposition and this, independently of CP. GSH thus competed with DAN for the capture of NO. Paradoxically, in absence of CP, Cys rather enhanced the NO^+ level. The inherent instability of the formed RSNO (the unstable CysNO compared to the stable GSNO) would explain the different behaviour. The nitrosating activity of CP on DAN (that is, the increment above control values) was diminished in the presence of either nitrosable GSH or Cys substrates. Finally, in accordance with the Griess assay, H_2O_2 did not inhibit the NO-oxidase activity of CP, neither in PBS nor in HBS/G (figure 2.3F).

Prior to cell culture assessments, we selected a culture medium optimizing the NO-oxidase activity of CP on cells. Figure 2.4 compares the generation of NO^+ by CP in different media. There were more CP-generated NO^+ available to nitrosate DAN in simple saline buffers, like PBS and HBS/G, than in more complex culture media, containing BSA or several additives such as amino acids. The same conclusion was reached by measuring

RSNO by the Griess assay (not shown). BSA and other culture additives can compete with DAN (or with cells) in the capture of NO^+ (Rafikova, Rafikov and Nudler, 2002 ; Stamler *et al.*, 1992). Consequently, DMF12, DMF12 + BSA and PBS + BSA were not chosen. HBS/G was preferred over PBS because it contains glucose, which protects cells from starvation, and also calcium and magnesium ions, important for cell physiology. HBS/G also simplified the manipulations since stock solutions of CysNO were stable in this buffer but not in PBS.

Acellular analysis of GSH-peroxidase activity of CP

Kim *et al.* (1998) reported a GSH-peroxidase activity of the human CP *in vitro*. This activity has been evidenced by measuring the residual H_2O_2 during the incubation of $500 \mu\text{M}$ H_2O_2 with $1000 \mu\text{g/mL}$ CP in the presence of $500 \mu\text{M}$ GSH. Using Kim *et al.*'s conditions (1998), we evaluated whether bovine CP behaves similarly to the human protein (figure 2.5A). The H_2O_2 level was stable in the absence of CP and GSH. After 40 min, bovine CP had a 18% depleting effect, higher than that of the human CP (about 8% (Kim *et al.*, 1998)). GSH had also a depleting effect (about 15%, similar to the value reported by Kim *et al.* (1998)). The combination of bovine CP and GSH causes a depletion equivalent to their totalized effect. This is different from human CP in Kim *et al.*'s study (1998) whereby the response of combined CP and GSH was more than additive (about 42% depletion of H_2O_2). The additive effect of bovine CP with GSH was observed at different concentrations of the protein and for the incubation time used with cells (1 h 45 min) (figure 2.5B), at lower H_2O_2 and GSH concentrations ($200 \mu\text{M}$ each, not shown), and using either ferrous ammonium sulfate (Hildebrandt *et al.*, 1978) or ferrous sulfate (Kim *et al.*, 1998) to detect H_2O_2 . The additive H_2O_2 -depletion induced by bovine CP and GSH points to a passive non-enzymatic scavenging effect of the bovine protein towards H_2O_2 rather than to a catalytic GSH-peroxidase activity. However, it appears that the catalytic action could have been masked by the passive scavenging effect, in view of the cell viability results described below.

CP, NO and GSH on the viability of cardiomyocytes exposed to H₂O₂

The protective effect of NO-oxidase and putative GSH-peroxidase activities of CP was then investigated, for the first time, on living cells stressed with H₂O₂. Cardiomyocytes were used in these experiments. A H₂O₂ concentration-response curve was drawn with these cells to determine the half-lethal H₂O₂ concentration and to set it as the working concentration in order to identify protecting and damaging conditions. Figure 2.6A shows that approximately 25 μ M H₂O₂ diminished cell viability by 50%. In figure 2.6B, different treatments with NO donors and CP were tested for their capacity to protect cardiomyocytes from 25 μ M H₂O₂. Physiologically relevant CP concentrations (200 and 600 μ g/mL (Healy and Tipton, 2007 ; Fox *et al.*, 2000 ; Banford *et al.*, 1982)) did not provide protection. PAPA/NO showed a protective tendency, which was not improved by increasing PAPA/NO concentration from 50 to 200 μ M (not shown), nor by adding CP to PAPA/NO (figure 2.6B). In contrast, pyruvate, a known H₂O₂ scavenger (Paquin *et al.* 2005), had a strong protective effect. Therefore, the results presented here did not permit to evidence cytoprotective effect of the NO-oxidase activity of CP. This was not due to any degradation of the protein. Indeed, analysis of CP present in culture media at the end of cell treatments revealed the complete recovery of the protein's electrophoretic profile and oxidase activity on *p*-phenylenediamine substrate (not shown). Like PAPA/NO, the slow NO donor GSNO did not prevent the loss of viability due to H₂O₂, and CysNO, a very short-lived NO donor, even worsened the effect of H₂O₂ (figure 2.6B). On the other hand, figure 2.6C shows the consequence of other treatments combining small thiols (GSH or Cys), CP and PAPA/NO. GSH provided a significant protection, as expected considering its capacity to deplete H₂O₂. Interestingly, there was a significant increase of this protection by CP, even though CP was not protective by itself. This more-than-additive cytoprotection would be in line with a GSH-peroxidase activity of bovine CP. Another interesting finding was that PAPA/NO eradicated the enhancement by CP of the protective effect of GSH. The presence of Cys, itself or in the form of CysNO, was always detrimental to the viability of cardiomyocytes, exposed (Figs 6B, C) or not (not shown) to H₂O₂. It is surprising that Cys toxicity has been observed at concentrations around those

found in commonly used culture media. Possibly, the multiple other components of media temper the effect.

2.5 Discussion

The NO-oxidase/S-nitrosating activity reported for human CP (Inoue *et al.*, 1999 ; Shiva *et al.*, 2006) is now confirmed for bovine CP. In addition, this activity was found to generate NO⁺ equivalents as evidenced with the fluorogenic DAN probe. For the first time, the self-S-nitrosation of CP in the presence of a NO donor was revealed, by both the Griess and the DAN assays. Bovine CP consumed H₂O₂, and was helped by GSH in this process. However, in the case of bovine CP, this property involved some passive, non-enzymatic, scavenging effect, that could have masked the putative catalytic GSH-peroxidase activity previously reported for human CP (Kim *et al.*, 1998). Having established the NO-oxidase/S-nitrosating activity and the H₂O₂ consuming action of bovine CP, we then investigated the CP capacity to protect, through these two mechanisms, cardiomyocyte cultures exposed to H₂O₂. Under the conditions used in this study, CP alone or in the presence of NO donor did not protect cardiomyocytes against the loss of viability induced by H₂O₂. However, CP increased more than additively the protection provided by GSH, pointing to the implication of the putative GSH-peroxidase activity of the protein in this protection. This CP protection was impeded in the presence of a NO donor, raising a possible *in vivo* modulation of the GSH-peroxidase activity by NO level, through S-nitrosation.

The cellular fate of exogenous H₂O₂, NO and GSH, and how it can be affected by CP, can be quite complex. Figure 2.7 diagrammatizes some possible relationships between these molecules. When added to the extracellular milieu, H₂O₂ freely enters the cell (Dalle-Donne *et al.*, 2007 ; Sun, Steenbergen and Murphy, 2006). Redox sensitive Cys residues of cellular proteins (-SH, figure 2.7A) become S-oxidized (-SOx, figure 2.7B), providing an important non-enzymatic cellular means to eliminate H₂O₂ (Adimora, Jones and Kemp, 2010). Excessive oxidation can however severely damage proteins by the formation of irreversible S-S bonds and the conversion of SH groups into sulfinic and sulfonic acids (Adimora, Jones and Kemp, 2010 ; Dalle-Donne *et al.*, 2007 ; Sun, Steenbergen and Murphy, 2006). These

attacks on sulfhydryls have been detected in cytosolic, membranous and cytoskeletal compartments of cardiomyocytes submitted to H₂O₂ and other oxidative conditions (Brennan *et al.*, 2004 ; Janero, Hreniuk and Sharif, 1991). The removal of H₂O₂ before it can attack vulnerable Cys residues or the shielding of these residues by reversible S-nitrosation can be considered as protective strategies. According to figure 2.5, bovine CP has H₂O₂ scavenging properties *in vitro*, being able to remove 0.002 nmol H₂O₂/min/μg protein when the initial concentration of the oxidant is 500 μM. If a similar removal rate was achieved in the cell culture conditions used in this work, 600 μg/mL CP would have consumed all of the extracellular H₂O₂ (25 μM) in 19 min. However, this concentration of CP did not afford protection to cells. Three facts can plausibly explain this result. Firstly, whereas H₂O₂ diffuses into cells, CP does not penetrate cells and would thus not provide intracellular protection (figure 2.7E). In contrast, pyruvate, which is taken up by cells, had a protective action (figure 2.7C). Secondly, even if CP was able to deplete extracellular H₂O₂, the easy entry of this oxidant in cells could be too fast for this phenomenon to occur to a large extent. Thirdly, if a sacrificial non-enzymatic scavenging action by CP exists *in vitro*, it could be eclipsed by a similar sacrificial capture of H₂O₂ possibly performed by other cellular targets *ex vivo*.

GSH alone was reported to provide some cell protection possibly by consuming H₂O₂, generating extracellular GSSG and protein S-glutathionylated adducts (-SSG, figure 2.7G) (Dalle-Donne *et al.*, 2007 ; Klatt and Lamas, 2000), and thus decreasing the amount of oxidant that can attack sulfhydryls. Interestingly, while CP provided no cell protection by itself, it increased the protective effect of GSH (figure 2.6). The more-than-additive protection could suggest the existence of a GSH-peroxidase activity of bovine CP that accelerates the formation of GSSG, perhaps through the transient formation of S-glutathionylated CP (CP-SSG, figure 2.7H). The reason why the GSH-peroxidase activity was less evident with bovine CP (this study) than with human CP (Kim *et al.*, 1998) in acellular assays is not known. Bovine CP could possess more sites that can be attacked by H₂O₂ and serve in non-enzymatic (sacrificial) scavenging mechanisms, surpassing the contribution of the GSH-peroxidase activity in H₂O₂ consumption. Variations in amino acid

composition or accessibility can influence the scavenging properties. The impact of such parameters on H_2O_2 consumption has been evidenced with human CP, comparing the whole native protein (132 kDa) and its 116 kDa-proteolytic fragment (Kim and Park, 1998). Indeed, the fragment, which had the equivalent of one more accessible Cys residue compared to the native protein, was two times more potent in removing H_2O_2 in the absence of GSH. In line with these findings, it is worth mentioning that there are 17 Cys in bovine CP and 15 in human CP (Pruitt, Tatusova and Maglott, 2007 ; Wyatt and Wilson, 2010).

NO is a poor nitrosating agent and hardly reaches, by itself, the intracellular proteins to S-nitrosate them (Zhang and Hogg, 2005). However, some basal S-nitrosation could occur extracellularly and perhaps propagated intracellularly through transnitrosation reactions between sulfhydryls (figure 2.7D), explaining the tendency of cell protection by PAPA/NO (figure 2.6B). Combining CP with NO did not increase protection, perhaps due to a slower rate of CP's NO-oxidase activity compared to the rates of H_2O_2 entry into the cells and of H_2O_2 -mediated oxidation reactions (figure 2.7F). As shown in Figs 2 and 3, this absence of a clear cytoprotection by the CP's NO-oxidase activity cannot be attributed to an inactivation of this activity by H_2O_2 . In agreement with this resistance to H_2O_2 , the NO-oxidase activity of CP and its general oxidase/ferroxidase activity were proposed to share the same catalytic site, which was shown to withstand harsh conditions of H_2O_2 exposure (millimolar H_2O_2 over several hours (Aouffen *et al.*, 2004). Possibly, protection by CP + NO could be observed in other conditions which remain to be determined (*e.g.* changing the source of NO, the moment of NO and CP application, the stress duration or strength). We attempted to detect increased RSNO levels in cardiomyocyte cultures treated with CP + NO using an anti-Cys-SNO antibody (Gow *et al.*, 2004), but there was no change when compared to untreated cultures (not shown). Possibly, changes in RSNO levels could have been below the detection threshold. The biotin-switch assay, a frequently used method for measuring RSNO, would also have an insufficient sensitivity. Indeed, high levels of sulfhydryl NO-donors are required (0.5 mM and higher) to see changes in the S-nitrosation of proteins in live cells (Haqqani, Do and Birnboim, 2003).

Finally, the combination of CP, NO and GSH was tested on oxidatively stressed cardiomyocytes (figure 2.7I). One reason to do this test was that a protective effect of the S-nitrosating activity of CP could necessitate a small sulfhydryl intermediate capable of transporting NO into the cells, such as GSH or Cys transformed into GSNO or CysNO (Romero and Bizzozero, 2006 ; Zhang and Hogg, 2005). CP has the potential, through its NO-oxidase/S-nitrosating activities, to regulate NO flow by stimulating NO exchange between thiols. Indeed, CP can have nitrosating as well as denitrosating activities on the same small thiol, as exemplified with GSH and GSNO ((Inoue *et al.*, 1999); Figs 2 and 3 in this work). These opposite activities do not necessarily neutralize each other *in vivo*. For example, GSNO newly formed by the action of CP could enter cells, where it would liberate NO, escaping extracellular denitrosation. The CP+GSH+NO combination afforded cell protection, although smaller than that observed with CP+GSH (figure 2.6C). This was not due to a direct action of any formed GSNO since this NO donor was not protective (figure 2.6B). A possible competition between the NO-oxidase and the putative GSH-peroxidase activities of CP can provide an explanation. The formation of S-nitrosated CP (CP-SNO) and GSNO through the NO-oxidase/S-nitrosating activity of CP on itself and on GSH could decrease the amount of GSH and CP able to consume H₂O₂ through the GSH-peroxidase activity of CP, leaving more H₂O₂ to attack cells (figure 2.7I).

Interaction between CP and NO has been studied before (Wever, van Leeuwen and van Gelder, 1973 ; Cappelli-Bigazzi *et al.*, 1997 ; Musci, Bonaccorsi di Patti and Calabrese, 1997), but none revealed the CP self-S-nitrosation. Calabrese's group tried but failed to induce S-nitrosation of the free Cys residue in sheep CP by directly providing gaseous NO (Cappelli-Bigazzi *et al.*, 1997), perhaps due to animal species difference in accessibility of this Cys or the inefficient S-nitrosating action of the gas. However, this group (Musci, Bonaccorsi di Patti and Calabrese, 1997) and Wever, van Leeuwen and van Gelder (1973) showed some complexation of NO with copper sites in the protein. Interestingly, Cha and Kim (1999) demonstrated, for the GSH-peroxidase activity of human CP, a catalytic site distinct from the general oxidase/ferroxidase site and containing a critical Cys. The essential Cys, number 699, exists in bovine CP (number 694) and is surrounded by almost the same

amino acid residues in both species (*e.g.* 85% identity over nineteen residues on either side) (Pruitt, Tatusova and Maglott, 2007 ; Wyatt and Wilson, 2010). Considering that the cellular protection provided by CP and GSH was reduced in the presence of PAPA/NO (figure 2.6) and that at least one Cys residue in CP was S-nitrosated in the presence of this NO donor (figure 2.2), it is tempting to assume that the Cys responsible for the putative GSH-peroxidase activity may be S-nitrosated and inactivated by this modification. The attempt to demonstrate, acellularly, an inhibitory action of NO on this activity, using the NO donor PAPA/NO and the colorimetric GSH-peroxidase assay, was unfruitful because NO interfered in this assay. However, our postulate is in line with the work of Asahi *et al.* (1997) demonstrating that the S-nitrosation of the "classical" cellular GSH-peroxidase (EC 1.11.1.9) abolished its peroxidase activity.

In conclusion, CP can provide cellular protection against H₂O₂ when combined with GSH, likely through its putative GSH-peroxidase activity. *In vivo*, this activity could be regulated by the NO level, through S-nitrosation.

2.6 Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Studentships afforded by the NSERC Undergraduate Research Awards to J.G. and by the UQAM-FARE programs to J.G. and M.P. are gratefully acknowledged.

2.7 Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; BSA-SNO, S-nitroso-albumin; CP, ceruloplasmin; Cys, L-cysteine; CysNO, S-nitroso-L-cysteine; DAN, 2,3-diaminonaphthalene; DEA/NO, diethylamine-NONOate; DMEM, Dubelcco's modified Eagle's minimal essential medium; FBS, fetal bovine serum; GSH, glutathione; GSNO, S-nitroso-glutathione; GSSG, glutathione disulfide; HBS, HEPES buffer saline; HBS/G, HBS supplemented with glucose; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NAT, 2,3-naphthyltriazole; NEDD, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride; NO, nitric oxide; NO⁺, nitrosonium

ion; NONOate, diazeniumdiolate; PAPA/NO, propylamine-propylamine-NONOate or 3-(2-hydroxy-2-nitroso-1-propylhydrazino)-1-propanamine; PA/NO, propylamine-NONOate; PBS, phosphate buffer saline; ROS, reactive oxygen species; RSH, thiol species; RSNO, S-nitrosated species; SNAP, S-nitroso-N-acetyl-penicillamine.

2.8 References

- Adimora, N. J., D. P. Jones and M. L. Kemp. 2010. «A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses». *Antioxid Redox Signal.* vol. 13, no 6, p. 731-743.
- Aouffen, M., J. Paquin, A. Furtos, K. C. Waldron and M. A. Mateescu. 2004. «Oxidative aggregation of ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide is prevented by pyruvate». *Free Radic Res.* vol. 38, no 1, p. 19-26.
- Asahi, M., J. Fujii, T. Takao, T. Kuzuya, M. Hori, Y. Shimonishi and N. Taniguchi. 1997. «The oxidation of selenocysteine is involved in the inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide donor». *J Biol Chem.* vol. 272, no 31, p. 19152-19157.
- Atanasiu, R., M. J. Dumoulin, R. Chahine, M. A. Mateescu and R. Nadeau. 1995. «Antiarrhythmic effects of ceruloplasmin during reperfusion in the ischemic isolated rat heart». *Can J Physiol Pharmacol.* vol. 73, no 9, p. 1253-1261.
- Atanasiu, R. L., D. Stea, M. A. Mateescu, C. Vergely, F. Dalloz, F. Briot, V. Maupoil, R. Nadeau and L. Rochette. 1998. «Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties». *Mol Cell Biochem.* vol. 189, no 1-2, p. 127-135.
- Banford, J. C., D. H. Brown, R. A. Hazelton, C. J. McNeil, R. D. Sturrock and W. E. Smith. 1982. «Serum copper and erythrocyte superoxide dismutase in rheumatoid arthritis». *Ann Rheum Dis.* vol. 41, no 5, p. 458-462.

- Bell, R. M., H. L. Maddock and D. M. Yellon. 2003. «The cardioprotective and mitochondrial depolarising properties of exogenous nitric oxide in mouse heart». *Cardiovasc Res.* vol. 57, no 2, p. 405-415.
- Boivin, S., M. Aouffen, A. Fournier and M. A. Mateescu. 2001. «Molecular characterization of human and bovine ceruloplasmin using MALDI-TOF mass spectrometry». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 288, no 4, p. 1006-1010.
- 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.* vol. 72, p. 248-254.
- Brennan, J. P., R. Wait, S. Begum, J. R. Bell, M. J. Dunn and P. Eaton. 2004. «Detection and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis». *J Biol Chem.* vol. 279, no 40, p. 41352-41360.
- Cappelli-Bigazzi, M., G. Ambrosio, G. Musci, C. Battaglia, M. C. Bonaccorsi di Patti, P. Golino, M. Ragni, M. Chiariello and L. Calabrese. 1997. «Ceruloplasmin impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta». *Am J Physiol.* vol. 273, no 6 Pt 2, p. H2843-2849.
- Cha, M. K., and I. H. Kim. 1999. «Ceruloplasmin has a distinct active site for the catalyzing glutathione-dependent reduction of alkyl hydroperoxide». *Biochemistry.* vol. 38, no 37, p. 12104-12110.
- Chahine, R., M. A. Mateescu, S. Roger, N. Yamaguchi, J. de Champlain and R. Nadeau. 1991. «Protective effects of ceruloplasmin against electrolysis-induced oxygen free radicals in rat heart». *Can J Physiol Pharmacol.* vol. 69, no 10, p. 1459-1464.
- Cohen, M. V., X. M. Yang and J. M. Downey. 2006. «Nitric oxide is a preconditioning mimetic and cardioprotectant and is the basis of many available infarct-sparing strategies». *Cardiovasc Res.* vol. 70, no 2, p. 231-239.

- Cook, J. A., S. Y. Kim, D. Teague, M. C. Krishna, R. Pacelli, J. B. Mitchell, Y. Vodovotz, R. W. Nims, D. Christodoulou, A. M. Miles, M. B. Grisham and D. A. Wink. 1996. «Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols». *Anal Biochem.* vol. 238, no 2, p. 150-158.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, R. Colombo and A. Milzani. 2007. «S-glutathionylation in protein redox regulation». *Free Radic Biol Med.* vol. 43, no 6, p. 883-898.
- Fox, P. L., B. Mazumder, E. Ehrenwald and C. K. Mukhopadhyay. 2000. «Ceruloplasmin and cardiovascular disease». *Free Radic Biol Med.* vol. 28, no 12, p. 1735-1744.
- Goldstein, I. M., H. B. Kaplan, H. S. Edelson and G. Weissmann. 1982. «Ceruloplasmin: an acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals». *Ann N Y Acad Sci.* vol. 389, p. 368-379.
- Gow, A. J., C. R. Farkouh, D. A. Munson, M. A. Posencheg and H. Ischiropoulos. 2004. «Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications». *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* vol. 287, no 2, p. L262-268.
- Gutteridge, J. M. 1978. «Caeruloplasmin: a plasma protein, enzyme, and antioxidant». *Ann Clin Biochem.* vol. 15, no 6, p. 293-296.
- Haqqani, A. S., S. K. Do and H. C. Birnboim. 2003. «The role of a formaldehyde dehydrogenase-glutathione pathway in protein S-nitrosation in mammalian cells». *Nitric Oxide.* vol. 9, no 3, p. 172-181.
- Haramaki, N., D. B. Stewart, S. Aggarwal, H. Ikeda, A. Z. Reznick and L. Packer. 1998. «Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia-reperfusion». *Free Radic Biol Med.* vol. 25, no 3, p. 329-339.

- Healy, J., and K. Tipton. 2007. «Ceruloplasmin and what it might do». *J Neural Transm.* vol. 114, no 6, p. 777-781.
- Hildebrandt, A. G., I. Roots, M. Tjoe and G. Heinemeyer. 1978. «Hydrogen peroxide in hepatic microsomes». *Methods Enzymol.* vol. 52, p. 342-350.
- Hrabie, Joseph A., John R. Klose, David A. Wink and Larry K. Keefer. 1993. «New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines». *Journal of Organic Chemistry.* vol. 58, p. 1472-1476.
- Inoue, K., T. Akaike, Y. Miyamoto, T. Okamoto, T. Sawa, M. Otagiri, S. Suzuki, T. Yoshimura and H. Maeda. 1999. «Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo». *J Biol Chem.* vol. 274, no 38, p. 27069-27075.
- Inserte, J., G. Taimor, B. Hofstaetter, D. Garcia-Dorado and H. M. Piper. 2000. «Influence of simulated ischemia on apoptosis induction by oxidative stress in adult cardiomyocytes of rats». *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* vol. 278, no 1, p. H94-99.
- Janero, D. R., D. Hreniuk and H. M. Sharif. 1991. «Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to the mammalian heart-muscle cell (cardiomyocyte): lethal peroxidative membrane injury». *J Cell Physiol.* vol. 149, no 3, p. 347-364.
- Jones, S. P., and R. Bolli. 2006. «The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection». *J Mol Cell Cardiol.* vol. 40, no 1, p. 16-23.
- Kim, I. G., and S. Y. Park. 1998. «Requirement of intact human ceruloplasmin for the glutathione-linked peroxidase activity». *FEBS Lett.* vol. 437, no 3, p. 293-296.
- Kim, I. G., S. Y. Park, K. C. Kim and J. J. Yum. 1998. «Thiol-linked peroxidase activity of human ceruloplasmin». *FEBS Lett.* vol. 431, no 3, p. 473-475.

- Klatt, P., and S. Lamas. 2000. «Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress». *Eur J Biochem.* vol. 267, no 16, p. 4928-4944.
- Krezel, A., and W. Bal. 2004. «Contrasting effects of metal ions on S-nitrosoglutathione, related to coordination equilibria: GSNO decomposition assisted by Ni(II) vs stability Increase in the presence of Zn(II) and Cd(II)». *Chem Res Toxicol.* vol. 17, no 3, p. 392-403.
- Lim, C. C., N. S. Bryan, M. Jain, M. F. Garcia-Saura, B. O. Fernandez, D. B. Sawyer, D. E. Handy, J. Loscalzo, M. Feelisch and R. Liao. 2009. «Glutathione peroxidase deficiency exacerbates ischemia-reperfusion injury in male but not female myocardium: insights into antioxidant compensatory mechanisms». *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* vol. 297, no 6, p. H2144-2153.
- Lopez-Sanchez, L. M., F. J. Corrales, M. De La Mata, J. Muntane and A. Rodriguez-Ariza. 2008. «Detection and proteomic identification of S-nitrosated proteins in human hepatocytes». *Methods Enzymol.* vol. 440, p. 273-281.
- Loscalzo, Joseph, and Joseph A. Vita. 2000. *Nitric oxide and the cardiovascular system.* Totowa, N.J.: Humana Press.
- Marklund, S. L. 1986. «Ceruloplasmin, extracellular-superoxide dismutase, and scavenging of superoxide anion radicals». *J Free Radic Biol Med.* vol. 2, no 4, p. 255-260.
- Mateescu, M. A., X. T. Wang, M. J. Dumoulin, O. Befani and B. Mondovi. 1999. «Simultaneous chromatographic separation of ceruloplasmin and serum amine oxidase». In *Analytical and Separation Methods of Biomacromolecules*, Hassan Y. Aboul-Einen, p. 445-455. New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Meyer, D. J., H. Kramer, N. Ozer, B. Coles and B. Ketterer. 1994. «Kinetics and equilibria of S-nitrosothiol-thiol exchange between glutathione, cysteine, penicillamines and serum albumin». *FEBS Lett.* vol. 345, no 2-3, p. 177-180.

- Miranda, K. M., M. G. Espey and D. A. Wink. 2001. «A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite». *Nitric Oxide*. vol. 5, no 1, p. 62-71.
- Mosmann, T. 1983. «Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays». *J Immunol Methods*. vol. 65, no 1-2, p. 55-63.
- Musci, G., M. C. Bonaccorsi di Patti and L. Calabrese. 1993. «The state of the copper sites in human ceruloplasmin». *Arch Biochem Biophys*. vol. 306, no 1, p. 111-118.
- Paquin, J., M. Aouffen, E. De Grandpre, R. Nadeau, D. Langlois and M. A. Mateescu. 2005. «Neuroprotective and cardioprotective actions of an association of pyruvate, vitamin E and fatty acids». *Arzneimittelforschung*. vol. 55, no 7, p. 359-369.
- Park, Y. S., K. Suzuki, N. Taniguchi and J. M. Gutteridge. 1999. «Glutathione peroxidase-like activity of caeruloplasmin as an important lung antioxidant». *FEBS Lett*. vol. 458, no 2, p. 133-136.
- Penna, C., D. Mancardi, R. Rastaldo and P. Pagliaro. 2009. «Cardioprotection: a radical view Free radicals in pre and postconditioning». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1787, no 7, p. 781-793.
- Pruitt, K. D., T. Tatusova and D. R. Maglott. 2007. «NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins». *Nucleic Acids Res*. vol. 35, no Database issue, p. D61-65.
- Rafikova, O., R. Rafikov and E. Nudler. 2002. «Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 99, no 9, p. 5913-5918.
- Romero, J. M., and O. A. Bizzozero. 2006. «Extracellular S-nitrosoglutathione, but not S-nitrosocysteine or N(2)O(3), mediates protein S-nitrosation in rat spinal cord slices». *J Neurochem*. vol. 99, no 4, p. 1299-1310.

- Saville, B. 1958. «A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols». *Analyst*. vol. 83, p. 670-672.
- Schulz, R., M. Kelm and G. Heusch. 2004. «Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury». *Cardiovasc Res*. vol. 61, no 3, p. 402-413.
- Shiva, S., X. Wang, L. A. Ringwood, X. Xu, S. Yuditskaya, V. Annavajjhala, H. Miyajima, N. Hogg, Z. L. Harris and M. T. Gladwin. 2006. «Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis». *Nat Chem Biol*. vol. 2, no 9, p. 486-493.
- Stamler, J. S., D. I. Simon, J. A. Osborne, M. E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D. J. Singel and J. Loscalzo. 1992. «S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 89, no 1, p. 444-448.
- Sun, J., C. Steenbergen and E. Murphy. 2006. «S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress». *Antioxid Redox Signal*. vol. 8, no 9-10, p. 1693-1705.
- Tarpey, M. M., D. A. Wink and M. B. Grisham. 2004. «Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations». *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. vol. 286, no 3, p. R431-444.
- Wang, G., D. A. Liem, T. M. Vondriska, H. M. Honda, P. Korge, D. M. Pantaleon, X. Qiao, Y. Wang, J. N. Weiss and P. Ping. 2005. «Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition». *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. vol. 288, no 3, p. H1290-1295.
- Wang, X. T., M. J. Dumoulin, O. Befani, B. Mondovi and M. A. Mateescu. 1994. «Joint chromatographic purification of bovine serum ceruloplasmin and amineoxidase». *Prep Biochem*. vol. 24, no 3-4, p. 237-250.

Wever, R., F. X. van Leeuwen and B. F. van Gelder. 1973. «The reaction of nitric oxide with ceruloplasmin». *Biochim Biophys Acta*. vol. 302, no 2, p. 236-239.

Wyatt, A. R., and M. R. Wilson. 2010. «Identification of human plasma proteins as major clients for the extracellular chaperone clusterin». *J Biol Chem*. vol. 285, no 6, p. 3532-3539.

Zhang, Y., and N. Hogg. 2005. «S-Nitrosothiols: cellular formation and transport». *Free Radic Biol Med*. vol. 38, no 7, p. 831-838.

2.9 Figures

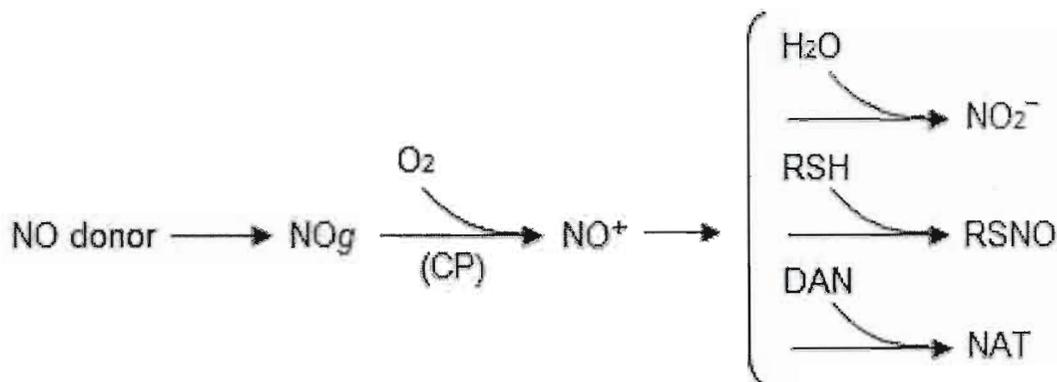


Figure 2.1 Some aspects of NO generation and reaction. NO donors release gaseous NO (NOg) which, in oxygenated milieu and physiological pH, is oxidized to nitrosating species (referred to as NO⁺ equivalents). These species can react with water or thiols (RSH) to respectively produce nitrite and S-nitrosated derivatives (RSNO). CP stimulates the formation of nitrite (nitrite-synthase activity) and RSNO (S-nitrosating activity) through possibly the generation of NO⁺ from NOg (NO-oxidase activity) (Inoue *et al.*, 1999 ; Shiva *et al.*, 2006). In the present study, nitrite was assayed colorimetrically with the Griess reagents. RSNO were assayed by the Griess reaction combined with sulfamic acid and HgCl₂ treatment. NO⁺ formation was followed through the conversion of DAN into the fluorescent derivative NAT.

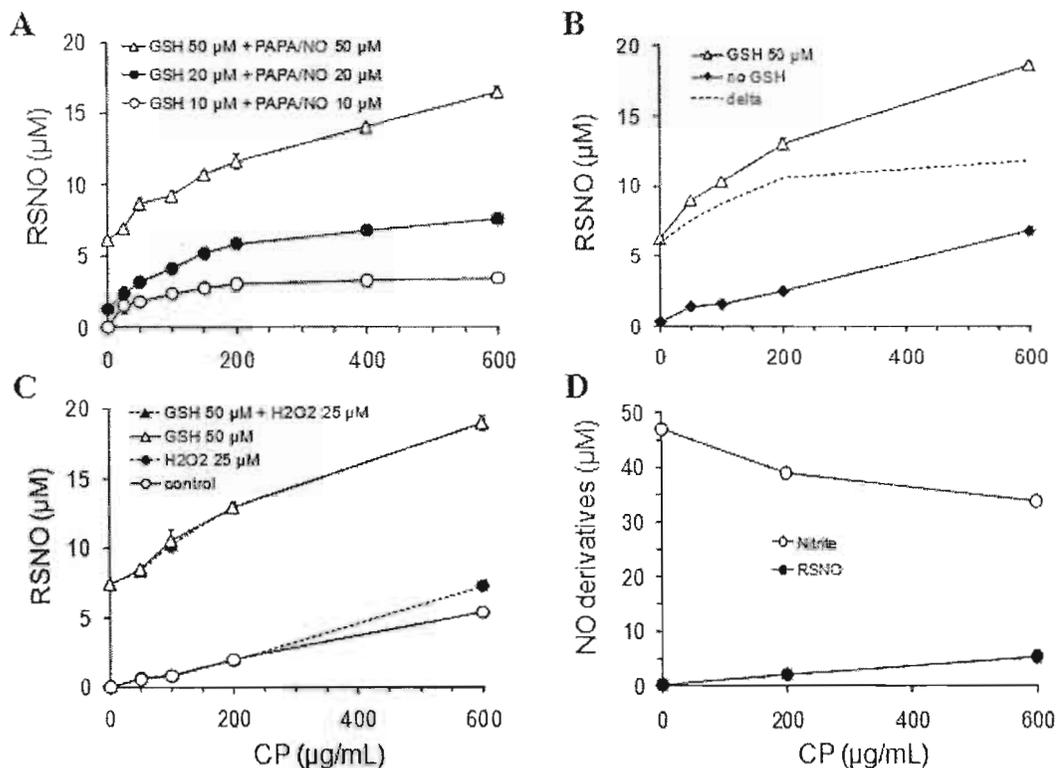


Figure 2.2 Nitrosating activity of CP. (A) Incubation, for 30 min, of equimolar concentrations of GSH and PAPA/NO with different concentrations of CP. (B) Incubation, for 30 min, of 50 μM PAPA/NO with different concentrations of CP, in the absence or presence of 50 μM GSH. The delta curve represents GSH nitrosation. (C) As in B except that 25 μM H₂O₂ was also present where indicated. Control had no GSH and no H₂O₂. (D) Incubation, for 1 h 45 min, of 50 μM PAPA/NO with different concentrations of CP. All incubations were done in PBS, at 37°C, and RSNO and nitrite were evaluated with the Griess reagents. Results (means \pm SEM of triplicate determinations of one study) are representative of three studies. When not apparent, the error bars have the size of symbols.

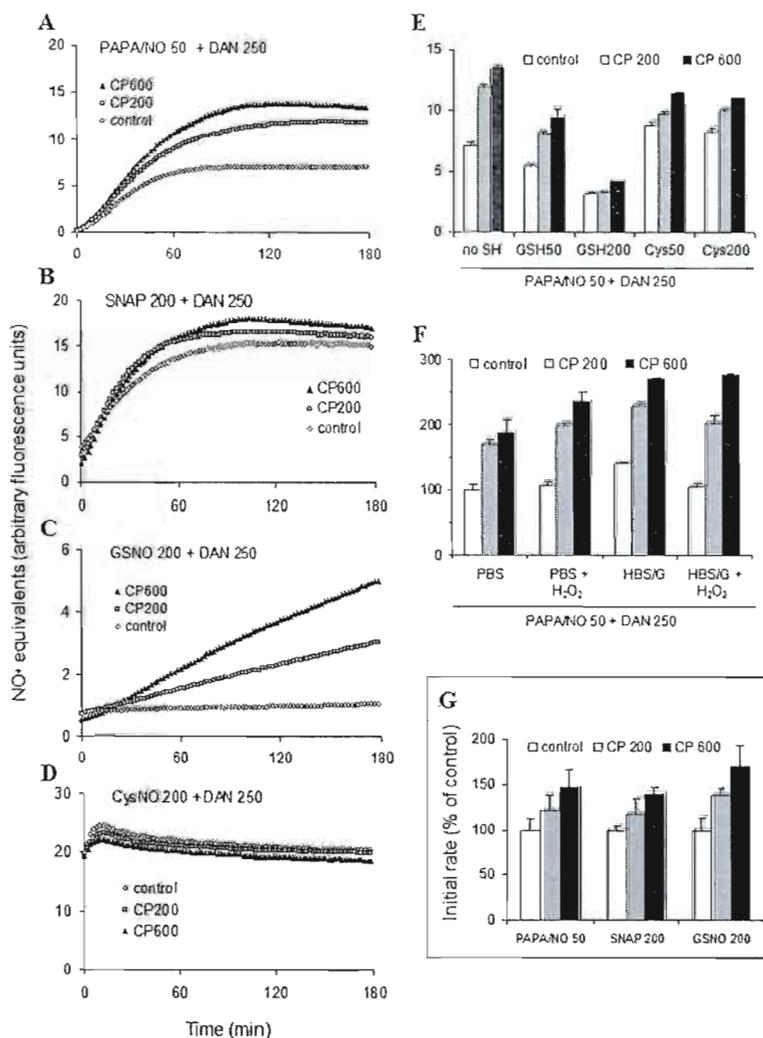


Figure 2.3 Generation of NO⁺ equivalents by CP. (A-D) NO donors (PAPA/NO, 50 μ M; SNAP, GSNO and CysNO, 200 μ M each) and 250 μ M DAN were incubated without (control) or with CP (200 or 600 μ g/mL) in HBS/G, at 37°C. NO⁺ equivalents were continuously monitored by fluorescence. Results (means \pm SEM of triplicate determinations) are shown for the same study (same gain setting), and are representative of three studies. Error bars have the size of symbols. Notice the lower production of NO⁺ with GSNO. (E) The experiment was identical to A, but with the addition of GSH or Cys (50 or 200 μ M). Fluorescence values were taken at the plateau (from 160 to 180 min). (F) The presence of 25 μ M H₂O₂ did not inhibit the CP-induced generation of NO⁺ equivalents, neither in PBS nor in HBS/G. (G) Initial rates of NO⁺ generation (changes in fluorescence units per min, expressed relatively to control) as determined over the first six minutes of fluorescence monitoring with each NO donor. The results (means \pm SEM) are from three independent studies.

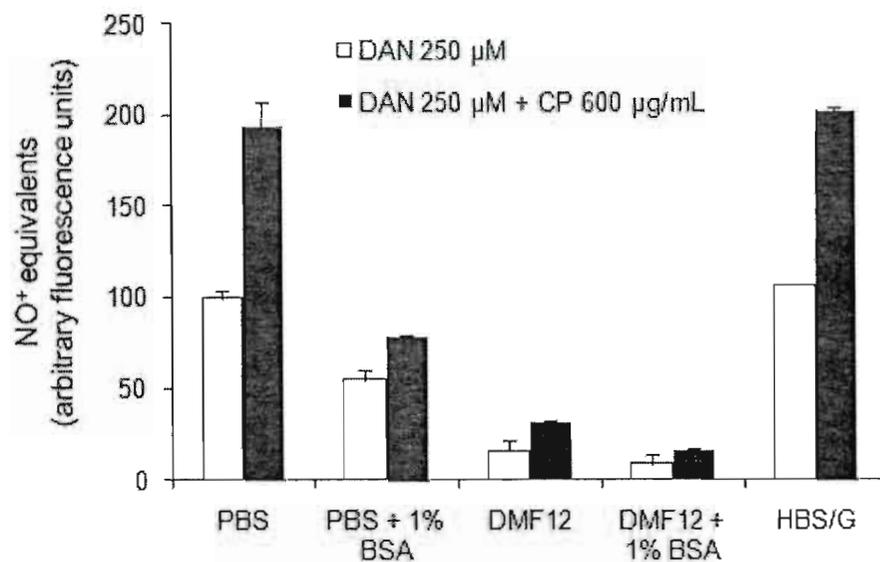


Figure 2.4 Effect of incubation medium on DAN nitrosation. DAN (250 μM) and PAPA/NO (50 μM) were incubated at 37°C, in the indicated media, in the absence or presence of CP (600 μg/mL). NO⁺ equivalents were continuously monitored during 3 h. The reported fluorescence values are for 3 h but similar conclusions were drawn at earlier times. Results (means ± SEM of triplicate determinations of one study) are representative of two studies.

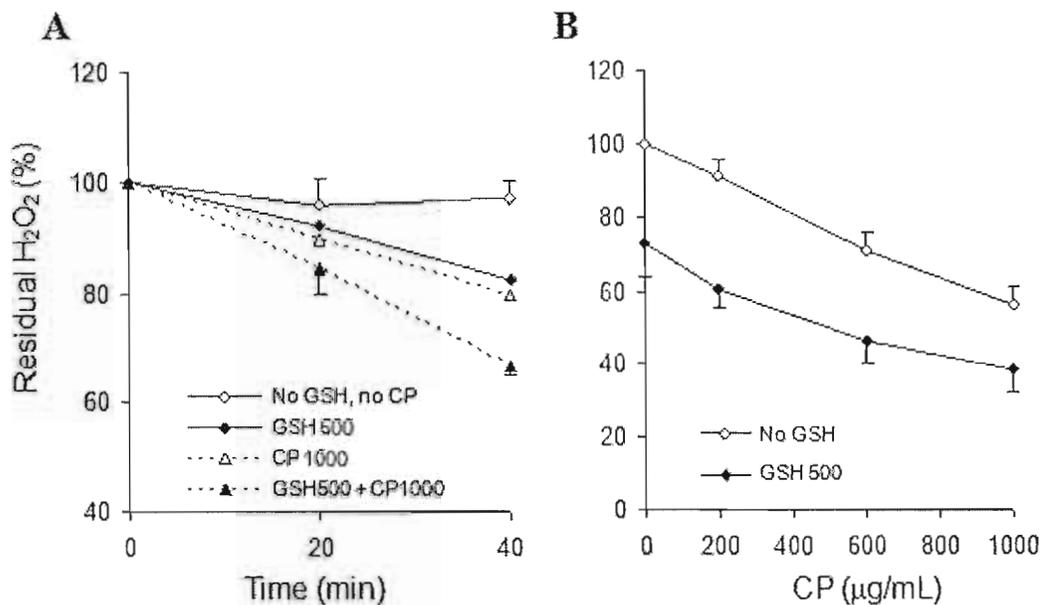


Figure 2.5 Assay of GSH-peroxidase activity of CP. (A) H_2O_2 (initially, $500 \mu\text{M}$ in HBS/G) was incubated for short times, at 37°C , without or with CP ($1000 \mu\text{g/mL}$) and/or GSH ($500 \mu\text{M}$). (B) Same conditions as in A, but incubation lasted 1 h 45 min and the concentration of CP varied. Results are expressed as the means \pm SEM of three independent studies (each analysed in triplicate). The error bars, similar in all conditions, are not shown for the GSH and the CP curves in A, for the sake of clarity.

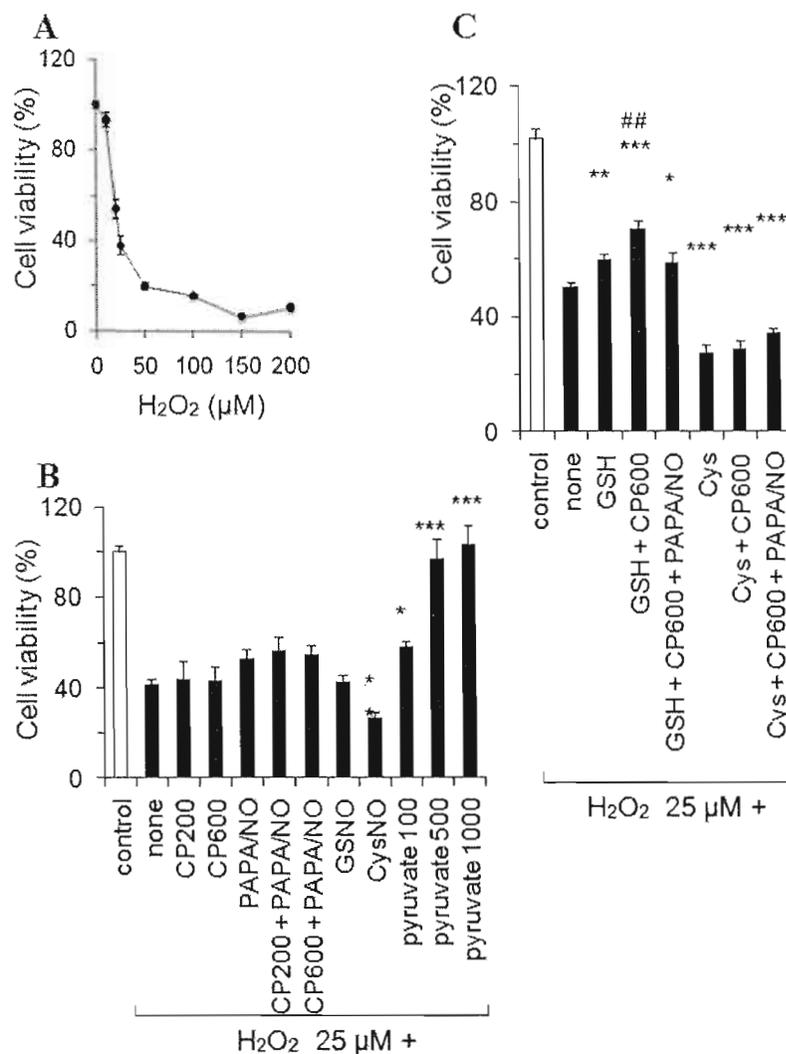


Figure 2.6 CP, NO donors and thiols in H₂O₂-induced loss of cell viability. (A) Cardiomyocytes were incubated for 1 h 45 min in HBS/G, 37°C, in the presence of various concentrations of H₂O₂. (B,C) Cardiomyocytes were incubated under the same conditions as in A but in the presence of 25 μM H₂O₂ and without (none) or with the following agents: CP (200 and 600 μg/mL), PAPA/NO (50 μM), pyruvate (100, 500 and 1000 μM), GSNO, CysNO, GSH or Cys (each at 200 μM). The control had no H₂O₂ and no other agent. Results (means ± SEM) were obtained, in A, from three independent studies analyzed in triplicate, and in B and C, from 9-14 microplates obtained with three independent cell preparations. Respectively, *, ** and *** indicate $p \leq 0.05$, 0.01 and 0.001 compared to "H₂O₂+none", and ## indicates $p \leq 0.01$ compared to "H₂O₂+GSH". It is worth of note that CP, PAPA/NO, GSNO, GSH did not affect viability in absence of H₂O₂ (not shown).

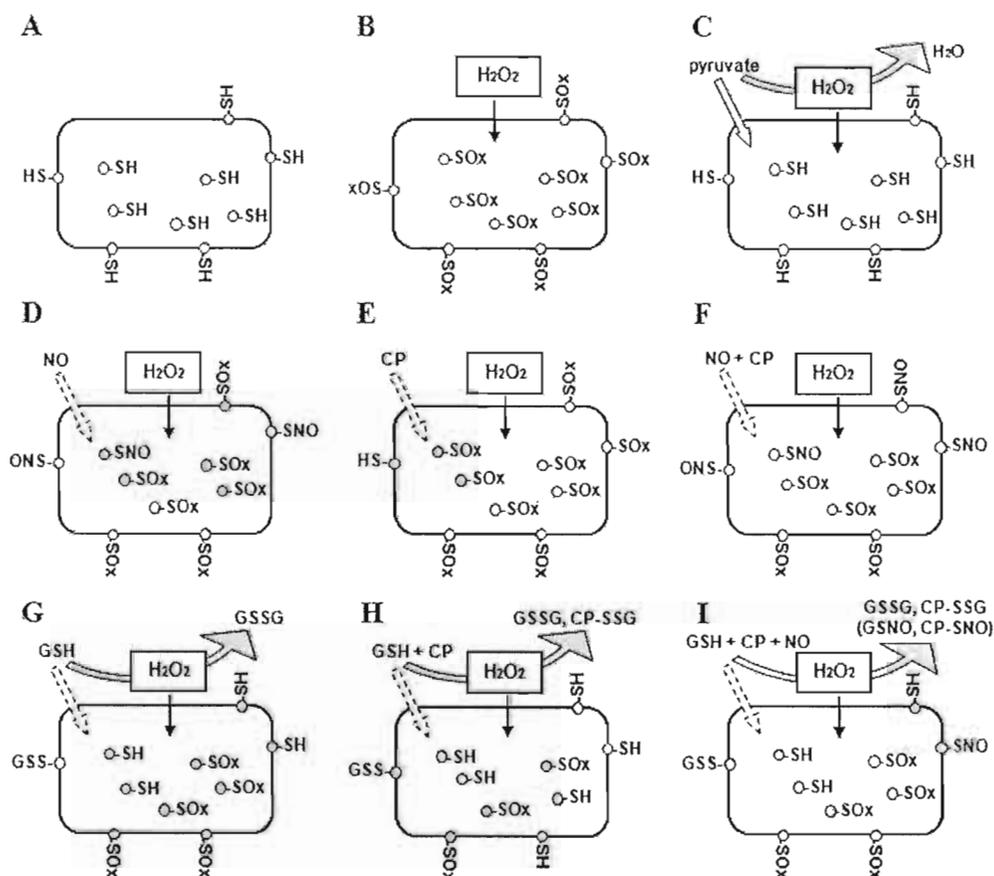


Figure 2.7 Schematical presentation of possible relationships between H_2O_2 , thiols, NO and CP. Redox sensitive protein thiols (-SH) exist inside cells and at their surface (A). Thiols can be oxidized to various species (-SOx : sulfenic, sulfinic and sulfonic acids, and disulfides) by exposure to H_2O_2 (B), S-nitrosated (-SNO) by exposure to NO (D), or S-glutathiolated by exposure to GSH (G). Extracellular H_2O_2 freely moves into the intracellular compartment (B-I, black arrows). Extracellularly provided pyruvate can also enter the cells (C, full white arrow), whereas NO, GSH and CP can hardly, or not all, do that (D-I, dotted white arrows). The semi-circular arrows crossing the H_2O_2 box indicate consumption of this oxidant (C, G-I).

CHAPITRE III : LA CP ET LE POTENTIEL MEMBRANAIRE DANS LA CARDIOPROTECTION

L'efficacité du tampon phosphate de potassium (KPi) pour éluer la CP au cours de sa purification chromatographique constitue un bon indice de l'affinité particulière de la protéine pour le K^+ (Wang *et al.*, 1994). D'ailleurs, la CP se conserve mieux lorsqu'entreposée dans le KPi plutôt que le phosphate de sodium (NaPi). Il est dommage qu'aucune équipe ne se soit encore intéressée à étudier la liaison du K^+ à la CP par diffractométrie à rayons X, bien que des études aient été faites pour d'autres cations, incluant le Na^+ (Bento *et al.*, 2007). Néanmoins, la CP s'est fait attribuer un effet antiarythmique soupçonné d'impliquer les canaux à K^+ (Atanasiu *et al.*, 1996). Elle pourrait aussi dépolariser la membrane cellulaire de cellules de neuroblastomes (Wang *et al.*, 1995). Ces prémisses suggèrent la possibilité que la cardioprotection par la CP puisse impliquer une régulation du potentiel membranaire, plus particulièrement en interagissant avec le K^+ .

3.1 Stratégies

3.1.1 Filtration de la CP/KPi sur gel Sephadex G-25

La CP utilisée a été purifiée selon la méthode préalablement décrite (Gagné, 2008). Il est important de mentionner que cette technique de purification inclut une désorption de la CP par une concentration massive de tampon KPi à pH 7,4, soit 200 mM, puis une dilution de l'éluat par un facteur de 2 dans l'eau. Il a donc été supposé que la CP obtenue repose dans du tampon KPi 100 mM, mais cette concentration n'a jamais été mesurée et risque d'être inexacte. En effet, la CP a peut-être été désorbée de la colonne avec une concentration de KPi inférieure à celle de la solution d'éluat, puisque celle-ci se dilue dans le tampon KPi (30 mM) qui occupe déjà la colonne. De cette manière, l'unique certitude à propos de la concentration de KPi qui permette la désorption de la CP est qu'elle se situe entre 30 et 200 mM. Donc, après la dilution par un facteur de 2, l'échantillon final de CP purifiée baignerait dans du KPi à pH 7,4 dont la concentration est entre 15 et 100 mM.

Pour évaluer l'interaction entre la CP et le K^+ , un échantillon de cette CP a été filtré sur gel Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich). Les microsphères de Sephadex G-25 permettent de séparer les protéines des sels. En effet, les protéines, comme la CP, subissent une exclusion stérique et sont éluées avant les sels, tels que le KPi. Le KPi est assez petit pour être retenu

par les microsphères et son parcours chromatographique est ainsi allongé. Cependant, en cas de liaison du K^+ avec la CP, il faut s'attendre à leur coélution, puisque la CP entraînerait le K^+ dans son élution rapide et empêcherait qu'il soit retenu par les microsphères.

D'abord, un volume de 71 μL de CP 14,1 mg/mL de KPi a été déposé sur une colonne de 10 mL de Sephadex G-25 préalablement équilibrée dans l'eau. La collecte des 24 fractions de 1 mL a débuté en même temps que l'élution. La même opération a été effectuée en remplaçant l'échantillon de CP par un volume égal de KPi 100 mM. Le dosage de la CP dans chacune des fractions de 1 mL a été fait en mesurant leur absorbance à 280 nm. Ensuite, chaque fraction a été diluée dans l'eau par un facteur de 4 pour faciliter le dosage du K^+ par un spectromètre atomique (Varian 220FS) à une λ d'émission de 766,5 nm. Une courbe standard a été faite en utilisant des solutions aqueuses de KCl dont la concentration varie de 0 à 160 μM . La concentration réelle de KPi dans l'échantillon de CP et la solution de KPi 100 mM a aussi été évaluée par spectrométrie d'émission atomique, après dilution par un facteur de 7500.

3.1.2 Dosage de l'activité amine-oxydase de la CP

Une éventuelle interaction entre la CP et le K^+ risque de se manifester par une modification de son activité enzymatique. Le dosage colorimétrique de l'activité amine-oxydase de la CP a donc permis d'étudier l'effet du K^+ sur cette activité. Le dosage utilise la *p*-PD (Sigma-Aldrich) comme substrat, que la CP oxyde en un produit coloré (figure 1.16 et section 1.8.2) à une λ_{max} de 530 nm.

L'oxydation de la *p*-PD à 10 mM a été effectuée par 0,2 mg/mL de CP dans du tampon KPi à 50 mM et pH de 7,2. La réaction a été initiée par l'ajout du substrat. Après 90 min de réaction à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à tous les 10 nm, entre les λ de 350 et 750 nm, par un spectrophotomètre pour microplaque de 96 puits (Molecular Devices, SpectraMax), afin de tracer le spectre d'absorbance (figure 3.1). La λ de 560 nm, pour laquelle l'absorbance se situe près du maximum, a été choisie pour les dosages subséquents en raison des filtres disponibles pour le spectrophotomètre pour microplaques (Molecular Devices, ThermoMax).

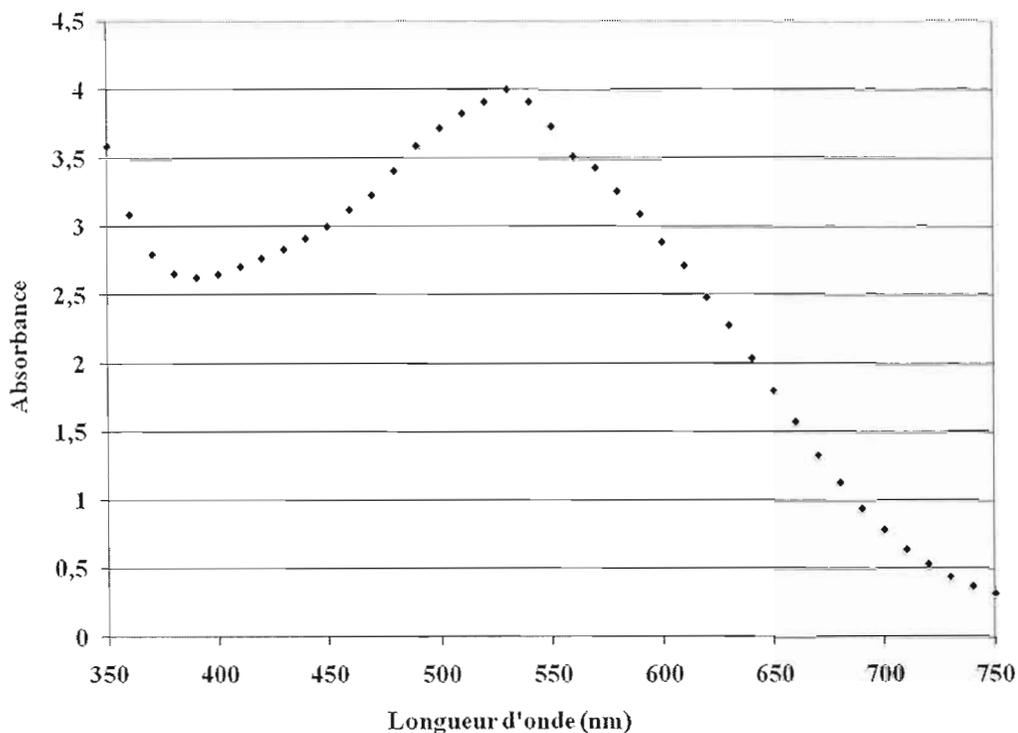


Figure 3.1 Spectre d'absorbance du produit d'oxydation de la *p*-PD. L'oxydation de la *p*-PD à 10 mM a été effectuée par 0,2 mg/mL de CP dans du tampon KPi à 50 mM et pH de 7,2. La réaction a été initiée par l'ajout du substrat. Après 90 min de réaction à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à tous les 10 nm, entre les λ de 350 et 750 nm, par un lecteur d'absorbance pour microplaques (Molecular Devices, SpectraMax).

Ultimement, l'activité amine-oxydase de la CP a été mesurée en présence de Na^+ ou de K^+ afin de comparer l'effet de ces deux cations sur l'activité. De cette manière, la réaction d'oxydation de la *p*-PD (10 mM) par la CP (0,1 mg/mL) a pris place, à température ambiante, dans les différents tampons à des concentrations allant de 10 à 150 mM. Les tampons utilisés sont l'acétate de sodium (NaOAc) et l'acétate de potassium (KOAc) à pH de 5,2, ainsi que le NaPi et le KPi à pH de 6,5. Pour chaque condition, les mesures d'absorbance ont été prises après 60 min pour suivre l'activité relative de la CP en fonction de la concentration de tampon, donc en fonction de la concentration du cation.

3.1.3 Dosage de l'activité ferroxidase de la CP

Il s'avère aussi pertinent de vérifier l'influence du K^+ sur l'activité ferroxidase de la CP. Puisque le site de l'activité oxydase est le même pour tous les substrats, il faut s'attendre à ce que l'effet du K^+ sur l'activité amine-oxydase de la CP se répète pour son activité ferroxidase.

Celle-ci peut d'ailleurs être quantifiée en dosant le Fe^{2+} résiduel par une méthode colorimétrique (Erel, 1998). La réaction d'oxydation du Fe^{2+} par la CP 0,01 mg/mL prend place dans les tampons KOAc et NaOAc à des concentrations allant de 10 à 150 mM et à pH de 5,2. La réaction est démarrée par l'ajout de la solution aqueuse qui contient le substrat Fe^{2+} , ce qui fait monter le volume réactionnel à 200 μ L. Plus précisément, la solution de substrat est composée de thiourée et de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, dont les concentrations respectives dans le milieu réactionnel atteignent 20 et 65 μ M. La thiourée est ajoutée dans la solution de substrat avant que le $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ y soit dissout, car elle empêche l'oxydation spontanée du Fe^{2+} qui pourrait survenir dès sa dissolution. Après une incubation de 20 min à température ambiante, 14 μ L de la solution aqueuse chromogène sont ajoutés. Cette dernière solution contient de l'acide 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(2-[5-furysulfonique]) à une concentration de 18 mM. La substance chromogène forme, avec le Fe^{2+} résiduel, un complexe qui absorbe à 595 nm. Le Fe^{3+} ne permet pas de former un tel complexe. Dans l'heure qui suit l'ajout du chromogène, l'absorbance est donc mesurée par un spectrophotomètre pour microplaques de 96 puits (Molecular Devices, ThermoMax).

La méthode de dosage de l'oxydation du fer n'utilise pas de courbe standard, mais plutôt des témoins à 0 et 100% d'oxydation pour chacune des conditions. Le témoin à 0% d'oxydation du fer ne contient pas de CP, alors que le témoin à 100% d'oxydation contient 530 μ M d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) au lieu de la CP. En effet, le témoin à 0% d'oxydation possède l'absorbance maximale, car le Fe^{2+} reste intact et peut former le complexe coloré. Le témoin qui contient l'EDTA représente 100% d'oxydation, car il chélate le Fe^{2+} et donne l'illusion qu'il a entièrement été oxydé en Fe^{3+} qui ne forme aucune couleur. Contrairement au dosage de l'activité amine-oxydase, celui de l'activité ferroxidase ne peut

être fait dans les tampons à base de phosphate, car ceux-ci augmentent le taux d'oxydation spontanée du fer (Erel, 1998).

3.1.4 Microscopie de fluorescence dynamique

Les variations du potentiel membranaire provoquent dans les cardiomyocytes des flux calciques initiateurs de battements. Un moyen possible de vérifier l'effet de la CP sur le potentiel membranaire des cardiomyocytes repose donc sur le suivi de leurs battements par microscopie de fluorescence dynamique. En effet, il existe une sonde fluorescente, le Fluo-3 (figure 3.2), dont l'émission de fluorescence est proportionnelle à la concentration de calcium cytoplasmique. L'utilisation du Fluo-3 pour l'analyse indirecte des variations du potentiel membranaire des cardiomyocytes est relatée dans la littérature (Plank et Sussman, 2003 ; Sauer *et al.*, 2001).

Les propriétés non-polaires du méthylester de Fluo-3 le font traverser la membrane cytoplasmique pour entrer dans la cellule. Ensuite, les estérases cellulaires effectuent un clivage pour ainsi révéler des groupements $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ sur la molécule de Fluo-3. Le Ca^{2+} , que chélatent ces groupements dans le cytoplasme, rend le Fluo-3 fluorescent en lui permettant de réémettre, maximalement à une λ de 515 nm, la lumière qu'il absorbe à une λ de 488 nm. De cette manière, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la concentration instantanée de Ca^{2+} cytoplasmique.

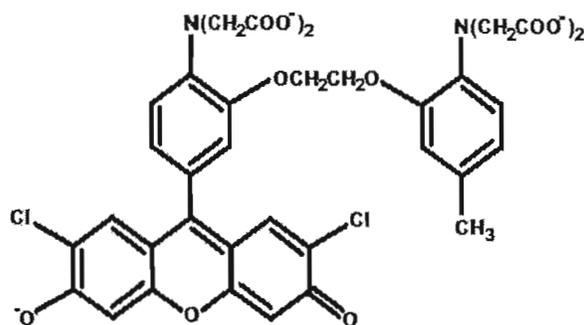


Figure 3.2 Structure moléculaire du Fluo-3. Le Fluo-3 est une molécule dérivée d'un méthylester clivé par les estérases cellulaires. Ce clivage donne au Fluo-3 sa polarité et sa capacité à chélater le Ca^{2+} cytoplasmique, grâce à des groupements CH_2COO^- , pour ensuite absorber la lumière à 488 nm et la réémettre à 515 nm (Minta, Kao et Tsien, 1989).

Les cardiomyocytes, préparés selon la méthode décrite au chapitre II et destinés à être marqués au Fluo-3, ont été cultivés sur des lamelles de verre gélatinisées (diamètre de 25 mm et épaisseur de 0,17 mm) au nombre estimé d'un million de cellules par lamelle. Le marquage se fait dans 500 μ L de tampon HBS/G contenant 3,5 μ M de Fluo-3 (Invitrogen) pendant 20 min à température ambiante. Il est important de noter que la solution-mère de Fluo-3 est préparée dans un volume égal de diméthylsulfoxyde (DMSO) et d'une solution de Pluronic (Sigma-Aldrich) 20% dans le DMSO, de manière à favoriser la dissolution du Fluo-3. Ainsi, la concentration finale de DMSO et de Pluronic à laquelle sont exposées les cellules atteint respectivement 0,1% et 0,01%. Après le marquage, les cellules sont rincées trois fois avec 1 mL de HBS/G et une attente subséquente de 30 min permet de compléter la désestérification. Pour l'observation microscopique, chaque lamelle d'intérêt a été montée dans une chambre cellulaire Attofluor (Invitrogen) contenant 1 mL de HBS/G. En attente d'être observées, les lamelles ont été gardées à température ambiante pendant 2 heures ou moins.

La fluorescence a été acquise à un grossissement de 400X à l'aide d'un microscope inversé Nikon Ti-Eclipse muni d'une caméra monochrome DS-QiMc (Sony ICX 285), d'un filtre FITC (fluorescéine isothiocyanate) pour lumière verte et du programme d'analyse NIS-Elements version 3.00. Des vidéos montrant les fluctuations de l'intensité de fluorescence dans les cellules ont été enregistrés pour l'observation qualitative des flux cytoplasmiques de Ca^{2+} . La fonction « Time measurement » a été utilisée pour suivre quantitativement la fluorescence en fonction du temps dans des régions cytoplasmiques d'intérêt délimitées manuellement (figure 3.3). L'éventuel ajout de la CP a été fait manuellement à l'aide d'une pipette automatique pour atteindre une concentration finale de 600 μ g/mL, à partir d'une solution-mère de CP à 28,5 mg/mL dans du KPi. Les mesures ont été faites à des intervalles de 70 ms.

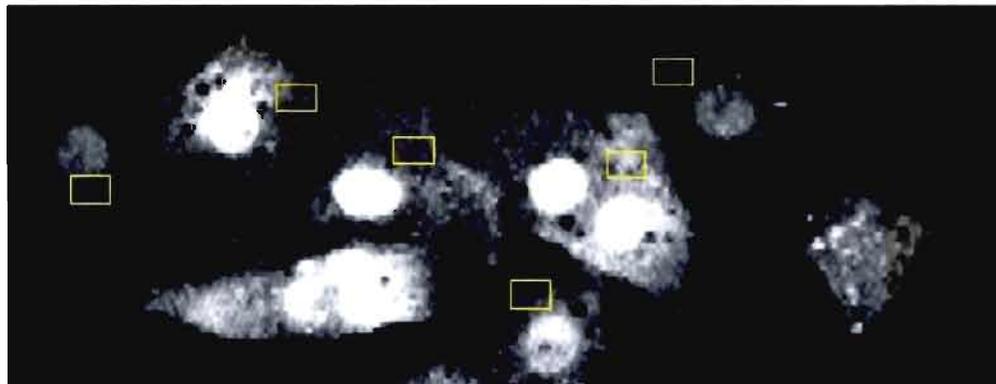


Figure 3.3 Sélection des régions cytoplasmiques d'intérêt. La délimitation de régions d'intérêt (rectangles) a permis de suivre quantitativement la fluorescence en fonction du temps, donc les variations de la concentration calcique dans le temps dans diverses portions de cytoplasme, à l'aide de la fonction « Time measurement ».

3.2 Résultats et discussion

3.2.1 Liaison du K^+ sur la CP

La courbe standard pour le dosage du K^+ témoigne de la grande sensibilité et de l'exactitude du dosage par spectrométrie d'émission atomique, avec un coefficient de corrélation au carré (R^2) supérieur à 0,99 (figure 3.4). La figure 3.5 montre le profil d'élution du K^+ et de la CP. Lorsque la CP et le KPi sont déposés ensemble sur la colonne, il est possible de constater qu'il y a co-élution de la CP et du K. Par contre, quand du KPi 100 mM est déposé seul sur la colonne, le K^+ élue beaucoup plus tard. La co-élution révèle donc que la CP entraîne avec elle le K^+ vers la sortie de la colonne, ce qui accélère son élution et prouve l'interaction du K^+ et de la CP. Cependant, la présence d'un second pic d'élution du K^+ aurait pu être attendue. L'absence d'un tel pic est étonnante, car elle suppose que toute la quantité de K^+ présente dans l'échantillon de CP co-élue avec la protéine et se lie sur elle. Plus concrètement, cela représente une liaison de 178 cations par molécule de CP, nombre qui peut sembler élevé. Néanmoins, il est probable que cette quantité de K^+ ne se lie pas directement à la CP, mais qu'elle fréquente plutôt l'environnement de solvation de la protéine. Dans le même ordre d'idée, l'abondance d'acides sialiques sur la structure de la CP

lui confère une forte charge négative qui est susceptible d'attirer les cations K^+ dans son environnement de solvation.

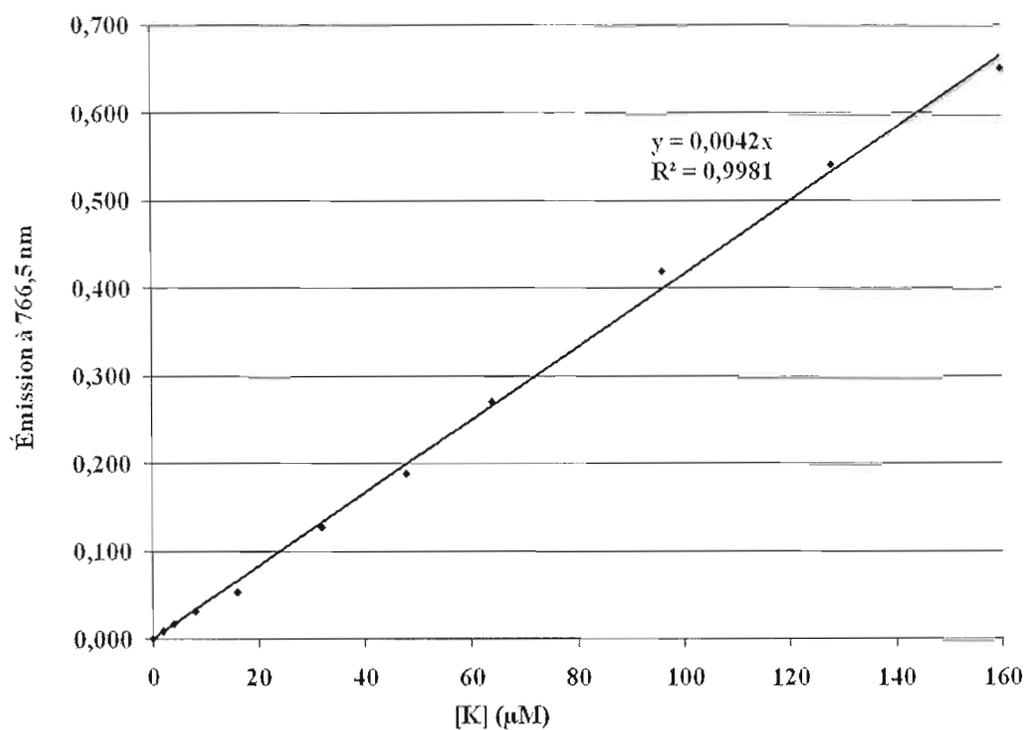


Figure 3.4 Courbe standard pour le dosage du K^+ par spectrométrie d'émission atomique. Des solutions aqueuses de KCl dont la concentration varie de 0 à 160 μM ont servi à tracer cette courbe standard, alors que l'intensité de l'émission à 766,5 nm a été mesurée par spectrométrie atomique.

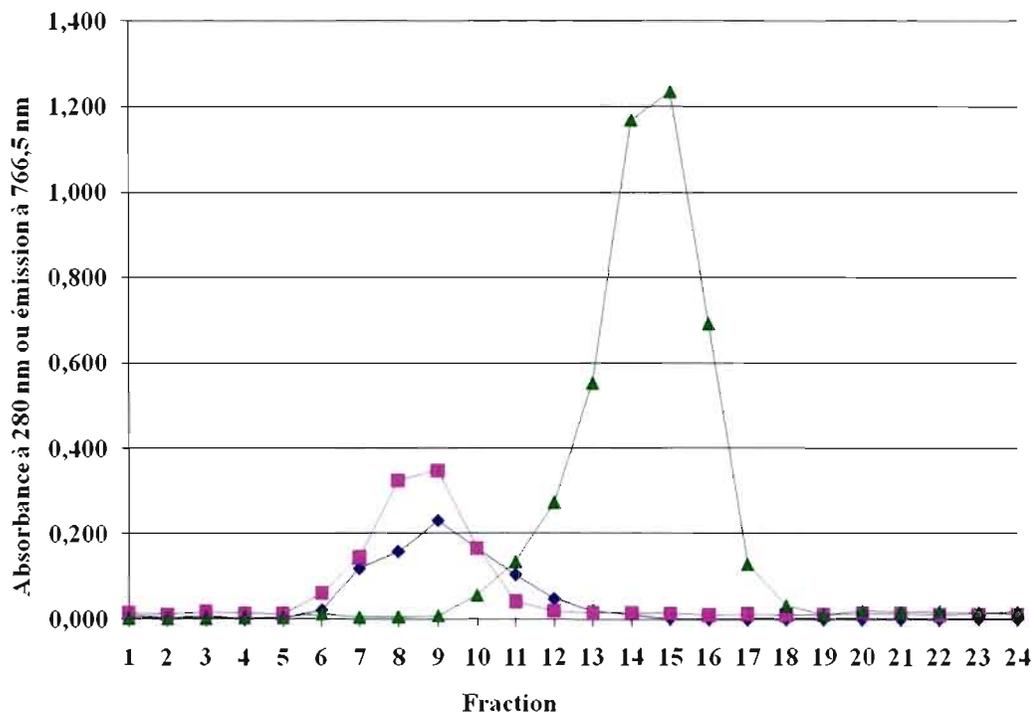


Figure 3.5 Filtration sur gel de la CP et du K⁺. Après son dépôt sur la colonne de Sephadex G-25, l'échantillon de CP dans du KP_i a été élué. La même opération a ensuite été effectuée pour la solution de KP_i à une concentration dite de 100 mM. Chacune des fractions de 1 mL a été dosée pour la CP en mesurant son absorbance à 280 nm. Ensuite, une dilution de chaque fraction dans l'eau par un facteur de 4 a permis de doser le K⁺ par mesure de l'émission atomique à 766,5 nm (◆ = détection de la CP par mesure de l'absorbance à 280 nm quand 71 μL de CP 14,1 mg/mL de KP_i sont déposés sur la colonne; ■ = détection du K⁺ par mesure de l'émission à 766,5 nm quand 71 μL de CP 14,1 mg/mL de KP_i sont déposés sur la colonne; ▲ = détection du K⁺ par mesure de l'émission à 766,5 nm quand 71 μL de KP_i dit de 100 mM sont déposés sur la colonne).

L'analyse des échantillons avant qu'ils ne soient déposés sur la colonne révèle que la solution de KP_i dite à 100 mM a une concentration réelle de 102 mM alors que l'échantillon de CP contient véritablement 19 mM de KP_i. D'ailleurs, cette différence de concentration s'exprime sur le chromatogramme quand on compare la quantité relative de K⁺ dans la solution de KP_i dite à 100 mM et dans l'échantillon de CP.

3.2.2 Activité amine-oxydase de la CP augmentée en présence de K^+ vs Na^+

La figure 3.6 révèle une pente ascendante de l'activité de la CP en fonction de la concentration de tampon à pH 5,2. De 10 à 50 mM, il y a une pente pour les deux tampons, qui est probablement due à l'atteinte de la concentration optimale du pouvoir tamponnant du NaOAc et du KOAc, car le substrat ajouté est acide (pH de 2,6 à une concentration de 10 mM dans l'eau). Néanmoins, la pente pour le KOAc (0,0153) à cet intervalle de concentrations est beaucoup plus abrupte que pour le NaOAc (0,0041), ce qui révèle un effet activateur de la présence de K^+ , qui s'additionne à celui du pH. À des concentrations dépassant 50 mM, il est possible de constater que l'activité de la CP atteint un plateau (pente presque nulle de 0,0002) dans le cas du NaOAc, alors qu'elle emprunte une nouvelle pente dans le cas du KOAc (pente de 0,0031). Cela confirme l'effet de la présence de K^+ . Par ailleurs, l'addition des pentes à des concentrations de KOAc allant de 50 à 150 mM (effet du K^+ seulement) et à des concentrations de NaOAc allant de 10 à 50 mM (effet du pH seulement) donne une valeur de 0,0072, ce qui s'approche davantage de la pente à des concentrations de KOAc allant de 10 à 50 mM. Cela prouve la collaboration du pH et de la présence de K^+ pour augmenter l'activité de la CP dans cet intervalle de concentrations.

L'allure des courbes présentées à la figure 3.7 pour les tampons KP_i et NaP_i, à pH 6,5, est très différente de ce qui a été trouvé pour les tampons NaOAc et KOAc, à pH 5,2. D'abord, la hausse de l'activité de la CP due à l'ajustement du pH, jusqu'à des concentrations de 50 mM, est beaucoup plus marquée que pour la figure 3.6, probablement parce que le pH tenu par ces tampons à base de phosphate (6,5) favorise davantage l'activité oxydase générale de la CP (Osaki, 1966) que le pH tenu par les tampons à base d'acétate (5,2). De plus, il semble que cette hausse soit plus rapide pour le NaP_i que pour le KP_i, ce qui est difficilement explicable, puisque le pK_a est identique pour les deux tampons. À la différence des tampons à base d'acétate, ceux à base de phosphate réduisent l'activité de la CP après stabilisation de leur pH. Ceci s'expliquerait par l'inhibition probable de l'activité oxydase de la CP par le phosphate. En effet, il est déjà connu que le site catalytique de l'oxydation par la CP puisse être obstrué par la liaison de divers anions (Musci, Bellenchi et Calabrese, 1999). Finalement, une fois le pH stabilisé, donc à des concentrations de KP_i et NaP_i supérieures à 50 mM, il est

évident que l'effet inhibiteur par le phosphate est beaucoup moins marqué dans le KPi que le NaPi. Cela confirme l'effet activateur de l'activité amine-oxydase de la CP par le K^+ , puisque cette activation camoufle une grande partie de l'effet inhibiteur par le phosphate.

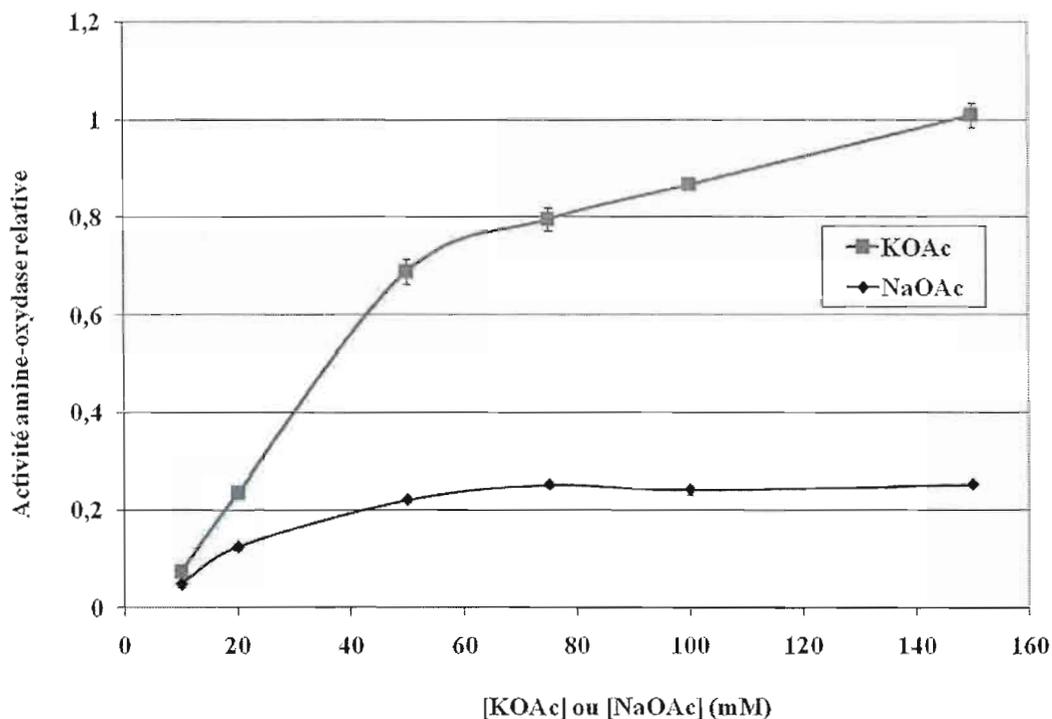


Figure 3.6 Activité amine-oxydase de la CP dans les tampons KOAc et NaOAc. La réaction d'oxydation de la *p*-PD (10 mM) par la CP (0,1 mg/mL) a pris place, à température ambiante, dans le NaOAc et le KOAc (pH de 5,2) à des concentrations allant de 10 à 150 mM. La réaction a été initiée par l'ajout du substrat. Pour chaque condition, les mesures d'absorbance ont été prises après 60 min, alors que les barres d'erreur correspondent aux écarts moyens des duplicatas.

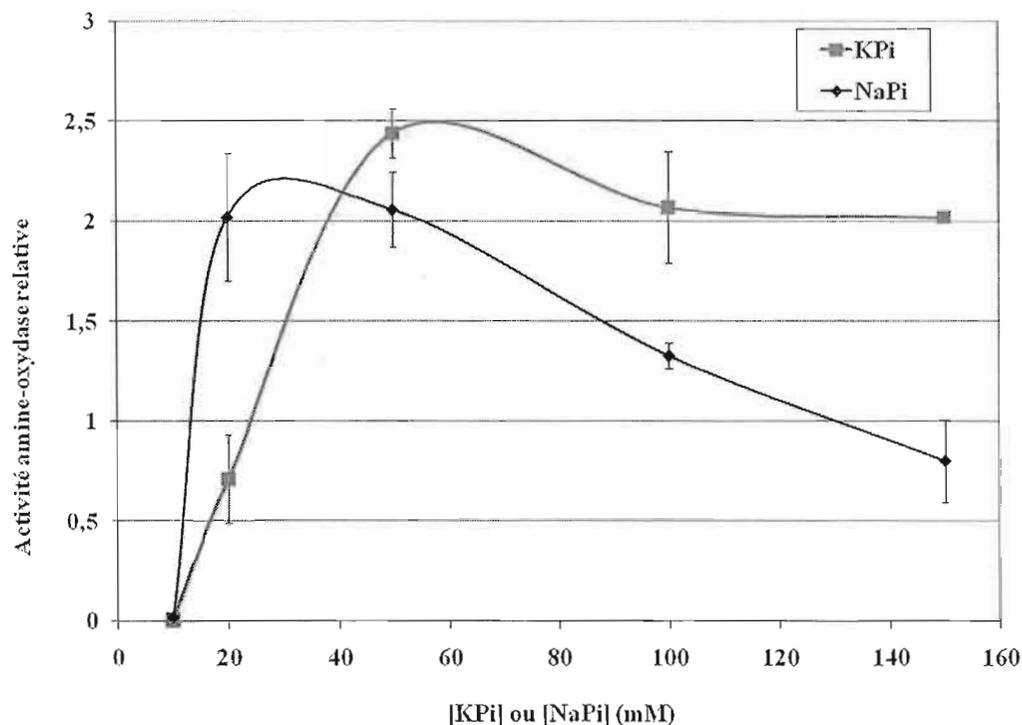


Figure 3.7 Activité amine-oxydase de la CP dans les tampons KPi et NaPi. La réaction d'oxydation de la *p*-PD (10 mM) par la CP (0,1 mg/mL) a pris place, à température ambiante, dans le NaPi et le KPi (pH de 6,5) à des concentrations allant de 10 à 150 mM. La réaction a été initiée par l'ajout du substrat. Pour chaque condition, les mesures d'absorbance ont été prises après 60 min, alors que les barres d'erreur correspondent aux écarts moyens des duplicatas.

3.2.3 Activité ferroxidase de la CP augmentée en présence de K^+ vs Na^+

La figure 3.8 montre de manière flagrante que l'activité ferroxidase de la CP s'épanouit davantage en présence de K^+ que de Na^+ , à pH 5,2. Ces résultats confirment, de concert avec ceux concernant l'activité amine-oxydase, que le K^+ favorise l'activité enzymatique de la CP. Il est dommage que le phosphate interfère dans le dosage de l'activité ferroxidase, car il aurait été intéressant de voir s'il possède un potentiel inhibiteur comme pour l'activité amine-oxydase. Malgré tout, avec l'étude de liaison de la CP et du K^+ , les études enzymatiques appuient l'idée d'une interaction structurale et fonctionnelle entre la CP et le K^+ . Cela permet de renforcer l'hypothèse stipulant que la cardioprotection par la CP

puisse impliquer une action sur le potentiel membranaire des cardiomyocytes en affectant les flux de K^+ .

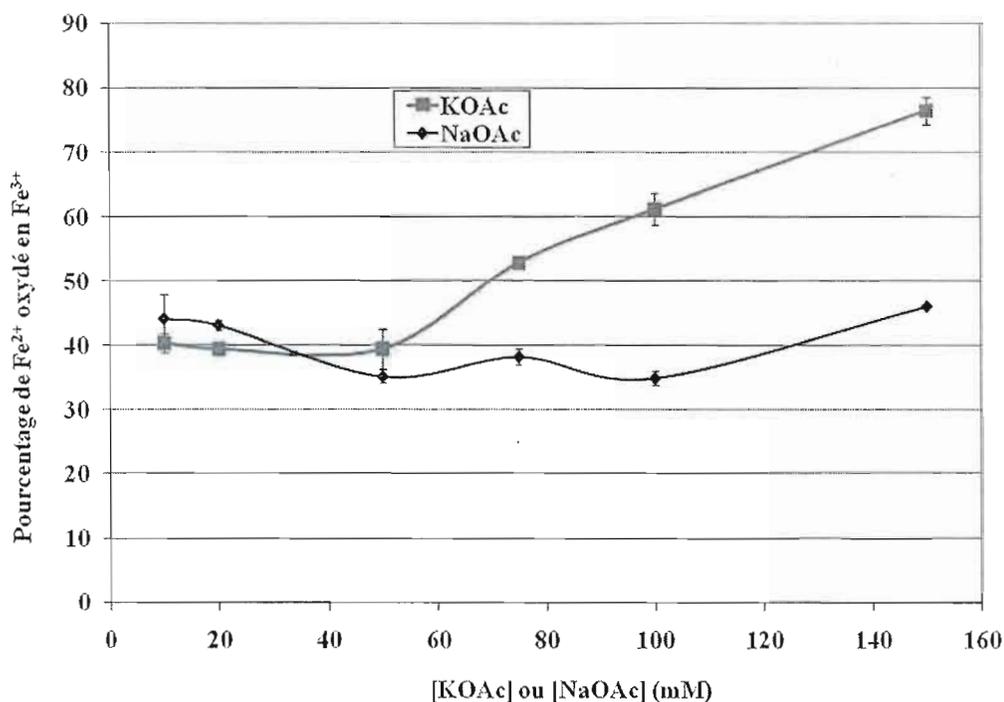


Figure 3.8 **Activité ferroxidase de la CP dans les tampons KOAc et NaOAc.** La réaction d'oxydation du fer ($65 \mu M$) par la CP ($0,01 \text{ mg/mL}$) est conduite dans les tampons KOAc et NaOAc à des concentrations allant de 10 à 150 mM et à pH de 5,2. La réaction est démarrée par l'ajout du substrat $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$. Après une incubation de 20 min à température ambiante, la solution chromogène est ajoutée et l'absorbance est lue à 595 nm pour doser le Fe^{2+} résiduel. Enfin, les valeurs d'absorbance sont converties en pourcentage d'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} grâce à des témoins à 0% et 100% d'oxydation. Les barres d'erreur correspondent aux écarts moyens des duplicatas.

3.2.4 Action indéterminée de la CP sur le potentiel membranaire des cardiomyocytes

Il a été possible de suivre les battements des cardiomyocytes à l'aide des variations de concentration de Ca^{2+} cytoplasmique. En effet, les cardiomyocytes de rats nouveau-nés possèdent la capacité de battre spontanément en culture (Guo *et al.*, 2009), contrairement à ceux provenant de cœurs adultes (Jovanovic *et al.*, 1997). D'ailleurs, les flux calciques se propagent d'une cellule à l'autre quand les populations de cardiomyocytes adhérents sont

denses et permettent les contacts intercellulaires (voir vidéo 1 sur le CD-ROM annexé). Par contre, chacun des cardiomyocytes de populations moins denses adopte son propre flux calcique (voir vidéo 2 sur le CD-ROM annexé).

La quantification de la fluorescence en fonction du temps a été faite pour 3 cellules, dont chacune provient d'une lamelle différente. Les cellules 1, 2 et 3 font partie des champs optiques représentés respectivement par la figure 3.9 A, B et C. Il est visible que la cellule 2 se situe dans un champ où la population de cardiomyocytes est plus dense que pour les cellules 1 et 3. Le marquage est bien circonscrit au cytoplasme, mais la fluorescence est plus intense près du noyau, probablement à cause de la forte localisation périnucléaire des réticulums sarcoplasmiques largueurs de Ca^{2+} .



Figure 3.9 Champs optiques contenant les cardiomyocytes étudiés. Les champs optiques dans lesquels se situent les cellules 1, 2 et 3 sont respectivement présentés en **A**, **B** et **C**.

La figure 3.10 présente les tracés issus de l'analyse quantitative de la fluorescence de ces cardiomyocytes en fonction du temps, avant l'ajout de CP. La fréquence des hausses de concentration calcique cytoplasmique est semblable pour les cellules 1 et 3. Quant à la cellule 2, qui se situe dans une population cellulaire plus dense, elle montre une fréquence moins élevée. Déjà, cette source de variabilité complique l'analyse. Malgré tout, l'allure des tracés rappelle ce qui a été obtenu par d'autres équipes (Sauer *et al.*, 2001 ; Toraason *et al.*, 1997). Aussi, il a été remarqué qu'une durée d'enregistrement trop longue, c'est-à-dire de 5 à 10 min, induit la hausse générale et permanente de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire des cardiomyocytes observés (non montré). Ce comportement découle probablement du stress occasionné par l'intensité du faisceau lumineux exciteur. Encore là, un autre défi technique

s'ajoute à l'analyse des cellules, qui supportent l'excitation lumineuse pendant une durée variable. Cette sensibilité lumineuse des cardiomyocytes a été considérée pour limiter à 1 min le temps d'enregistrement avant l'ajout de la CP.

La figure 3.11 montre l'effet de l'ajout de CP sur les fluctuations de la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique des cellules 1 à 3. Dans la cellule 1, aucune modification de la fréquence des fluctuations ne se fait remarquer. Dans la cellule 2, une réduction de l'amplitude des flux calciques semble se produire après l'ajout de CP et une accumulation cytoplasmique de Ca^{2+} débute environ 40 secondes après l'ajout. Il est difficile de déterminer si ces effets sont réellement dus à l'ajout de CP ou plutôt à l'intolérance des cardiomyocytes envers l'excitation lumineuse. Pour ce qui est de la cellule 3, qui possède pourtant une fréquence basale de flux calciques comparable à celle de la cellule 1, elle réagit en moins de 10 secondes à l'ajout de CP. La réaction de la cellule consiste en des fluctuations vives, rapides et soudaines de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Ce bref événement réduit ensuite à néant l'activité calcique cytoplasmique. À cause du caractère instantané de la réaction, il est pratiquement indubitable qu'elle soit vraiment créée par l'ajout de CP. Néanmoins, nébuleuse reste l'implication de la présence de CP dans le phénomène. En effet, il pourrait s'agir d'une réaction aux mouvements liquides du milieu extracellulaire suite à l'ajout manuel de la CP. D'autre part, il pourrait aussi s'agir d'une réaction au tampon KPi de la solution-mère de CP. Pourtant, l'ajout témoin du tampon a été tenté (non montré) mais, encore là, la réaction des cardiomyocytes demeure inconstante d'une lamelle à l'autre. Bref, les cellules 1, 2 et 3 réagissent différemment à l'ajout de CP. Cette expérience, ainsi que les dizaines de tests effectués sur 8 préparations différentes de cardiomyocytes, permettent de conclure au manque de reproductibilité de la réponse cellulaire vis-à-vis de l'ajout de substances ou de l'excitation lumineuse intense. Ainsi, malgré certaines réactions cellulaires, la méthode n'est pas encore parvenue à prouver l'effet de la CP sur le potentiel membranaire des cardiomyocytes.

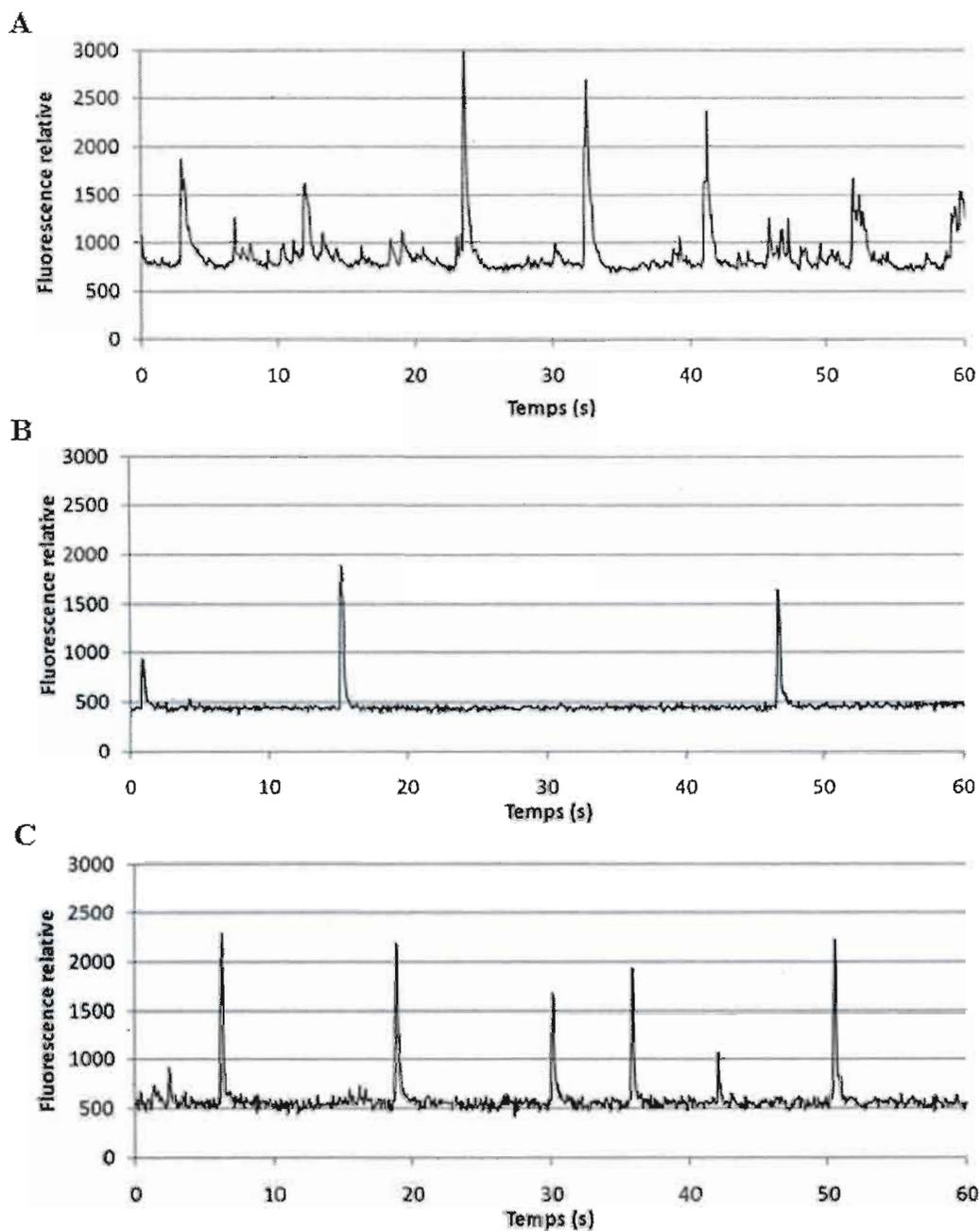


Figure 3.10 Fluctuations de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Les tracés des fluctuations de Ca^{2+} dans le cytoplasme des cellules 1 (A), 2 (B) et 3 (C) sont représentés quantitativement en fonction du temps, durant une période de 60 secondes.

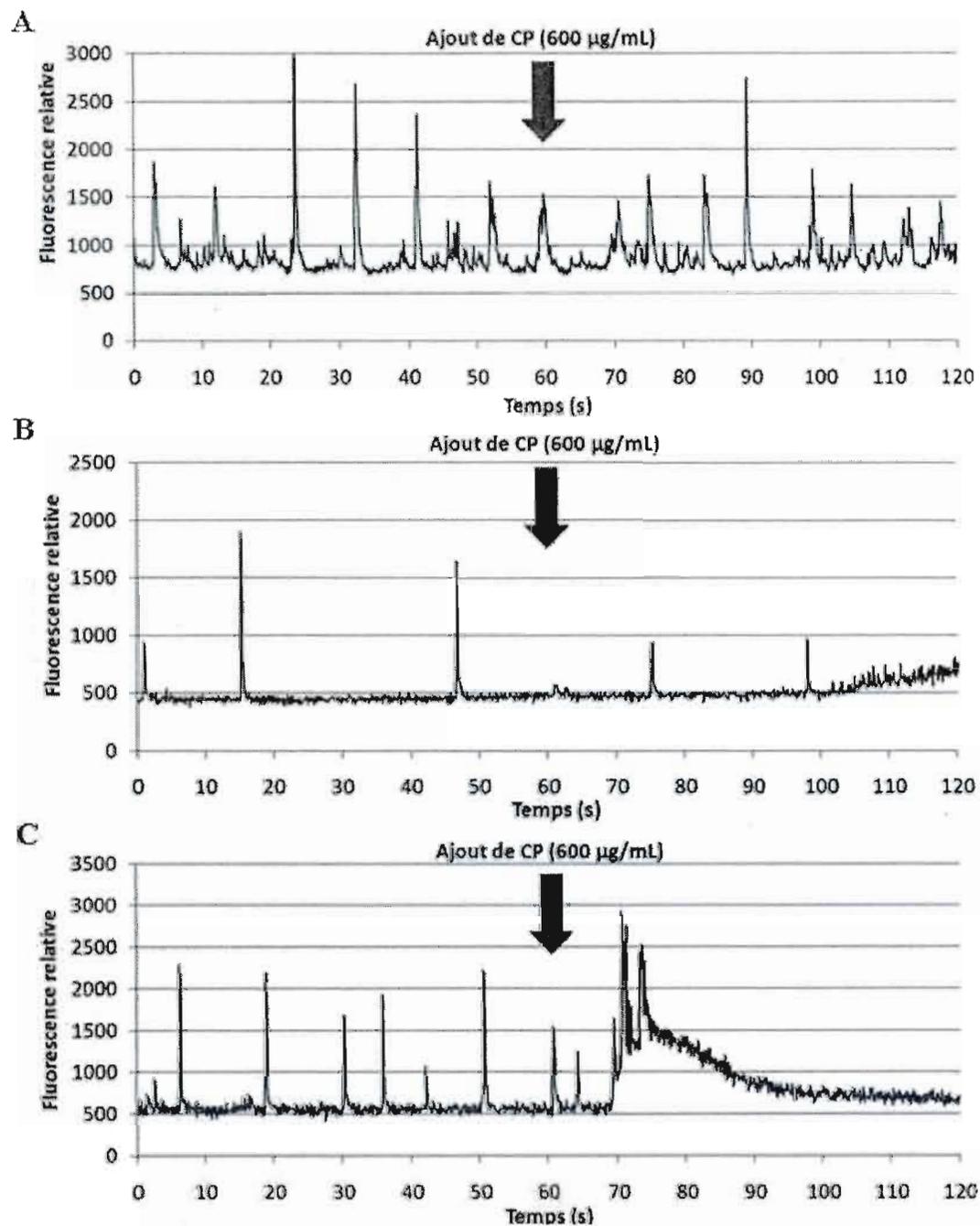


Figure 3.11 Effet de la CP sur les fluctuations de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . L'ajout de CP jusqu'à une concentration finale de $600 \mu\text{g/mL}$ influence différemment les flux calciques des cellules 1 (A), 2 (B) et 3 (C).

Il est à souligner qu'une exposition des cardiomyocytes à un champ électrique a été tentée dans le but de régulariser leur comportement contractile et électrochimique, mais cette initiative ne s'est pas révélée fructueuse (non montré). Aussi, l'ajout de plusieurs combinaisons de substances, incluant le GSH et le H_2O_2 , a été essayé et aucun résultat reproductible n'a pu en être tiré. L'ouabaine, la phényléphrine et le chlorure de tétraéthylammonium, pourtant reconnus pour agir sur les échanges ioniques des cardiomyocytes (Borchert *et al.*, 2008 ; Hallaq *et al.*, 1990 ; Zhu *et al.*, 2008), ont aussi donné des effets irréguliers et difficiles à analyser.

Un seul traitement a réussi à produire un effet reproductible chez les cardiomyocytes. Il s'agit de l'ajout massif de 20 mM de KCl. En effet, à tout coup, une accumulation de Ca^{2+} cytoplasmique se produit, comme rapporté dans la littérature (figure 3.12). En fait, l'utilisation de solutions hyperkaliémiques est courante pour la préservation de cœurs destinés à la transplantation, mais l'accumulation de Ca^{2+} constitue un facteur endommageant pour les cardiomyocytes (Jovanovic *et al.*, 1997). La vidéo 3 (voir CD-ROM annexé) représente en visible et en fluorescence les cardiomyocytes après l'enregistrement, c'est-à-dire en présence de l'excès de K^+ . La vidéo montre non seulement l'accumulation de Ca^{2+} cytoplasmique, mais aussi une sorte de fibrillation des cardiomyocytes, alors que la littérature est plutôt discrète à propos de cet effet de l'hyperkaliémie. Cette fibrillation est d'ailleurs aussi perceptible sur la figure 3.12, sous forme d'oscillations rapides de la fluorescence à partir de 80 secondes.

Enfin, la technique de suivi des battements des cardiomyocytes par microscopie de fluorescence dynamique comporte beaucoup de limites. Cependant, la capacité à observer de manière reproductible l'effet d'un excès de K^+ nourrit l'espoir qu'un travail d'optimisation pourrait rendre la technique très utile pour l'étude des contractions cellulaires cardiaques.

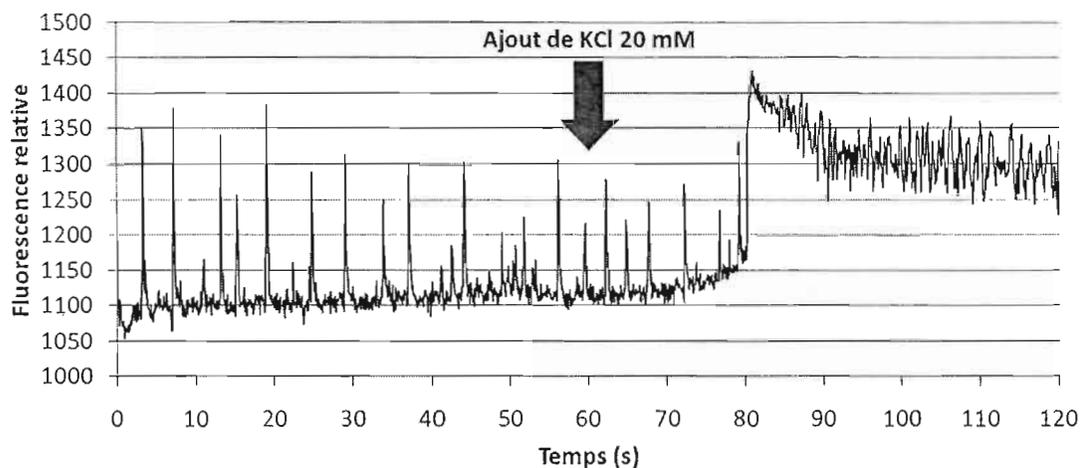


Figure 3.12 Accumulation de Ca^{2+} cytoplasmique et fibrillation chez les cardiomyocytes en milieu hyperkaliémique. L'ajout de KCl 20 mM provoque invariablement une accumulation calcique cytoplasmique et un genre de fibrillation chez les cardiomyocytes. Cet effet a été observé une quinzaine de fois, avec 2 préparations différentes de cardiomyocytes, après 4, 5 et 6 jours de culture.

3.3 Conclusions

L'hypothèse d'un mécanisme de cardioprotection impliquant un effet de la CP sur le potentiel membranaire par l'intermédiaire d'une interaction avec le K^+ a confirmé sa pertinence, grâce aux études de filtration sur gel et de dosage de l'activité oxydase de la CP. En effet, la co-élution du K^+ et de la CP lorsqu'ils sont déposés ensemble sur une colonne de Sephadex G-25 suggère fortement qu'ils partagent une liaison. Il serait d'ailleurs très intéressant que des équipes spécialisées dans la diffractométrie de rayons X illustrent davantage cette liaison en étudiant les potentiels sites de liaison spécifique du K^+ sur la CP. De plus, une telle étude apporterait davantage de précisions sur l'effet amplifiant du K^+ sur les activités amine-oxydase et ferroxidase de la CP.

Par contre, l'élégante technique microscopique de fluorescence, qui permet de suivre les battements des cardiomyocytes par l'intermédiaire des flux de Ca^{2+} intracellulaire, a montré de nombreuses limites pour l'étude de l'effet de la CP sur le potentiel membranaire. Malgré tout, il est envisageable qu'une optimisation de la technique puisse un jour permettre de mener de telles études avec pertinence, puisque certains phénomènes sont observables de

cette manière, comme l'induction de l'accumulation calcique cytoplasmique et l'effet profibrillatoire d'une surabondance de K^+ extracellulaire. Malgré l'insuccès à confirmer l'hypothèse d'un mécanisme de cardioprotection impliquant un effet de la CP sur le potentiel membranaire par l'intermédiaire d'une interaction avec le K^+ , rien ne l'a encore infirmée et d'autres stratégies pourraient aussi être envisagées pour tenter de savoir ce qui en est. Par exemple, la technique de patch-clamp, beaucoup plus éprouvée, pourrait permettre de définir l'implication de la CP sur le potentiel membranaire. De plus, une étude de liaison de la CP sur les cardiomyocytes pourrait révéler des récepteurs insoupçonnés, ou même des interactions avec des canaux à K^+ .

CHAPITRE IV : CONCLUSION GÉNÉRALE

Pour finir, le travail d'envergure réalisé dans le cadre de la maîtrise a permis d'éclaircir davantage le rôle potentiellement cardioprotecteur des activités NO-oxydase/RSNO-synthase et GSH-peroxydase de la CP, ce qui satisfait la première hypothèse. Malgré la confirmation de l'activité NO-oxydase/RSNO-synthase en milieu acellulaire, seule la combinaison de CP et de GSH a significativement protégé les cardiomyocytes de la mort induite par une exposition au H₂O₂. Le dosage acellulaire de l'activité GSH-peroxydase de la CP suggère un effet additif de piégeage du H₂O₂ par la CP et le GSH. Néanmoins, la présence de NO annule la protection significative procurée par la CP et le GSH, ce qui rend possible une régulation par S-nitrosation de l'activité GSH-peroxydase présumée.

La deuxième hypothèse, portant sur le probable effet protecteur de la CP sur le potentiel membranaire par l'intermédiaire d'une interaction avec le K⁺ a confirmé sa pertinence. En effet, les études de filtration sur gel et de dosage de l'activité oxydase de la CP ont confirmé l'interaction de cette dernière avec le K⁺. Par contre, l'élégante technique microscopique de fluorescence, qui permet de suivre les battements des cardiomyocytes par l'intermédiaire des flux de Ca²⁺ intracellulaire, a montré de nombreuses limites pour l'étude de l'effet de la CP sur le potentiel membranaire.

Enfin, la déplétion du H₂O₂ par la CP, assistée du GSH, est un mécanisme de cardioprotection plausible. L'implication des autres propriétés de la CP, soient celles d'agent dépolarisant et de NO-oxydase, n'a pu être confirmée, ni infirmée, mais mérite que des investigations supplémentaires lui soient dédiées.

RÉFÉRENCES

- Adelstein, S. J., T. L. Coombs et B. L. Vallee. 1956. «Metalloenzymes and myocardial infarction. I. The relation between serum copper and ceruloplasmin and its catalytic activity». *N Engl J Med.* vol. 255, no 3, p. 105-109.
- Akassoglou, K. 2005. «Nerve growth factor-independent neuronal survival: a role for NO donors». *Mol Pharmacol.* vol. 68, no 4, p. 952-955.
- Al-Timimi, D. J., et T. L. Dormandy. 1977. «The inhibition of lipid autoxidation by human caeruloplasmin». *Biochem J.* vol. 168, no 2, p. 283-288.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper et R. G. Knowles. 2001. «Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition». *Biochem J.* vol. 357, no Pt 3, p. 593-615.
- Alencar, J. L., I. Lobysheva, M. Geffard, M. Sarr, C. Schott, V. B. Schini-Kerth, F. Nepveu, J. C. Stoclet et B. Muller. 2003. «Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone». *Mol Pharmacol.* vol. 63, no 5, p. 1148-1158.
- Anderson, G. J., et C. D. Vulpe. 2009. «Mammalian iron transport». *Cell Mol Life Sci.* vol. 66, no 20, p. 3241-3261.
- Atanasiu, R., M. J. Dumoulin, R. Chahine, M. A. Mateescu et R. Nadeau. 1995. «Antiarrhythmic effects of ceruloplasmin during reperfusion in the ischemic isolated rat heart». *Can J Physiol Pharmacol.* vol. 73, no 9, p. 1253-1261.
- Atanasiu, R., L. Guoin, M. A. Mateescu, R. Cardinal et R. Nadeau. 1996. «Class III antiarrhythmic effects of ceruloplasmin on rat heart». *Can J Physiol Pharmacol.* vol. 74, no 6, p. 652-656.
- Atanasiu, R. L., D. Stea, M. A. Mateescu, C. Vergely, F. Dalloz, F. Briot, V. Maupoil, R. Nadeau et L. Rochette. 1998. «Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties». *Mol Cell Biochem.* vol. 189, no 1-2, p. 127-135.
- Auer, D. E., J. C. Ng, H. L. Thompson, S. Inglis et A. A. Seawright. 1989. «Acute phase response in horses: changes in plasma cation concentrations after localised tissue injury». *Vet Rec.* vol. 124, no 10, p. 235-239.
- Bai, C. X., K. Takahashi, H. Masumiya, T. Sawanobori et T. Furukawa. 2004. «Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng, in guinea-pig cardiomyocytes». *Br J Pharmacol.* vol. 142, no 3, p. 567-575.

- Banford, J. C., D. H. Brown, R. A. Hazelton, C. J. McNeil, R. D. Sturrock et W. E. Smith. 1982. «Serum copper and erythrocyte superoxide dismutase in rheumatoid arthritis». *Ann Rheum Dis*. vol. 41, no 5, p. 458-462.
- Béliveau, Richard, et Denis Gingras. 2005. *Les aliments contre le cancer : la prévention et le traitement du cancer par l'alimentation*. Outremont, Québec: Trécarré.
- Bellavite, P. 1988. «The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes». *Free Radic Biol Med*. vol. 4, no 4, p. 225-261.
- Bellavite, P., F. Corso, S. Dusi, M. Grzeskowiak, V. Della-Bianca et F. Rossi. 1988. «Activation of NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane extracts of pig neutrophils by phosphatidic acid». *J Biol Chem*. vol. 263, no 17, p. 8210-8214.
- Bento, I., C. Peixoto, V. N. Zaitsev et P. F. Lindley. 2007. «Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites». *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. vol. 63, no Pt 2, p. 240-248.
- Bertini, Ivano. 1994. *Bioinorganic chemistry*. Mill Valley, Calif.: University Science Books.
- Bharucha, K. J., J. K. Friedman, A. S. Vincent et E. D. Ross. 2008. «Lower serum ceruloplasmin levels correlate with younger age of onset in Parkinson's disease». *J Neurol*. vol. 255, no 12, p. 1957-1962.
- Bolotina, V. M., S. Najibi, J. J. Palacino, P. J. Pagano et R. A. Cohen. 1994. «Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle». *Nature*. vol. 368, no 6474, p. 850-853.
- Borchert, G. H., M. Giggey, F. Kolar, T. M. Wong, P. H. Backx et P. V. Escriba. 2008. «2-hydroxyoleic acid affects cardiomyocyte [Ca²⁺]_i transient and contractility in a region-dependent manner». *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. vol. 294, no 4, p. H1948-1955.
- Boron, Walter F., et Emile L. Boulpaep. 2009. *Medical physiology : a cellular and molecular approach*, 2e éd. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders/Elsevier.
- Borutaite, V., R. Morkuniene, O. Arandarcikaite, A. Jekabsone, J. Barauskaite et G. C. Brown. 2009. «Nitric oxide protects the heart from ischemia-induced apoptosis and mitochondrial damage via protein kinase G mediated blockage of permeability transition and cytochrome c release». *J Biomed Sci*. vol. 16, p. 70.

- Bouchard, Frédéric. 2007. *L'ocytocine dans la différenciation cardiomyogénique et adipogénique de cellules souches embryonnaires P19*. Mémoire de maîtrise. Montréal: Université du Québec à Montréal.
- Bredt, D. S., et S. H. Snyder. 1990. «Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 87, no 2, p. 682-685.
- Broniowska, K. A., Y. Zhang et N. Hogg. 2006. «Requirement of transmembrane transport for S-nitrosocysteine-dependent modification of intracellular thiols». *J Biol Chem*. vol. 281, no 45, p. 33835-33841.
- Brown, M. A., L. M. Stenberg et A. G. Mauk. 2002. «Identification of catalytically important amino acids in human ceruloplasmin by site-directed mutagenesis». *FEBS Lett*. vol. 520, no 1-3, p. 8-12.
- Brunetti, N. D., P. L. Pellegrino, M. Correale, L. De Gennaro, A. Cuculo et M. Di Biase. 2008. «Acute phase proteins and systolic dysfunction in subjects with acute myocardial infarction». *J Thromb Thrombolysis*. vol. 26, no 3, p. 196-202.
- Burley, D. S., P. Ferdinandy et G. F. Baxter. 2007. «Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling». *Br J Pharmacol*. vol. 152, no 6, p. 855-869.
- Bustamante, J. B., M. C. Mateo, J. Fernandez, B. de Quiros et O. O. Manchado. 1976. «Zinc, copper and ceruloplasmin in arteriosclerosis». *Biomedicine*. vol. 25, no 7, p. 244-245.
- Byette, Frédéric. 2010. *Matériaux à base de protéines avec applications biomédicales. La fibroïne de soie comme support pour culture cellulaire*. Mémoire de maîtrise. Montréal : Université du Québec à Montréal.
- Cadiou, H., M. Studer, N. G. Jones, E. S. Smith, A. Ballard, S. B. McMahon et P. A. McNaughton. 2007. «Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide». *J Neurosci*. vol. 27, no 48, p. 13251-13260.
- Calabrese, L., et M. Carbonaro. 1986. «An e.p.r. study of the non-equivalence of the copper sites of caeruloplasmin». *Biochem J*. vol. 238, no 1, p. 291-295.
- Calvert, J. W., et D. J. Lefter. 2009. «Myocardial protection by nitrite». *Cardiovasc Res*. vol. 83, no 2, p. 195-203.
- Canalli, A. A., C. F. Franco-Penteadó, S. T. Saad, N. Conran et F. F. Costa. 2008. «Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation». *Haematologica*. vol. 93, no 4, p. 605-609.

- Capo, C. R., M. Arciello, R. Squitti, E. Cassetta, P. M. Rossini, L. Calabrese et L. Rossi. 2008. «Features of ceruloplasmin in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients». *Biometals*. vol. 21, no 3, p. 367-372.
- Carrier, G. O., L. C. Fuchs, A. P. Winecoff, A. D. Giulumian et R. E. White. 1997. «Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels». *Am J Physiol*. vol. 273, no 1 Pt 2, p. H76-84.
- Cerbai, E., G. Ambrosio, F. Porciatti, M. Chiariello, A. Giotti et A. Mugelli. 1991. «Cellular electrophysiological basis for oxygen radical-induced arrhythmias. A patch-clamp study in guinea pig ventricular myocytes». *Circulation*. vol. 84, no 4, p. 1773-1782.
- Cha, M. K., et I. H. Kim. 1999. «Ceruloplasmin has a distinct active site for the catalyzing glutathione-dependent reduction of alkyl hydroperoxide». *Biochemistry*. vol. 38, no 37, p. 12104-12110.
- Chen, J., R. F. Crossland, M. M. Noorani et S. P. Marrelli. 2009. «Inhibition of TRPC1/TRPC3 by PKG contributes to NO-mediated vasorelaxation». *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. vol. 297, no 1, p. H417-424.
- Chen, K., et A. S. Popel. 2007. «Vascular and perivascular nitric oxide release and transport: biochemical pathways of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and endothelial nitric oxide synthase (NOS3)». *Free Radic Biol Med*. vol. 42, no 6, p. 811-822.
- Choi, S. Y., H. Y. Kwon, O. B. Kwon, W. S. Eum et J. H. Kang. 2000. «Fragmentation of human ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide». *Biochimie*. vol. 82, no 2, p. 175-180.
- Ciccarelli, M., E. Cipolletta, G. Santulli, A. Campanile, K. Pumiglia, P. Cervero, L. Pastore, D. Astone, B. Trimarco et G. Iaccarino. 2007. «Endothelial beta2 adrenergic signaling to AKT: role of Gi and SRC». *Cell Signal*. vol. 19, no 9, p. 1949-1955.
- Cohen, R. A., R. M. Weisbrod, M. Gericke, M. Yaghoubi, C. Bierl et V. M. Bolotina. 1999. «Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx». *Circ Res*. vol. 84, no 2, p. 210-219.
- Corde, S., J. L. Samuel et L. Rappaport. 2000. «Extracellular matrix and growth factors during heart growth». *Heart Fail Rev*. vol. 5, no 2, p. 119-130.
- Cottart, C. H., V. Nivet-Antoine, L. Do, G. Al-Massarani, G. Descamps, F. Xavier-Galen et J. P. Clot. 2003. «Hepatic cytoprotection by nitric oxide and the cGMP pathway after ischaemia-reperfusion in the rat». *Nitric Oxide*. vol. 9, no 2, p. 57-63.

- Cousins, R. J. 1985. «Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin». *Physiol Rev.* vol. 65, no 2, p. 238-309.
- CTSNet, Wiki Notes. 2008. «Coronary Arteries». En ligne. <<http://wiki.ctsnet.org/index.php?n=Main.CoronaryArteries>>. Consulté le 5 novembre 2009.
- Danson, E. J., D. Li, L. Wang, T. A. Dawson et D. J. Paterson. 2009. «Targeting cardiac sympatho-vagal imbalance using gene transfer of nitric oxide synthase». *J Mol Cell Cardiol.* vol. 46, no 4, p. 482-489.
- Dean, John Aurie, et Norbert Adolph Lange. 1985. *Lange's handbook of chemistry*, 13th. New York ; London: McGraw-Hill.
- DeMaster, E. G., B. J. Quast, B. Redfern et H. T. Nagasawa. 1995. «Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide». *Biochemistry.* vol. 34, no 36, p. 11494-11499.
- Déry, Bernard. 2005-2009. «Cœur». En ligne. <http://www.infovisual.info/03/062_fr.html>. Consulté le 5 novembre 2009.
- Di Raimondo, D., A. Pinto, A. Tuttolomondo, P. Fernandez, C. Camaschella et G. Licata. 2008. «Aceruloplasminemia: a case report». *Intern Emerg Med.* vol. 3, no 4, p. 395-399.
- Ducharme, P., D. Maltais, D. Desroches, M. A. Mateescu et J. Paquin. 2010. «Ceruloplasmin-induced aggregation of P19 neurons involves a serine protease activity and is accompanied by reelin cleavage». *Neuroscience*.
- Ducharme, Philippe. 2007. *L'action neuroagréative de la céruloplasmine impliquerait une activité protéolytique*. Mémoire de maîtrise. Montréal: Université du Québec à Montréal.
- Dumoulin, M. J., R. Chahine, R. Atanasiu, R. Nadeau et M. A. Mateescu. 1996. «Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin». *Arzneimittelforschung.* vol. 46, no 9, p. 855-861.
- Dun, N. J., S. L. Dun, U. Forstermann et L. F. Tseng. 1992. «Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord». *Neurosci Lett.* vol. 147, no 2, p. 217-220.
- Dun, N. J., S. L. Dun, S. Y. Wu et U. Forstermann. 1993. «Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands». *Neurosci Lett.* vol. 158, no 1, p. 51-54.

- Eghbali, M., O. O. Blumenfeld, S. Seifter, P. M. Buttrick, L. A. Leinwand, T. F. Robinson, M. A. Zern et M. A. Giambone. 1989. «Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization». *J Mol Cell Cardiol.* vol. 21, no 1, p. 103-113.
- Eghbali, M., M. J. Czaja, M. Zeydel, F. R. Weiner, M. A. Zern, S. Seifter et O. O. Blumenfeld. 1988. «Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats». *J Mol Cell Cardiol.* vol. 20, no 3, p. 267-276.
- Eghbali, M., R. Tomek, C. Woods et B. Bhambi. 1991. «Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 88, no 3, p. 795-799.
- Erel, O. 1998. «Automated measurement of serum ferroxidase activity». *Clin Chem.* vol. 44, no 11, p. 2313-2319.
- Fitch, C. A., Y. Song et C. W. Levenson. 1999. «Developmental regulation of hepatic ceruloplasmin mRNA and serum activity by exogenous thyroxine and dexamethasone». *Proc Soc Exp Biol Med.* vol. 221, no 1, p. 27-31.
- Fontana, J., D. Fulton, Y. Chen, T. A. Fairchild, T. J. McCabe, N. Fujita, T. Tsuruo et W. C. Sessa. 2002. «Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release». *Circ Res.* vol. 90, no 8, p. 866-873.
- Fontijn, Arthur. 1985. *Gas-phase chemiluminescence and chemi-ionization*. Amsterdam ; New York: North Holland.
- Forstermann, U., E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath et H. Kleinert. 1994. «Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions». *Hypertension.* vol. 23, no 6 Pt 2, p. 1121-1131.
- Forstermann, U., L. D. Gorsky, J. S. Pollock, K. Ishii, H. H. Schmidt, M. Heller et F. Murad. 1990. «Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin». *Mol Pharmacol.* vol. 38, no 1, p. 7-13.
- Forstermann, U., J. S. Pollock, H. H. Schmidt, M. Heller et F. Murad. 1991. «Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 88, no 5, p. 1788-1792.

- Fortna, R. R., H. A. Watson et S. E. Nyquist. 1999. «Glycosyl phosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is expressed by rat Sertoli cells and is concentrated in detergent-insoluble membrane fractions». *Biol Reprod.* vol. 61, no 4, p. 1042-1049.
- Fox, P. L. 2003. «The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship». *Biometals.* vol. 16, no 1, p. 9-40.
- Fox, P. L., B. Mazumder, E. Ehrenwald et C. K. Mukhopadhyay. 2000. «Ceruloplasmin and cardiovascular disease». *Free Radic Biol Med.* vol. 28, no 12, p. 1735-1744.
- Fox, P. L., C. Mukhopadhyay et E. Ehrenwald. 1995. «Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin». *Life Sci.* vol. 56, no 21, p. 1749-1758.
- Furchgott, R. F., et J. V. Zawadzki. 1980. «The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine». *Nature.* vol. 288, no 5789, p. 373-376.
- Fuster, Valentin. 2008. *Hurst's the heart*, 12th. New York: McGraw-Hill Medical.
- Gagné, Josianne. 2008. «La céruloplasmine et l'oxyde nitrique dans la protection des cellules cardiaques». Mémoire de maîtrise. Montréal, Université du Québec à Montréal.
- Geller, D. A., et T. R. Billiar. 1998. «Molecular biology of nitric oxide synthases». *Cancer Metastasis Rev.* vol. 17, no 1, p. 7-23.
- Gibbs, Frederick William. 1965. *Joseph Priestley, adventurer in science and champion of truth*. London, Ont: Nelson.
- Girard, James. 2005. *Principles of environmental chemistry*. Sudbury, MA: Jones and Bartlett Publishers.
- Gitlin, J. D. 1999. «The sky blue protein». *J Lab Clin Med.* vol. 134, no 5, p. 431-432.
- Gladwin, M. T., J. H. Shelhamer, A. N. Schechter, M. E. Pease-Fye, M. A. Waclawiw, J. A. Panza, F. P. Ognibene et R. O. Cannon, 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.* vol. 97, no 21, p. 11482-11487.
- Goldstein, I. M., H. B. Kaplan, H. S. Edelson et G. Weissmann. 1979. «Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals». *J Biol Chem.* vol. 254, no 10, p. 4040-4045.

- Gonzalez, D. R., F. Beigi, A. V. Treuer et J. M. Hare. 2007. «Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 104, no 51, p. 20612-20617.
- Gonzalez, D. R., I. C. Fernandez, P. P. Ordenes, A. V. Treuer, G. Eller et M. P. Boric. 2008. «Differential role of S-nitrosylation and the NO-cGMP-PKG pathway in cardiac contractility». *Nitric Oxide*. vol. 18, no 3, p. 157-167.
- Griffiths, T. A., A. G. Mauk et R. T. MacGillivray. 2005. «Recombinant expression and functional characterization of human hephaestin: a multicopper oxidase with ferroxidase activity». *Biochemistry*. vol. 44, no 45, p. 14725-14731.
- Gruetter, D. Y., C. A. Gruetter, B. K. Barry, W. H. Baricos, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz et L. J. Ignarro. 1980. «Activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside, and nitrosoguanidine--inhibition by calcium, lanthanum, and other cations, enhancement by thiols». *Biochem Pharmacol*. vol. 29, no 21, p. 2943-2950.
- Guller, S., C. S. Buhimschi, Y. Y. Ma, S. T. Huang, L. Yang, E. Kuczynski, E. Zambrano, C. J. Lockwood et I. A. Buhimschi. 2008. «Placental expression of ceruloplasmin in pregnancies complicated by severe preeclampsia». *Lab Invest*. vol. 88, no 10, p. 1057-1067.
- Guo, Y., X. Z. Zhang, Y. Wei, C. Guo, R. X. Li, Q. C. Zeng et Y. J. Zhang. 2009. «Culturing of ventricle cells at high density and construction of engineered cardiac cell sheets without scaffold». *Int Heart J*. vol. 50, no 5, p. 653-662.
- Hallaq, H., A. Sellmayer, T. W. Smith et A. Leaf. 1990. «Protective effect of eicosapentaenoic acid on ouabain toxicity in neonatal rat cardiac myocytes». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 87, no 20, p. 7834-7838.
- Halliwell, Barry, et John M. C. Gutteridge. 2007. *Free radicals in biology and medicine*, 4e éd. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Han, D., E. Williams et E. Cadenas. 2001. «Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space». *Biochem J*. vol. 353, no Pt 2, p. 411-416.
- Haqqani, A. S., S. K. Do et H. C. Birnboim. 2003. «The role of a formaldehyde dehydrogenase-glutathione pathway in protein S-nitrosation in mammalian cells». *Nitric Oxide*. vol. 9, no 3, p. 172-181.
- Hare, J. M. 2003. «Nitric oxide and excitation-contraction coupling». *J Mol Cell Cardiol*. vol. 35, no 7, p. 719-729.

- Hassall, C. J., M. J. Saffrey, A. Belai, C. H. Hoyle, E. W. Moules, J. Moss, H. H. Schmidt, F. Murad, U. Forstermann et G. Burnstock. 1992. «Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in a subpopulation of intrinsic neurones of the guinea-pig heart». *Neurosci Lett.* vol. 143, no 1-2, p. 65-68.
- Healy, J., et K. Tipton. 2007. «Ceruloplasmin and what it might do». *J Neural Transm.* vol. 114, no 6, p. 777-781.
- HeartPoint. 1997. «Heart Attack». En ligne. <<http://www.heartpoint.com/mimore.html>>. Consulté le 5 novembre 2009.
- Heinecke, J. W., W. Li, G. A. Francis et J. A. Goldstein. 1993. «Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins». *J Clin Invest.* vol. 91, no 6, p. 2866-2872.
- Hellman, N. E., S. Kono, G. M. Mancini, A. J. Hoogeboom, G. J. De Jong et J. D. Gitlin. 2002. «Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin». *J Biol Chem.* vol. 277, no 48, p. 46632-46638.
- Hellman, N. E., M. Schaefer, S. Gehrke, P. Stegen, W. J. Hoffman, J. D. Gitlin et W. Stremmel. 2000. «Hepatic iron overload in aceruloplasminaemia». *Gut.* vol. 47, no 6, p. 858-860.
- Hernandez-Pacheco, A., C. I. Araiza-Saldana, V. Granados-Soto et T. Mixcoatl-Zecuatl. 2008. «Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K+ channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin». *Eur J Pharmacol.* vol. 596, no 1-3, p. 70-76.
- Hille, R., et V. Massey. 1981. «Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase». *J Biol Chem.* vol. 256, no 17, p. 9090-9095.
- Hogg, N. 1999. «The kinetics of S-transnitrosation--a reversible second-order reaction». *Anal Biochem.* vol. 272, no 2, p. 257-262.
- Hogg, N., K. A. Broniowska, J. Novalija, N. J. Kettenhofen et E. Novalija. 2007. «Role of S-nitrosothiol transport in the cardioprotective effects of S-nitrosocysteine in rat hearts». *Free Radic Biol Med.* vol. 43, no 7, p. 1086-1094.
- Huang, J., H. Zhou, S. Mahavadi, W. Sriwai et K. S. Murthy. 2007. «Inhibition of Galphaq-dependent PLC-beta1 activity by PKG and PKA is mediated by phosphorylation of RGS4 and GRK2». *Am J Physiol Cell Physiol.* vol. 292, no 1, p. C200-208.
- Huie, R. E., et S. Padmaja. 1993. «The reaction of NO with superoxide». *Free Radic Res Commun.* vol. 18, no 4, p. 195-199.

- Hunter, J. C., A. Zeidan, S. Javadov, A. Kilic, V. Rajapurohitam et M. Karmazyn. 2009. «Nitric oxide inhibits endothelin-1-induced neonatal cardiomyocyte hypertrophy via a RhoA-ROCK-dependent pathway». *J Mol Cell Cardiol.* vol. 47, no 6, p. 810-818.
- Ignarro, L. J., R. E. Byrns, G. M. Buga et K. S. Wood. 1987. «Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical». *Circ Res.* vol. 61, no 6, p. 866-879.
- Inoue, K., T. Akaike, Y. Miyamoto, T. Okamoto, T. Sawa, M. Otagiri, S. Suzuki, T. Yoshimura et H. Maeda. 1999. «Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo». *J Biol Chem.* vol. 274, no 38, p. 27069-27075.
- Irwin, C., W. Roberts et K. M. Naseem. 2009. «Nitric oxide inhibits platelet adhesion to collagen through cGMP-dependent and independent mechanisms: the potential role for S-nitrosylation». *Platelets.* vol. 20, no 7, p. 478-486.
- Ischiropoulos, H., L. Zhu et J. S. Beckman. 1992. «Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide». *Arch Biochem Biophys.* vol. 298, no 2, p. 446-451.
- Ischiropoulos, H., L. Zhu, J. Chen, M. Tsai, J. C. Martin, C. D. Smith et J. S. Beckman. 1992. «Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase». *Arch Biochem Biophys.* vol. 298, no 2, p. 431-437.
- Jayakumari, N., V. Ambikakumari, K. G. Balakrishnan et K. S. Iyer. 1992. «Antioxidant status in relation to free radical production during stable and unstable anginal syndromes». *Atherosclerosis.* vol. 94, no 2-3, p. 183-190.
- Jeong, S. Y., et S. David. 2003. «Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system». *J Biol Chem.* vol. 278, no 29, p. 27144-27148.
- Jiang, L. H., D. J. Gawler, N. Hodson, C. J. Milligan, H. A. Pearson, V. Porter et D. Wray. 2000. «Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase». *J Biol Chem.* vol. 275, no 9, p. 6135-6143.
- Jovanovic, A., A. E. Alekseev, J. R. Lopez, W. K. Shen et A. Terzic. 1997. «Adenosine prevents hyperkalemia-induced calcium loading in cardiac cells: relevance for cardioplegia». *Ann Thorac Surg.* vol. 63, no 1, p. 153-161.

- Karabudak, O., R. E. Ulusoy, A. A. Eripci, E. Solmazgul, B. Dogan et Y. Harmanyceri. 2008. «Inflammation and hypercoagulable state in adult psoriatic men». *Acta Derm Venereol.* vol. 88, no 4, p. 337-340.
- Katsuki, S., W. Arnold, C. Mittal et F. Murad. 1977. «Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine». *J Cyclic Nucleotide Res.* vol. 3, no 1, p. 23-35.
- Kawano, T., V. Zoga, M. Kimura, M. Y. Liang, H. E. Wu, G. Gemes, J. B. McCallum, W. M. Kwok, Q. H. Hogan et C. D. Sarantopoulos. 2009. «Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation». *Mol Pain.* vol. 5, p. 12.
- Keefer, L. K., R. W. Nims, K. M. Davies et D. A. Wink. 1996. «"NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms». *Methods Enzymol.* vol. 268, p. 281-293.
- Kelley, E. E., B. A. Wagner, G. R. Buettner et C. P. Burns. 1999. «Nitric oxide inhibits iron-induced lipid peroxidation in HL-60 cells». *Arch Biochem Biophys.* vol. 370, no 1, p. 97-104.
- Kharitonov, V. G., A. R. Sundquist et V. S. Sharma. 1995. «Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen». *J Biol Chem.* vol. 270, no 47, p. 28158-28164.
- Kim, B. E., T. Nevitt et D. J. Thiele. 2008. «Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation». *Nat Chem Biol.* vol. 4, no 3, p. 176-185.
- Kim, I. G., et S. Y. Park. 1998. «Requirement of intact human ceruloplasmin for the glutathione-linked peroxidase activity». *FEBS Lett.* vol. 437, no 3, p. 293-296.
- Kim, I. G., S. Y. Park, K. C. Kim et J. J. Yum. 1998. «Thiol-linked peroxidase activity of human ceruloplasmin». *FEBS Lett.* vol. 431, no 3, p. 473-475.
- Kim, J. S., S. Ohshima, P. Pediaditakis et J. J. Lemasters. 2004. «Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition- and pH-dependent cell death after reperfusion». *Free Radic Biol Med.* vol. 37, no 12, p. 1943-1950.
- Kim, R. H., J. E. Park et J. W. Park. 2000. «Ceruloplasmin enhances DNA damage induced by hydrogen peroxide in vitro». *Free Radic Res.* vol. 33, no 1, p. 81-89.
- Kleinert, H., A. Pautz, K. Linker et P. M. Schwarz. 2004. «Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase». *Eur J Pharmacol.* vol. 500, no 1-3, p. 255-266.

- Klevay, L. M. 2008. «Alzheimer's disease as copper deficiency». *Med Hypotheses*. vol. 70, no 4, p. 802-807.
- Klink, M., K. Bednarska, K. Jastrzemska, M. Banasik et Z. Sulowska. 2007. «Signal transduction pathways affected by nitric oxide donors during neutrophil functional response in vitro». *Inflamm Res*. vol. 56, no 7, p. 282-290.
- Koesling, D., M. Russwurm, E. Mergia, F. Mullershausen et A. Friebe. 2004. «Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation». *Neurochem Int*. vol. 45, no 6, p. 813-819.
- Koo, Y. K., J. M. Kim, S. Y. Kim, J. Yong Koo, D. Oh, S. Park et H. S. Yun-Choi. 2009. «Elevated plasma concentration of NO and cGMP may be responsible for the decreased platelet aggregation and platelet leukocyte conjugation in platelets hyporesponsive to catecholamines». *Platelets*. vol. 20, no 8, p. 555-565.
- Koppenol, W. H. 2001. «The Haber-Weiss cycle--70 years later». *Redox Rep*. vol. 6, no 4, p. 229-234.
- Koppenol, W. H., J. J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos et J. S. Beckman. 1992. «Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide». *Chem Res Toxicol*. vol. 5, no 6, p. 834-842.
- Korkmaz, S., T. Radovits, E. Barnucz, K. Hirschberg, P. Neugebauer, S. Loganathan, G. Veres, S. Pali, B. Seidel, S. Zollner, M. Karck et G. Szabo. 2009. «Pharmacological activation of soluble guanylate cyclase protects the heart against ischemic injury». *Circulation*. vol. 120, no 8, p. 677-686.
- Koshland, D. E., Jr. 1992. «The molecule of the year». *Science*. vol. 258, no 5090, p. 1861.
- Kotrikadze, N., M. Alibegashvili, M. Zibzivadze, N. Abashidze, T. Chigogidze, L. Managadze et K. Artsivadze. 2008. «Activity and content of antioxidant enzymes in prostate tumors». *Exp Oncol*. vol. 30, no 3, p. 244-247.
- Kruger, M., S. Kotter, A. Grutzner, P. Lang, C. Andresen, M. M. Redfield, E. Butt, C. G. dos Remedios et W. A. Linke. 2009. «Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs». *Circ Res*. vol. 104, no 1, p. 87-94.
- Kruszewski, M. 2003. «Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress». *Mutat Res*. vol. 531, no 1-2, p. 81-92.

- Kuchan, M. J., et J. A. Frangos. 1993. «Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells». *Am J Physiol.* vol. 264, no 1 Pt 2, p. H150-156.
- Lim, S. Y., M. Raftery, H. Cai, K. Hsu, W. X. Yan, H. L. Hseih, R. N. Watts, D. Richardson, S. Thomas, M. Perry et C. L. Geczy. 2008. «S-nitrosylated S100A8: novel anti-inflammatory properties». *J Immunol.* vol. 181, no 8, p. 5627-5636.
- Little, Robert C. 1985. *Physiology of the heart and circulation*, 3e éd. Chicago: Year Book Medical.
- Lopez-Sanchez, L. M., F. J. Corrales, M. De La Mata, J. Muntane et A. Rodriguez-Ariza. 2008. «Detection and proteomic identification of S-nitrosated proteins in human hepatocytes». *Methods Enzymol.* vol. 440, p. 273-281.
- Loscalzo, Joseph, et Joseph A. Vita. 2000. *Nitric oxide and the cardiovascular system*. Totowa, N.J.: Humana Press.
- Maltais, D., D. Desroches, M. Aouffen, M. A. Mateescu, R. Wang et J. Paquin. 2003. «The blue copper ceruloplasmin induces aggregation of newly differentiated neurons: a potential modulator of nervous system organization». *Neuroscience.* vol. 121, no 1, p. 73-82.
- Maltais, Domynick. 2001. «La céruloplasmine : protéine à cuivre bleu ayant un rôle potentiel de modulateur de l'organisation neuronale». Mémoire de maîtrise. Montréal, Université du Québec à Montréal.
- Marsh, N., et A. Marsh. 2000. «A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology». *Clin Exp Pharmacol Physiol.* vol. 27, no 4, p. 313-319.
- Masters, B. S., K. McMillan, E. A. Sheta, J. S. Nishimura, L. J. Roman et P. Martasek. 1996. «Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO. as a cellular signal». *FASEB J.* vol. 10, no 5, p. 552-558.
- Mayer, B., M. John et E. Bohme. 1990. «Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin». *FEBS Lett.* vol. 277, no 1-2, p. 215-219.
- Mendes-Ribeiro, A. C., G. E. Mann, L. R. de Meirelles, M. B. Moss, C. Matsuura et T. M. Brunini. 2009. «The role of exercise on L-arginine nitric oxide pathway in chronic heart failure». *Open Biochem J.* vol. 3, p. 55-65.

- Merriam-Webster Inc. (2007). Merriam-Webster's medical dictionary. Springfield, Massachusetts, Merriam-Webster: 1005 p
- Miclescu, A., et T. Gordh. 2009. «Nitric oxide and pain: 'Something old, something new'». *Acta Anaesthesiol Scand.* vol. 53, no 9, p. 1107-1120.
- Minta, A., J. P. Kao et R. Y. Tsien. 1989. «Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores». *J Biol Chem.* vol. 264, no 14, p. 8171-8178.
- Moncada, S., R. M. Palmer et E. A. Higgs. 1991. «Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology». *Pharmacol Rev.* vol. 43, no 2, p. 109-142.
- Morell, A. G., R. A. Irvine, I. Sternlieb, I. H. Scheinberg et G. Ashwell. 1968. «Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo». *J Biol Chem.* vol. 243, no 1, p. 155-159.
- Mudd, J. O., et D. A. Kass. 2008. «Tackling heart failure in the twenty-first century». *Nature.* vol. 451, no 7181, p. 919-928.
- Muller, F. L., Y. Liu, M. A. Abdul-Ghani, M. S. Lustgarten, A. Bhattacharya, Y. C. Jang et H. Van Remmen. 2008. «High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates». *Biochem J.* vol. 409, no 2, p. 491-499.
- Muller, F. L., Y. Liu et H. Van Remmen. 2004. «Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane». *J Biol Chem.* vol. 279, no 47, p. 49064-49073.
- Murthy, K. S., et H. Zhou. 2003. «Selective phosphorylation of the IP₃R-I in vivo by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* vol. 284, no 2, p. G221-230.
- Musci, G., G. C. Bellenchi et L. Calabrese. 1999. «The multifunctional oxidase activity of ceruloplasmin as revealed by anion binding studies». *Eur J Biochem.* vol. 265, no 2, p. 589-597.
- Nakane, M., H. H. Schmidt, J. S. Pollock, U. Forstermann et F. Murad. 1993. «Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle». *FEBS Lett.* vol. 316, no 2, p. 175-180.
- NCBI. 2009. «BLAST: Basic Local Alignment Search Tool». En ligne. <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Consulté le 30 novembre 2009.

- Osaki, S. 1966. «Kinetic studies of ferrous ion oxidation with crystalline human ferroxidase (ceruloplasmin)». *J Biol Chem.* vol. 241, no 21, p. 5053-5059.
- Osaki, S., et O. Walaas. 1967. «Kinetic studies of ferrous ion oxidation with crystalline human ferroxidase. II. Rate constants at various steps and formation of a possible enzyme-substrate complex». *J Biol Chem.* vol. 242, no 11, p. 2653-2657.
- Page, M. J., et E. Di Cera. 2006. «Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function». *Physiol Rev.* vol. 86, no 4, p. 1049-1092.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige et S. Moncada. 1987. «Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor». *Nature.* vol. 327, no 6122, p. 524-526.
- Park, Y., I. S. Lee, E. J. Joo, B. S. Hahn et Y. S. Kim. 2009. «A novel and one-step purification of human ceruloplasmin by acharan sulfate affinity chromatography». *Arch Pharm Res.* vol. 32, no 5, p. 693-698.
- Park, Y. S., K. Suzuki, N. Taniguchi et J. M. Gutteridge. 1999. «Glutathione peroxidase-like activity of caeruloplasmin as an important lung antioxidant». *FEBS Lett.* vol. 458, no 2, p. 133-136.
- Patel, B. N., et S. David. 1997. «A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes». *J Biol Chem.* vol. 272, no 32, p. 20185-20190.
- Plank, D. M., et M. A. Sussman. 2003. «Intracellular Ca²⁺ measurements in live cells by rapid line scan confocal microscopy: simplified calibration methodology». *Methods Cell Sci.* vol. 25, no 3-4, p. 123-133.
- Poteser, M., C. Romanin, W. Schreibmayer, B. Mayer et K. Groschner. 2001. «S-nitrosation controls gating and conductance of the alpha 1 subunit of class C L-type Ca(2+) channels». *J Biol Chem.* vol. 276, no 18, p. 14797-14803.
- Poulos, T. L. 2006. «Soluble guanylate cyclase». *Curr Opin Struct Biol.* vol. 16, no 6, p. 736-743.
- Prime, T. A., F. H. Blaikie, C. Evans, S. M. Nadtochiy, A. M. James, C. C. Dahm, D. A. Vitturi, R. P. Patel, C. R. Hiley, I. Abakumova, R. Requejo, E. T. Chouchani, T. R. Hurd, J. F. Garvey, C. T. Taylor, P. S. Brookes, R. A. Smith et M. P. Murphy. 2009. «A mitochondria-targeted S-nitrosothiol modulates respiration, nitrosates thiols, and protects against ischemia-reperfusion injury». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 106, no 26, p. 10764-10769.

- Pryor, W. A., J. N. Lemercier, H. Zhang, R. M. Uppu et G. L. Squadrito. 1997. «The catalytic role of carbon dioxide in the decomposition of peroxynitrite». *Free Radic Biol Med.* vol. 23, no 2, p. 331-338.
- Radi, Z. A., et Y. Murad. 2009. «Cellular expression of renal, cardiac and pulmonary inducible nitric oxide synthase in double-transgenic mice expressing human renin and angiotensinogen genes». *Clin Exp Pharmacol Physiol.* vol. 36, no 5-6, p. 571-575.
- Rathore, K. I., B. J. Kerr, A. Redensek, R. Lopez-Vales, S. Y. Jeong, P. Ponka et S. David. 2008. «Ceruloplasmin protects injured spinal cord from iron-mediated oxidative damage». *J Neurosci.* vol. 28, no 48, p. 12736-12747.
- Reif, A., L. G. Frohlich, P. Kotsonis, A. Frey, H. M. Bommel, D. A. Wink, W. Pfeleiderer et H. H. Schmidt. 1999. «Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase». *J Biol Chem.* vol. 274, no 35, p. 24921-24929.
- Rice-Evans, Catherine, et K. Richard Bruckdorfer. 1995. *Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction*. Coll. «Portland Press research monograph 7». London: Portland Press.
- Romeo, J., D. Jimenez-Pavon, M. Cervantes-Borunda, J. Warnberg, S. Gomez-Martinez, M. J. Castillo et A. Marcos. 2008. «Immunological changes after a single bout of moderate-intensity exercise in a hot environment». *J Physiol Biochem.* vol. 64, no 3, p. 197-204.
- Romero, J. M., et O. A. Bizzozero. 2006. «Extracellular S-nitrosoglutathione, but not S-nitrosocysteine or N(2)O(3), mediates protein S-nitrosation in rat spinal cord slices». *J Neurochem.* vol. 99, no 4, p. 1299-1310.
- Russwurm, M., et D. Koesling. 2004. «NO activation of guanylyl cyclase». *EMBO J.* vol. 23, no 22, p. 4443-4450.
- Saffrey, M. J., C. J. Hassall, C. H. Hoyle, A. Belai, J. Moss, H. H. Schmidt, U. Forstermann, F. Murad et G. Burnstock. 1992. «Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in cultured myenteric neurones». *Neuroreport.* vol. 3, no 4, p. 333-336.
- Satoh, H., et K. Matsui. 1997. «Electrical and mechanical modulations by oxygen-derived free-radical generating systems in guinea-pig heart muscles». *J Pharm Pharmacol.* vol. 49, no 5, p. 505-510.

- Sauer, H., T. Theben, J. Hescheler, M. Lindner, M. C. Brandt et M. Wartenberg. 2001. «Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells». *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. vol. 281, no 1, p. H411-421.
- Scharfstein, J. S., J. F. Keane, Jr., A. Slivka, G. N. Welch, J. A. Vita, J. S. Stamler et J. Loscalzo. 1994. «In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols». *J Clin Invest*. vol. 94, no 4, p. 1432-1439.
- Schmidt, H. H., G. D. Gagne, M. Nakane, J. S. Pollock, M. F. Miller et F. Murad. 1992. «Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction». *J Histochem Cytochem*. vol. 40, no 10, p. 1439-1456.
- Schmidt, H. H., J. S. Pollock, M. Nakane, L. D. Gorsky, U. Forstermann et F. Murad. 1991. «Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 88, no 2, p. 365-369.
- Schmidt, H. H., T. D. Warner, K. Ishii, H. Sheng et F. Murad. 1992. «Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides». *Science*. vol. 255, no 5045, p. 721-723.
- Scholten, A., T. T. Aye et A. J. Heck. 2008. «A multi-angular mass spectrometric view at cyclic nucleotide dependent protein kinases: in vivo characterization and structure/function relationships». *Mass Spectrom Rev*. vol. 27, no 4, p. 331-353.
- Segal, A. W. 1989. «The electron transport chain of the microbicidal oxidase of phagocytic cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease». *J Clin Invest*. vol. 83, no 6, p. 1785-1793.
- Segal, A. W., et A. Abo. 1993. «The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes». *Trends Biochem Sci*. vol. 18, no 2, p. 43-47.
- Selvakumar, B., R. L. Haganir et S. H. Snyder. 2009. «S-nitrosylation of stargazin regulates surface expression of AMPA-glutamate neurotransmitter receptors». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 106, no 38, p. 16440-16445.
- Sheng, H., G. D. Gagne, T. Matsumoto, M. F. Miller, U. Forstermann et F. Murad. 1993. «Nitric oxide synthase in bovine superior cervical ganglion». *J Neurochem*. vol. 61, no 3, p. 1120-1126.
- Sheng, H., H. H. Schmidt, M. Nakane, J. A. Mitchell, J. S. Pollock, U. Forstermann et F. Murad. 1992. «Characterization and localization of nitric oxide synthase in non-

- adrenergic non-cholinergic nerves from bovine retractor penis muscles». *Br J Pharmacol.* vol. 106, no 4, p. 768-773.
- Shiva, S., X. Wang, L. A. Ringwood, X. Xu, S. Yuditskaya, V. Annavajjhala, H. Miyajima, N. Hogg, Z. L. Harris et M. T. Gladwin. 2006. «Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis». *Nat Chem Biol.* vol. 2, no 9, p. 486-493.
- Shreffler, D. C., G. J. Brewer, J. C. Gall et M. S. Honeyman. 1967. «Electrophoretic variation in human serum ceruloplasmin: a new genetic polymorphism». *Biochem Genet.* vol. 1, no 2, p. 101-115.
- Silverthorn, Dee Unglaub. 2007. *Physiologie humaine : une approche intégrée*, 4e éd. Paris: Pearson Education France.
- Singh, R. J., N. Hogg, J. Joseph et B. Kalyanaraman. 1996. «Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols». *J Biol Chem.* vol. 271, no 31, p. 18596-18603.
- Sokolov, A. V., K. V. Ageeva, M. O. Pulina, E. T. Zakharova et V. B. Vasilyev. 2009. «Effect of lactoferrin on oxidative features of ceruloplasmin». *Biometals.* vol. 22, no 3, p. 521-529.
- Stamler, J. S., O. Jaraki, J. Osborne, D. I. Simon, J. Keaney, J. Vita, D. Singel, C. R. Valeri et J. Loscalzo. 1992. «Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 89, no 16, p. 7674-7677.
- Stamler, J. S., D. I. Simon, J. A. Osborne, M. E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D. J. Singel et J. Loscalzo. 1992. «S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 89, no 1, p. 444-448.
- Statistique-Canada. 2005. «Tableau 102-0529 - Décès, selon la cause, Chapitre IX Maladies de l'appareil circulatoire (I00 à I99), le groupe d'âge et le sexe, Canada, annuel (nombre)». En ligne. <<http://www.statcan.gc.ca/>>. Consulté le 5 novembre 2009.
- Stuehr, D. J. 1997. «Structure-function aspects in the nitric oxide synthases». *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* vol. 37, p. 339-359.
- Swanton, R. H., et Shrilla Banerjee. 2008. *Swanton's cardiology : a concise guide to clinical practice*, 6e éd. Malden, Massachussets: Blackwell Pub.

- Takahashi, N., T. L. Ortel et F. W. Putnam. 1984. «Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 81, no 2, p. 390-394.
- Tapryal, N., C. Mukhopadhyay, D. Das, P. L. Fox et C. K. Mukhopadhyay. 2009. «Reactive oxygen species regulate ceruloplasmin by a novel mRNA decay mechanism involving its 3'-untranslated region: implications in neurodegenerative discases». *J Biol Chem*. vol. 284, no 3, p. 1873-1883.
- Tarr, M., et D. P. Valenzano. 1991. «Modification of cardiac ionic currents by photosensitizer-generated reactive oxygen». *J Mol Cell Cardiol*. vol. 23, no 5, p. 639-649.
- Tegenge, M. A., M. Stern et G. Bicker. 2009. «Nitric oxide and cyclic nucleotide signal transduction modulates synaptic vesicle turnover in human model neurons». *J Neurochem*.
- Thom, S. R., V. M. Bhopale, D. J. Mancini et T. N. Milovanova. 2008. «Actin S-nitrosylation inhibits neutrophil beta2 integrin function». *J Biol Chem*. vol. 283, no 16, p. 10822-10834.
- Toraason, M., H. E. Wey, D. E. Richards, P. I. Mathias et E. Krieg. 1997. «Altered Ca²⁺ mobilization during excitation-contraction in cultured cardiac myocytes exposed to antimony». *Toxicol Appl Pharmacol*. vol. 146, no 1, p. 104-115.
- Traylor, T. G., et V. S. Sharma. 1992. «Why NO?». *Biochemistry*. vol. 31, no 11, p. 2847-2849.
- Ulutas, P. A., B. Musal, F. Kiral et A. Bildik. 2009. «Acute phase protein levels in pregnancy and oestrus cycle in bitches». *Res Vet Sci*. vol. 86, no 3, p. 373-376.
- van den Berghe, P. V., et L. W. Klomp. 2009. «New developments in the regulation of intestinal copper absorption». *Nutr Rev*. vol. 67, no 11, p. 658-672.
- Van Eden, M. E., et S. D. Aust. 2000. «Intact human ceruloplasmin is required for the incorporation of iron into human ferritin». *Arch Biochem Biophys*. vol. 381, no 1, p. 119-126.
- Varghese, M., M. Pandey, A. Samanta, P. K. Gangopadhyay et K. P. Mohanakumar. 2009. «Reduced NADH coenzyme Q dehydrogenase activity in platelets of Parkinson's disease, but not Parkinson plus patients, from an Indian population». *J Neurol Sci*. vol. 279, no 1-2, p. 39-42.

- Venema, R. C. 2002. «Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin». *Int Immunopharmacol.* vol. 2, no 13-14, p. 1755-1762.
- Wang, H., M. J. Kohr, C. J. Traynham, D. G. Wheeler, P. M. Janssen et M. T. Ziolo. 2008. «Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban». *Am J Physiol Cell Physiol.* vol. 294, no 6, p. C1566-1575.
- Wang, R., L. Zhang, M. A. Mateescu et R. Nadeau. 1995. «Ceruloplasmin: an endogenous depolarizing factor in neurons?». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 207, no 2, p. 599-605.
- Wang, X. T., M. J. Dumoulin, O. Befani, B. Mondovi et M. A. Mateescu. 1994. «Joint chromatographic purification of bovine serum ceruloplasmin and aminoxidase». *Prep Biochem.* vol. 24, no 3-4, p. 237-250.
- Westermann, D., A. Riad, U. Richter, S. Jager, K. Savvatis, M. Schuchardt, N. Bergmann, M. Tolle, D. Nagorsen, M. Gotthardt, H. P. Schultheiss et C. Tschope. 2009. «Enhancement of the endothelial NO synthase attenuates experimental diastolic heart failure». *Basic Res Cardiol.* vol. 104, no 5, p. 499-509.
- Wever, R., F. X. van Leeuwen et B. F. van Gelder. 1973. «The reaction of nitric oxide with ceruloplasmin». *Biochim Biophys Acta.* vol. 302, no 2, p. 236-239.
- Wilson, M. T., et B. J. Reeder. 2008. «Oxygen-binding haem proteins». *Exp Physiol.* vol. 93, no 1, p. 128-132.
- Wong, L. F., D. M. Taylor et M. Bailey. 2004. «Vagal response varies with Valsalva maneuver technique: a repeated-measures clinical trial in healthy subjects». *Ann Emerg Med.* vol. 43, no 4, p. 477-482.
- Yu, Y. K., J. C. Wootton et S. F. Altschul. 2003. «The compositional adjustment of amino acid substitution matrices». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 100, no 26, p. 15688-15693.
- Yui, Y., R. Hattori, K. Kosuga, H. Eizawa, K. Hiki et C. Kawai. 1991. «Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages». *J Biol Chem.* vol. 266, no 19, p. 12544-12547.
- Zaitseva, I., V. Zaitsev, G. Card, K. Moshkov, B. Bax, A. Ralph et P. Lindley. 1996. «The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres». *JIBC.* vol. 1, p. 15-23.
- Zhang, Y., et N. Hogg. 2005. «S-Nitrosothiols: cellular formation and transport». *Free Radic Biol Med.* vol. 38, no 7, p. 831-838.

- Zhou, L., et D. Y. Zhu. 2009. «Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications». *Nitric Oxide*. vol. 20, no 4, p. 223-230.
- Zhu, X., X. Niu, J. Pei, L. Xiong, S. Chen, S. Y. Lu, J. Wei, B. Xing, L. Liu, Q. Mei, M. Zhu et A. D. Kaye. 2008. «Inhibition of cardiomyocyte contractile/relaxation by MN9202 and mechanisms involved». *Arch Med Res*. vol. 39, no 5, p. 489-495.

ANNEXE A : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES RELIÉS À L'ACTIVITÉ S-
NITROSANTE DE LA CP

Il a été aperçu que la présence de CP réduisait la libération totale de NO^+ à partir de la CysNO (voir chapitre II). L'une des hypothèses pour expliquer ce phénomène était que la CP puisse favoriser la conservation de la CysNO, en catalysant instantanément la re-S-nitrosation de la Cys. C'est alors qu'une étude de la stabilité de la CysNO dans le HBS/G a été faite, en présence comme en absence de CP (figure A1). La constatation d'une diminution, par la CP, de la stabilité de la CysNO a donc infirmé cette hypothèse. Par conséquent, l'hypothèse que la CP soit elle-même S-nitrosée par une partie du NO^+ libéré par la CysNO a pris davantage de valeur.

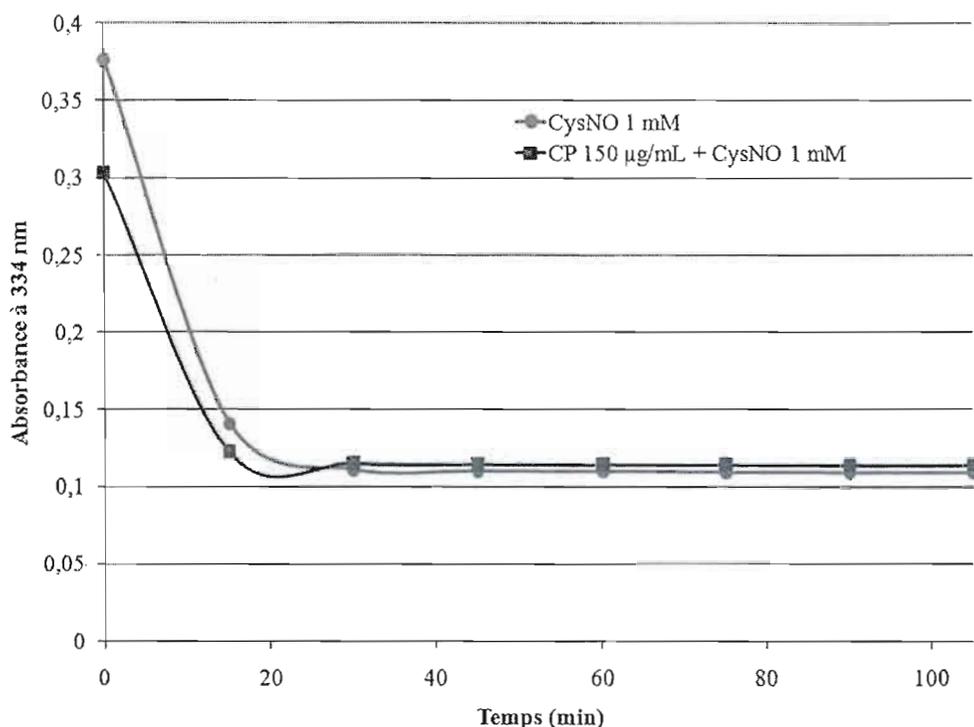


Figure A1 Dégradation de la CysNO, plus rapide en présence de CP. La cinétique de décomposition de la CysNO 1 mM a été suivie dans le HBS/G à 37°C, en présence ou en absence de CP 150 µg/mL, dans un volume total de 200 µL. La détection de la CysNO 1 mM a été faite par la mesure de l'absorbance à 334 nm par un lecteur de microplaque (Tecan Infinite M200). Les valeurs correspondent à la moyenne de triplicatas. Les barres d'erreur, dont la taille est généralement inférieure à celle des symboles, représentent les écarts moyens.

L'utilisation de la CysNO comme source de NO^{\cdot} a suscité d'autres interrogations. En effet, les premiers dosages fluorimétriques du NO^+ ont été faits dans le PBS et ne révélait aucune libération de NO^+ . Plus tard, il a été constaté que la dissolution de la CysNO dans le PBS provoquait sa décomposition instantanée. Cette constatation a mené à l'utilisation du HBS/G pour les dosages. D'ailleurs, une comparaison de la libération de NO^+ par les différents donneurs a été faite pour les deux tampons. Comme la CysNO, la SNAP libérait moins rapidement son NO^+ dans le HBS/G (figure A2). Par contre, pour le GSNO et le PAPA/NO, le profil de libération s'est montré similaire dans les deux tampons.

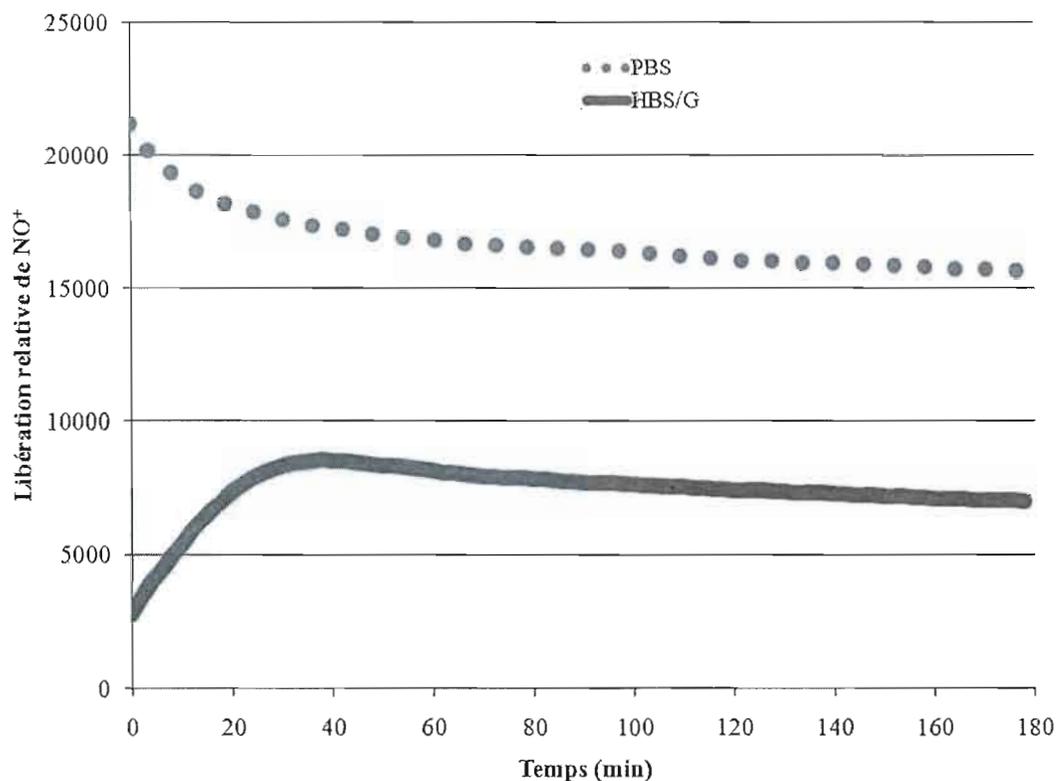


Figure A2 Libération variable de NO^+ par la SNAP selon le tampon. La cinétique de libération de NO^+ par la SNAP 200 μM a été mesurée par la méthode de fluorescence décrite dans le chapitre II, dans les tampons PBS et HBS/G à 37°C. La taille des barres d'erreur n'excède pas l'épaisseur de la courbe.

Puisque le GSNO libère très peu de NO^+ par lui-même, il s'est avéré intéressant de vérifier sa véritable contenance en NO^+ , pour quantifier en quelque sorte son potentiel de libération. Pour ce faire, tout le NO^+ du GSNO a été décroché volontairement par l'ajout de HgCl_2 dans le milieu de libération (figure A3). Cette vérification a révélé que le GSNO conserve plus de 90% de son intégrité après une période de 2h dans du HBS/G à 37°C .

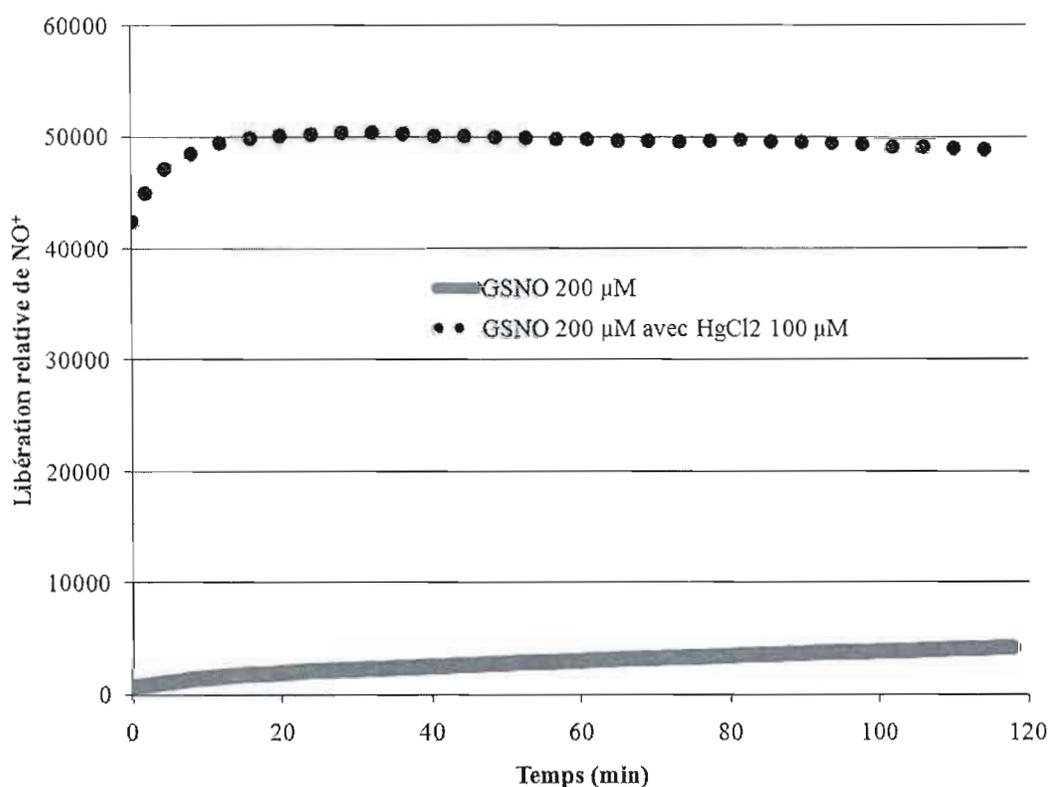


Figure A3 Faible libération spontanée de NO^+ par le GSNO, comparativement à sa contenance en NO^+ . La cinétique de libération de NO^+ par le GSNO 200 μM , avec ou sans HgCl_2 , a été mesurée par la méthode de fluorescence décrite dans le chapitre II, à 37°C . La taille des barres d'erreur n'exède pas l'épaisseur de la courbe.

De manière à évaluer l'effet S-nitrosant de la CP sur les protéines des cardiomyocytes, les RSNO cellulaires ont été analysés, par immunohistochimie, après divers traitements (figure A4). Les images révèlent qu'il est difficile de déceler des différences de fluorescence entre les différents échantillons. En effet, le niveau de S-nitrosation semble aussi élevé en absence qu'en présence d'un donneur de NO \cdot (Figure A4 **A** vs **B**). Certaines figures semblent même indiquer une présence de RSNO plus forte en absence du donneur de NO (Figure A4 **C** vs **D**), ce qui est vraisemblablement fortuit. La densité cellulaire, qui varie d'un échantillon à l'autre, semble aussi influencer la fluorescence perçue et contribue à rendre l'analyse difficile. Il se peut que les changements dans les niveaux de RSNO se situent sous le seuil de détection. Des études rapportant de tels changements ont été réalisées avec des concentrations de donneurs de NO \cdot de 0,5 mM et plus (Haqqani, Do et Birnboim, 2003 ; Lopez-Sanchez *et al.*, 2008).

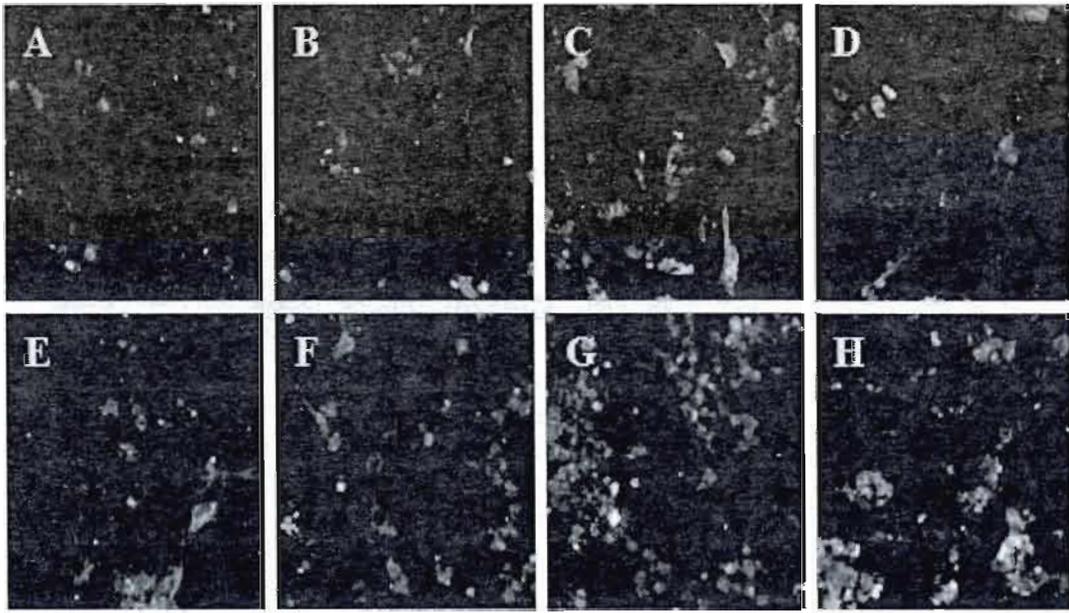


Figure A4 Détection immunohistochimique peu révélatrice des RSNO sur des cardiomyocytes exposés à divers traitements. Les cardiomyocytes ont été cultivés, selon la méthode décrite au chapitre II, sur des lamelles (diamètre de 25 mm et épaisseur de 0,17 mm). Après avoir subi différents traitements (A Témoin ; B PAPA/NO 50 μ M ; C H₂O₂ 40 μ M ; D PAPA/NO 50 μ M et H₂O₂ 40 μ M ; E CP 200 μ g/mL ; F CP 200 μ g/mL et PAPA/NO 50 μ M ; G CP 200 μ g/mL et H₂O₂ 40 μ M ; H CP 200 μ g/mL, PAPA/NO 50 μ M et H₂O₂ 40 μ M) dans le HBSS (Hank's balanced salt solution) pendant 1h45 à 37°C et un lavage au PBS contenant 0,1 mM d'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA), les cardiomyocytes ont été fixés au *para*formaldéhyde 4%. Ensuite, une incubation d'une heure à 25°C avec l'anticorps primaire (de lapin, anti-S-nitrosocystéine, Sigma, dilué 1/100) a été succédée d'une incubation d'une heure à 25°C avec l'anticorps secondaire (tétraméthyl-rhodamine-isothiocyanate (TRITC) anti-IgG de lapin dilué 1/50). Le blocage, les incubations et les lavages ont été faits avec du PBS contenant 0,005% de saponine, 0,2% de gélatine et 0,1 mM de DTPA. Un réactif (ProLong Gold, Invitrogen) a permis le montage et la conservation des lamelles.

ANNEXE B : CULTURE CELLULAIRE ET BIOMATÉRIAU

La purification de la fibroïne de soie effectuée dans un laboratoire collaborateur (celui de Dr Mateescu) a mené à l'étude de l'utilité de cette protéine en culture cellulaire. En effet, la fibroïne de soie, purifiée par Frédéric Byette (Byette, 2010), a été ajoutée au milieu de culture de cellules souches de carcinome embryonnaire de souris P19 (figure B1). La présence croissante de fibroïne semble mener au regroupement des cellules P19, ce qui suggère un effet pro-agrégatif de cette protéine. Cette observation est intéressante, si l'on considère que la différenciation des cellules P19 en cardiomyocytes ou en neurones requiert d'abord leur agrégation.

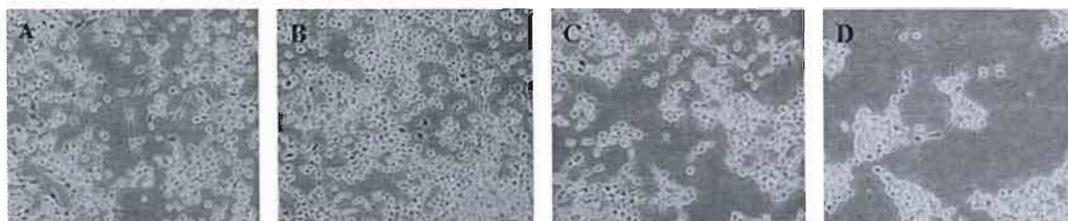


Figure B1 Regroupement des cellules P19 induit par la présence de fibroïne de soie. Les cellules P19 non-différenciées ont été cultivées dans des pétris traités pour la culture tissulaire, selon la méthode préalablement décrite (Bouchard, 2007), en présence de différentes proportions d'une solution de 4% (m/v) de fibroïne de soie (**A** 0% (v/v) ; **B** 0,1% (v/v) ; **C** 1% (v/v) ; **D** 10% (v/v)). La solution de fibroïne a été fournie par le laboratoire de Dr Mircea-Alexandru Mateescu (Byette, 2010).

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont des cellules adultes dont de nombreux chercheurs tentent de contrôler la différenciation. Contrairement aux cellules P19, les MSC résistent beaucoup à l'agrégation. De la fibroïne de soie a donc été ajoutée au milieu de culture des MSC pour en tester l'effet. La figure B2 montre une agrégation considérable des MSC par la présence de fibroïne. La viabilité des agrégats a d'ailleurs été confirmée par leur adhésion subséquente à un pétri traité pour la culture cellulaire. Cependant, l'ajout de fibroïne au milieu de culture n'est pas encore envisagé pour les protocoles de différenciation. Il subsiste un problème pour retirer la fibroïne des cultures de cellules, puisque la protéine possède une faible hydrosolubilité et précipite avec les cellules lors de la centrifugation.



Figure B2 Agrégation des MSC induite par la présence de fibroïne de soie. Des agrégats de taille considérable sont formés en présence, dans le milieu de culture, de 10% (v/v) d'une solution de fibroïne de soie de 4% (m/v). Les MSC ont été préparées selon la méthode décrite antérieurement (Bouchard, 2007) et ont été déposées dans des pétris non-traités pour l'adhésion cellulaire.

Le laboratoire de Dr Mircea-Alexandru Mateescu conçoit aussi des éponges en fibroïne de soie dans le but de les utiliser en tant que supports de culture cellulaire, notamment pour les cellules souches destinées à être différenciées en cardiomyocytes. Développée tout au long de la maîtrise, l'expertise en culture primaire de cardiomyocytes et en microscopie confocale de fluorescence a donc été mise à profit pour tester que les éponges permettent l'adhésion et les battements des cardiomyocytes (voir vidéo B1). En effet, le marquage du calcium cytoplasmique des cardiomyocytes par le Fluo-3 (vert) et le marquage de l'éponge par l'iodure de propidium (rouge) permettent de visualiser la colonisation de l'éponge par les cardiomyocytes, qui se contractent et s'agrègent.

Finalement, pour vérifier la prédominance de cardiomyocytes dans les cultures utilisées pour l'ensemble du projet, la troponine I cardiaque (qui leur est spécifique) a été immunochimiquement marquée en vert par la FITC (figure B3). La phalloïdine couplée au TRITC a marqué l'actine (commune à tous les types cellulaires). Cette étude immunohistochimique révèle une forte prédominance de cardiomyocytes dans les cultures, car la plupart des cellules arborent une colocalisation de l'actine et de la troponine I cardiaque (couleur jaune). Il semble cependant y avoir un fibroblaste, dont la couleur est majoritairement rouge, dans le centre de l'image. Ce fibroblaste peut aussi être distingué des cardiomyocytes par sa grande taille et son fort étalement.

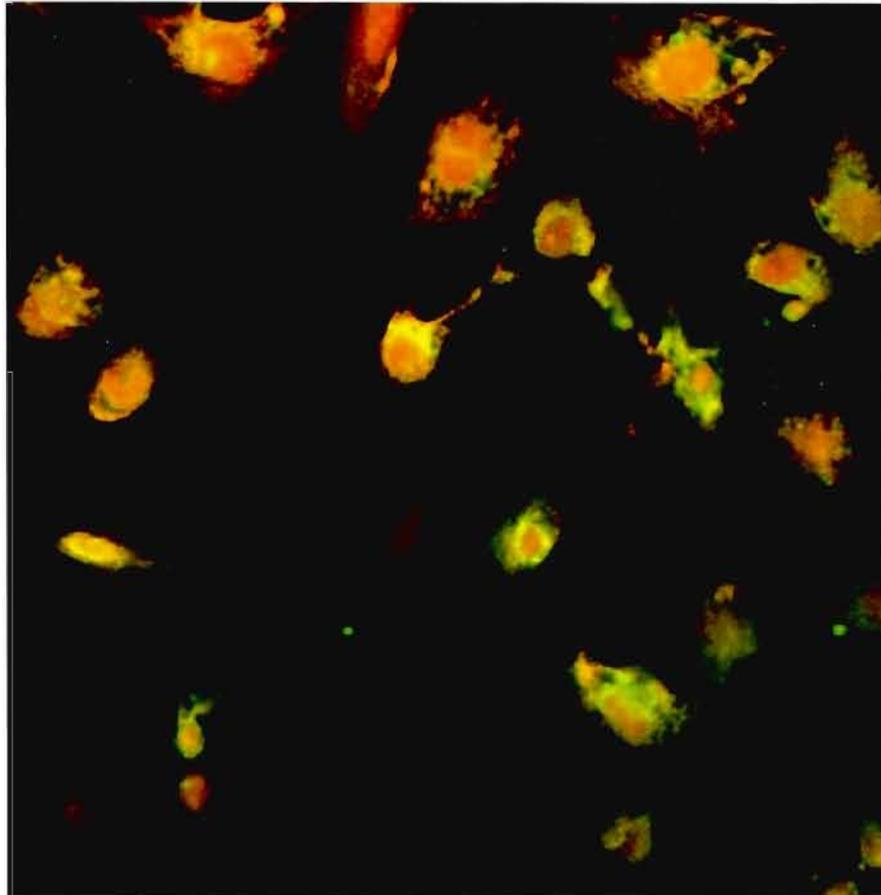


Figure B3 Marquage immunohistochimique de l'actine et de la troponine I cardiaque d'une culture de cardiomyocytes. Après fixation au *paraformaldéhyde* 4%, les cellules ont été incubées pendant 2 heures à 25°C avec l'anticorps primaire (de chèvre, anti-troponine I-C, Santa Cruz, dilué 1/50) pour le marquage de la troponine I cardiaque (vert). Ensuite, une incubation d'une heure à 25°C avec l'anticorps secondaire (FITC, anti-IgG de chèvre dilué 1/50) a été effectuée. L'actine (**rouge**) a été marquée par une incubation de 30 min avec la phalloïdine-TRITC. Le blocage, les incubations et les lavages ont été faits avec du PBS contenant 0,005% de saponine et 3% de sérum de cheval.