

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Frères Mentouri- Constantine

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale



N°d'ordre : 06/DS/2016

Série : 01/BioA/2016

Thèse

Présentée par

Faouzia Derouiche

En vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat en Sciences**

Option : **Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Thème

*Évaluation du stress oxydatif induit par l'hyperhomocystéinémie
dans le cœur et l'aorte chez le rat Wistar albinos :
implication du système ubiquitine protéasome.*

Soutenue le / 28 / 01 / 2016

Devant le jury :

Présidente :	Pr. Satta Dalila	Université des Frères Mentouri - Constantine
Directrice de thèse :	Pr. Naimi Dalila	Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie- Constantine 3
Examinatrice :	Pr. Tebibel Soraya	Université des Frères Mentouri - Constantine
Examineur :	Pr. Lahouel Mesbah	Université de Jijel - Jijel
Examineur :	Pr. Houcher Bakhouche	Université Ferhat Abbas – Sétif I - Sétif
Examineur :	Pr. Yahia Mouloud	Université Hadj Lakhdar - Batna

Année universitaire 2015 - 2016

Dédicace

Cette thèse est dédiée à ma famille

A ma mère



A la mémoire de mon père



A la mémoire de ma sœur Malika



A mes sœurs : Moufida, Samia, Abla, Leila

A mes frères : Redouane, Djalil, Karoum

A mon beau-frère Magora

A Abdel Rahmane (Bidou), mon petit ange



(A Ibrahim Youcef (Této) et Lotfi Chams Eddine (Chmissou))

Zouzou

Dieu, merci de m'avoir donné la force pour la réalisation de cette thèse.

Au Pr. Dalila Naïmi, ma directrice de thèse, pour vos encouragements constants, vos conseils avisés, l'intérêt que vous avez porté au protéasome et la liberté de recherche avec confiance tout au long de ces années. Veuillez trouver ici mes très sincères remerciements et mon profond respect.

Au Dr. Moïse Coëffier, Vous m'avez ouvert les portes du laboratoire et guidé pour le travail, la soumission et la révision de l'article. Je vous remercie pour votre écoute, disponibilité, vos conseils précieux et pour la confiance que vous m'avez faite. Votre positivité et intelligence m'ont beaucoup impressionné. Que ce travail soit l'expression de ma grande reconnaissance et de mon profond respect.

A Christine Bôle-Feysot, pour les moments inoubliables passés à la paillasse, pour ton aide avisée et ton soutien bienveillant. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Aux professeurs : Mme. Satta Dalila, Mme. Tebibel Soraya, Mr. Lahouel Msbah, Mr. Yahia Mouloud, Mr. Houcher Bakhouché, qui m'ont honoré en acceptant de participer au jury de cette thèse en tant que Président ou examinateurs. Que vous soyez remerciés pour votre disponibilité et le temps consacré à juger ce travail.

Au Pr, Pierre Dechéotte, de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche INSERM unit 1073, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen, France, Veuillez trouver ici mes vifs remerciements

Au Dr Olivier Coux, de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche au CRBM, CNRS, Montpellier, France et pour tout ce qu'il m'a appris. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

A ma chère Claudine Azzouz, la vie à Rouen était facile grâce à ton accueil et ta gentillesse. Merci pour tout.

A tous les membres de l'unité INSERM Unit 1073, Rouen, France Sans oublier personne je l'espère, pour les bons moments partagés dans l'ambiance et gentillesse : Stéphanie, Wassila, Naouel, Khally, Ibtissem, Marie, Julien, Ludovique Cloué, Kunuko et mon respect pour Françoise (merci pour les stylos et blocs notes), Charlène, Alexey, Dr Rachel, Pr Sergueï.

Au Dr. Randa Djemil, ma chère amie, un énorme merci pour ton aide précieuse et soutien constant, sans oublier ton ami le Dr Hichem pour son aide.

A Magora et Redouane, merci infiniment pour les multiples trajets entre la zone industrielle, l'animalerie et l'hôpital et djalil pour la sciure.

A mon Bidou Bidou, jouer avec toi, est mon seul soulagement, gros bisou petit génie.

A ma chère amie Lylia et son frère Mehdi, merci chaleureusement pour votre amitié et confiance.

A mes chers amis Naouri et Malika, merci infiniment de m'avoir assurée la DL-Homocystéine, pour votre amitié et vos encouragements constants.

A ma chère amie et voisine Chahra, merci sincèrement pour les repas partagés, discussions, et shopping. Tu ne m'écoutes pas parfois et je sais pourquoi sans que tu t'expliques (Que Dieu exauce tous vos souhaits).

A ma chère amie et voisine Naassa pour ta bonté et tout le reste, ainsi que Zahira et Fouzia, merci infiniment. (L'énorme temps à Khenchela s'est vite passé ensemble !).

A mes amies, Amel Bouakkaz pour ton aide dans les coupes histologiques, Hasna Zetal, pour ton aide dans la dissection dans un climat très chaud, Zoubida Hachem pour la conservation des tissus et Dr Ibtissem Elouar pour la courte période passée ensemble au laboratoire et pour tes services administratifs sans hésitation, Dr Souad Lamda de m'avoir aidé à surmonter la phobie de rats, Dr Cherifa et sans oublier Houria notre secrétaire très gentille du département ainsi que Mr Madaci. Mes vifs remerciements.

A mes amies et collègues, Fatima Z. Hiba, (pour ton encouragement durant la rédaction de l'article), ainsi que Dr Rima, Nassima, Sofiane. Mes vifs remerciements pour vos encouragements constants. Et tous les collègues qui m'ont encouragé.

En fin, à ma très chère mère, sans qui, cette thèse n'aurait pu aboutir.

Résumé

Le système ubiquitine protéasome (UPS) est un complexe multi-enzymatique responsable de la dégradation de la majorité des protéines intracellulaires. De ce fait, il est impliqué dans la régulation de la plupart des processus biologiques, telle que l'élimination des protéines oxydées accumulées lors du stress oxydatif dans certaines maladies. Cependant sa régulation durant l'hyperhomocystéinémie (HHcy) reste à démontrer.

L'objectif de mon travail de thèse est d'évaluer la fonction et la composition de ce système au niveau du cœur et de l'aorte durant le stress oxydatif induit dans un modèle de rat Wistar albino par l'administration intrapéritonéale d'une dose unique de la DL-homocystéine (Hcy) (0.6 -1.2 μ M/g : poids corporel) pendant 03 semaines. Dans ce contexte, ma thèse s'est développée autour de 02 axes principaux.

Dans le premier axe, l'induction du stress oxydatif dans ce modèle d'HHcy a été confirmée dans les deux organes (cœur et aorte) par l'augmentation significative du malondialdéhyde (MDA) et des protéines carbonylées (PC), respectivement, marqueurs de la peroxydation lipidique et de l'oxydation protéique et aussi par la diminution significative du glutathion (GSH) et des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). En outre, le stress oxydatif vérifié dans ce même modèle supplémenté d'une dose unique intrapéritonéale d'acide folique (F) (0,011 μ M/g poids corporel) ou de vitamine C (vit C) (100 mg/kg poids corporel) durant la deuxième et la troisième semaines du traitement n'a pas été réduit. Des coupes histologiques ont été aussi réalisées pour confirmer ce stress oxydatif. L'analyse des facteurs impliqués dans le stress oxydatif et le protéasome : le monoxyde d'azote (NO) et la Caspase 3 a également été conduite dans ce modèle d'étude. Une augmentation en Caspase 3 avec une diminution en NO ont été observées dans le cœur et l'aorte.

Le deuxième axe est consacré à l'étude du protéasome. Les trois activités protéasomales cardiaques et aortiques : chymotrypsin-like, trypsin-like et caspase-like et aussi l'activité de peptidases ont été quantifiées à 355/ 460 nm excitation / émission par Microplate Fluoromètre Reader en utilisant respectivement les peptides fluorogéniques synthétiques spécifiques Suc- LLVY-AMC, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Z-Leu-Leu-Glu-AMC, Z-Leu-Leu-Leu-AMC en présence et en absence d'inhibiteur spécifique du protéasome : le MG

132 (Z-Leu-Leu-Leu-al). L'expression de 05 sous-unités du protéasome, 20S β 1, 20S β 2, 20S β 5, 20S α 1, 20S Core et des protéines ubiquitylées a été analysée par SDS PAGE et western blot (WB). Une inhibition des 03 activités peptidasiques du protéasome cardiaque a été observée, en revanche, ces activités n'ont pas été changées au niveau de l'aorte. Cependant l'expression des sous-unités a significativement été réduite dans le cœur (dans l'aorte uniquement le 20S Core) et celle des protéines ubiquitylées a significativement été augmentée dans les deux organes. De plus, pour mieux expliquer les résultats au niveau du cœur, l'analyse du rapport 26S/20S protéasomal a montré l'association du complexe, ainsi que l'accumulation du produit final de la peroxydation lipidique, le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE).

En conclusion, le protéasome est altéré durant le stress oxydatif induit par le taux élevé d'homocystéine, dû aux protéines oxydées et ubiquitylées accumulées.

Mots clés : Protéasome, Homocystéine, Stress oxydatif, Aorte, Cœur, Rat.

Evaluation of oxidative stress induced by hyperhomocysteinemia in heart and aorta of Wistar albinos rat: implication of ubiquitin-proteasome system.

Abstract

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is a multi-enzyme complex responsible for the degradation of the major intracellular proteins. Therefore, it is involved in the regulation of most biological processes, such as the removal of oxidized proteins accumulated during oxidative stress in some diseases. However its regulation in hyperhomocysteinemia (HHcy) remains to be demonstrated.

The aim of my thesis is to evaluate the function and composition of this system at the heart and aorta during oxidative stress induced in a rat model by intraperitoneal administration of a single dose of DL- Homocysteine (Hcy) (1.2 0.6 μ M / g: body weight) for 03 weeks. In this context, my thesis is developed around 02 main axes.

In the first axis, the induction of oxidative stress in this model of hyperhomocysteinemia has been confirmed in both organs (heart and aorta) by the significant increase of the malondialdehyde (MDA) and proteins carbonyl content (PC), respectively, markers of lipid peroxidation and protein oxidation and also by the significant decrease of glutathione (GSH) and antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Furthermore, oxidative stress investigated in this model supplemented with a single intraperitoneal dose of folic acid (0,011 μ M/g body weight) or vitamin C (100 mg / kg body weight) during the second and the third week of treatment has not been reduced. Histological sections were also performed to confirm this oxidative stress. Analysis of factors involved in oxidative stress and proteasome: nitrogen monoxide (NO) and Caspase 3 was also carried out in this model. An increase in Caspase 3 with a reduction of NO were observed in both heart and aorta.

The second axis is focused on the study of the proteasome. The heart and aortic proteasome activities: chymotrypsin-like, trypsin-like and caspase-like and also peptidases activity were quantified at 355/460 nm excitation / emission by Microplate Fluorometer Reader using respectively specific synthetic fluorogenic peptides Suc- LLVY-AMC-AMC, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC ,Z-Leu-Leu-Glu-AMC, Z-Leu-Leu-Leu-AMC in the presence or absence of specific proteasome inhibitor: the MG 132 (Z-Leu-Leu-Leu-al). Expression of

05 subunits of the proteasome, 20S β 1, 20S β 2, 20S β 5, 20S α 1, 20S Core and ubiquitinated proteins was analyzed by SDS PAGE and western blot (WB). Inhibition of the 03 proteasome peptidase activities of the heart was observed but, these activities were not changed in aorta. However the expression of subunits was significantly reduced in heart (in aorta, only the 20S Core) and the expression of ubiquitinated proteins was significantly increased in both organs. In addition, to better explain the results in heart, analysis of the 26S / 20S proteasomal report showed the association of the complex, as well as the accumulation of 4-hydroxy 2-nonenal (HNE), the end product lipid peroxidation.

In conclusion, the proteasome is altered during the oxidative stress induced by high level of homocysteine due to accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins.

Keywords: Proteasome, homocysteine, oxidative stress, Aorta, Heart, Rat

تقدير الإجهاد التأكسدي المحرض من مرض ارتفاع الهوموسستين في القلب والشريان الأبهر عند الجرذ *Wistar albinos* : تدخل نظام اليوبيكويتين بروتيازوم.

ملخص

نظام اليوبيكويتين بروتيازوم (UPS) هو مركب متعدد الإيزيم مسؤول عن تحليل أغلب البروتينات داخل الخلية ولذلك فهو يدخل في تنظيم معظم العمليات البيولوجية، مثل إزالة البروتينات المؤكسدة المتراكمة أثناء الإجهاد التأكسدي في بعض الأمراض لكن دوره التنظيمي خلا مرض ارتفاع الهوموسستين لم يبين بعد.

الهدف من عمل أطروحتي، هو تقدير وظيفة وتركيبية هذا النظام على مستوى القلب والشريان الأبهر أثناء الإجهاد التأكسدي في نموذج الجرذ *Wistar albino* المعالج بجرعة واحدة في اليوم داخل الصفاق من DL - هوموسستين (Hcy) (DL-Homocysteine) (0.6- 1.2 ميكرو مو/غرام من وزن الجسم) لمدة 3 اسابيع. في هذا السياق أطروحتي طورت حول محورين رئيسيين.

في المحور الأول، تم تأكيد الإجهاد التأكسدي في هذا النموذج للجرذ في القلب والشريان الأبهر من خلال الزيادة المعنوية للمالون دي ألدهيد (MDA) والبروتينات الكربونيلية (PC) على التوالي، مؤشري بيروأكسدة الدهون والأكسدة البروتينية وأيضا انخفاض المعنوي للجلوتاثيون (GSH) والإيزيمات المضادة للأكسدة مثل فوق البيروكسيد ديسميتاز (SOD)، الكتالاز (CAT) والجلوتاثيون بيروكسيداز (GPX). علاوة على ذلك لم يلاحظ انخفاض الإجهاد التأكسدي في هذا النموذج المزود بجرعة إضافية داخل الصفاق من حمض الفوليك (0.011 ميكرو مو/غرام من وزن الجسم) أو الفيتامين ج (vit C) (100 ملغ/كغ من وزن الجسم) أثناء الاسبوع الثاني والثالث للعلاج. تحليل العوامل المتعلقة بالإجهاد التأكسدي والبروتيازوم: أو أكسيد النيتروجين (NO) والكاسباس 3 (Caspase 3) فذت في نموذج هذه الدراسة وقد لوحظت زيادة في الكاسباس 3 (Caspase 3) مع انخفاض في أو أكسيد النيتروجين (NO) في القلب والشريان الأبهر.

المحور الثاني خصص لدراسة البروتيازوم (Protéasome). الأشطة الأيزيمية الثلاثة للبروتيازوم في القلب والشريان الأبهر: المماثلة للكينوتربسين، المماثلة للتربسين، المماثلة للكاسباس وأيضا شاطئ البيبتدازات قدرت عند موجة 460/355 نانومتر وإثارة بعباث بواسطة قارئ صفيحة الميكروسكوب التألقي على التوالي باستخدام ببتيدات الفلورة الإصطناعية النوعية: Suc-LLVY-AMC، Boc-Gln-Ala-Arg-AMC، Z-Leu-Leu-Glu-AMC، Z-Leu-Leu-Leu-AMC في

وجود وغياب المثبط النوعي للبروتيازوم: (Z-Leu-leu-leu-al) MG132. تعبير الخمس تحت وحدات البروتيازوم: 20S β 1 ، 20S β 2 ، 20S β 5 ، 20S α 1 ، 20S Core والبروتينات اليوبيكويتيلية تم بواسطة إلكتروفوريز صوديوم دوديسيل بولي أكريلاميد جل (SDS PAGE) و western blot (WB). لوحظ تثبيط لـ 03 شطة البروتيازوم القلبي وبالمقابل لم يتم تغيير في هذه الأنشطة على مستوى الشريان الأبهر. ولكن تعبير تحت وحدات البروتيازوم خفض بشكل معنوي في القلب (في الشريان الأبهر ماعدا 20S Core) ، بينما في البورتينات اليوبيكويتيلية ارتفع بشكل معنوي في القلب والشريان. إضافة لذلك ولشرح أفضل للنتائج على مستوى القلب أظهر تحليل سبة 26S/20S البروتيازومي عدم تفكك المركب فضلا عن تراكم المنتج النهائي ليبروأكسدة كسيد الدهون: 4- هيدروكسي 2- وينا (HNE).

خلصت هذه الدراسة إلى أن نظام اليوبيكويتين بروتيازوم تعرض للتغيير خلال الإجهاد التأكسدي الناتج عن مستوى الهوموسستين المرتفع ، بسبب تراكم البروتينات المؤكسدة واليوبيكويتيلية.

مفتاح الكلمات: البروتيازوم ، الهوموسستين ، الإجهاد التأكسدي، القلب، الشريان الأبهر، الجرذ.

Avant-propos

Les expérimentations de ce travail de thèse ont été réalisées sous la direction de Mme, le professeur, Naimi Dalila au laboratoire de Génie Microbiologique et Applications au sein de l'équipe de Physiologie Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université des Frères Mentouri de Constantine, Algérie et sous la direction de Mr, le Docteur, Moïse Coëffier, à l'unité de recherche : INSERM unit 1073, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Faculté de médecine et pharmacie, Université de Rouen, France .

Le travail exposé dans cette thèse a fait l'objet (une partie) d'une publication internationale (un autre article est en cours de rédaction) et des communications internationales.

Publication internationale

Faouzia Derouiche, Christine Bôle-Feysot, Dalila Naimi, Moïse Coëffier. Hyperhomocysteinemia induced-oxidative stress differentially alters proteasome composition and activities in heart and aorta. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 452 (2014) 740-745.

Communications internationales.

Faouzia Derouiche, Dalila Naimi, Christine Bôle-Feysot, Moïse Coëffier. Ubiquitin-proteasome system, a novel strategic therapy in hyperhomocysteinemia associated with vascular diseases. Séminaire International des Biotechnologies (Biotechnologie et Santé), 19, 20, 21 Octobre 2015. Constantine, Algérie.

Faouzia Derouiche, Moïse Coëffier, Christine Bôle-Feysot, Dalila Naimi. Alterations of proteasome activities and expression during oxidative stress induced by hyperhomocysteinemia. Association Tunisienne de Sciences Biologiques (ATSB), Décembre 2012. Hammamet, Tunisie.

F. Derouiche, O. Coux, D. Naimi, et al. Activation of 26S proteasome in hyperhomocysteinemia. 3^{ème} Séminaire International de Biologie Animale (Biologie Cellulaire et Physio-Pathologie). 9, 10, 11 Mai 2011. Constantine, Algérie.

F. Derouiche, O. Coux, D. Naimi, et al. Effect of oxidative stress on the ubiquitin-proteasome system activity in modeling of hyperhomocysteinemia. 3^{ème} Séminaire International de Biologie Animale (Physio-Toxicologie Animale), 9, 10, 11 Mai 2011. Constantine, Algérie.

F. Derouiche, O. Coux, D. Naimi, et al. Peptidases activities of the 20S proteasome change in aorta and heart tissues during hyperhomocysteinemia. Huitièmes Journées Biotechnologiques, 20-23 Décembre 2009. Sousse, Tunisie.

Table des matières

Résumé	I
Abstract.....	III
Résumé en arabe.....	V
Remerciements.....	VII
Avant-propos.....	IX
Table des matières	X
Liste des figures.....	XIV
Liste des tableaux.....	XVII
Liste des abréviations.....	XVIII
Introduction.....	1
Chapitre I : Système ubiquitineprotéasome.....	4
I.1. Historique de la découverte du système ubiquitine protéasome.....	4
I.2. Structure et composition du système ubiquitine protéasome.....	6
I.2.1. Complexes de protéasome.....	6
I.2.1.1. Protéasome 26S.....	6
I.2.1.2. Protéasome 20S.....	7
I.2.1.2.1. Chambre catalytique du protéasome 20S.....	9
I.2.1.2.2. Accès à la chambre catalytique du protéasome 20S.....	9
I.2.1.2.3. Assemblage du protéasome 20S de mammifères.....	10
I.2.1.2.4. Régulateurs du protéasome 20S.....	12
I.2.1.2.5. Nomenclature des sous- unités du protéasome 20S.....	13
I.2.1.3. Protéasome 19S ou PA 700.....	15
I.2.1.3.1. Reconnaissance du substrat ubiquitylé.....	15
I.2.1.3.2. Dépliement du substrat.....	16
I.2.1.3.3. Translocation du substrat.....	17
I.2.1.3.4. Déubiquitylation du substrat et recyclage de l'ubiquitine.....	17
I.2.1.3.5. Assemblage de la particule régulatrice 19S.....	20
I.2.1.4. Protéasome 11S ou PA28 ou REG.....	21
I.2.1.5. PA200.....	21
I.2.2. Ubiquitine et ubiquitylation des protéines.....	22
I.2.2.1. Ubiquitine	22
I.2.2.2. Cascade d'ubiquitylation	23
I.2.2.3. Différents types d'ubiquitylation.....	24
I.2.2.4. Protéines à UBD ou Récepteurs de l'ubiquitine.....	25
I.2.2.5. Protéines de la famille ubiquitine ou ubiquitin-like.....	25
I.2.2.6. Déubiquitylation des protéines.....	26
I.2.3. Inhibiteurs du protéasome	26
I.2.3.1. Inhibiteur du protéasome MG 132.....	27
I.2.3.2. Analyse du protéasome	29
I.3. Protéasome, fonctions et pathologies.....	29
I.3.1. Protéasome et stress oxydatif	32
I.3.2. Protéasome et NF-KB.....	33
I.3.3. Protéasome et apoptose.....	36
I.3.4. Protéasome et monoxyde d'azote (NO).....	38

Chapitre II. Stress oxydatif	
II.1. Définition du stress oxydatif.....	41
II.2. Espèces réactives de l'oxygène ou ROS.....	41
II.3. Mécanismes de production des espèces réactives de l'oxygène.....	43
II.4. Conséquences biologiques du stress oxydatif.....	44
II.4.1. Lipides.....	45
II.4.2. Protéines.....	45
II.4.3. Acides nucléiques.....	46
II.4.4. Polysaccharides.....	47
II.5. Pathologies liées au stress oxydatif.....	47
II.6. Systèmes de défenses antioxydants.....	49
II.6.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	49
II.6.1.1. Superoxyde dismutase.....	50
II.6.1.2. Catalase.....	50
II.6.1.3. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR).....	50
II.6.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	51
II.6.2.1. Glutathion.....	51
II.6.2.2. Vitamine C.....	52
II.7. Méthodes d'évaluation du stress oxydatif.....	52
II.8. Lutte contre le stress oxydatif.....	53
Chapitre III. Hyperhomocystéinémie	54
III.1. Définition de l'hyperhomocystéinémie.....	54
III.2. Métabolisme de l'homocystéine.....	54
III.2.1. Différentes formes de l'homocystéine circulante.....	56
III.3. Différents types d'hyperhomocystéinémie.....	56
III.4. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie.....	57
III.4.1. Facteurs nutritionnels.....	58
III.4.2. Facteurs génétiques.....	58
III.4.3. Facteurs environnementaux.....	59
III.5. Hyperhomocystéinémie et maladies cardiovasculaires.....	59
III.5.1. Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie.....	60
III.5.1.1. Production d'un stress oxydatif.....	60
III.5.1.2. Dysfonction endothéliale et diminution de la production de NO.....	62
III.5.1.3. Diminution de la fonction de thromborésistance endothéliale.....	62
III.5.1.4. Prolifération cellulaire de cellules musculaires lisses.....	63
III.5.1.5. Inflammation.....	63
III.5.1.6. Apoptose.....	63
III.5.1.7. Altération des réactions de méthylation intracellulaire.....	64
III.5.1.8. Stress du réticulum.....	64
III.6. Traitement de l'hyperhomocystéinémie et affections cardiovasculaires.....	65
III.7. Système cardiovasculaire.....	66
III.7.1. Structure histologique du cœur.....	67
III.7.2. Structure histologique de l'aorte.....	69
III.7.2.1. Intima.....	69
III.7.2.2. Média.....	69
III.7.2.3. Adventice.....	69

Chapitre IV. Méthodologies expérimentales	71
IV.1. Modèle animal d'hyperhomocystéinémie.....	71
IV.3. Préparation des homogénats.....	72
IV.4. Dosage de l'homocystéine (Hcy).....	72
IV.4.1. Réactifs du Kit	72
IV.4.2. Protocole.....	73
IV.5. Déterminations des concentrations en protéines totales.....	75
IV.6. Analyse des paramètres du stress oxydatif	76
IV.6.1. Analyse de la peroxydation lipidique par le dosage du malondialdéhyde	76
IV.6.2. Analyse de l'oxydation protéique par le dosage des protéines carbonylées.....	76
IV.6.3. Analyse de l'activité antioxydante non enzymatique par le dosage du GSH	77
IV.6.4. Analyse des activités antioxydantes des enzymes tissulaires SOD, CAT et GPx	78
IV.7. Détermination de la concentration en monoxyde d'azote (NO)	79
IV.8. Analyse de l'apoptose par le dosage de la caspase 3.....	79
IV.9. Réalisation des coupes histologiques.....	80
IV.10. Evaluation des activités catalytiques du protéasome.....	82
IV.11. Evaluation de l'expression des sous unités du protéasome et des protéines ubiquitylées par SDS-PAGE et Western blot.....	82
IV.11.1. Séparation des protéines par SDS-PAGE.....	82
IV.11.2. Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.....	83
IV.11.3. Blocage de la membrane	83
IV.11.4. Incubation de l'anticorps primaire.....	83
IV.11.5. Incubation de l'anticorps secondaire.....	84
IV.11.6. Révélation par chimioluminescence ou ECL.....	85
IV.11.7. Expression des résultats	85
IV.11.8. Déshybridation ou (décapage) de la membrane	85
IV.12. Analyse du rapport 26S/ 20S protéasomal cardiaque par native électrophorèse.....	86
IV.13. Evaluation de l'expression des protéines modifiées par HNE.....	87
IV.14. Analyse statistique des résultats.....	87
Chapitre V. Résultats	88
V.1. Modèle animal d'hyperhomocystéinémie.....	88
V.2. Paramètres du stress oxydatif.....	88
V.2.1. Teneurs en malondialdéhyde (MDA).....	88
V.2.2. Teneurs en protéines carbonylées (PC).....	89
V.2.3. Teneurs en glutathion (GSH)	92
V.2.4. Activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx) du cœur e aorte.....	91
V. 3. Teneurs en NO et activité Caspase 3.....	93
V. 4. Étude histologique.....	94
V.4.1. Histologie du cœur.....	94
V.4.2. Histologie de l'aorte.....	96
V.4.2.1. Histologie de l'arc aortique ou (crosse aortique).....	96
V.4.2.2. Histologie de l'aorte thoracique.....	96
V.4.2.3. Histologie de l'aorte abdominale	96

V.4.2.4. Histologie de l'aorte iliaque.....	96
V.5. Étude du système ubiquitine protéasome.....	101
V.5.1. Activités peptidasiques du protéasome 20S.....	101
V.5.1.1. Activités peptidasiques du protéasome 20S cardiaque.....	101
V.5.1.2. Activités peptidasiques du protéasome 20S aortique	101
V.5.2. Expression relative des sous unités protéasomales et des protéines ubiquitylées	104
V.5.2.1. Expression au niveau du cœur	104
V.5.2.2. Expression au niveau de l'aorte.....	104
V.5.3. Analyse du rapport 26S/20S protéasomale cardiaque	109
V.6. Évaluation des protéines modifiées par HNE au niveau du cœur	110
Chapitre VI . Discussion des résultats.....	111
Chapitre VII. Conclusion et perspectives.....	118
Chapitre VIII. Références bibliographiques.....	120
Annexe. Publication internationale	

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique du Système Ubiquitine Protéasome 26S (UPS).....4

Figure 2. Modèle original proposé pour la séquence des évènements aboutissant à la dégradation6

Figure 3. Rôle du protéasome 26S dans la dégradation des protéines ubiquitylées.....7

Figure 4. Structure du protéasome 20S.....8

Figure 5. Assemblage de protéasome 20S.....12

Figure 6. Protéasome 20S associé à ses différents activateurs.....13

Figure 7. Représentation schématique du protéasome 26S chez la Levure.....18

Figure 8. Représentation schématique du protéasome 26S chez l'humain18

Figure 9. Etapes de la dégradation des substrats polyubiquitylés par le protéasome 26S19

Figure 10. Modèle d'assemblage du complexe régulateur 19S de *S.cerevisiae*20

Figure 11. Structure de l'ubiquitine22

Figure 12. La cascade d'ubiquitylation24

Figure 13. Principales classes d'inhibiteurs du protéasome.....28

Figure 14. Devenir des protéines intracellulaires.....33

Figure 15. Voie de signalisation NF- κ B et Système Ubiquitine Protéasome.....35

Figure 16. Régulation du stress cellulaire induisant les voies de mort cellulaire par XIAPS38

Figure 17. S-nitrosylation-induisant des effets cellulaires via le système ubiquitine protéasome40

Figure 18. Les principales sources cellulaires des ROS.....43

Figure 19. Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR44

Figure 20. Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.....45

Figure 21 : Types de lésions de l’ADN provoqués par les attaques radicalaires.....47

Figure 22. Pathologies dans lesquelles le stress oxydatif est impliqué.....48

Figure 23. Régulation de la production de ROS par les systèmes de défenses Antioxydant.....49

Figure 24: Métabolisme de l’homocystéine.....55

Figure 25. Illustration de toutes les formes de l’Hcy présentes dans le plasma.....56

Figure 26. Mécanismes hypothétiques de la pathogénicité de l’hyperhomocystéinémie.....60

Figure 27. Les 7 étapes du développement de l’athérosclérose en plaque.61

Figure 28. Différentes parties de l’aorte67

Figure 29. Représentation histologique du cœur.....68

Figure 30. Représentation histologique de l’aorte.....70

Figure 31. Protocole du dosage immunoenzymatique de l’homocystéine.....74

Figure 32. Teneurs en malondialdéhyde (MDA) du plasma, cœur et aorte chez les rats traités et témoins.....89

Figure 33. Teneurs en protéines carbonylées (PC) du plasma, cœur et aorte chez les rats traités et témoins.....90

Figure 34. Teneurs en glutathion (GSH) du plasma, cœur et aorte chez les rats traités et témoins.....91

Figure 35. Activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, CAT) du cœur et aorte chez les rats traités et témoins.....93

Figure 36. Teneurs en NO et activité Caspase 3 du cœur et aorte chez les rats traités et témoins.....94

Figure 37. Micrographies du myocarde en coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités.....95

Figure 38. Micrographies de l’arc aortique en coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités.....97

Figure 39. Micrographies de l'aorte thoracique en coupe histologique.....98
longitudinale des rats témoins et traités

Figure 40. Micrographies de l'aorte abdominale en coupe histologique
longitudinale des rats témoins et traités.....99

Figure 41. Micrographies de l'aorte iliaque en Coupe histologique
longitudinale des rats témoins et traités.....100

Figure 42. Activités du protéasome cardiaque des rats témoins et traités.....102

Figure 43. Activités du protéasome aortique des rats témoins et traités.....103

Figure 44. Analyse par Western blot (WB) des sous unités protéasomales
(20S α 1, 20S β 1, 20S β 5, 20S β 2, 20SCore) et des protéines ubiquitylées
cardiaques des rats traités (tHcy) et témoins.....105

Figure 45. Analyse par Western blot (WB) des sous unités protéasomales
(20S α 1, 20S β 2, 20S β 5, 20S β 1, 20SCore) et des protéines
ubiquitylées aortiques des rats traités (tHcy) et témoins.....106

Figure 46. Quantification de l'expression relative des sous unités
protéasomales (20S α 1, 20S β 5, 20S β 1, 20S β 2, 20SCore) et des
protéines ubiquitylées cardiaques des rats traités et témoins.....107

Figure 47. Quantification de l'expression relative des sous unités
protéasomales (20S α 1, 20S β 2, 20S β 5, 20SCore) et des protéines
ubiquitylées aortiques des rats traités et témoins.....108

Figure 48. Rapport 26S/20S sur gel natif du protéasome cardiaque
des rats traités par la DL-homocystéine (tHcy) et témoins (T).....109

Figure 49. Analyse des protéines cardiaques modifiées par HNE du protéasome
des rats traités par la DL-homocystéine (tHcy) et témoins (T).....110

Liste des tableaux

Tableau 1. Nomenclature des sous- unités du protéasome 20S chez *S.cerevisiae* et chez les mammifères.....14

Tableau 2. Nomenclature des sous- unités de la RP 19S chez *S.cerevisiae* (Sc) et *Homo sapiens*.....19

Tableau 3. Effets de l’environnement et de l’âge sur le système protéasome..... 31

Tableau 4. Principales espèces réactives de l’oxygène de la biologie.....42

Tableau 5. Classification des hyperhomocystéinémies57

Tableau 6. Principales causes de l’HHcy.....57

Tableau 7. Protocole du modèle animal chez les rats témoins et traités.....71

Tableau 8. Réactifs du Kit: Axis® Homocysteine73

Tableau 9. Mesure de l’activité protéolytique du protéasome sur microplaque.....81

Tableau 10. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection des protéines cibles en western blot.....84

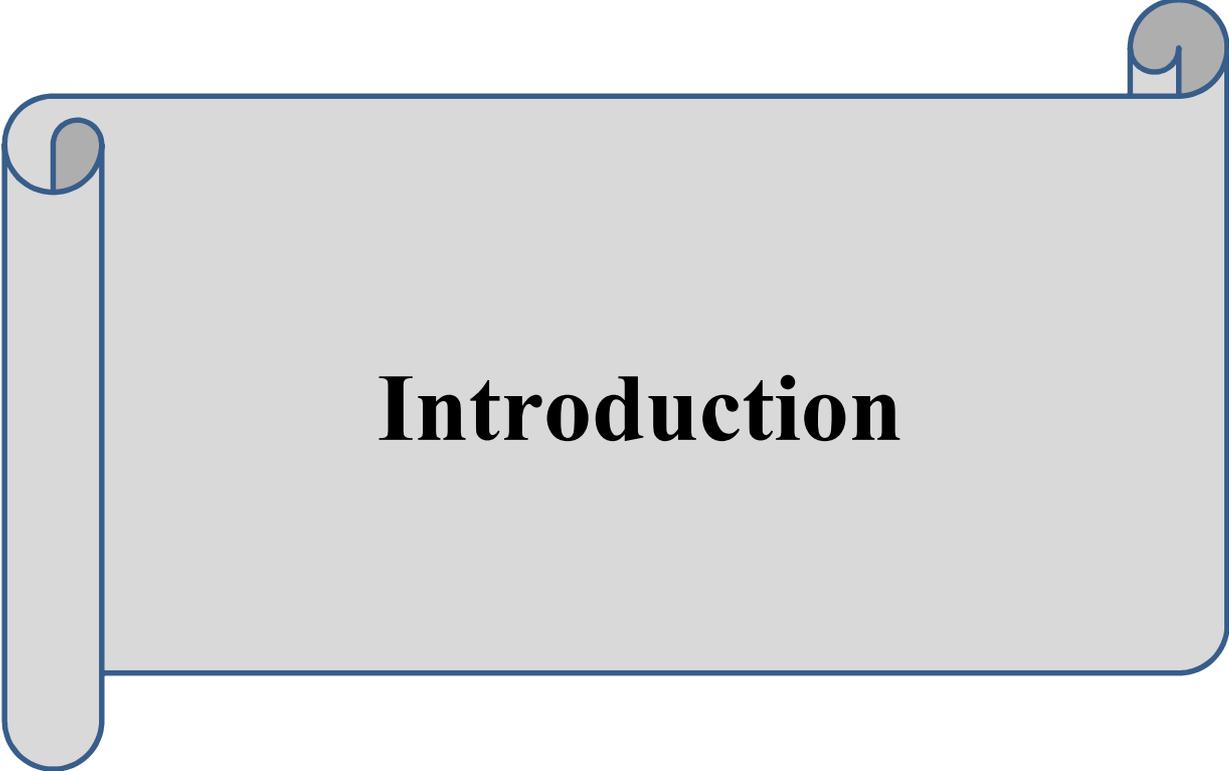
Tableau 11. Valeurs du Taux d’homocystéine (Hcy) total plasmatique (μM) chez les rats témoins et traités.....88

Liste des abréviations

AAA	ATPasiques Associated with different cellular Activity
ADN	Adenosine désoxyribonucléique
Apaf-1	Apoptotic Protease- activating factor-1
APF1	ATP-dependent Proteolysis Factor 1
APS	Amonium Persulfate
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovine Serum Albumine
Caspases	Cystéinyl aspartate specific proteinases
CAT	Catalase
CBS	Cystathionine bêta-synthase
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CML	Cellules musculaires lisses
CP	Core Particle
DL-Hcy	DL- homocystéine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNP	Dinitrophénylhydrazone
DNPB	Dinitrophénylhydrazine
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
DUB	Déubiquitinylation
ECL	Enhanced chemiluminescent
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GR	Gglutathion réductase
GRP78	Glucose regulated protein-78
GPx	Glutathion peroxydase
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
Hcy	Homocystéine
HHcy	Hyperhomocystéinémie
HECT	Homologous to E6-associated protein C-Terminus
HNE	Hydroxy nonenal
HRP	Horseradish peroxidase
Hsp90	Heat shock protein 90

ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IKB	Inhibiteur kB
IPA I	Inhibitors of Apoptosis Proteins
ISG15	Interferon-Stimulated Gene 15
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipoprotéines de basse densité
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases
MDA	Malonaldialdéhyde
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MJDs	Machado-Joseph Disease Protein Domain Proteases
MTHFR	Méthylènetétrahydrofolate réductase
MTR	Méthionine synthase
MTRR	Méthionine synthase réductase
MOMP	Mitochondrial outermembrane permeabilization
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
NEDD8	Neural precursor cell-expressed Developmentally Downregulated-8
NEMO	NFkB essentiel modulator
NF-kB	Nuclear Factor kappa B
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO Synthase
NOSc	NOS constitutives
NOSi	NOS inductible
$O_2^{\bullet-}$	Radical superoxide
1O_2	Oxygène singulet
ODC	Ornithine décarboxylase
OH^{\bullet}	Radical hydroxyle
$ONOO^-$	Peroxynitrite
PA	Proteasome Activator
PAC	Proteasome Assembling Chaperone
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAN	Proteasome Activating Nucleotidase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Protéines carbonylées
PGPH	Peptidylglutamyl-peptide hydrolase
PI	PI: Proteasome Inhibitor
pNA	p-nitroaniline
POMP	Proteasome Maturation Protein
Pru	Pleckstrin-like receptor for ubiquitin

RING	Really Interesting New Gene
RIP1	Receptor Interacting Protein 1
RL	Radicaux libres
RLO	Radicaux libres oxygénés
ROO	Radicaux peroxyesReactive oxygen species
ROS	Radicaux peroxyes
ROO	Résonance paramagnétique électronique
RPE	Regulatory Particule non ATPases
Rpn	Regulatory Particule ATPases
Rpt	
SAH	S-adénosyl-L-homocystéine,
SAM	S-adénosyl-L-méthionine
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SOD	Superoxyde dismutase
SPS	Sample Preparation Solution
Suc-LLVY-AMC	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-methylcoumarin
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier
TBA	Thiobarbiturique acid
TBARS	Thiobarbiturique Réactive Species
TCA	Trichloroacétique
TCN	Transcobalamine
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamine
TNF	Tumor Necrosis Factor
Ub	Ubiquitine
UBA	Ubiquitin-Associated
Ubc	Ubiquitin-carrier ou Ubiquitin-conjugating enzyme
UBD	Ubiquitin Binding Domain
UBL	Ubiquitin-Like
UBPs	Ubiquitin-specific processing proteases
UCHs	Ub C-terminale Hydrolases
UDPs	Ubiquitin-Like Domain Proteins
UIM	Ubiquitine Interacting Motif
UIMs	Ubiquitin Interacting Motifs
UPR	Unfolded Protein Response
UPS	Ubiquitin Proteasome System
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
vit C	Vitamine C
VWA	Von Willebr And
WB	Western blot
XIPA	X linked IAP



Introduction

Introduction

Le système ubiquitine protéasome ou UPS (Ubiquitin- Proteasome System) est la principale voie de protéolyse intracellulaire hautement régulée pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, du fait de son implication large dans la régulation de tous les processus cellulaires. Notamment il assure le contrôle de la qualité et la quantité des protéines, le contrôle du cycle cellulaire, la transduction du signal, la différenciation cellulaire, l'apoptose et la production d'antigènes [1]. Des défauts dans cette voie de protéolyse ubiquitine-dépendante sont la cause de diverses pathologies incluant le cancer, le rhumatisme, les maladies auto-immunes, les infections virales, les pathologies neurodégénératives, et inflammatoires [2].

Actuellement et depuis la découverte de son rôle par les trois lauréats : A. Hershko, A. Ciechanover et I. Rose du prix Nobel de chimie en 2004, ce système occupe une place très importante et préoccupante en biologie moderne et il constitue un domaine de recherche en plein expansion [3]. Les connaissances dans ce domaine progressent très vite et l'implication de ce système est très vaste et ouvre un grand espoir dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à cibler le dysfonctionnement de l'UPS [4,5]. En effet d'intenses recherches sont menées dans le monde afin de développer des drogues, notamment dans le traitement du cancer, par l'administration des inhibiteurs spécifiques, comme le cas du bortezomib (VelcadeTM) dans le traitement des myélomes multiples [6]. Aussi dans l'inflammation, par la stabilisation d'I κ B (Inhibitor of Kappa B) et donc l'inactivation de NF- κ B (Nuclear Factor- kappa B) [7].

L'UPS est un système protéolytique cytosolique et nucléaire existant dans toutes les cellules eucaryotes, les archaebactéries et certains actinomycètes et fonctionne en deux grandes étapes dans la dégradation des protéines : l'ubiquitylation (ubiquitination ou ubiquitinylation) du substrat par l'addition covalente d'une chaîne de poly-ubiquitine par l'activation d'une cascade d'enzymes d'ubiquitylation E1, E2 et E3, et la dégradation par le protéasome 26S, formé par l'assemblage de deux sous-complexes le protéasome 20S (corps catalytique) et le complexe régulateur 19S [8, 9]. Le rôle du protéasome 26S est clairement bien établi grâce au développement d'inhibiteurs spécifiques [10].

Une des fonctions importantes de la protéolyse intracellulaire par le système UPS est l'élimination des protéines anormales, comme les protéines mal conformées, surnuméraires et les protéines oxydées et par conséquent des dysfonctionnements à ce niveau participent

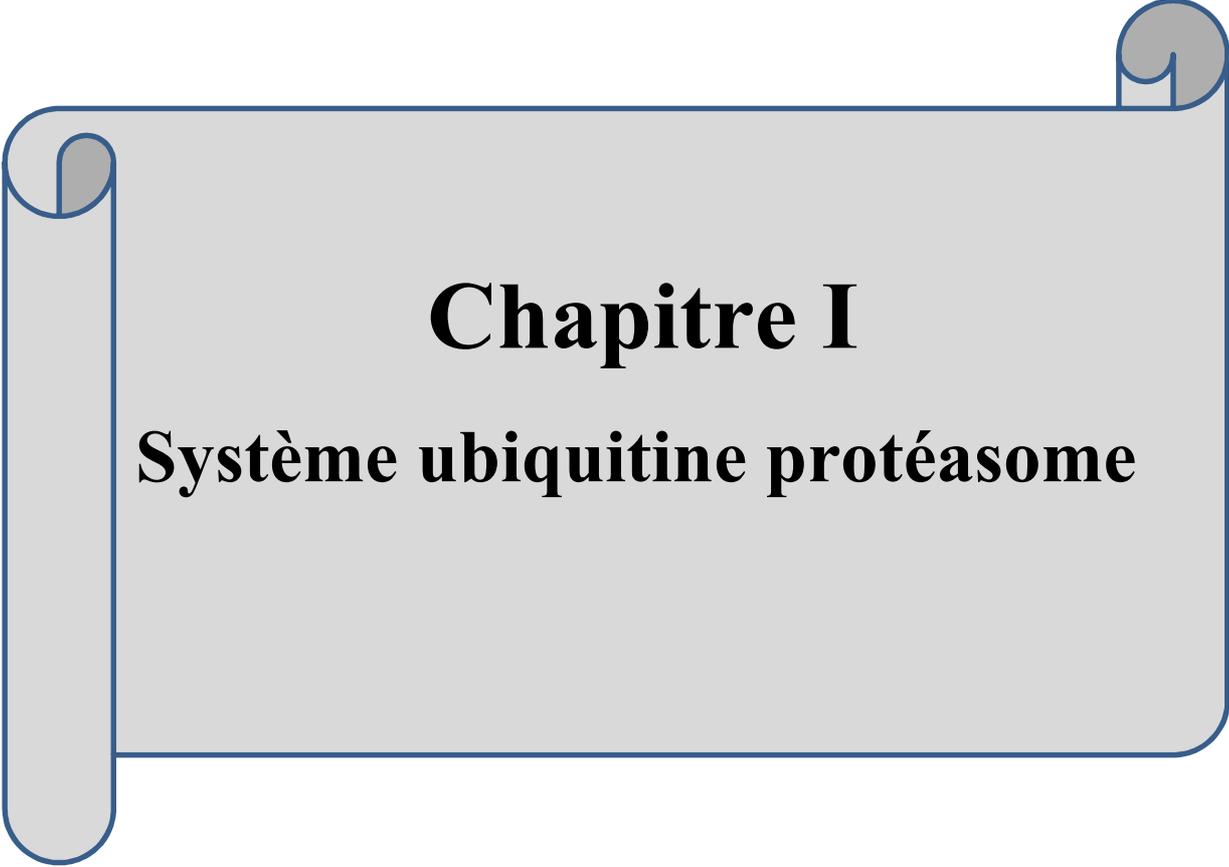
au développement, avec le temps, de pathologies sévères comme certaines maladies neurodégénératives et le vieillissement, dont l'activité du protéasome se trouve diminuée [11]. Le déclin de l'activité du protéasome résulte de plusieurs effets et/ou de leur combinaison comme la diminution de l'expression des sous unités du protéasome, l'inactivation directe par modification des sous-unités du protéasome et la présence d'inhibiteurs endogènes telles que des protéines fortement modifiées [11]. L'inactivation de certaines activités protéolytiques a été observée suite à une ischémie-réperfusion coronaire ou cérébrale chez le rat [12,13], de même dans des cellules neuronales [14] ou rénales du rat [15] et des lymphocytes humains [16] et des kératinocytes humains [17].

Il est donc bien clair que l'UPS est impliqué dans l'élimination des protéines oxydées accumulées lors du stress oxydatif et de même il est cible du stress oxydatif. Les protéines oxydées sont préférentiellement dégradées par le protéasome 20S de façon indépendante de l'ATP et de l'ubiquitine [18,19]. Cependant, certaines études ont montré que le système ubiquitine protéasome 26S pourrait également être impliqué dans la dégradation des protéines oxydées [20]. Néanmoins son implication dans la dégradation des protéines endommagées par oxydation durant l'hyperhomocystéinémie (HHcy) reste à démontrer. En effet peu ou presque pas d'études à notre connaissance sur le statut du protéasome suite à un stress oxydatif induit par l'HHcy. Une étude a montré, l'inactivation des activités du protéasome au niveau du foie chez la souris hyperhomocystéinémique par déficience en cystathionine beta synthase [21]. Une autre a également montré que l'inhibition du protéasome conduit à la diminution du NFkB dans des cellules endothéliales cultivées in vitro après traitement par l'Hcy et des polyphénols [22].

L'HHcy qui se définit comme étant un taux anormal élevé d'homocystéine (Hcy) plasmatique causé par des facteurs génétiques, nutritionnels ou environnementaux, est bien démontrée comme un facteur de risque indépendant de la maladie cardiovasculaire et aussi liée à plusieurs d'autres pathologies. En effet, il est bien établi que l'homocystéine s'auto-oxyde pour former des espèces réactives de l'oxygène ou reactive oxygen species (ROS), formées aussi via des chaînes de transport d'électrons telles que celles existant dans les mitochondries chez les eucaryotes. Ces ROS sont responsables de l'augmentation d'une part du stress oxydatif et d'autre part de la dysfonction endothéliale qui contribue à la morbidité-mortalité des maladies cardiovasculaires essentiellement par l'oxydation des lipides et des protéines [23]. Il est clairement admis que le traitement vitaminique combiné

(acide folique et vitamines du groupe B) fait chuter le taux d'homocystéine mais le bénéfice en termes de diminution de la morbi- mortalité cardio-vasculaire n'est pas connu à ce jour [24,25].

Partant de ces données précédentes et en se basant sur le concept que l'accumulation de protéines oxydées conduisent au déclin de l'activité du protéasome, l'objectif de cette thèse est de vérifier la composition et la fonction du protéasome au cours de l'HHcy dans le cœur et l'aorte de rat pour mieux comprendre son rôle dans cette pathologie et dans les conditions du stress oxydatif qui contribue à la perturbation de l'homéostasie cellulaire et par conséquent à l'augmentation de la physiopathologie de l'HHcy, notamment dans les maladies cardiovasculaires. De ce fait, nous avons exposé une revue bibliographique sur le système ubiquitine protéasome en relation avec le stress oxydatif et ce dernier avec l'hyperhomocystéinémie. Les travaux expérimentaux sont apportés dans un premier temps sur l'étude des paramètres du stress oxydatif, ainsi que l'analyse du NO et Caspase 3 dans un modèle d'hyperhomocystéinémie chez le rat Wistar albinos par l'injection d'une dose de la DL- homocystéine pendant 03 semaines. De même l'administration, d'une dose de la vitamine C ou acide folique, est conduite durant la deuxième et la troisième semaine pour vérifier une correction possible de ce modèle. Dans un deuxième temps, les expérimentations sont menées sur l'étude du protéasome par les dosages, des activités peptidasiques du corps catalytique 20S, de l'expression des sous unités relatives et des protéines ubiquitylées. En fin pour mieux expliquer les résultats, nous avons vérifié l'assemblage du système par l'analyse du rapport 26S/20S, ainsi que l'accumulation des protéines modifiées par l'HNE au niveau du cœur.

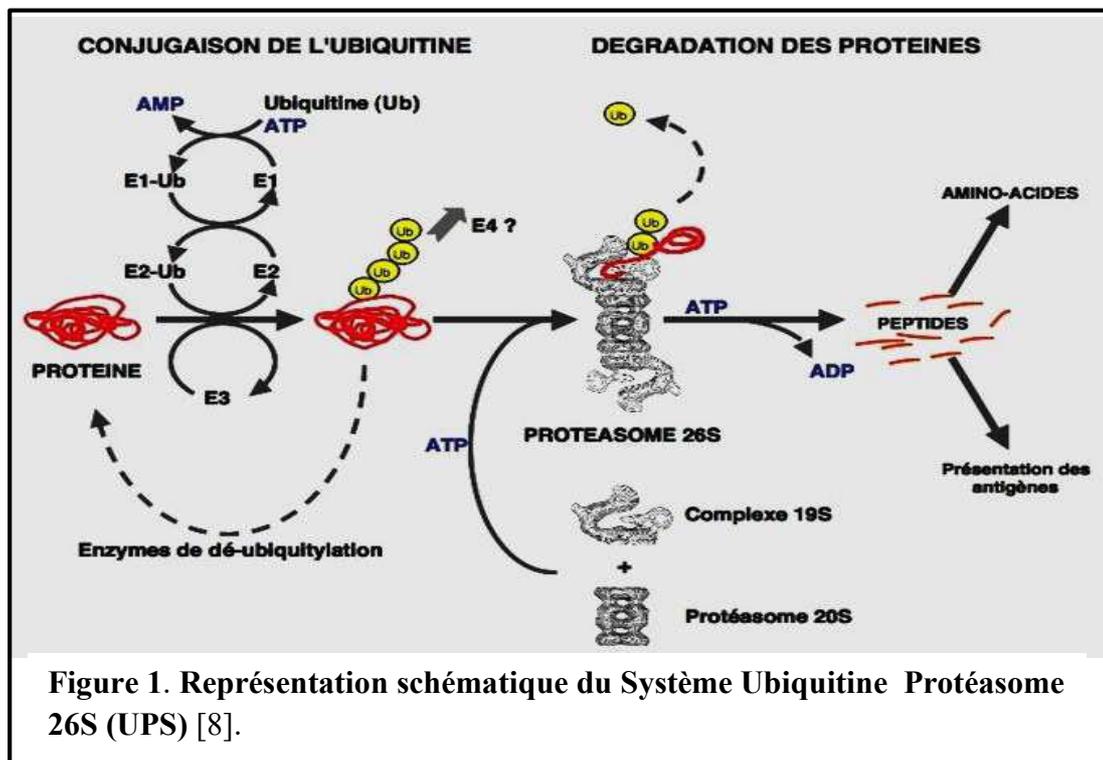


Chapitre I

Systeme ubiquitine protéasome

I. Système ubiquitine protéasome

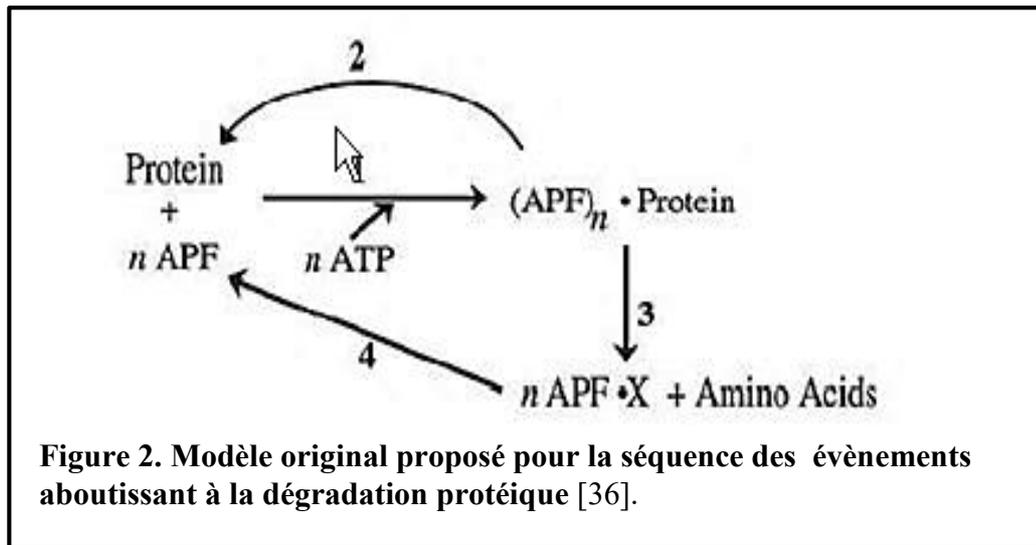
Le système ubiquitine protéasome (UPS) est une machinerie très sophistiquée, présente dans toutes les cellules eucaryotes, les archées et certaines bactéries et joue un rôle majeur dans la protéolyse intracellulaire, du fait de son implication dans la plupart des processus cellulaires. Il constitue maintenant un domaine d'étude très vaste et en pleine évolution. La dégradation d'une protéine via ce système nécessite un apport d'énergie, de l'ATP (Adénosine triphosphate)) et implique généralement deux grandes étapes successives: l'ubiquitylation de la protéine et sa dégradation par le protéasome 26S (Figure 1). L'importance de cette voie de dégradation a d'ailleurs justifié l'attribution du Prix Nobel de Chimie en 2004 à Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose pour leur contribution significative à sa découverte et sa caractérisation.



I.1. Historique de la découverte du système ubiquitine protéasome

Dans les cellules eucaryotes, il existe deux grandes voies de protéolyse essentielles à la régulation des protéines : la voie lysosomale et la voie non lysosomale. Les protéases impliquées dans la première voie, sont essentiellement les cathepsines localisées à l'intérieur des lysosomes [26]. Les protéases de la voie non lysosomale sont essentiellement représentées par les calpaïnes, qui sont des protéases à cystéine calcium-

dépendantes [27], principalement impliquées dans les processus d'adhésion, de locomotion, de réarrangement du cytosquelette, d'inflammation et dans les voies apoptotiques des cellules, les caspases [28] et le protéasome qui est admis qu'il assure une part très importante de la protéolyse intracellulaire [8]. Les lysosomes ont longtemps été considérés comme la principale voie assurant la dégradation des protéines intracellulaires, jusqu'à la découverte que la durée de vie des protéines peut varier de plusieurs minutes à plusieurs jours [29,30]. De plus, la dépendance énergétique de la machinerie de protéolyse intracellulaire [31,32] a été une grande controverse. L'idée d'une protéolyse sélective hautement régulée est suggérée. Tout a commencé en 1977 par la découverte par Etlinger et Goldberg d'un système de protéolyse ATP-dépendante soluble à partir de réticulocytes, des cellules dépourvues de lysosomes, allait fournir des informations décisives en ce sens [33]. En procédant à l'analyse par fractionnement biochimique d'extraits cellulaires de réticulocytes, Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose ont alors isolé et purifié un facteur de 8,5 kDa indispensable à la protéolyse ATP-dépendante dans ces extraits, qu'ils ont appelé APF1 (ATP-dependent (Proteolysis Factor 1) [34]. Ils ont ensuite montré qu'une ou plusieurs molécules d'APF1 est attachée de façon covalente au substrat, que cette modification nécessite de l'ATP, et qu'elle est réversible [35,36]. Les 3 futurs lauréats du Prix Nobel de Chimie en 2004 ont proposé un modèle dans lequel la modification ATP-dépendante d'une protéine par la liaison covalente d'APF1 entraîne sa dégradation par une protéase (non identifiée à cette époque) qui est incapable de reconnaître la protéine non-modifiée (Figure2). Un système de protéolyse sélective, donc. Bien entendu, APF1 n'est autre que l'ubiquitine, un polypeptide très conservé de 76 acides aminés, la protéase inconnue, le protéasome. Durant les années 1980 et 1990, différents travaux de la même équipe ont permis ensuite de mieux comprendre les mécanismes des processus de conjugaison par les enzymes (E1, E2 et E3) impliquées dans la cascade enzymatique d'ubiquitylation et de dégradation des protéines par la purification et la caractérisation du protéasome 26S. Ensuite avec l'identification de ses substrats et ses inhibiteurs spécifiques, la recherche dans ce domaine a connu depuis une grande importance biologique.



I.2. Structure et composition du système ubiquitine protéasome

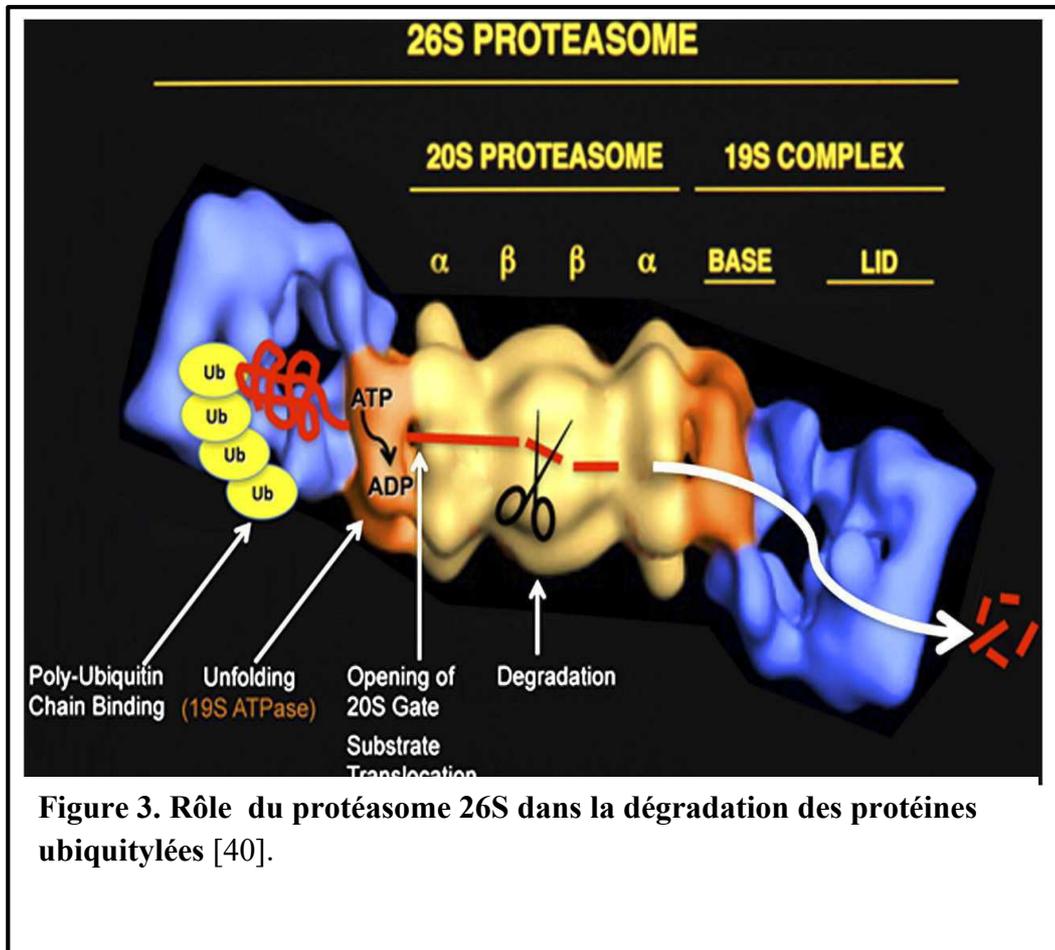
Les protéines poly-ubiquitylées vont être dégradées de manière ATP-dépendante par un complexe multiprotéique, le protéasome 26S, qui résulte de l'association du protéasome 20S (corps catalytique) ou Core Particle (CP) renfermant les activités protéolytiques, et de deux complexes régulateurs appelés complexes 19S (PA700), encore appelé RP pour Regulatory Particule, responsable de la reconnaissance des substrats marqués d'une chaîne de polyubiquitine, de leur dépliement et de leur translocation dans le 20S, ainsi que de leur déubiquitylation [8, 37, 38] (Figure 1). Les sous-composants du protéasome sont souvent désignés par leur Svedberg coefficient de sédimentation (*S* notée).

I.2.1. Complexes de protéasome

I.2.1.1. Protéasome 26S

Le protéasome 26S est la machinerie multiprotéique centrale du système de protéolyse ubiquitine-dépendante. En microscopie électronique, le protéasome 26S se présente comme une structure symétrique formée de deux complexes 19S ajustés à chacune des extrémités de la particule 20S. IL est très conservé chez les eucaryotes, d'un poids moléculaire de 2000 kDa, composé de plus de 40 sous-unités, et représente de 1 à 2 % des protéines totale [1]. La dégradation par le protéasome 26S des protéines polyubiquitylées peut intervenir dans le noyau comme dans le cytoplasme, ou encore à la surface du réticulum endoplasmique [38]. Le protéasome est également capable de dégrader certaines protéines non ubiquitylées [39]. La reconnaissance et la dégradation du substrat ubiquitylé ont lieu à des sites distincts du protéasome 26S. Le substrat ubiquitylé est reconnu puis

déplié, avec consommation d'ATP, par le complexe régulateur 19S, puis injecté à l'intérieur du corps catalytique 20S à travers le pore étroit formé par des anneaux des sous-unités α du 20S, pour atteindre la cavité centrale (corps catalytique) où il sera dégradé en peptides (Figure 3).



I.2.1.2. Protéasome 20S

Le protéasome 20S est un complexe multicatalytique d'environ 700 kDa, sa structure a été déterminée par microscopie électronique puis par cristallographie, ce qui a révélé un cylindre creux, 160Å de long pour 120Å de diamètre, cette taille s'est relativement bien conservée pendant l'évolution, composé de 28 sous-unités assemblées en 4 anneaux superposés identiques 2 à 2, empilés dans une symétrie cyclique C2 [41] (Figure 4). Les 2 anneaux centraux sont constitués de 7 sous-unités β et les 2 anneaux extérieurs sont formés de 7 sous-unités α donnant une configuration $\alpha 7\beta 7\beta 7\alpha 7$ au CP le long d'un axe vertical. Chez l'archaebactérie *Thermophila acidophilum*, le protéasome 20S se compose de 14 copies de chacune des 2 sous-unités α et β ($\alpha 7\beta 7\beta 7\alpha 7$) [42]. Alors que chez les eucaryotes,

il est construit à partir de 2 copies de 7 sous-unités α et 7 sous-unités β différentes mais présentant de fortes homologies de séquences ($\alpha 1-7\beta 1-7\beta 1-7\alpha 1-7$) [43]. Les 2 anneaux β délimitent la cavité interne, qui renferme les sites catalytiques, tandis que les cavités externes (appelées "antichambres") sont délimitées par un anneau α et un anneau β . Cette structure favoriserait la rétention des substrats à l'intérieur du cylindre et jouerait de ce fait un rôle déterminant dans la processivité du protéasome [44]. Même si la composition du protéasome 20S des eucaryotes est plus complexe que celui des archaebactéries, en raison de l'augmentation du nombre des différentes sous-unités au cours de l'évolution, la structure quaternaire de ces complexes est très similaire [41, 45,46].

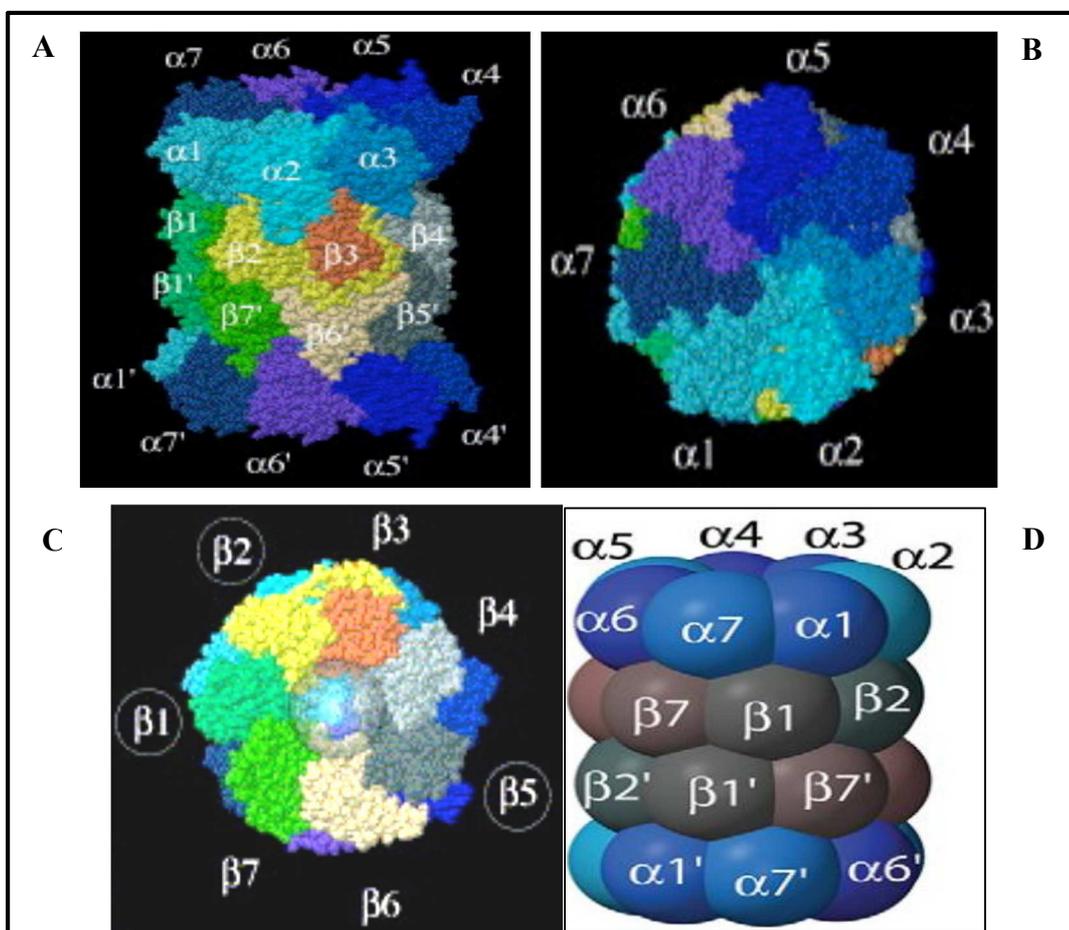


Figure 4. Structure du protéasome 20S.

(A) Vue schématique du protéasome 20S eucaryote : 4 anneaux, 2 anneaux alpha et 2 anneaux bêta. (B) Vue du dessus du protéasome 20S, (C) Coupe transversale du protéasome 20S au niveau de l'anneau β . Les 3 sous-unités catalytiques ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) sont entourées. (D) Topologie en vue latérale des 28 sous-unités du protéasome 20S représentées sous forme de sphères. A., B. et C [38] et D [47].

I.2.1.2.1. Chambre catalytique du protéasome 20S

Chez les eucaryotes, seules 3 des sous-unités β (β_1 , β_2 et β_5) possèdent une activité protéolytique clairement définie [45]. La cavité centrale contient donc 6 sites actifs. De plus, ces activités ont des spécificités distinctes qui ont pu être caractérisées grâce à l'utilisation de substrats peptidiques modèles : l'activité dite PGPH (peptidylglutamyl-peptide hydrolase) ou caspase-like (qui coupe après les résidus acides : aspartate ou glutamate...) est portée par β_1 , l'activité trypsin-like (qui coupe après les résidus basiques : arginine ou lysine) est portée par β_2 et l'activité chymotrypsin-like (qui coupe après des résidus hydrophobes : tyrosine ou phénylalanine) par β_5 [48]. On remarquera que la spécificité des différentes activités est strictement corrélée à la nature physico-chimique de l'environnement des sites actifs (Figure 3), ainsi β_2 présente dans son site actif un environnement acide dans lequel vont venir se loger des résidus basiques. Quel que soit le type de sous-unité β , le site actif utilise le groupement hydroxyle d'un résidu thréonine N-terminal comme nucléophile pour attaquer les liaisons peptidiques [42,49]. De plus ces trois sous-unités sont séquestrées dans la lumière de la cavité protéolytique, ce qui évite la dégradation non spécifique et inappropriée de protéines cellulaires [45]. La fonction des 4 autres sous-unités, n'est pas clairement définie à ce jour [50]. Il semblerait que le protéasome de mammifères pourrait abriter un nouveau site catalytique au niveau de la sous-unité β_7 . L'activité de ce site putatif reste à mettre en évidence [51].

I.2.1.2.2. Accès à la chambre catalytique du protéasome 20S

L'accès des protéines à l'intérieur de la chambre catalytique est limitée par un moyen d'auto-compartimentation utilisé par le protéasome au sein duquel les extrémités N-terminales des sous-unités α forment un réseau d'interactions entre elles et constituent ainsi un complexe en forme de baril, dont la cavité interne qui renferme les sites actifs n'est accessible qu'au travers d'un pore étroit [45]. Par cette organisation, les protéines doivent être "dépliées" pour accéder à la chambre catalytique et être dégradées [52]. Les extrémités N-terminales des sous-unités α correspondent également aux sites de liaisons avec les complexes régulateurs, notamment les régulateurs PA28/11S et le complexe 19S qui modulent l'activité protéolytique du protéasome en rendant accessible l'intérieur du complexe et en levant ainsi l'inhibition due à ces extrémités N-terminales [53]. In vitro, il est possible d'activer artificiellement le 20S par différents traitements, comme une

incubation prolongée à 37°C, un chauffage à 55°C, une incubation avec des faibles concentrations de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate, un détergent) ou avec des acides gras qui induisent probablement des changements de conformation des protéines qui altèrent les anneaux alpha et facilitent l'entrée des substrats [54]. Par ailleurs, il a également été montré que certaines protéines non repliées étaient capables d'ouvrir l'accès à la chambre protéolytique en absence d'activateurs, probablement via des interactions non-spécifiques avec des motifs hydrophobes de leurs séquences [55].

I.2.1.2.3. Assemblage du protéasome 20S

Il est longtemps présumé que la formation spontanée de l'anneau α constitue la première étape de l'assemblage du protéasome 20S. Grâce à de nombreux et récents travaux, l'intégrité du protéasome 20S est plus complexe et est assurée par l'assemblage précis et organisé des 14 sous-unités α et des 14 sous-unités β (Figure 5). Au moins cinq des sept sous-unités β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, $\beta 6$ et $\beta 7$) seraient synthétisées sous forme de précurseurs avec des propeptides N-terminaux, ces propeptides seraient nécessaires à l'assemblage du protéasome 20S eucaryote [56]. C'est le cas des trois sous-unités catalytiques $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ dont les propeptides permettent de protéger les thréonines N-terminales d'une N-acétylation qui serait fatale à leur activité [57]. De plus, les rôles des propeptides sont déterminants dans le positionnement précis des deux héli-protéasomes en vue de leur assemblage. Toutefois, le propeptide N-terminal de $\beta 5$ paraît être le plus important. En effet, des études ont montré qu'une délétion de ce propeptide chez la levure stoppe la maturation du protéasome 20S et rend ainsi la cellule non viable [58]. La dimérisation des deux héli-protéasomes est couplée au clivage des propeptides. Ce clivage libère la thréonine N terminale des sous-unités catalytiques et permet ainsi aux sites actifs de n'être formés que dans la particule assemblée [59]. Des études récentes montrent que l'assemblage du protéasome 20S des eucaryotes requiert la participation de protéines (accessoires). Chez la levure, l'assemblage final nécessite la participation de la protéine Ump1 (16 kDa) qui sera rapidement dégradée après maturation du protéasome. Ump1 serait fixée au niveau des complexes précurseurs par le propeptide de $\beta 5$ et permettrait de coordonner l'assemblage des sous-unités β entre elles [60]. Chez les mammifères, une famille de protéines homologues a été décrite. Chez l'homme, elle porte le nom de POMP pour (Proteasome Maturation Protein). Par ailleurs, des études montrent qu'il existe chez les mammifères des protéines « accessoires » PAC1 (30 kDa) et PAC2 (28 kDa) (Proteasome Assembling Chaperone) avec 19% d'identité entre ces deux protéines)

formant un hétérodimère qui se lierait très tôt aux intermédiaires d'assemblage et faciliterait la formation des anneaux β [61]. L'hétérodimère PAC1-PAC2 resterait associé aux anneaux β après leur formation et permettrait d'empêcher la formation de dimères d'anneaux α , favorisant ainsi l'association de sous-unité β aux anneaux α . Ces protéines (accessoires) seraient ensuite dégradées par le protéasome après sa maturation. Il semblerait que chez les mammifères, tout comme chez la levure, les sous unités β s'associeraient aux anneaux α de façon coordonnée. En effet des complexes incomplets de précurseurs contenant les 7 sous-unités α et 3 sous-unités β (β_2 , β_3 et β_5) ont été décrits [62]. Une nouvelle protéine (accessoire) a été identifiée chez le mammifère, il s'agit de la protéine PAC3, qui s'associerait également aux anneaux α et serait requise pour leur bonne formation [63]. Contrairement aux complexes PAC1-PAC2 et Ump1, PAC3 se dissocierait avant la formation de l'hémiprotéasome, ce qui conduirait au recrutement des sous-unités β et Ump1 (Figure 7). Enfin, une nouvelle protéine PAC pouvant intervenir dans la biogénèse du protéasome des mammifères a été identifiée, PAC4, son rôle et sa fonction reste encore peu clair [64].

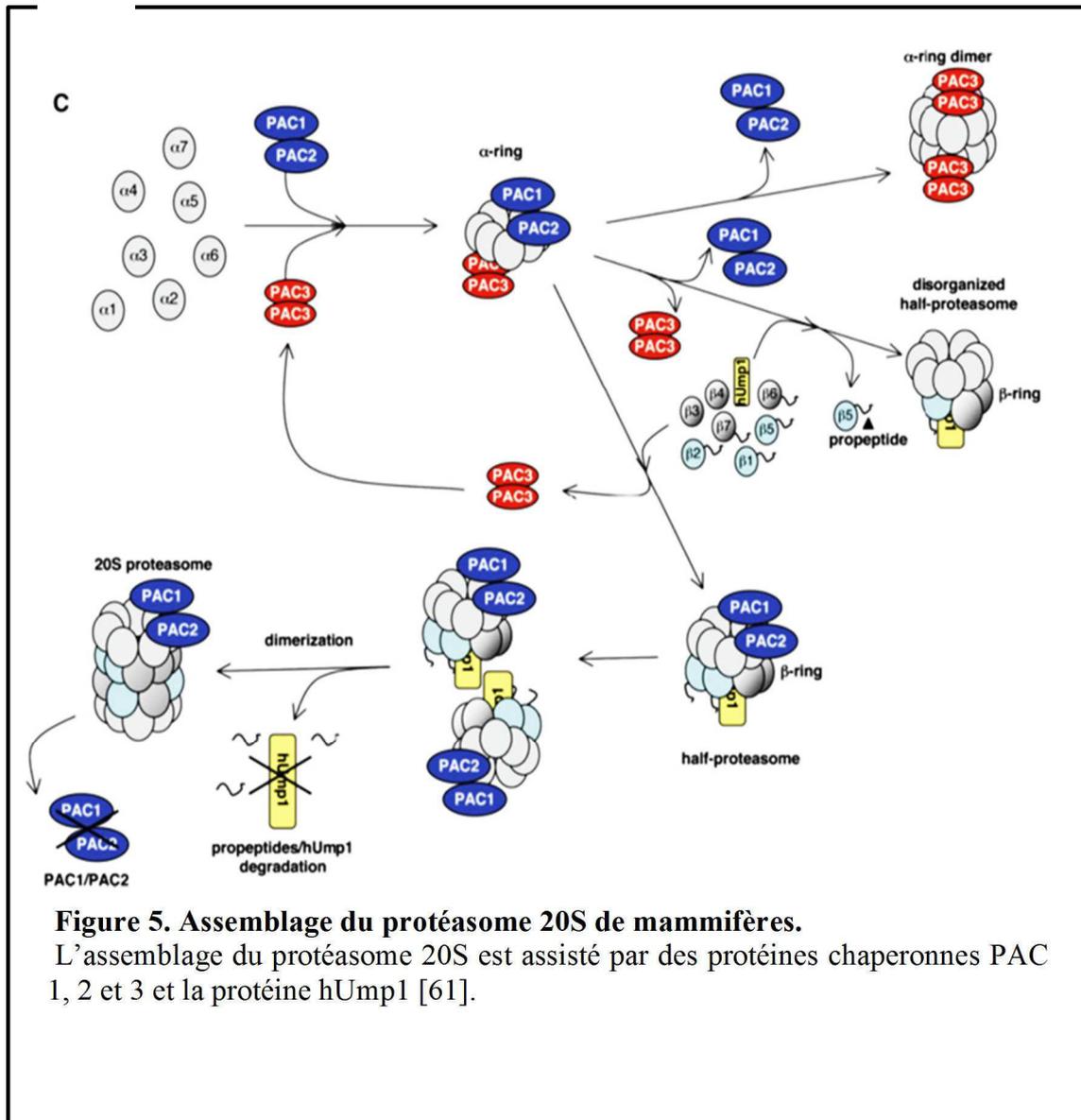


Figure 5. Assemblage du protéasome 20S de mammifères.

L'assemblage du protéasome 20S est assisté par des protéines chaperonnes PAC 1, 2 et 3 et la protéine hUmp1 [61].

I.2.1.2.4. Régulateurs du protéasome 20S

Le protéasome 20S est activé par trois activateurs. Il s'agit de 19S (ou PA700), 11S (ou PA28), et PA200 (où PA signifie Proteasome Activator) qui s'associent au 20S par des interactions avec l'anneau des sous-unités α (Figure 6). Les données structurales obtenues pour ces régulateurs du protéasome montrent qu'ils sont traversés par un pore ou un canal qui va se positionner dans le prolongement du canal du 20S. Pour PA28 (ou 11S), les données cristallographiques le montrent très clairement [65]. (Figure 6). En ce qui concerne PA200, des données de microscopie électronique prédisent un agencement en solénoïde dont le pore pourrait se positionner dans le prolongement du canal du 20S [66] (Figure 6). Pour le 19S (ou PA700), cet agencement semble concerner au moins le sous

complexe appelé "base". De plus, on peut observer des formes « hybrides » de protéasome [67] où une extrémité du 20S est associée à PA700 et l'autre à PA28 [65] (Figure 6). Ces données de structure sont en faveur d'un rôle de ces activateurs dans la régulation du 20S.

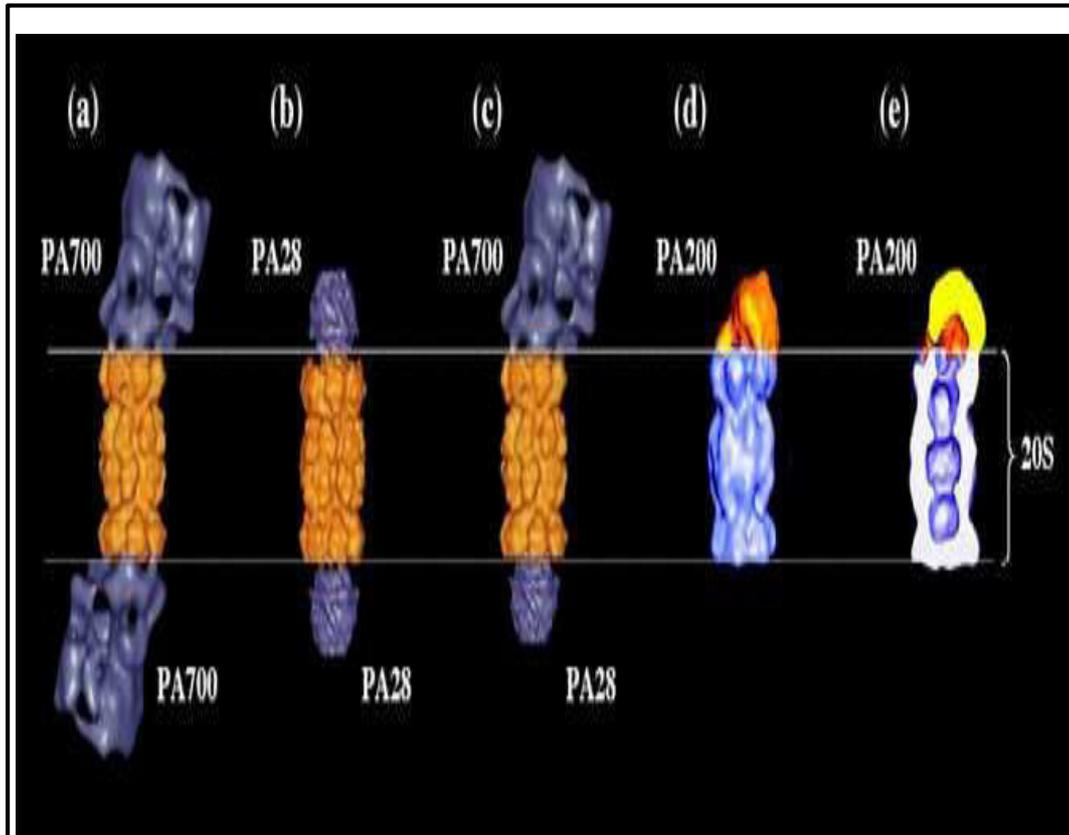


Figure 6. Protéasome 20S associé à ses différents activateurs.

Reconstitution tridimensionnelle des structures obtenues en microscopie électronique (a) Protéasome 26S : PA700 + 20S+ PA700. (b) Protéasome PA28+ 20S + PA28. (c) Protéasome hybride : PA700 + 20S+ PA28. (d) Protéasome PA200 + 20S [65, 66].

I.2.1.2.5. Nomenclature des sous- unités du protéasome 20S

Le (Tableau1) récapitule la plupart de noms utilisés pour les sous-unités du protéasome 20S chez les eucaryotes.

Tableau 1. Nomenclature des sous- unités du protéasome 20S chez *S.cerevisiae* et chez les mammifère [68] : définitions des sous- unités basées sur les données de structure cristallographique du protéasome 20S de *S. cerevisiae* (Groll et al 1997 [45]). Les sous-unités $\beta 1i$ et $\beta 2i$ ont été identifiées par homologie avec les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ respectivement. Les sous-unités $\beta 5i$ et $\beta 5t$ ont été identifiées par homologie avec la sous-unité $\beta 5$. Les noms les plus couramment utilisés pour les protéines de levure sont indiqués en gras.

<i>Protéasome 20S (CP)</i>						
<i>S. cerevisiae</i>			<i>Mammifères</i>			
[1]	Noms usuels	Gènes	[1]	Noms	Gènes	Autres noms
<i>Sous- unités de type α</i>						
$\alpha 1$	<i>Scl 1</i> <i>Prc2, Prcl, Y8</i>	<i>YGLOMC</i>	$\alpha 1$	<i>Iota</i>	<i>PSMA6</i>	<i>P27K, Pros27</i>
$\alpha 2$	<i>Pre8</i> , <i>Y7</i>	<i>YMLO92C</i>	$\alpha 2$	<i>C3, μ</i>	<i>PSMA2</i>	
$\alpha 3$	<i>Pre9</i> , <i>Y13</i>	<i>YGR135W</i>	$\alpha 3$	<i>C9</i>	<i>PSMA4</i>	
$\alpha 4$	<i>Pre6</i>	<i>YOLO38W</i>	$\alpha 4$	<i>C6</i>	<i>PSMA7</i>	<i>XAPC-7</i>
$\alpha 5$	<i>Pup2</i> , <i>Doa5</i>	<i>YGR253C</i>	$\alpha 5$	<i>C5, ζ</i>	<i>PSMA5</i>	<i>RC6-1</i>
$\alpha 6$	<i>Pre5</i>	<i>YMR314W</i>	$\alpha 6$	<i>C2, ν</i>	<i>PSMA1</i>	<i>Pros30,p30k</i>
$\alpha 7$	<i>Pre10</i> , <i>YC1</i>	<i>YOR362C</i>	$\alpha 7$	<i>C8</i>	<i>PSMA3</i>	<i>Psc3</i>
<i>Sous- unités de type β</i>						
$\beta 1$	<i>Pre 3</i>	<i>YJLOO1W</i>	$\beta 1$ $\beta 1i$	<i>Y, δ</i> <i>LMP2</i>	<i>PSMB6</i> <i>PSMB9</i>	<i>LMPY</i> <i>RING12</i>
$\beta 2$	<i>Pup1</i>	<i>YOR157C</i>	$\beta 2i$	<i>Z</i> <i>MECL1</i>	<i>PSMB7</i> <i>PSMB10</i>	<i>MC14</i> <i>LMP10</i>
$\beta 3$	<i>Pup3</i>	<i>YEER094C</i>	$\beta 3$	<i>C10</i>	<i>PSMB3</i>	<i>ϵ, HC10-11</i>
$\beta 4$	<i>Pre1</i>	<i>YER012W</i>	$\beta 4$	<i>C7</i>	<i>BSMB2</i>	<i>HC7-1</i>
$\beta 5$	<i>Pre2</i> , <i>Doa3</i> <i>Prg1,</i> <i>Srr2</i>	<i>YPR103W</i>	$\beta 5$ $\beta 5i$ $\beta 5t$	<i>X</i> <i>LMP7</i>	<i>BSMB5</i> <i>BSMB8</i> <i>BSMB11</i>	<i>LMPX, MB1</i> <i>C13</i> <i>RING10</i>
$\beta 6$	<i>Pre7</i> , <i>Prs3</i>	<i>YBL041W</i>	$\beta 6$	<i>C5</i>	<i>BSMB1</i>	
$\beta 7$	<i>Pre4</i>	<i>YFR050C</i>	$\beta 7$	<i>N3</i>	<i>BSMB4</i>	<i>Pros26</i>

I.2.1.3. Protéasome 19S ou PA 700

Le complexe régulateur 19S, est une macromolécule de 900 kDa qui s'associe aux deux extrémités du protéasome 20S pour former le protéasome 26S [69], comme il peut se lier à une seule extrémité [70]. On parle parfois de protéasome 30S pour distinguer les protéasomes 20S associés à 2 particules régulatrices. La microscopie électronique mais pas la cristallographie, vu qu'il n'a pas pu être cristallisé, le montre en structure asymétrique en forme de « tête de dragon chinois », chacune de deux extrémités pointant dans une direction opposée au sein du protéasome 26S [71,72]. (Figure 6). Ce complexe assure la reconnaissance des substrats polyubiquitylés ou non, leur dépliement, l'ouverture du canal puis leur translocation dans le 20S. Il prend aussi en charge la déubiquitylation des substrats ubiquitylés pour recycler l'ubiquitine. Le 19S est composé de deux sous-complexes, la base et le couvercle (lid) [73] (Figure 7). La base est constituée de 6 ATPases (Rpt 1 à Rpt 6), faisant partie de la famille AAA (ATPasiques Associated with different cellular Activity), et de trois sous-unités non ATPasiques (Rpn 1, Rpn 2 et Rpn 10), où "Rp" signifie Regulatory Particle chez *S. cerevisiae*, chez les mammifères, la nomenclature "S" est utilisée, où "S" signifie Subunit. On désigne les "Rpt" pour les ATPases et les "Rpn" pour les sous-unités non ATPases [1]. Le couvercle contient 9 sous-unités non ATPasiques (Rpn 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 et Rpn15) [1]. Une autre sous-unité, découverte plus récemment, Rpn13, est considérée comme une sous-unité intrinsèque du 19S [74,75]. (Figure 7, 8). Les 6 ATPases, assurent le lien avec l'anneau α du protéasome 20S permettant ainsi l'ouverture du pore [69]. Les sous-unités ATPasiques portent également une activité de liaison aux protéines mal repliées et ont pour fonction de déplier et transloquer ces protéines vers la cavité protéolytique par des processus ATP dépendant [78]. Le couvercle est nécessaire pour la dégradation des substrats ubiquitylés, en assurant la reconnaissance des substrats et/ou leur déubiquitylation, par clivage des chaînes d'ubiquitine via une activité isopeptidase de la sous-unité Rpn11 [79] (Figure 9).

I.2.1.3.1. Reconnaissance du substrat ubiquitylé

La majorité des substrats du protéasome sont étiquetés par une chaîne de polyubiquitine, qui joue probablement un rôle important dans la reconnaissance des substrats par le protéasome. La protéine Rpn10 (S5a chez les eucaryotes supérieurs) assure la jonction entre la base et le couvercle et a été précédemment décrite comme étant responsable de l'interaction avec les chaînes d'ubiquitine impliquant les lysines K48 et K63

de l'ubiquitine, et donc de la reconnaissance des substrats ubiquitylés [81]. Rpn10 contient dans sa partie C-terminale un domaine UIM (pour Ubiquitine Interacting Motif) qui permet son interaction avec l'ubiquitine [82,83] et dans sa partie N-terminale un domaine VWA (un motif structural identifié dans le facteur de Von Willebr And) impliqué dans l'interaction avec les autres sous-unités du 19S [73,84]. Son affinité est augmentée lorsque la taille de la chaîne d'ubiquitine augmente, avec un minimum de 4 molécules d'ubiquitine, ce qui peut s'expliquer par l'organisation des chaînes de poly-ubiquitine en modules de tétra-ubiquitine qui pourraient servir d'unités de reconnaissance par le protéasome [85]. Par ailleurs, il semblerait qu'une ATPase, la sous-unité Rpt5, soit capable de lier la chaîne d'ubiquitine, même si le motif d'interaction de Rpt5 avec l'ubiquitine reste à identifier [86]. En outre, la sous-unité Rpn13 du 19S a également été caractérisée comme un récepteur à l'ubiquitine via son domaine Pru (Pleckstrin-like receptor for ubiquitin) N-terminal [87,88]. Certains substrats mono-ubiquitylés peuvent également être ciblés au protéasome et leur reconnaissance pourrait dépendre tout particulièrement de Rpn13 [89]. Enfin, il existe des récepteurs extrinsèques qui s'associent de façon réversible et transitoire avec le protéasome et qui ont donc une organisation similaire à celle de la sous-unité Rpn10 avec ses motifs VWA et UIM, caractérisées par deux domaines : un domaine amino-terminal UBL (Ubiquitin-Like) d'interaction avec le protéasome et un ou plusieurs domaines UBA (Ubiquitin-Associated) de liaison à l'ubiquitine [90]. Une organisation similaire à celle de Rpn10 avec ses domaines VWA et UIM, et qui permettrait d'escorter les substrats ubiquitylés jusqu'au protéasome [91]. Certains substrats sont reconnus et dégradés par le protéasome 26S de façon ATP-dépendante sans avoir été préalablement ubiquitylés [74]. L'exemple le mieux caractérisé est celui de la paire formée par l'ornithine décarboxylase (ODC), p21 ou encore c-fos [92].

I.2.1.3.2. Dépliage du substrat

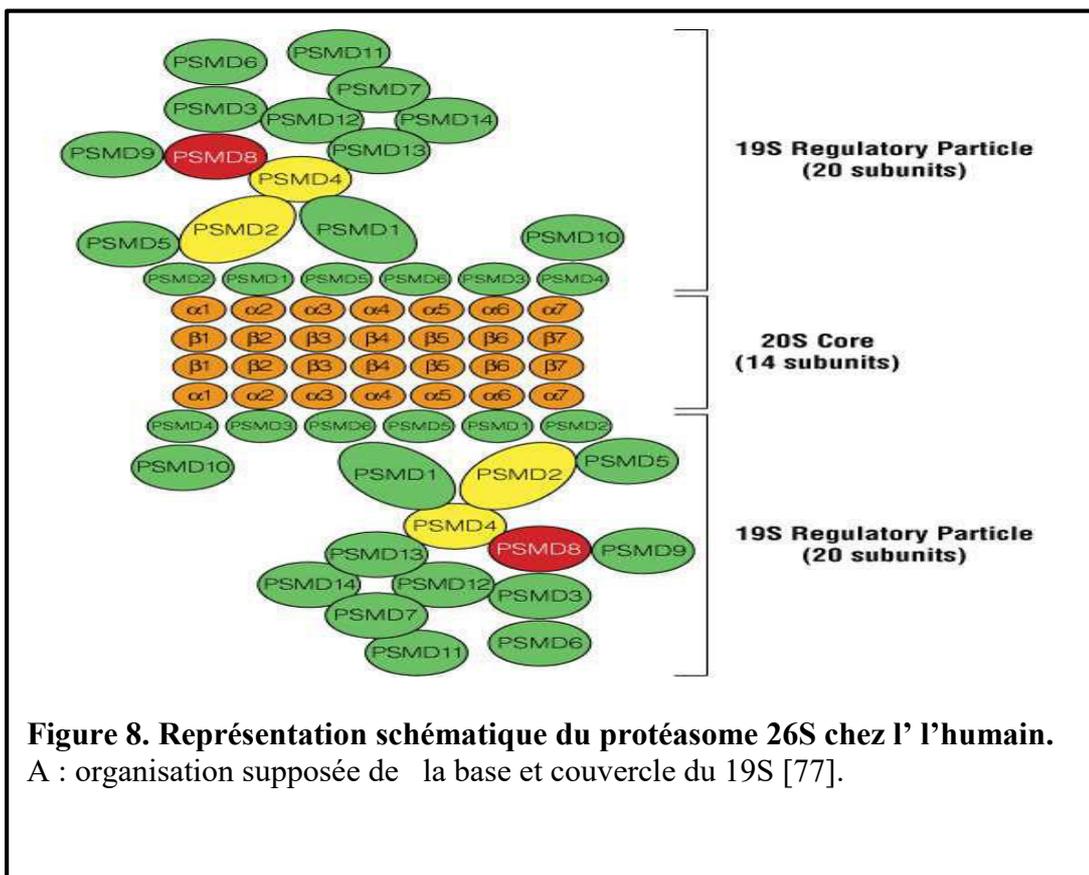
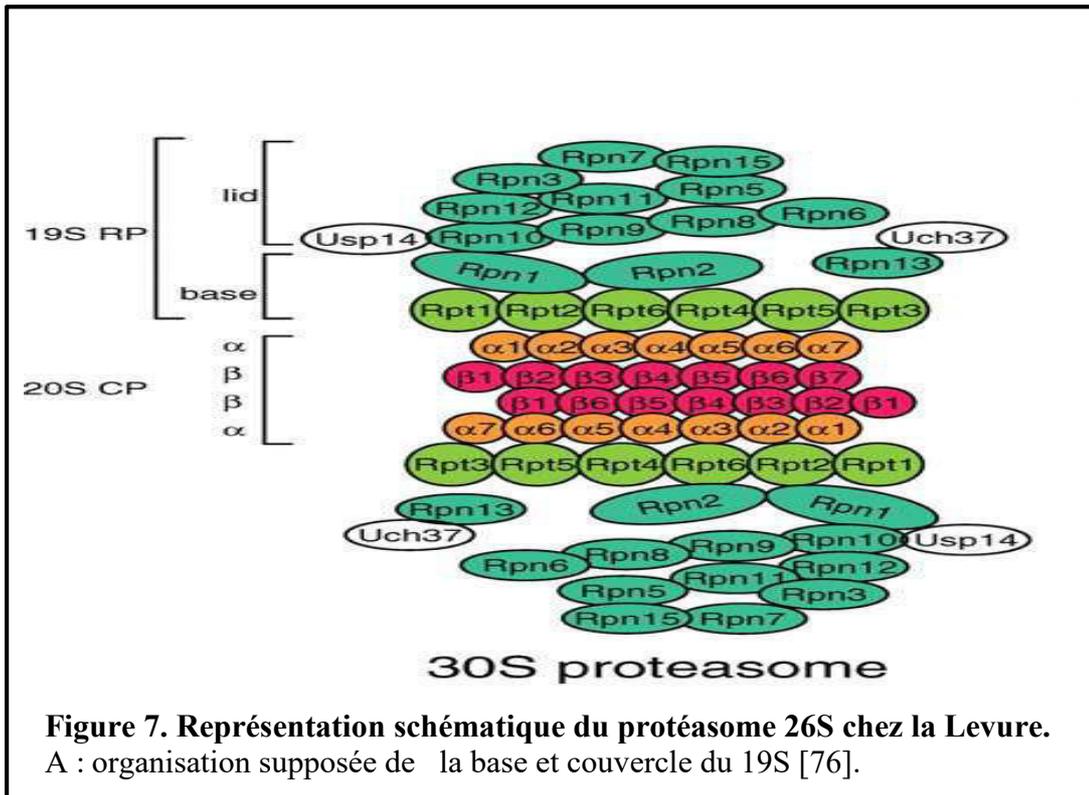
Le substrat protéique sous sa forme native ne peut traverser le canal trop étroit du protéasome 20S qui n'excède pas 13 Å sous sa forme ouverte chez les eucaryotes. Ainsi, le dépliage du substrat doit précéder sa dégradation [54]. Cette fonction est réalisée par la base du complexe 19S, plus précisément par ses ATPases, qui possèdent une activité de chaperon nécessitant l'hydrolyse de l'ATP et empêche l'agrégation des protéines et favorise le repliement de protéines dénaturées [93,94]. Cette activité de type chaperon est homologue au complexe PAN (Proteasome Activating Nucleotidase) des archaebactéries [95].

I.2.1.3.3. Translocation du substrat

La translocation du substrat à l'intérieur de la chambre catalytique du 20S est un processus couplé au dépliement du substrat par les ATPases du complexe 19S, avec consommation d'ATP [96,97]. Il a été proposé que le substrat déplié serait transloqué dans le corps catalytique par un mécanisme de déplacement analogue à celui de "DNA helicases" [98]. Il faut noter que pour des substrats non ubiquitylés et non structurés, tels que p21 et la caséine, il a été montré que leur dégradation ne nécessitait pas l'hydrolyse de l'ATP, suggérant que le transit de ces protéines aux sites catalytiques se fait par un processus passif et que la translocation par elle-même ne nécessite pas d'être couplée à l'hydrolyse de l'ATP [44].

I.2.1.3.4. Déubiquitylation du substrat et recyclage de l'ubiquitine

Le substrat polyubiquitylé reconnu par le protéasome 26S, après son dépliement et sa translocation vers la chambre protéolytique du 20S, est déubiquitylé par des protéases, pour le recyclage de l'ubiquitine et son réutilisation et également pour le bon fonctionnement du protéasome [80]. De nombreux enzymes de déubiquitylation (DUB) associés aux sous-unités du complexe régulateur 19S ont été décrites et présentant une activité isopeptidasique. La protéine clé de ce processus est la sous-unité intrinsèque du couvercle de la RP : Rpn11 [79, 99]. La correspondance entre la nomenclature utilisée chez la levure *S. cerevisiae* et celle des sous-unités humaines est indiquée dans le (Tableau 2).



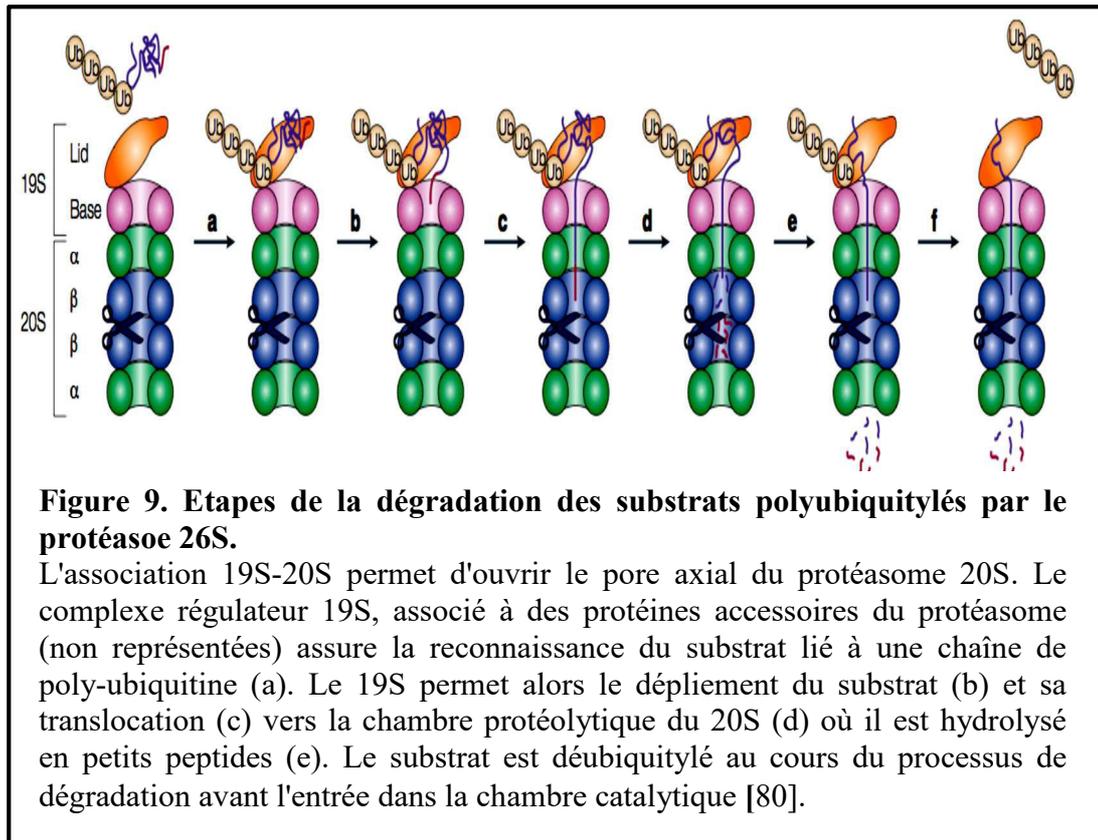
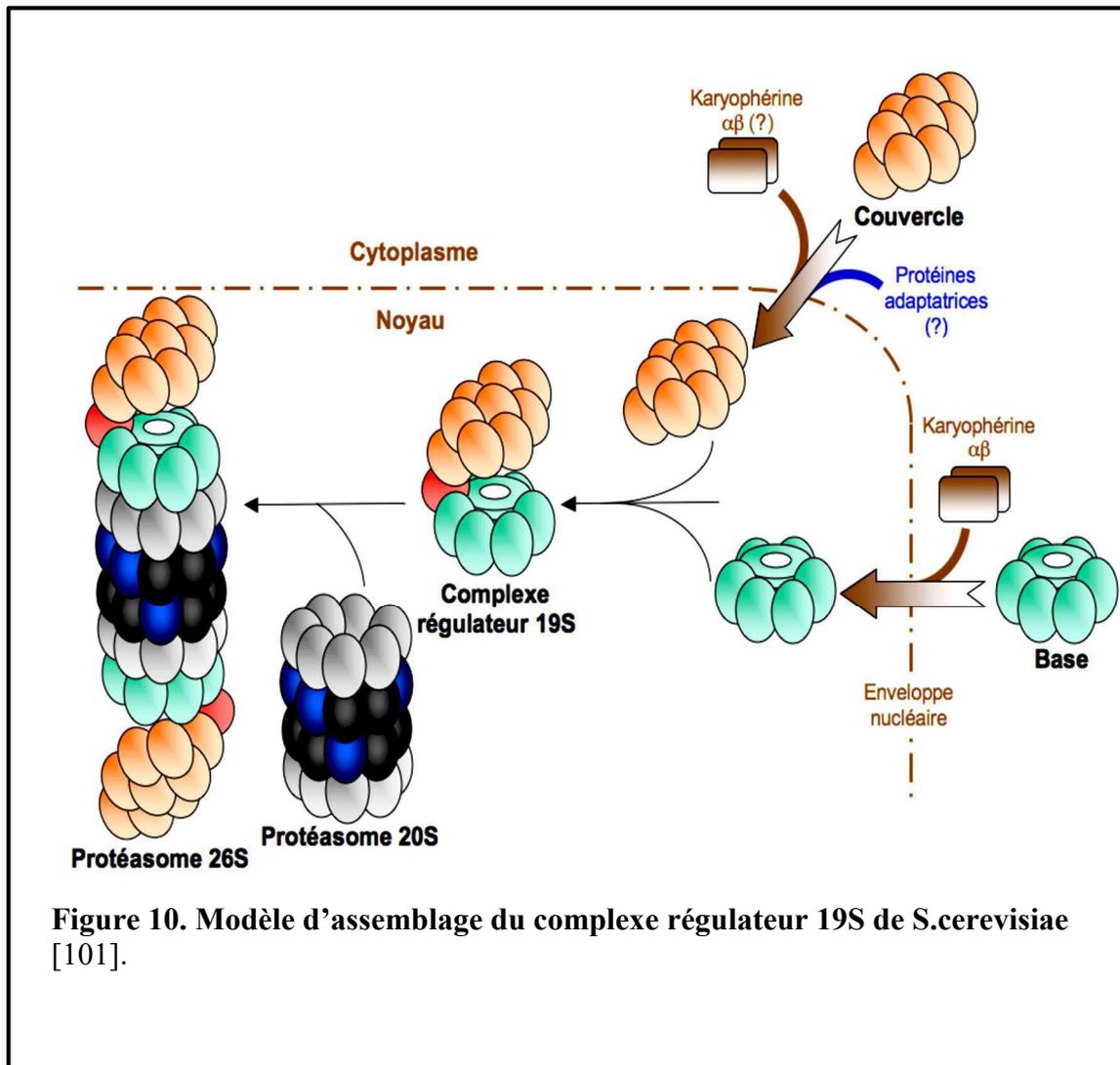


Tableau 2. Nomenclature des sous- unités de la RP 19S chez *S.cerevisiae* (S.c.) et *Homo sapiens* (H.s.) [68].

S.c	H.s	S.c	H.s	S.c	H.s
Rpt1	S7(Mss1)	Rpn1	S2	Rpn9	S11
Rpt2	S4	Rpn2	S1	Rpn10	S5a
Rpt3	S6b(Tbp7)	Rpn3	S3	Rpn11	S13
Rpt4	S10(Sug2)	Rpn5	P55	Rpn12	S14
Rpt5	S6a(Tbp1)	Rpn6	S9	Rpn13	hrpn13(Adrm1)
Rpt6	S8(Sug1)	Rpn7	S10a	Rpn15/Sem1	Dss1
		Rpn8	S12(Mov3 4)	??	UCH37

I.2.1.3.5. Assemblage de la particule régulatrice 19S

L'assemblage du protéasome 19S n'est pas très bien compris, cependant des études ont montré qu'il fait appel comme le protéasome 20S à des multiples protéines chapérones. La formation de la base de la RP serait indépendante de celle du couvercle [100]. La base s'associerait tout d'abord avec le protéasome 20S, puis le couvercle s'assemblerait au complexe base 20S pour former le protéasome 26S mature [100] (Figure 10). Des protéines Nas2, Hsm6 et Rpn14 sont impliquées dans l'assemblage de la base chez *S.cerevisiae* [102] et respectivement p27, S56, p28 et Rpn14 chez les mammifères [103]. Ces protéines interagissent avec certaines des ATPases de la RP. Il est à noter que l'assemblage du protéasome 26S mammifère requiert de l'ATP, en plus l'ATP retarde la dissociation du 26S en sous complexes CP et RP [8].



I.2.1.4. Protéasome 11S ou PA28 ou REG

Le complexe activateur 11S retrouvé chez les eucaryotes supérieurs mais pas chez la levure, ni les plantes et capable en s'associant aux deux extrémités du protéasome 20S d'activer fortement l'hydrolyse de petits peptides fluorogéniques, mais incapable de stimuler la dégradation de protéines natives, ubiquitylées ou non. , regroupe une famille de protéines de 28 kDa dénommés PA28 ou 11S REG qui comprend trois membres homologues : PA28 α , PA28 β et PA28 γ [47]. PA28 γ est exprimé plus fortement dans le cerveau et forme un homoheptamère, alors que PA28 α et β s'assemblent en un complexe hétéroheptamérique et sont très peu exprimés dans le cerveau ; ils sont exprimés dans tous les tissus, avec un niveau particulièrement élevé dans les tissus immuns. [47]. Le Complexe PA28 γ est strictement nucléaire et non inductible par l'interféron gamma et pourrait être impliqué dans la régulation de la transcription et de l'apoptose, tandis que le complexe PA28 α - β est essentiellement cytoplasmique et inductible par l'interféron gamma et intervient dans la réponse immunitaire en contribuant à la présentation antigénique par le CMH de classe I, de façon indépendante de l'ATP, formant ainsi l'immunoprotéasome, par induction de trois nouvelles sous-unités du 20S (β 1i, β 5i et β 2i) (i pour inductible) qui vont s'incorporer à la place des sous-unités constitutives, mais des rôles non-immunologiques sont probables [104,105]. De complexes hybrides dans lesquels un protéasome 20S est associé d'une part à un complexe 19S et d'autre part à un complexe 11S pour former l'immunoprotéasome, propose que ces deux régulateurs pourraient avoir un rôle complémentaire dans la réponse immunitaire [67,106].

I.2.1.5. PA200

L'activateur PA200 est une protéine de 200 kDa qui se fixe au niveau des extrémités du protéasome 20S, mais son rôle biologique est très peu connu cependant, il a été suggéré qu'il joue un rôle dans la réparation de l'ADN et des homologues ont été retrouvés chez la levure, le vers, et l'homme [47]. PA 200 comme PA 28 est capable d'activer la dégradation de peptides par le protéasome 20S de façon indépendante de l'ATP mais incapable de le faire sur des protéines ubiquitylées [47]. L'association de PA200 à une seule extrémité du 20S forme avec PA700 un protéasome hybride [107]. Actuellement il est proposé que PA200 jouerait ainsi le rôle d'adaptateur comme PA28 en modulant l'activité du 26S [108].

I.2.2. Ubiquitine et ubiquitylation des protéines

I.2.2.1. Ubiquitine

L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine de 76 acides aminés, de masse moléculaire d'environ 8,5 kDa, présente dans toutes les cellules eucaryotes, est très conservée au cours de l'évolution [109]. Elle est synthétisée sous forme de précurseurs protéiques, soit en fusion N-terminale avec une autre protéine (souvent des protéines ribosomales), soit sous forme de plusieurs molécules d'ubiquitine fusionnées les unes aux autres [110,109]. Pour rendre disponible l'ubiquitine, ses précurseurs doivent donc être clivés, ce qui est assuré par des enzymes de déubiquitylation ou DUB [111]. L'ubiquitine possède une structure globulaire compacte avec une extrémité en C-terminale libre et 7 résidus lysine présents en position 6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63 dans sa séquence et situés en surface de la molécule [112] (Figure 11). La conjugaison de l'ubiquitine aux substrats se fait via une liaison isopeptidique entre le groupement carboxylique de la glycine C-terminale et le groupement d'un résidu lysine du substrat, aussi l'allongement de la chaîne d'ubiquitine suit le même mécanisme [114]. Le rôle principal de cette molécule est de marquer les protéines qui doivent être détruites par le protéasome [9].

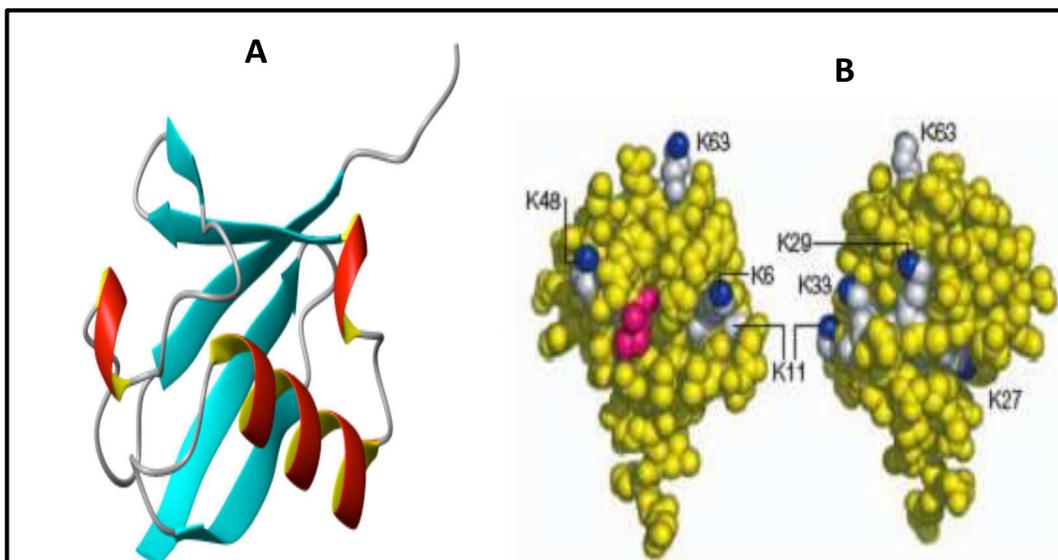


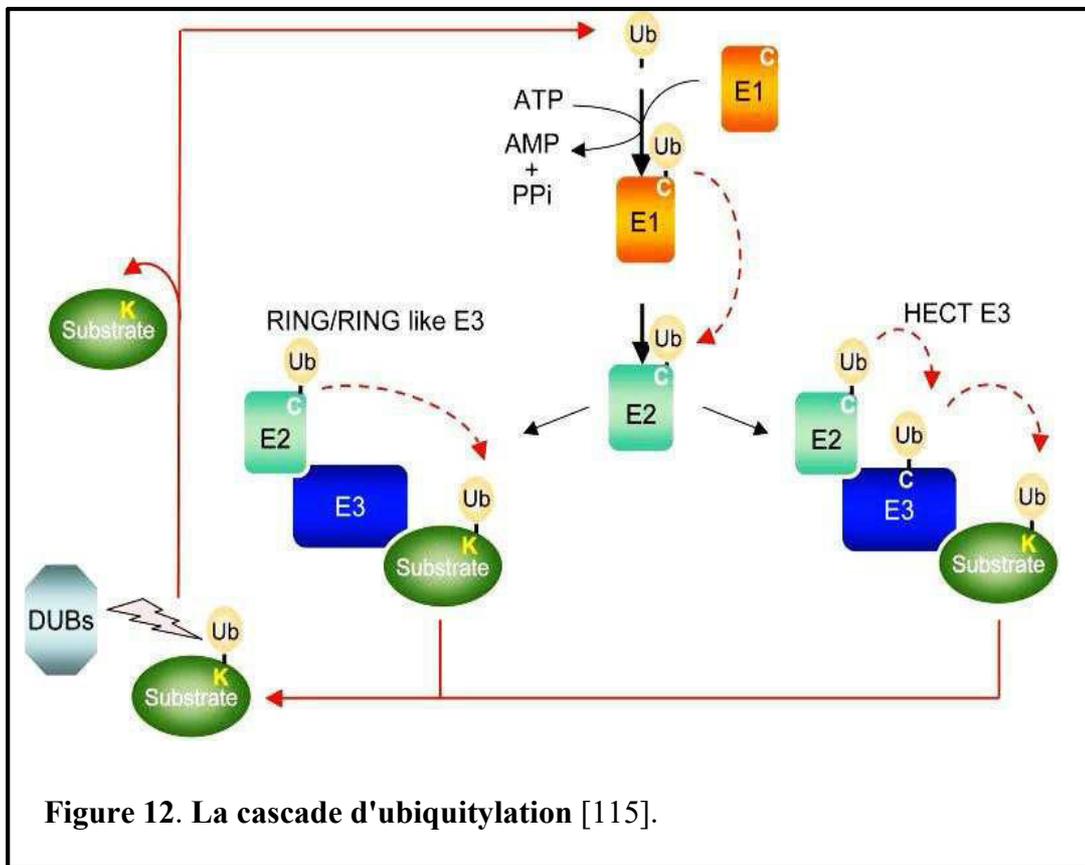
Figure 11. Structure de l'ubiquitine.

A) Structure globulaire compacte de l'ubiquitine caractérisée par un repliement spécifique qui comprend 5 feuillets α (en bleu) enroulés autour d'une hélice α (en rouge). **B)** Deux faces opposées de l'ubiquitine sont présentées; les 7 lysines sont représentées en blanc, avec l'atome d'azote du groupement amine en bleu; l'isoleucine 44 est représentée en rouge : ce résidu est impliqué dans les surfaces d'interaction entre l'ubiquitine et les UBD [113].

I.2.2.2. Cascade d'ubiquitylation

La conjugaison de l'ubiquitine ou (plusieurs molécules d'Ub) à son substrat (protéine) se fait par une cascade enzymatique impliquant au moins trois types d'enzymes, E1, E2 et E3 [9]. (Figure 12). La molécule d'ubiquitine est tout d'abord activée par l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (ubiquitin-activating enzyme) appelée E1 ou Uba qui effectue l'activation ATP-dépendante de l'ubiquitine en formant une liaison thiol-ester à haute énergie entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et le groupement thiol (SH) d'une cystéine de l'E1. L'ubiquitine activée est ensuite transférée, en formant une autre liaison thioester, à un E2 ou Ubc (Ubiquitin-carrier ou Ubiquitin-conjugating enzyme), enzyme de conjugaison au niveau du groupement thiol de sa cystéine active. En fin la dernière étape est catalysée par une ubiquitine-ligase (E3), qui favorise le transfert de l'ubiquitine liée à E2 directement sur le substrat sans former de liaison thioester avec l'ubiquitine mais par la formation d'une liaison isopeptidique entre le groupe carboxyl de la glycine terminale de l'ubiquitine et le groupe amine d'un résidu lysine du substrat [116]. Dans l'ubiquitylation, l'E3 est un facteur clé puisqu'il est impliqué dans la reconnaissance spécifique du substrat et est donc responsable de l'essentiel de la spécificité de la réaction. Ceci explique qu'il existe une très grande quantité d'E3s différentes, probablement des centaines chez les mammifères, alors que l'on ne compte qu'une trentaine d'E2s et que deux E1s [117]. Les E3s sont généralement classées en 2 principales familles [118,117]: la famille des E3s à domaine HECT (pour Homologous to E6-associated protein C-Terminus) dont le terme d'Ubiquitine-ligase est approprié car elles jouent un rôle direct dans la conjugaison de l'ubiquitine au substrat. De ce fait, l'ubiquitine activée est transférée de l'E2 sur un résidu cystéine de l'E3 avant d'être conjuguée au substrat [119] et les E3s à domaine RING (Really Interesting New Gene) qui par contre ne sont de véritables enzymes et servent de molécules adaptatrices entre l'E2 et le substrat pour faciliter l'ubiquitylation du substrat, en rapprochant celui-ci de l'E2 [116]. Dans certains cas, la poly-ubiquitylation du substrat nécessite l'intervention d'une quatrième enzyme appelé E4, enzyme d'élongation qui reconnaît spécifiquement la mono- ou l'oligo-ubiquitylation et permet, en coopération avec l'E3, d'allonger et de modifier le type de chaînes (de K29 à K48) présent sur le substrat, permettant ainsi sa dégradation efficace par le protéasome [120]. L'ubiquitylation d'une protéine est contrôlée par plusieurs signaux contrôlant les interactions entre les ubiquitine-ligases et leurs substrats, incluant des modifications post-traductionnelles de l'enzyme et/ou du substrat, le contrôle de leur localisation cellulaire ou encore l'intervention de

protéines [9, 1, 80]. En fait tout changement d'état du substrat ou de l'E3 est susceptible d'agir comme un signal permettant la reconnaissance du substrat par son E3. L'ubiquitylation est un processus réversible, les protéines peuvent être dé-ubiquitylées par l'intervention d'enzymes de dé-ubiquitylation (DUB) ou isopeptidases [121] (Figure 12).



I.2.2.3. Différents types d'ubiquitylation

Les protéines peuvent être modifiées soit par une seule ubiquitine (mono-ubiquitylation) soit par des chaînes de poly-ubiquitine (poly-ubiquitylation), sur un ou plusieurs résidus du substrat, au niveau d'une lysine le plus souvent; on parle alors de multi-mono-ubiquitylation et de multi-poly-ubiquitylation, respectivement. Dans le cas de la poly-ubiquitylation la réaction d'ubiquitylation est renouvelée, mais l'ubiquitine est conjuguée cette fois-ci sur une lysine de l'ubiquitine précédente. Compte tenu que l'ubiquitine possède 7 lysines dans sa séquence, et que toutes sont exposées à sa surface, il peut se former différents types de chaînes de poly-ubiquitine [121]. Cette série de modifications constitue une gamme de signaux qui peuvent avoir des implications très diverses. L'ubiquitine constitue une étiquette permettant au substrat d'être reconnu par des effecteurs spécifiques, et d'être orienter vers des destins différents [122,123]. Des

nombreux travaux montrent que seuls les substrats possédant une chaîne de poly-ubiquitine d'au moins 4 molécules d'ubiquitine sur leurs résidus de lysine 48 peuvent être dégradés par le protéasome. Ces chaînes K48, qui sont les plus représentées constituent donc le signal majoritaire de reconnaissance par le protéasome 26S [124]. La conjugaison d'un substrat par une chaîne de type K63 est impliquée dans la réparation de l'ADN, la régulation des voies de signalisation induites par NF- κ B [125], la réponse inflammatoire, le transport des protéines [126]. La mono-ubiquitinylation est impliquée dans d'autres fonctions, comme le tri à la sortie des endosomes [114], la régulation des histones, la réparation de l'ADN, le bourgeonnement des particules virales, et l'export nucléaire [125].

I.2.2.4. Protéines à UBD ou Récepteurs de l'ubiquitine

Les protéines ubiquitylées sont reconnues par des récepteurs de l'ubiquitine qui permettent leur orientation vers différentes voies cellulaires. Ces récepteurs contiennent généralement plusieurs motifs d'interaction avec l'ubiquitine ou UBD (Ubiquitin Binding Domain) qui peuvent interagir de manière autonome avec l'ubiquitine et parfois des motifs d'interaction avec les substrats. Plusieurs types d'UBD ont été caractérisés, comme les UIMs (Ubiquitin Interacting Motifs) ou encore les UBAs (Ubiquitin Associated domains) [126]. Les protéines à UBD regroupent des protéines diverses, telles que des E3s et des isopeptidases, ou une sous-unité du protéasome. Certaines protéines à UBD contiennent par ailleurs un domaine UBL (Ubiquitin-Like), qui peut lui-même interagir avec les domaines UBD. Cette structure confère à certaines protéines la propriété d'adresser des substrats ubiquitylés au protéasome, en interagissant avec les substrats ubiquitylés via leurs domaines UBD et avec le protéasome via leurs domaines UBL [127].

I.2.2.5. Protéines de la famille ubiquitine ou ubiquitin-like

Les protéines "ubiquitin-like" ont une structure homologue à celle de l'ubiquitine et comme cette dernière, elles ont le pouvoir d'être conjuguées sur des résidus lysines de protéines substrats. On distingue deux sous-familles. Les protéines strictement ubiquitin-Like (UBLs) et les protéines à domaine ubiquitin-like (UDPs : Ubiquitin-Like Domain Proteins). Les protéines UBLs les plus étudiées à ce jour sont les membres de la famille SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier), la protéine NEDD8 (Neural precursor cell-expressed Developmentally Downregulated-8), et ISG15 (Interferon-Stimulated Gene 15) [128].

I.2.2.6. Déubiuitylation des protéines

L'ubiquitylation est une réaction réversible par la présence d'isopeptidases ou enzymes de déubiquitylation (DUBs ou deubiquitinating enzymes) qui sont capable de cliver l'ubiquitine et permettre ainsi son recyclage pour une quantité intracellulaire libre nécessaire au maintien de la protéolyse. Elles sont donc dans le contrôle et le devenir des substrats ubiquitylés [129]. Les déubiquitylases ou déubiquitinyases (DUBs) constituent une famille d'enzymes divisée en cinq classes, basées sur les similarités de leurs séquences et sur leurs mécanismes d'action : 4 sous-familles de protéases à cystéine : les UBPs (Ubiquitin-specific processing proteases), les UCHs (Ub C-terminale Hydrolases), les MJDs (Machado-Joseph Disease Protein Domain Proteases), les OTUs/Cezanne et Ataxin-3/Josephin (Ovarian Tumor Protases) et une famille de métalloprotéases dépendantes du Zinc (MPN+/JAMM). La sous-famille des UBPs est la plus étendue et la plus et capable d'hydrolyser efficacement les chaînes de poly-ubiquitine [129].

I.2.3. Inhibiteurs du protéasome

Les inhibiteurs du protéasome ont des applications thérapeutiques contre des maladies telles que le cancer, et de nombreuses applications en laboratoire de recherche. Ils se lient aux sous-unités catalytiques du protéasome 20S et inhibent ainsi ces activités protéolytiques [130]. Ces inhibiteurs ont contribués à la compréhension des fonctions essentielles du protéasome 26S dans différents processus et mécanismes des cellules eucaryotes, par contre plusieurs d'entre eux sont peu spécifiques et par conséquent leur utilisation en thérapeutique est limitée [131]. La majorité des inhibiteurs utilisés actuellement agissent principalement sur l'activité chymotrypsine-like, portée par les sous-unités β_5 , et considérée comme activité de référence [130]. Ces inhibiteurs de l'activité chymotrypsine-like sont hautement hydrophobes ce qui facilite leur passage au niveau de la membrane plasmique des cellules, alors qu'ils possèdent également quelques effets sur les deux autres types d'activités (typsine- Like et PGPH) [130].

Les inhibiteurs du protéasome sont des petites molécules d'origine naturelle ou synthétiques. Ce sont des dérivées peptidiques à part la lactacystine (Figure13). Les inhibiteurs naturels sont la lactacystine, un métabolite issu de *Streptomyces* [132]. l'époxomycine, l'éponémycine et le peptide cyclique TMC-95 [130]. Les inhibiteurs synthétiques sont principalement représentés par la famille des peptides aldéhydiques, représentée par les molécules : l'Ac-Leu-Leu-nLeu-al (ALLN), Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-

al ou PSI, le tripeptide aldéhyde Z-Leu-Leu-Leu-al ou MG132 et le dipeptide aldéhyde CEP-1612 [130]. et la famille des peptides vinylsulfones représentée par deux composés majeurs : le NVLS et le peptide Tyr-Leu-Leu-Leu-vinylsulfone (YL3VS) [133] et également la famille des peptides boronates comme le Bortézomib ou PS-341 (Velcade) qui a montré une activité antitumorale significative et une toxicité tolérable utilisé seul ou en combinaison avec d'autres agents anticancéreux lors des essais précliniques et cliniques pour le traitement des myélomes multiples [6]. Il est à noter qu'une nouvelle génération d'inhibiteur du protéasome comme le NPI-0052 (salinosporamide A, β -lactone) et le carfilzomib (PR-171, dérivé de l'époxomicine) est actuellement plus prometteuse [134]. Des répresseurs de l'activité du protéasome ont été bien décrits in vivo comme in vitro, tels que le polypeptide PR39 [135]. La protéine PI31 (PI : Proteasome Inhibitor) [136]. La protéine HBx du virus de l'Hépatite B [137] et Tat du virus HIV [138].

I.2.3.1. Inhibiteur du protéasome MG 132

Le MG132, aussi appelé carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal, Z-LLL-CHO, est un aldéhyde peptidique, capable d'inhiber différents types de protéases comme les serine protéases, la calpaine, etc... Il a été démontré que le MG132 et d'autres aldéhydes peptidiques inhibent fortement les activités peptidases multiples du protéasome ainsi que la calpaine [139]. Le MG132, comme tous les autres inhibiteurs du protéasome, est toxique pour les cellules et tissus, et induit la mort cellulaire à des concentrations élevées ou après des traitements prolongés. Il est donc essentiel de titrer la concentration optimale sur une large gamme. La concentration optimale dépend non seulement du type de cellules mais également des conditions de culture cellulaire comme la confluence des cellules, la concentration en sérum et la composition du milieu de culture. Le MG132 doit être stocké à -20°C , et peut être dissout dans du DMSO (10mg/ml) ou du méthanol (1 mg/ml), et aliquoté et stocké à -20 ou -80°C . Lors de l'addition au milieu de culture, si la solution de MG132/DMSO produit un précipité, elle peut être réchauffée à 40°C [140]. Le MG132 a été aussi utilisé pour étudier les rôles des MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) et NF kappa B dans les monocytes humains [141].

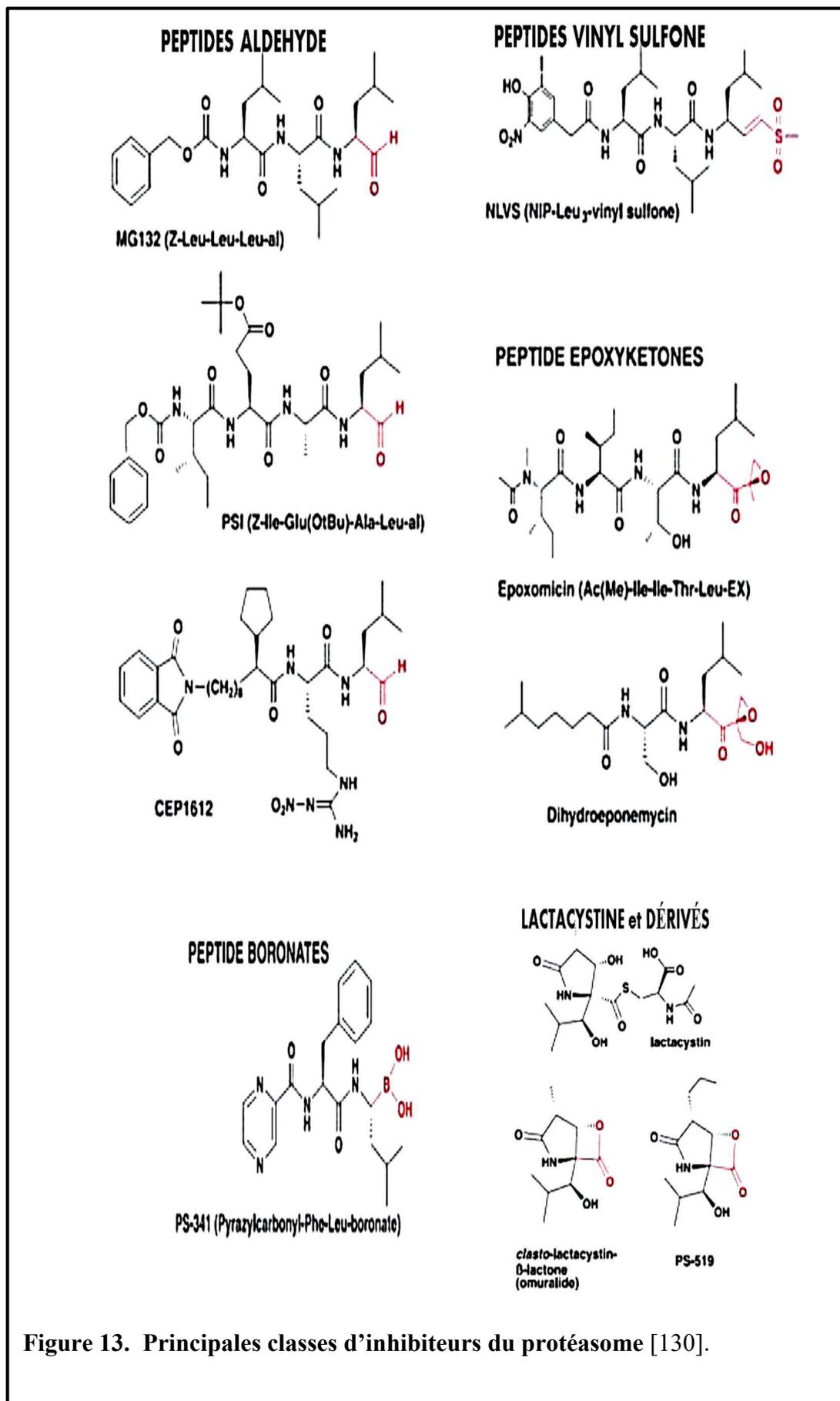


Figure 13. Principales classes d'inhibiteurs du protéasome [130].

I.2.3.2. Analyse du protéasome

Plusieurs méthodes sont maintenant utilisées dans les laboratoires de recherche afin de comprendre la fonction et la composition du système ubiquitine protéasome. Parmi ces méthodes : la mesure des activités protéolytiques spécifiques du protéasome (Trypsine-like, chymotrypsine-like et PGPH ou caspase –like) dans un lysat total ou dans un sous-compartiment cellulaire ou bien sur le protéasome purifié), en suivant la dégradation de peptides fluorogéniques spécifiques des activités du protéasome, la détermination de la composition en sous-unités du 20S et 19S du protéasome et l'évaluation de la quantité de protéasome 20S dans la cellule par ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).

I.3. Protéasome, fonctions et pathologies

Le système ubiquitine-protéasome (UPS), intervient dans plusieurs processus biologiques des cellules eucaryotes, incluant la destruction contrôlée de nombreux régulateurs cellulaires, la maturation de différents précurseurs polypeptidiques, l'élimination des protéines endommagées, ainsi que la production des peptides antigéniques présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. De ce fait, l'UPS est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires, comme la régulation du cycle cellulaire, Le stress, l'apoptose, la signalisation cellulaire et la réponse immunitaire.

Il est bien clair qu'une altération de ses fonctions conduit à de nombreuses pathologies, comme par exemple, le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, de parkinson, de Huntington), les maladies rénales, inflammatoires, auto-immunes, le vieillissement et certaines infections virales [142] (Tableau 3).

Il est bien établi aujourd'hui que la manipulation en ce système ouvre de très grands espoirs thérapeutiques. D'une manière brève, nous exposons ici quelques exemples de son rôle dans certaines pathologies :

L'inhibition du protéasome est prometteuse dans les maladies inflammatoires et auto-immunes, comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et le l'asthme, en réduisant les processus inflammatoires et prolifératives tel que le NFkB [143,144].

L'effet des inhibiteurs du protéasome dans le traitement des infections virales semble spécifique du type cellulaire infecté ainsi que du virus responsable de l'infection [145].

Dans la maladie d'Alzheimer, une interaction directe des peptides AB42 avec le protéasome, aboutit l'inactivation de ce dernier [146].

L'inhibition du protéasome conduit à la réduction de la production de l'endothéline-1, un vaso-constricteur très puissant dans le développement des maladies à prion, indiquant l'implication de l'UPS dans le contrôle de l'abondance de vasoconstricteur [147].

Un défaut d'expression de la sous-unité LMP2 du protéasome a été montré dans le diabète de type 1 chez la souris [148].

L'inhibition du protéasome induit une augmentation de la réplication bactérienne dans le cytoplasme des cellules infectées. Dans l'état normal, le protéasome agit directement sur les bactéries et permet la production de peptides antigéniques qui sont présentés par les molécules de CMH de classe I pour faire face en cas d'une réinfection [149].

Un dysfonctionnement de l'UPS est lié à des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, ou maladies à prion) qui sont caractérisées par l'accumulation des agrégats des protéines [150]. Il a été montré qu'au cours du vieillissement l'activité du protéasome est altérée [11].

Des anomalies de l'UPS sont rencontrées dans différents types de cancer, par exemple toute diminution dans la reconnaissance et l'ubiquitylation d'oncoprotéines ou au contraire, toute augmentation du ciblage de protéines oncosuppressives telles que P53, pBb ou P 27, vers la dégradation est susceptible de contribuer activement au développement tumoral [68].

Tableau 3. Effets de l'environnement et de l'âge sur le système protéasome.

Le Tableau résume les maladies dont les protéasomes sont reconnus d'être impliqués et l'impact des effecteurs : âge et environnement dans leur développement [2].

Disease	Impairment of proteasomes	Proteasome population affected	Symptoms	References
-Cardiac dysfunction				
- transient ischemia/reperfusion	decreased activity	26S proteasomes	apoptosis	89, 90
- pressure overload	decreased activity	26S proteasomes	apoptosis	68
- inclusion body myositis	decreased activity	26S proteasomes, induction of immunoproteasome	inclusion bodies	83 134
-Cataract formation	decreased activity	20S proteasomes	aggregation of (oxidized) proteins	66
-Neurodegenerative diseases				
- Alzheimer's	decreased activity	20S/26S proteasomes	β -amyloid plaques/tau tangles, neuronal loss	77 78
- Parkinson's	decreased activity	20S/26S proteasomes	Lewy bodies, neuronal loss	73
- amyotrophic lateral sclerosis	decreased activity	20S/26S proteasomes	SOD1 aggregates, motor neuron loss	75
- Huntington's	decreased activity	20S/26S proteasomes, induction of immunoproteasome	poly-glutamine inclusions, neuronal dysfunction/loss	76 135
Viral infections				
- HIV/adenovirus	decreased expression, inhibition	immunoproteasomes, 20S proteasomes	impaired immune response	156 182
- hepatitis B	inhibition	20S/26S proteasomes	hepatitis	183
- HTLV	activation	nuclear proteasomes	neurological inflammation	184
- Autoimmune/rheumatoid diseases				
- Sjogren's syndrome	decreased expression	subunit β 1i	tissue destruction	185
Cancer				
- multiple myeloma - renal carcinoma	increased activity, depressed expression	20S/26S proteasomes, immunoproteasomes	suppression of apoptosis, induction of proliferation	122 142,145
Cachexia				
- sepsis	increased activity	20S/26S proteasomes	Inflammation, muscle protein wasting	100
- metabolic acidosis	increased activity	20S/26S proteasomes	Inflammation, muscle protein wasting	97

I.3.1. Protéasome et stress oxydatif

L'élimination des protéines oxydées accumulées durant le stress oxydatif causé par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou réactives oxygen species (ROS) ou de l'azote est assurée par des systèmes de réparation et de dégradation dont la fonction a été généralement retrouvée diminuée avec l'âge [11] (Figure 14). Il a été montré que seules les oxydations des acides aminés : cystéine et méthionine sont considérées comme réparables par des systèmes enzymatiques catalysant leur réaction au sein des protéines [151,152]. Les oxydations des autres acides aminés irréversibles seront éliminées par dégradation des protéines altérées au niveau du cytoplasme et noyau via le système ubiquitine protéasome [19]. Les protéines oxydées représentent de bon substrat pour le protéasome *in vitro* et elles sont préférentiellement dégradées par le protéasome 20S de façon indépendante de l'ATP et de l'ubiquitine [18,19]. Cependant, certaines études ont montré que le système ubiquitine protéasome 26S pourrait également être impliqué dans la dégradation des protéines oxydées [20]. L'oxydation des acides aminés des protéines conduit le plus souvent à la formation de dérivés hydroxyles ou carbonylés. Ainsi la détection des groupements carbonyles associés aux protéines constitue une méthode utilisée pour déterminer l'état d'oxydation des protéines [153]. Plusieurs méthodes colorimétriques et immunochimiques sont basées sur la quantification des groupements carbonyles après formation d'un adduit dinitrophénylhydrazone (DNP) suite à la réaction avec le dinitrophénylhydrazine [154]. Les protéines oxydées sont plus thermosensibles, hydrophobes et moins actives [155, 156, 157]. En outre d'autres modifications pouvant aussi affecter les protéines comme la conjugaison avec les produits de peroxydation lipidique (par exemple malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal) et les produits de glycoxydation [158]. Ces modifiants irréversibles des protéines sont associées les plus souvent avec une perte de leur fonction [159,160]. De plus, ces protéines modifiées ont été retrouvées ubiquitylées [161]. L'accumulation des protéines endommagées a été rapportée dans plusieurs types cellulaires et tissus comme les fibroblastes et les kératinocytes humains, le cristalin, le cerveau humain, le cœur et le foie de rat [162]. Il a été observé que certaines sous unités du protéasome 20S et 26S étaient modifiées au niveau du cœur et du foie de rat âgé par glycoxylation et par conjugaison avec le produit de peroxydation lipidique 4-HNE qui entraînent une inactivation protéolytique du protéasome 20S *in vitro* [161,163]. Les protéines très oxydées ou très modifiées deviennent résistantes à la protéolyse par le protéasome du fait de la présence des pontages covalents intra ou

intermoléculaire et de leur agrégation [164,165]. En fait ces protéines agissent comme inhibiteurs non compétitifs du protéasome [164]. Le ralentissement du vieillissement par restriction calorique était associé au maintien de l'activité du protéasome [163].

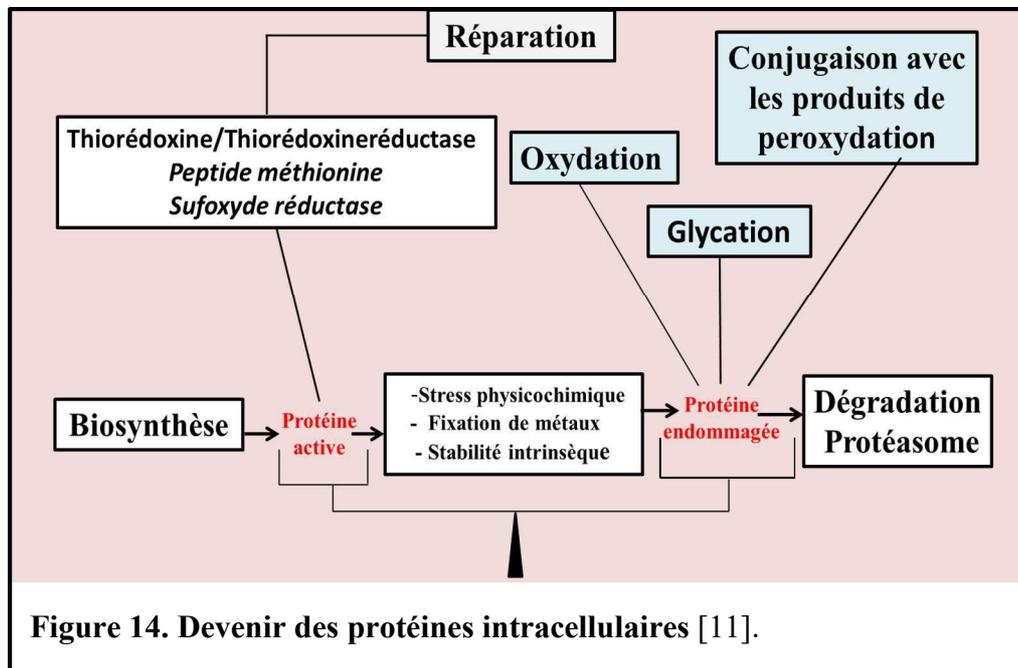


Figure 14. Devenir des protéines intracellulaires [11].

I.3.2. Protéasome et NF-KB

Le système ubiquitine protéasome est impliqué dans l'activation de la voie de signalisation NF-kB (Nuclear Factor kappa B) ou (Nuclear Factor k chain transcription in B cells) [166]. Ce facteur de transcription NF-kB a été décrit pour la première fois il y a une quinzaine d'années [167] et depuis, il a fait l'objet de très nombreuses études. Il est impliqué au niveau de diverses fonctions biologiques, telles que: la réponse immunitaire [168], la réaction inflammatoire, la détoxification des ROS (Reactive Oxygen Species), les mécanismes d'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire [169, 170]. Aussi, des dysfonctionnements de la voie NFkB sont impliqués chez l'homme dans des pathologies assez variées que l'arthrite, l'athérosclérose et le cancer [171]. La famille NFkB est composée de cinq membre (RelA ou (P65), Rel B, P50, P52, CRel) qui s'associent sous formes des combinaisons d'homo et hétérodimers [172] (Figure 15). En absence de stimulation, ces facteurs sont retenus inactifs dans le cytoplasme du fait de leur association avec des membres de la famille (IKB α , IKB β , IKB ϵ , P105, P100) [166]. L'activation de NFkB qui est étroitement contrôlée par une voie canonique (appelée voie classique) dépendante de la dégradation protéolytique des Ikb, ainsi que par une voie non canonique

(ou voie alterne) dépendante de la dégradation partielle de P100 (le précurseur de la protéine P52, conduit à la translocation nucléaire des facteurs de transcription NFκB et à l'activation de nombreux gènes cibles [173]. Dans des conditions anormales telles que le stress et certaines maladies, l'ubiquitylation couplée à la dégradation par le protéasome des protéines inhibitrices IκB est un élément clef de l'activation de la voie NFκB. En fait, après stimulation par un grand nombre de récepteurs comme exemple TNFα, conduit à l'activation du complexe kinase IKK, qui est un complexe multimérique de haut poids moléculaire, constitué de deux sous-unités catalytiques IKKα et IKKβ et de la sous-unité régulatrice NEMO (NFκB essentiel modulator) [174]. Une fois activé, le complexe IKK phosphoryle les IκB, ce qui permet leur reconnaissance par un complexe enzymatique d'ubiquitylation et entraîne leur poly-ubiquitylation via des chaînes d'ubiquitine utilisant la lysine K48 de cette dernière (chaînes UbK48) puis leur dégradation par le protéasome et en libérant les dimères NFκB qui passent du cytoplasme au noyau ou ils activent la transcription de leur gènes cibles [175]. Aussi la maturation du précurseur P105 en P50 est dépendante du protéasome. Dans la voie alterne d'activation de NFκB qui est indépendante de NEMO et IKKβ, la maturation des protéines P105 et P100, précurseur des protéines de la famille NFκB P50 et P52 respectivement sont phosphorylées et poly-ubiquitylées par des chaînes Ub-48 puis dégradées par le protéasome en P50 et P52 [176] (Figure 15). NF-κB est activé par des oxydants tels que H₂O₂ et cette induction peut être inhibée par des antioxydants [177,178]. Des inhibiteurs du protéasome ont été utilisés pour l'inhibition de l'activation de NF-κB [179]. Actuellement l'inactivation de cette voie par des inhibiteurs comme le bortézomib (Velcade) pour le traitement de certains cancers est très prometteuse [179].

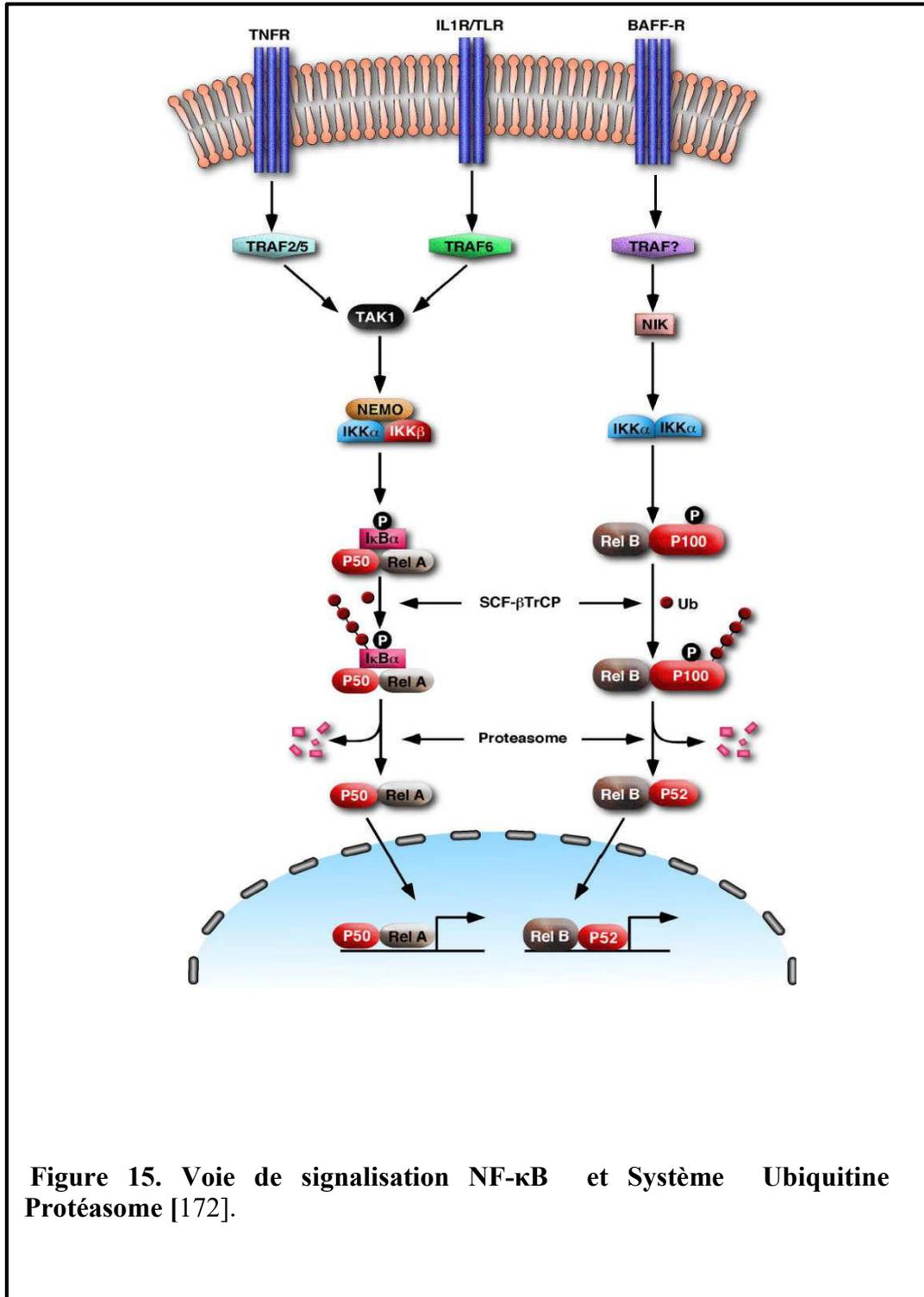


Figure 15. Voie de signalisation NF-κB et Système Ubiquitine Protéasome [172].

I.3.3. Protéasome et apoptose

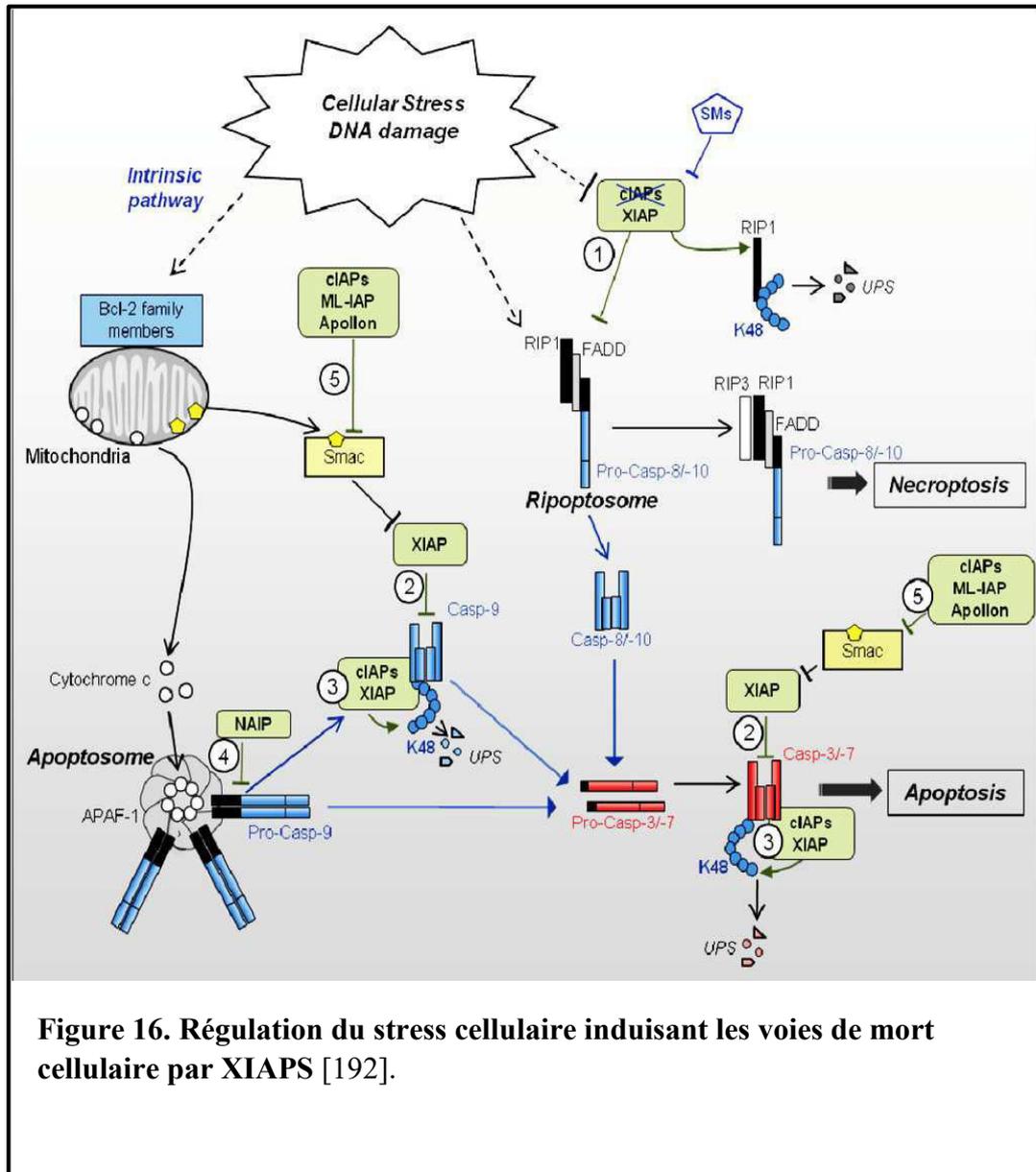
L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un mécanisme essentiel au développement embryonnaire et au maintien de l'homéostasie cellulaire et à la survie de l'organisme. Ainsi, une dérégulation des mécanismes contrôlant l'apoptose peut participer au développement de pathologies. L'apoptose est caractérisée par une condensation et une fragmentation de la chromatine nucléaire conduisant à la dégradation de l'ADN en petits fragments, puis la formation des corps apoptotiques qui seront éliminés par phagocytose sans réaction inflammatoire [180]. L'apoptose induit l'activation de deux grandes familles d'enzymes : les protéases à cystéine aspartate dépendantes que l'on nomme caspases (Cystéinyl aspartate specific proteinase) pour la dégradation des organites et les protéines de la famille Bcl2 (B-cell lymphoma 2) pour la régulation du signal [180]. Il existe au moins 14 caspases différentes situées dans le cytoplasme et dans la mitochondrie, dont sept sont responsables de l'apoptose et sont divisées en 2 groupes : les caspases initiatrices de l'apoptose (caspases 2, 8, 9,10,12) qui possèdent une partie N-terminale longue, les caspases effectrices de l'apoptose (caspases 3, 6, 7) qui possèdent une partie N- courte, les autres caspases (1,4,5,11,13,14) intervenant dans l'inflammation et l'activation des cytokines [181,182]. Les caspases sont toutes synthétisées sous forme de proenzymes, ayant une faible activité enzymatique. Leur activation nécessite un clivage protéolytique. Les caspases à l'état inactif ou pro-caspases, sont constituées d'une large sous- unité d'environ 20 kDa et d'une petite sous-unité effectrice d'environ 10 kDa et un domaine terminal NH₂ [183].

L'induction de l'apoptose se fait par deux voies majeures: la voie extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs de la mort cellulaire, dont le principal représentant est le TNF (Tumor Necrosis Factor), et la voie intrinsèque mettant particulièrement en jeu la mitochondrie. Ces deux voies de signalisation conduisent à deux phénomènes centraux dans l'apoptose qui sont l'activation de la cascade des caspases et la perméabilisation de la membrane mitochondriale [184].

Dans la voie intrinsèque, l'activation de protéines membres de la famille de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) participent à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP : Mitochondrial outermembrane permeabilization) et au relargage de facteurs mitochondriaux solubles (cytochrome c) impliqués dans la signalisation apoptotique. Le cytochrome c libéré dans le cytosol s'associe avec Apaf-1 (Apoptotic Protease- activating factor), et qui fait le recrutement ATP-dépendant de la pro-caspase-9. Le complexe ainsi

formé est appelé « apoptosome » et permet l'activation de la caspase-9. La caspase 9 peut par la suite recruter et cliver d'autres pro-caspases comme les pro-caspases 3, 6 et 7 [183]. L'activation de la pro-caspase 3 en caspase 3, permet l'activation d'autres caspases effectrices telles la 6 et la 7, et/ou active le processus de condensation de la chromatine et la formation des corps apoptotiques [185]. Il a été montré que NF-kB activé, induit l'expression de nombreuses protéines ayant une action anti-apoptotique. Ainsi, NF-kB activé par le TNF, bloque la cascade des activations de caspases en régulant positivement l'expression de gènes codant des inhibiteurs de l'apoptose [186]. NF-kB exerce une action anti-apoptotique en induisant l'expression de gènes anti-apoptotiques, ou en inhibant ou diminuant l'expression de gènes pro-apoptotiques. En fait, NF-kB peut réguler l'expression de certains gènes des protéines de la famille Bcl2 qui sont d'importants régulateurs cellulaires de l'apoptose [187]. Il est à noter que les protéines formant NFkB peuvent être des substrats des caspases ce qui entraîne une suppression de son rôle anti-apoptotique [188].

Plusieurs études ont bien montré que Les inhibiteurs du protéasome sont capables d'induire l'apoptose dans de nombreux types de cellules cancéreuses [189]. Récemment un nombre croissant d'observations, suggère que le système ubiquitine protéasome (UPS) pourrait jouer un rôle déterminant dans la régulation de l'apoptose, en contrôlant le niveau protéique et l'activité de molécules régulatrices clés [190]. A titre d'exemples, les IPA (Inhibitors of Apoptosis Proteins) sont des puissants facteurs anti-apoptotiques, qui entretiennent des relations toutes particulières avec l'UPS [191] (Figure 16). Parmi cette famille de protéines, il est apparu récemment que seule XIPA (X linked IAP) est capable d'inhiber directement les caspases et possède un domaine RING (really interesting gene) qui lui confère une activité d'ubiquitylation [193]. XIPA peut poly-ubiquityler les formes actives des caspases 3 et 9 [191]. La protéine RPII (Receptor Interacting Protein 1) poly-ubiquitylée inhibe l'apoptose induit par TNF α (Tumor Necrosis Factor α) en empêchant l'activation de la capase 8 et également RPII ubiquitylée peut également déclenchée l'activation de NFkB [194]. De nombreuses protéines de la famille Bcl₂, aussi bien pro-apoptotique qu'anti-apoptotiques sont dégradées par l'UPS [195].



I.3.4. Protéasome et monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) est synthétisé à partir de L-Arginine et d'oxygène moléculaire (O₂) selon la réaction suivante : L-Arginine + O₂ → L-Citrulline + NO. L'enzyme responsable de la synthèse du NO est la NO Synthase, ou NOS, dont il existe trois isoformes. Il existe ainsi la NOS1, ou NOS neuronale (nNOS), isolée pour la première fois dans des neurones [196]. La NOS2, mise en évidence dans les macrophages [197] et la NOS3, isolée dans des cellules endothéliales [198]. Les NOS1 et 3 sous le terme de NOS constitutives (cNOS), du fait de leur expression généralement (mais pas systématiquement) à l'état de base de la cellule, la NOS2 étant alors appelée NOS inductible (iNOS), son

expression étant induite en réponse à des stimuli inflammatoires. Les isoformes constitutives de la NOS se distinguent de l'isoforme inductible par leur dépendance face au calcium et à la calmoduline, en terme d'activité enzymatique. Physiologiquement, les NOS constitutives produisent un taux faible de NO à l'état de base, tandis que la NOS2, lorsqu'elle est induite, produit de larges quantités de NO. A faible concentration, le NO produit par nNOS et eNOS a une fonction de messenger, diffusant de l'endroit où il est synthétisé vers les cellules environnantes où il active la guanylate cyclase synthétisant le GMP cyclique. Il module les niveaux intracellulaires de calcium et a un effet vasodilatateur, neurotransmetteur ou relaxateur du muscle lisse selon la nature de la cellule cible [199]. L'endothélium, qui constitue une fine couche cellulaire qui tapisse la surface interne de tous les vaisseaux sanguins de l'organisme, joue un rôle central dans le contrôle de la balance vasoconstriction/vasodilatation et permet l'adaptation vasculaire aux modifications de débit sanguin. L'endothélium permet l'augmentation du diamètre artériel en réponse à l'augmentation du débit sanguin. Ce phénomène appelé dilatation débit-dépendante représente un mécanisme fondamental d'adaptation du diamètre des vaisseaux de gros calibre au débit sanguin. En plus de ses propriétés vasodilatatrices, le NO exerce de nombreuses fonctions au niveau vasculaire et notamment, une action inhibitrice sur l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium, sur l'agrégation plaquettaire, et sur la prolifération des cellules musculaires lisses qui lui permet de s'opposer au développement de l'athérosclérose [200]. L'implication de NOS et du NO a été démontrée dans plusieurs maladies chroniques dégénératives. On peut citer l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson [199]. Il a été montré que NO inhibe l'activité de la caspase 3, 8 et 9 dans les cellules normales et tumorales traités par des donneurs chimiques de NO ou bien par le NO généré à partir de NOS endogène, et par contre la transfection du gène INOS inhibe TNF α et induit l'activation de caspases au niveau cellulaire [195]. Il a été montré que l'inhibition de NO augmente l'ubiquitylation de Bcl2 et augmente l'apoptose [195]. eNOS synthase (iNOS) sont régulées par la dégradation dépendante du protéasome [201, 202] (Figure 17).

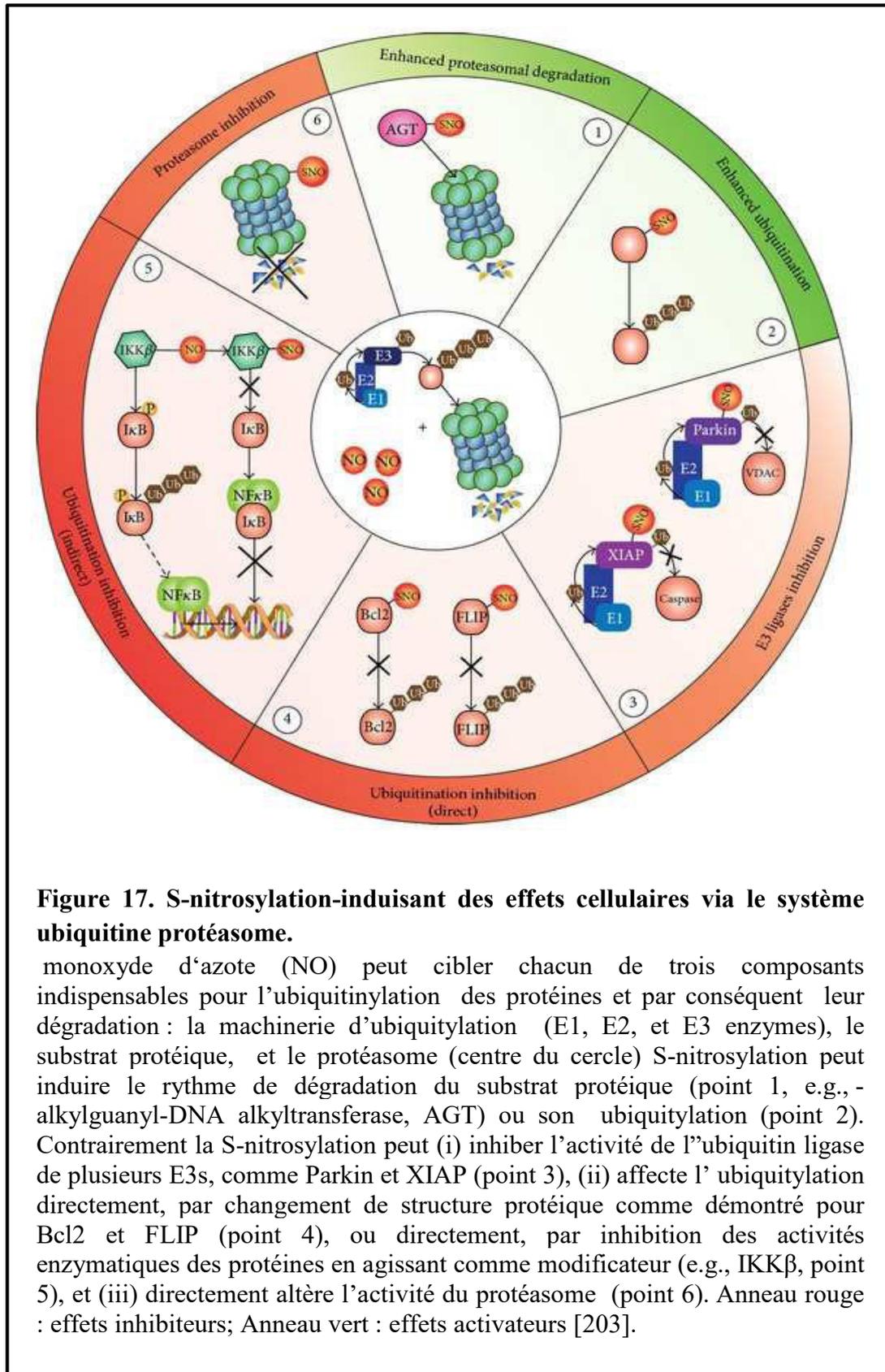
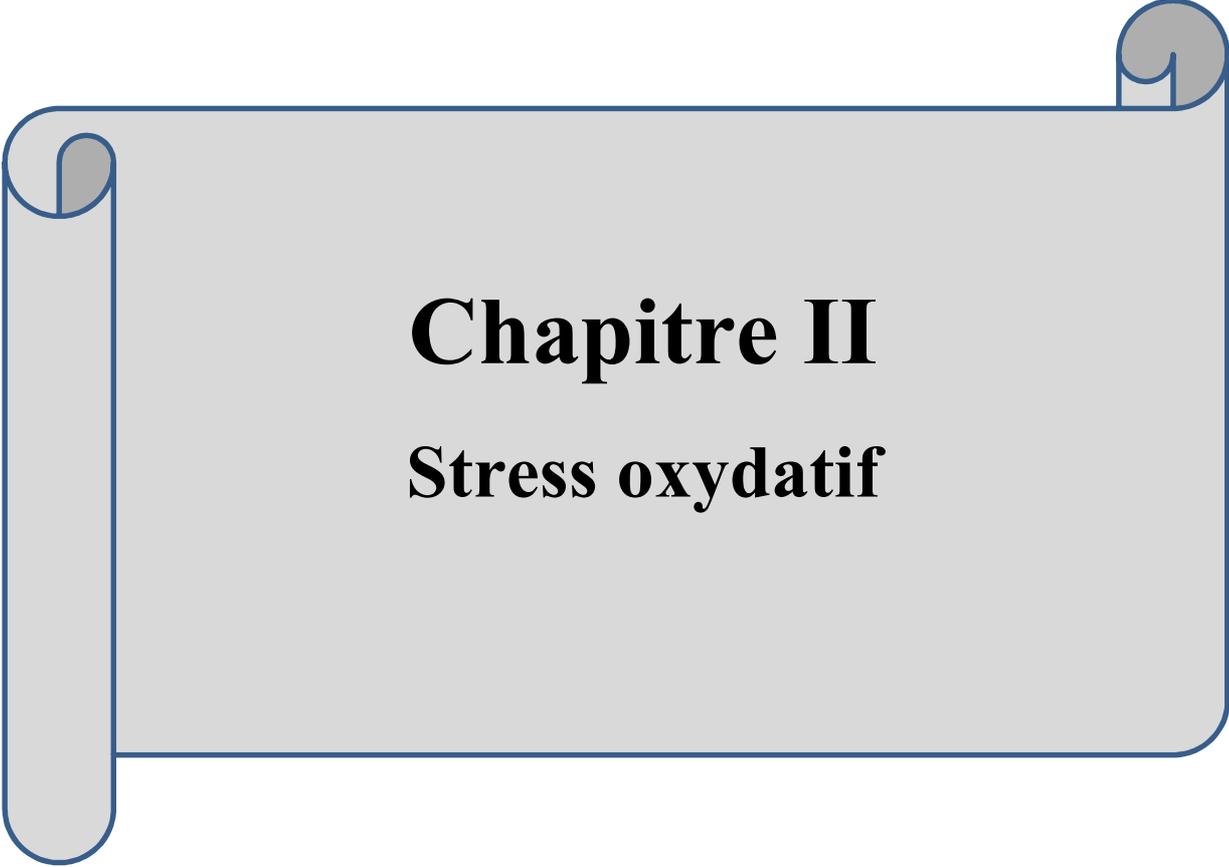


Figure 17. S-nitrosylation-induisant des effets cellulaires via le système ubiquitine protéasome.

monoxyde d'azote (NO) peut cibler chacun de trois composants indispensables pour l'ubiquitylation des protéines et par conséquent leur dégradation : la machinerie d'ubiquitylation (E1, E2, et E3 enzymes), le substrat protéique, et le protéasome (centre du cercle) S-nitrosylation peut induire le rythme de dégradation du substrat protéique (point 1, e.g., -alkylguanyl-DNA alkyltransferase, AGT) ou son ubiquitylation (point 2). Contrairement la S-nitrosylation peut (i) inhiber l'activité de l'ubiquitin ligase de plusieurs E3s, comme Parkin et XIAP (point 3), (ii) affecte l'ubiquitylation directement, par changement de structure protéique comme démontré pour Bcl2 et FLIP (point 4), ou directement, par inhibition des activités enzymatiques des protéines en agissant comme modificateur (e.g., IKK β , point 5), et (iii) directement altère l'activité du protéasome (point 6). Anneau rouge : effets inhibiteurs; Anneau vert : effets activateurs [203].



Chapitre II

Stress oxydatif

II. Stress oxydatif

II.1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux libres oxygénés (RLO) toxiques, appelées aussi espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou reactive oxygen species (ROS) ainsi que les radicaux du nitrogène (NO), situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines.

Ces radicaux libres (RL) sont produits par divers mécanismes physiologiques et sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable et éventuellement contrôlés par différents systèmes antioxydants de l'organisme. Dans des circonstances normales, on dit que la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé (stress oxydant) et qui conduit par conséquence à l'apparition de dégâts cellulaires souvent irréversibles [204]. De ce fait, le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers [205]. Autrement dit, il désigne un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène (ROS) et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels [206], et à des dégâts cellulaires irréversibles [207].

Le stress oxydatif est observé dans les intoxications aux métaux lourds, dans l'irradiation, dans les ischémies / reperfusions suivant des thromboses, au cours d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments, présents en quantité limitée dans l'alimentation et dans des anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine soit enzymatiquement antioxydante, soit synthétisant un antioxydant (comme la gamma glutamyl synthétase produisant le glutathion) [205]. Généralement, le stress oxydatif sera la résultante de plusieurs de ces facteurs et se produira dans un tissu et un type cellulaire bien précis [205].

II.2. Espèces réactives de l'oxygène ou ROS

L'oxygène (O_2) est indispensable à la vie des organismes aérobies pour produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons telles que celles existant dans les mitochondries des cellules eucaryotes. La toxicité de l'oxygène réside principalement dans sa réduction qui aboutit à la formation de radicaux libres très réactifs

connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont beaucoup plus toxiques que ne l'est l'oxygène lui-même.

Les ROS sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes [208]. Ces ROS incluent les radicaux libres de l'oxygène tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), etc..., mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) [209, 210] (Tableau 4). La réactivité de ces radicaux est très variable selon leur nature. L'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques. En revanche, des radicaux comme les radicaux peroxydes (ROO^{\cdot}) ou surtout le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et l'oxygène singulet (1O_2) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est peu réactif mais en présence des métaux, se décompose en OH^- et OH^{\cdot} . Le radical OH^{\cdot} a une vitesse de réaction très grande avec la majorité des molécules [205]. Des espèces peu réactives peuvent être très toxiques en raison de leur demi vie longue, mais non pas de leur réactivité, ce qui leur permet de se diffuser et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production [211].

Tableau 4. Principales espèces réactives de l'oxygène de la biologie [209].		
	Nom	Symbole
Espèces radicalaires	Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
	Radical hydroxyle	OH^{\cdot}
	Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}
Espèces non radicalaires	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
	Acide hypochlorique	$HOCl$
	Oxygène singulet	1O_2
	Peroxyde d'azote	$ONOO^-$

II. 3. Mécanismes de production des espèces réactives de l'oxygène

Les ROS peuvent être générés par différents mécanismes physiologiques [212], comportant le transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale qui peut laisser fuir une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène. L'activité de plusieurs enzymes, principalement les oxydases (xanthine oxydase, NADPH oxydase) et les déshydrogénases, constitue une source de ROS.

Une production des ROS a également lieu dans le processus d'auto-oxydation de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine, homocystéine), des coenzymes réduits (FMNH₂, FADH₂), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxines, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique [213] (Figure 18).

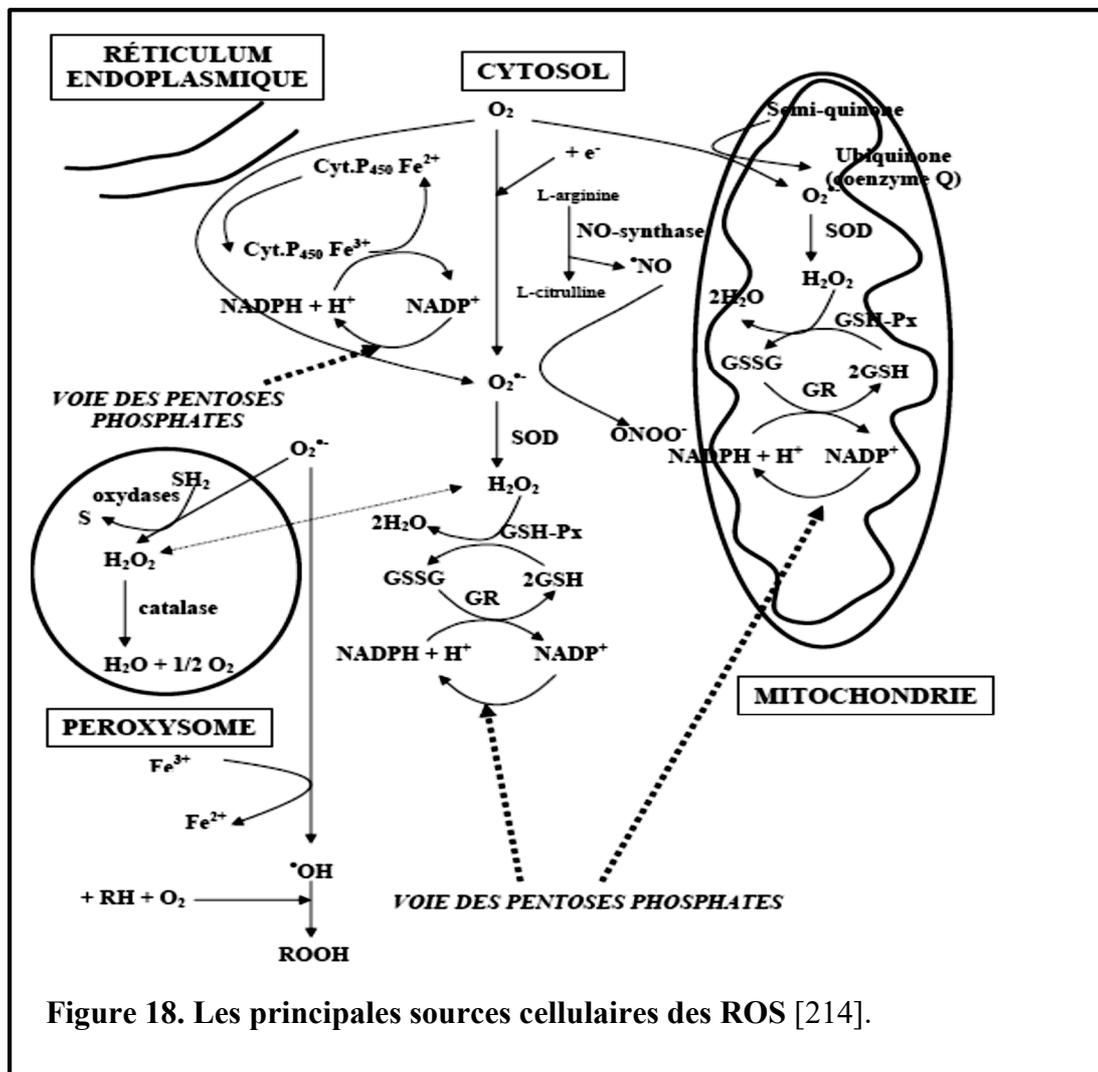


Figure 18. Les principales sources cellulaires des ROS [214].

II.4. Conséquences biologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif provoque des lésions directes de molécules biologiques dont les plus vulnérables sont l'ADN, les lipides et les protéines et de ce fait plusieurs mécanismes cellulaires peuvent être considérablement affectés [215] (Figure 19).

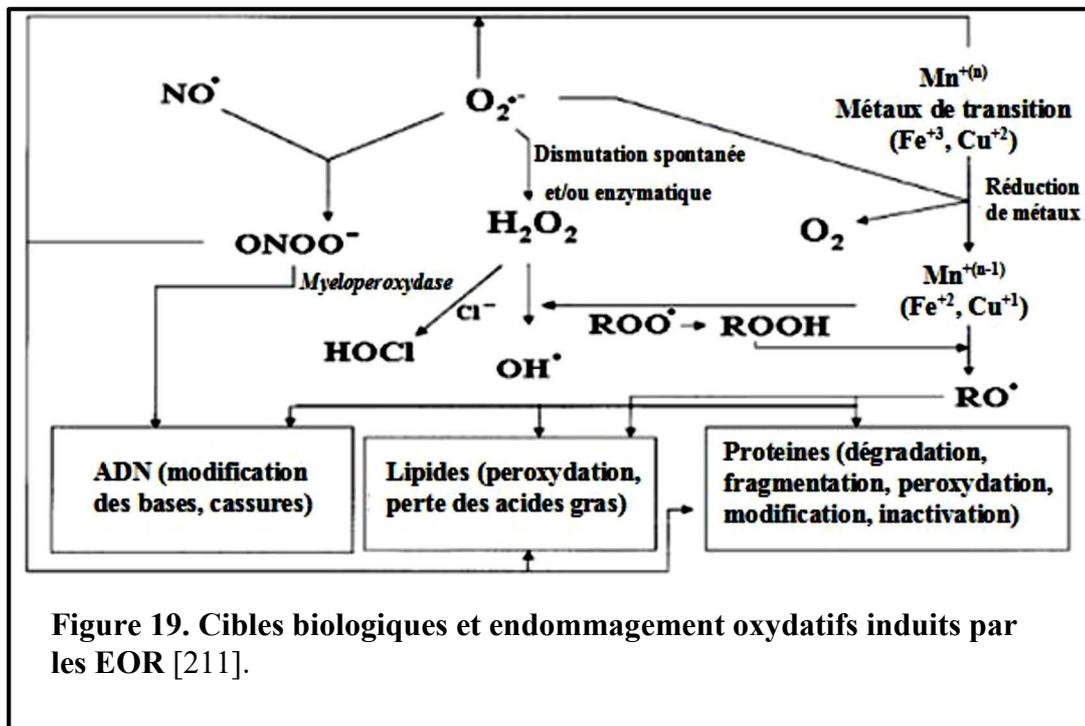
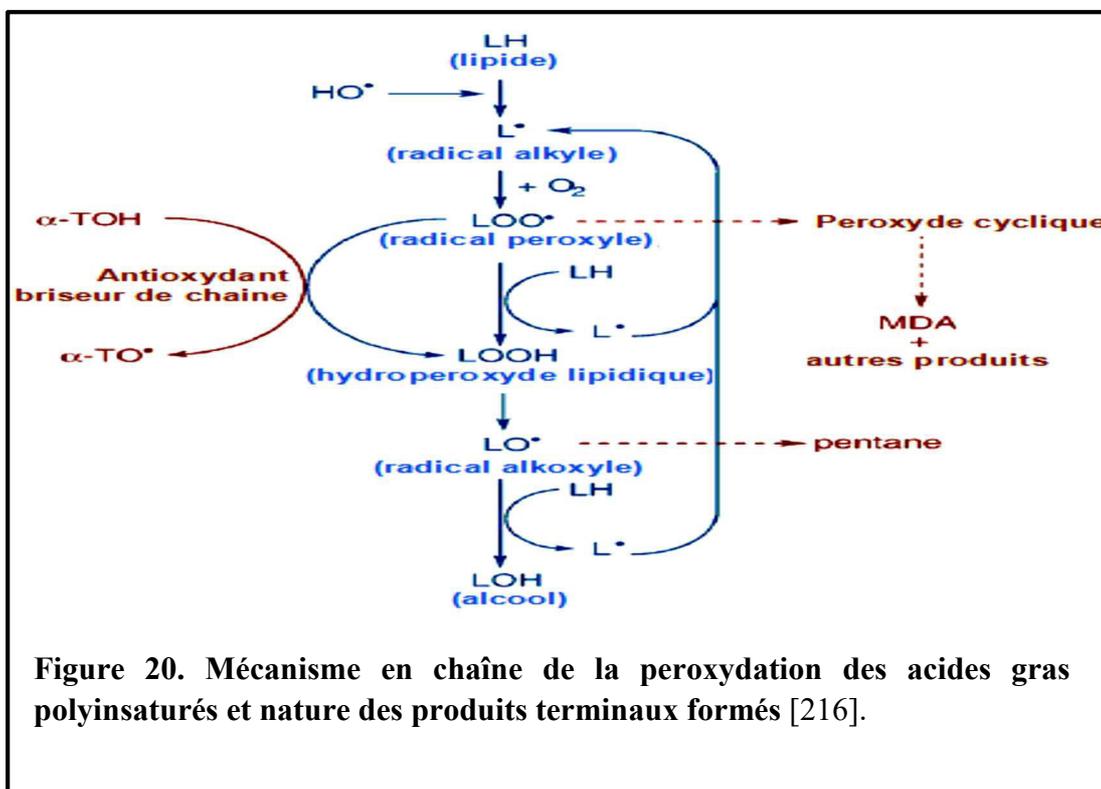


Figure 19. Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR [211].

II.4.1. Lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les ROS en raison de leur degré élevé d'insaturation. C'est au niveau de doubles liaisons lipidiques que les ROS vont générer des réactions en chaîne de peroxydation lipidique (Figure 20) qui débute par une phase d'initiation, impliquant l'attaque principalement par le radical hydroxyle OH^\bullet capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué RO^\bullet , oxydé en radical peroxyde RO_2^\bullet [217, 218]. Ensuite, en phase de Propagation, le radical peroxyde formé se transforme en hydroxyperoxyde ROOH au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué [217, 218]. Ces hydroxyperoxydes peuvent être réduits et neutralisés en phase de terminaison par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes ou continuer à s'oxyder en peroxydes cycliques qui après décomposition peuvent libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonaldaldéhyde (MDA), ou l'hydroxynonéal (HNE) [218, 205].

Ces derniers sont utilisés comme marqueurs de la peroxydation lipidique et sont les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique qui endommagent d'une manière très sévère les protéines membranaires et inactivent les récepteurs et les enzymes liées à la membrane cellulaire [217]. L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) [219]. En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages [220].



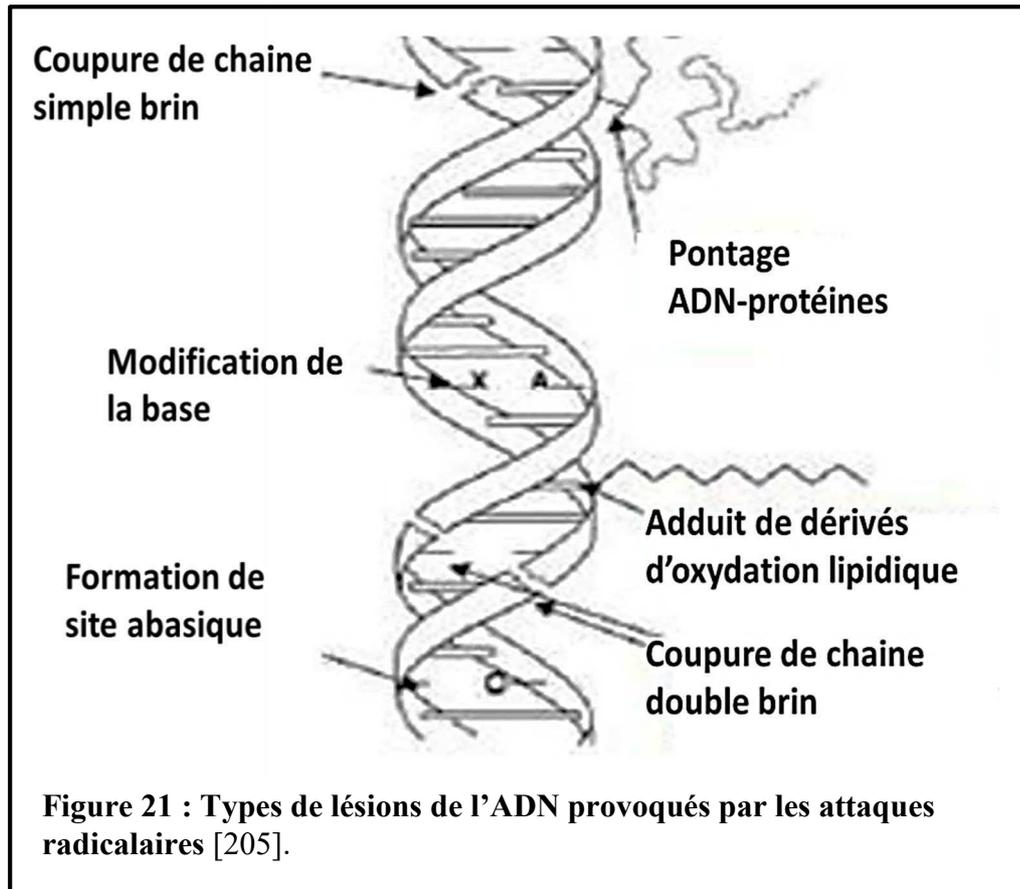
II.4.2. Protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées [205]. Les acides aminés des protéines vont subir des réactions d'oxydations, soit par coupure des liaisons peptidiques et modification de la chaîne protéique, ce qui génère des groupements

hydroxyles et carbonyles sur les protéines, soit par l'addition des produits issus de la peroxydation lipidiques comme le 4-HNE [221]. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques catalytiques ou structurales, les effets de la plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du Protéasome [222, 205]. Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules [205].

II.4.3. Acides nucléiques

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les ROS. Les principales dommages sont les coupures simples et doubles brins, l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimidouracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone, des sites abasiques par coupure de la liaison entre la base et le désoxyribose, des adduits intra-caténares par des produits issus de la peroxydation lipidique dont le MDA et le 4-HNE, et des pontages ADN-protéines [223]. Ces lésions sont normalement éliminées par des enzymes de réparation de l'ADN. Si ces systèmes sont défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement [208, 205, 215].



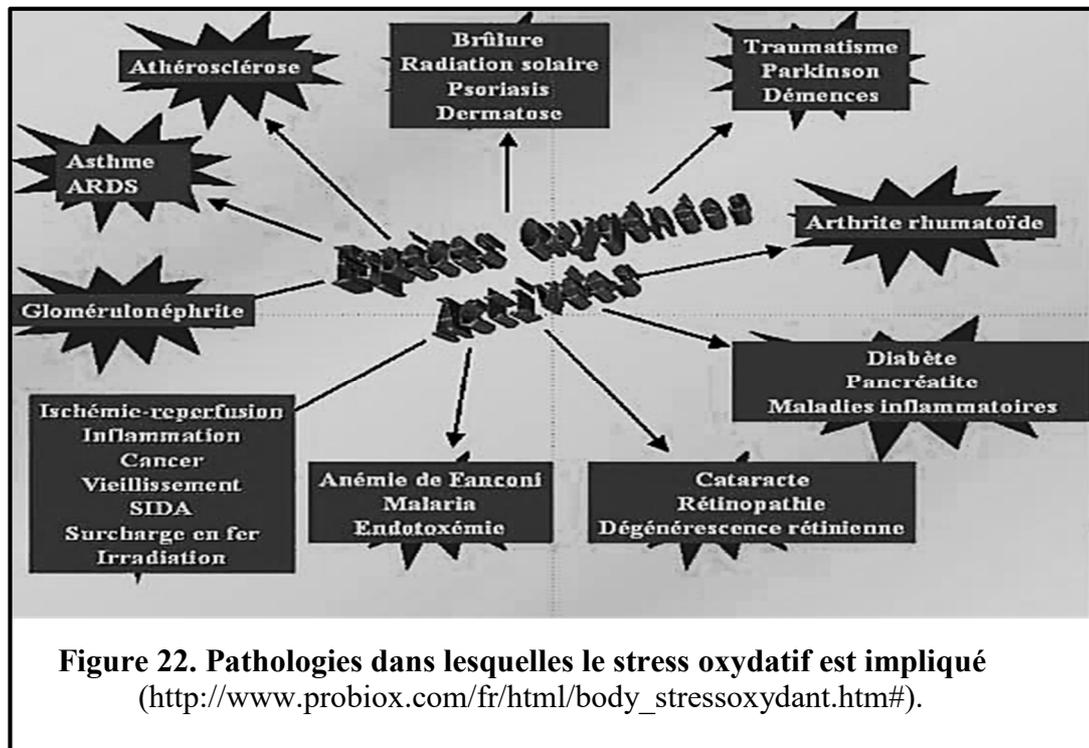
II.4.4. Polysaccharides

L'étude de l'attaque des polysaccharides par les ROS est la moindre étudiée par rapport aux autres macromolécules. Les ROS attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage [205]. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH^\bullet , qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine [205].

II.5. Pathologies liées au stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant [205]. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des ROS dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies. En fait, le stress oxydatif est impliqué dans le développement des maladies telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives,

inflammatoires, le diabète, le cancer, ainsi que le vieillissement cellulaire [224, 205, 215] (Figure 22).



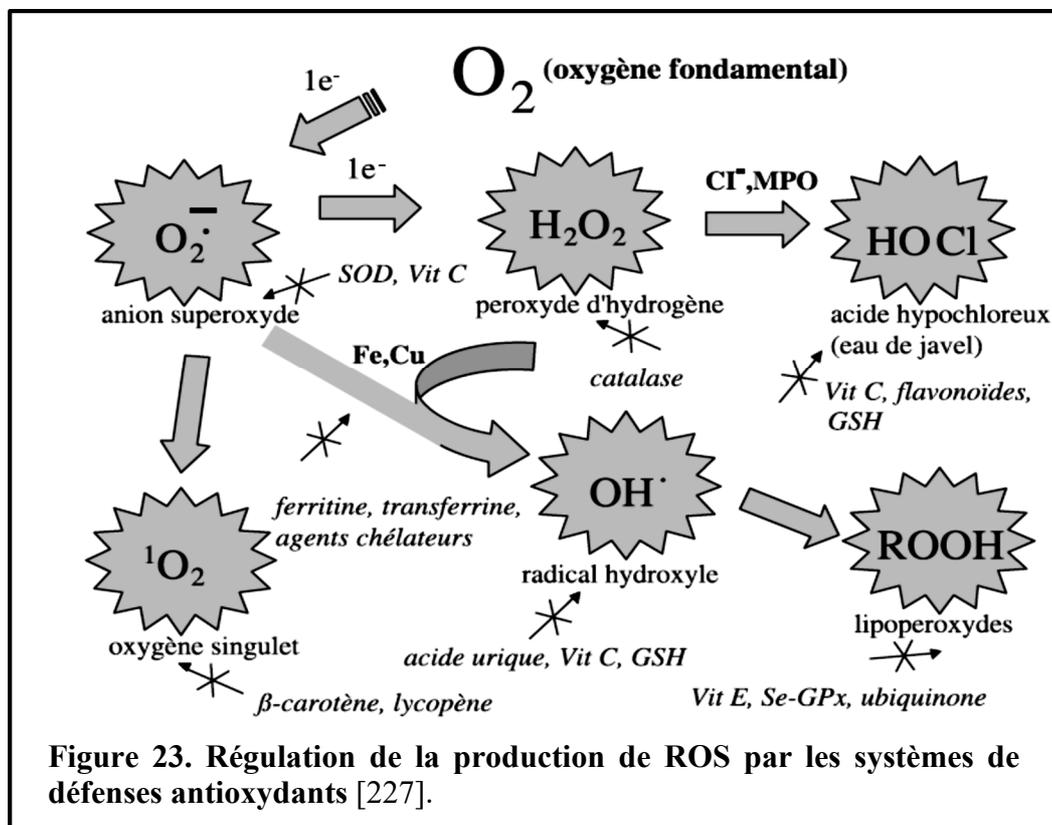
Dans l'athérosclérose, le rôle des ROS produites par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les monocytes-macrophages, sont susceptibles d'oxyder les lipoprotéines, notamment les lipoprotéines de basse densité (LDL), conduisant à la formation de stries lipidiques, première étape dans l'apparition de la plaque d'athérome (épaississement des artères par un dépôt composé, en partie, d'esters de cholestérol) [224]. Dans l'hyperhomocystéinémie, l'homocystéine par son action liée en partie à la génération de radicaux libres au cours de son métabolisme. Les causes essentielles du stress oxydatif sont soit d'origine nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments, ou inversement de surcharges en facteurs prooxydants (fer, acides gras), soit d'origine accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques prooxydants...), soit d'origine génétique. Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira au mécanisme pathogène [205].

Selon les maladies, le stress se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. Aussi, la plupart des maladies induites par le stress oxydatif apparaissent avec l'âge car le vieillissement

diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux libres [225].

II.6. Systèmes de défenses antioxydants

Le contrôle de la production excessive de ROS est assuré par l'action de molécules dites : antioxydantes de défense. Celles-ci ont pour rôle d'empêcher les ROS d'atteindre leurs cibles biologiques, en prévenant leur formation et les transformant enzymatiquement en produits moins réactifs ou en les piégeant [226]. Les défenses antioxydantes de notre organisme se divisent en systèmes antioxydants enzymatiques et systèmes antioxydants non enzymatiques (Figure 23).

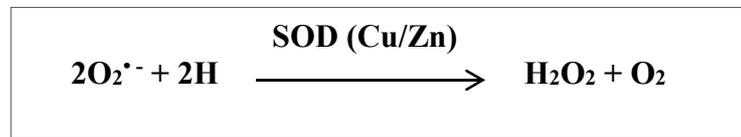


II.6.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les systèmes enzymatiques comprennent principalement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), et la glutathion réductase (GR) dont une action enzymatique complémentaire au niveau de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et du Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , conduisant à la formation de l'oxygène moléculaire O_2 et H_2O , et aussi le système thiorédoxine / thiorédoxine [226, 228].

II.6.1.1. Superoxyde dismutase

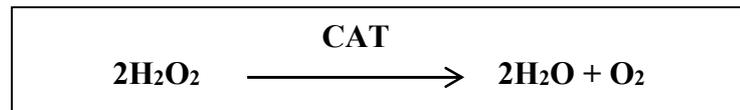
La superoxyde dismutase (SOD EC 1.15.1.1) est une métalloenzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.



La SOD existe sous plusieurs isoenzymes : SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) SOD à manganèse (Mn-SOD) et associée aux ions cuivre et zinc Cu/Zn-SOD en fonction de leur localisation cellulaire, structure et contenu métallique [229].

II.6.1.2. Catalase

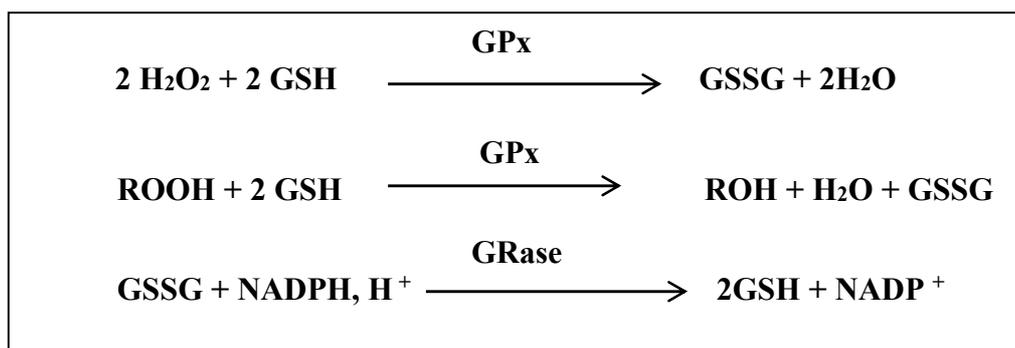
La catalase (CAT EC 1.11.1.6) est une enzyme qui transforme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en eau H_2O et en oxygène moléculaire O_2 .



La CAT est présente dans la majeure partie des organes mais surtout au niveau des peroxysomes hépatiques et des érythrocytes [212]. Elle est constituée de quatre sous-unités protéiques possédant chacune un groupement hémique (Fe) et une molécule de NADPH pour sa stabilité et agit en synergie avec la SOD. La CAT n'est efficace que pour de fortes teneurs en peroxyde d'hydrogène [230].

II.6.1.3. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPx EC 1.11.1.9) est une sélénoenzyme (Se-GPx) localisée dans les mitochondries et le cytosol et agit en synergie avec la SOD. En présence de glutathion réduit (GSH), la (GPx) réduit l' H_2O_2 en H_2O et les hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH). La glutathion réductase (GR), présente elle aussi dans le cytosol et les mitochondries, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du Glutathion oxydé (GSSG) en utilisant le NADPH comme un cofacteur [230, 231].



II.6.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Les systèmes non-enzymatiques appelés aussi piègeurs des radicaux libres, sont des molécules qui ont la capacité de neutraliser ces derniers et donc limiter leur propagation en chaîne. Ils renferment les oligoéléments comme Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) qui sont des cofacteurs des enzymes antioxydantes, le glutathion réduit (GSH) qui sert de substrat aux peroxydases et également un piègeur du radical hydroxyle comme aussi la bilirubine, l'ubiquinone, le cytochrome C, l'acide urique, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque, les caroténoïdes, les protéines chélatrices du fer comme la transferrine et l'hémossidérine ou du cuivre comme la céruloplasmine et l'albumine qui bloquent les ions métalliques impliqués dans la réaction de Fenton [205]. Les vitamines : E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), et les caroténoïdes agissant en piégeant les radicaux et les transformant en molécules stables [227]. Aussi des composés apportés par l'alimentation tels que les polyphénols. Les alcaloïdes et les phytates ont un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres [212].

II.6.2.1. Glutathion

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH) [232]. Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer [232]. Les autres propriétés antioxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire [232].

II.6. 2.2. Vitamine C

La vitamine C (vit C) ou l'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, se présente dans l'alimentation sous deux formes: l'acide ascorbique et l'acide déhydroascorbique. Elle a un fort pouvoir antioxydant, antiviral, anti-inflammatoire, un stimulant immunitaire et protecteur cardiovasculaire [212]. La vit C est un excellent piègeur des ROS ($\text{HO}\cdot$ ou $\text{O}_2^{\cdot-}$). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques RO_2^{\cdot} , ainsi que le glutathion. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer. [212, 205].

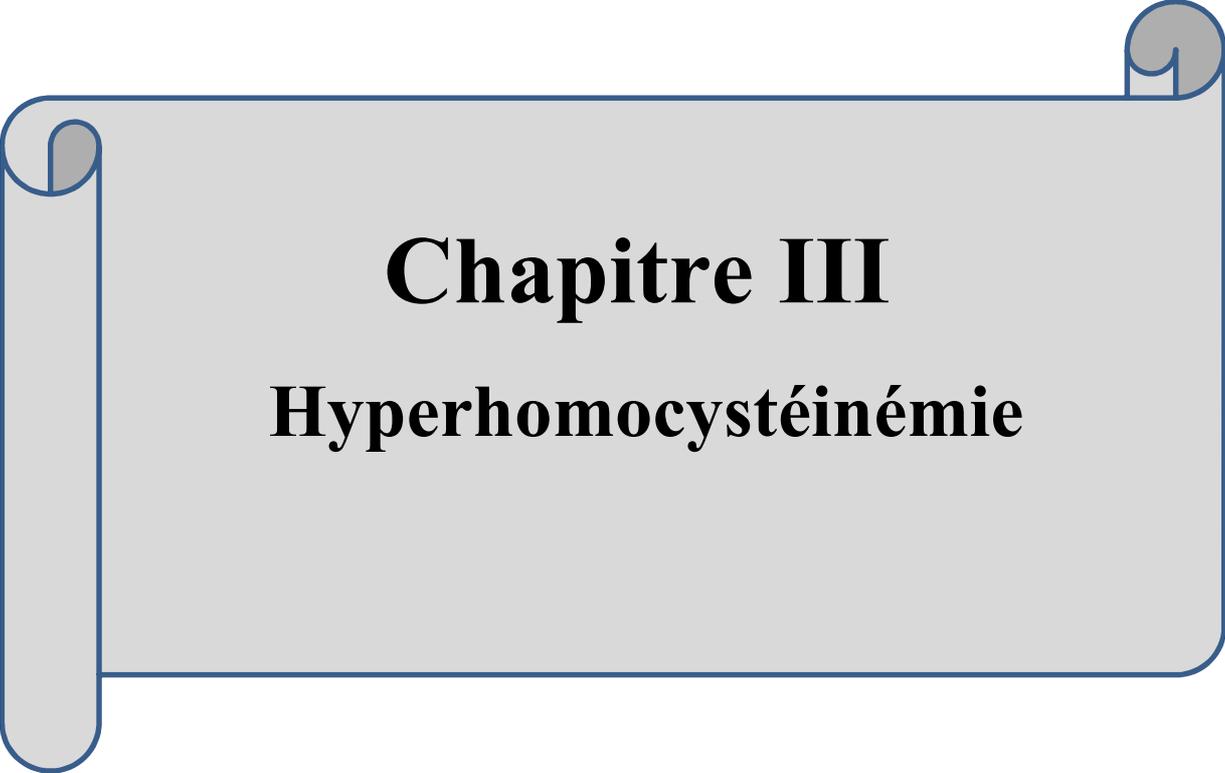
II.7. Méthodes d'évaluation du stress oxydatif

Le stress oxydatif implique un ensemble complexe de paramètres et ne peut donc être mis en évidence par une seule méthode, aussi élaborée soit-elle [233]. Ces paramètres se répartissent selon quatre axes : 1) la détermination des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques; 2) le dosage des oligo-éléments; 3) la mesure des dommages oxydatifs au niveau des lipides, de l'ADN et des protéines; 4) l'identification de sources génératrices de stress oxydant (inflammation, hyperglycémie, hyperhomocystéinémie) [234]. Parmi ces paramètres, nous citons comme exemples, les dosages des peroxydes lipidiques ou leur dérivés (MDA, HNE..) et des protéines carbonylés (PC), Le rapport vitamine C / α -tocophérol, Le rapport glutathion réduit (GSH) / glutathion oxydé (GSSG), le rapport Cu/Zn, les LDL() oxydées et les anticorps anti-LDL oxydées, la 8-OH-2-désoxyguanosine (8-OH-dG), la capacité antioxydante totale du plasma. Aussi la mesure directe des ROS par la résonance paramagnétique électronique (RPE) ou par la technique de piégeage de spin [235].

II.8. Lutte contre le stress oxydatif

La lutte contre le stress oxydatif doit être portée sur la diminution des dommages oxydatifs induits par les ROS au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides et l'augmentation de défenses antioxydantes adéquates dans un souci de prévention de nombreuses maladies. La conception de systèmes antioxydants susceptibles de prévenir la formation de radicaux libres oxygénés ou de permettre leur destruction est recommandée [205]. En fait l'augmentation de l'apport nutritionnel en antioxydants visera donc

essentiellement à prévenir les maladies. Cependant l'apport préventif d'antioxydants nutritionnels a montré ses limites à cause des effets paradoxaux de fortes doses d'antioxydants, car tous deviennent prooxydants s'ils sont administrés en excès. De même que les antioxydants non nutritionnels naturels et de synthèse comme les produits naturels extraits de plantes et des animaux ne sont pas encore tous autorisés à utilisation et sont en cours d'étude, ainsi que les produits de synthèse tels que les enzymes, chélatant le fer ou piégeant les radicaux, leur utilisation est très limitée par leur peu d'efficacité clinique et par le risque de contamination [205]. L'utilisation des enzymes antioxydantes n'a pas connu de succès, et la quasi-totalité des essais thérapeutiques ont porté sur la superoxyde dismutase cuivre-zinc [205]. Des études récentes ciblent actuellement sur la thérapie génique par transfert de gènes antioxydants et le transfert de protéines ciblées à un tissu et permettant un contrôle de l'état redox des cellules ou la prévention du stress, plutôt qu'à un effet global antioxydant qui ferait perdre à la cellule le bénéfice potentiel qu'elle tire paradoxalement des radicaux libres de l'oxygène [205]. En fin la recherche d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydant chez un individu afin d'apporter les corrections nécessaires pour optimiser ses défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs induits par les ROS est d'une grande importance.



Chapitre III
Hyperhomocystéinémie

III. Hyperhomocystéinémie

III.1. Définition de l'hyperhomocystéinémie

L'hyperhomocystéinémie (HHcy), désigne l'augmentation de l'homocystéine totale plasmatique (Hcy), un acide aminé soufré provenant de la déméthylation de la méthionine [236]. Elle est causée par des facteurs génétiques, nutritionnels et environnementaux et elle est également associée à plusieurs pathologies, telles que le diabète, l'insuffisance rénale, plusieurs troubles psychiatriques et neurodégénératifs liés au vieillissement, certains types de cancer et les maladies cardiovasculaires [23]. Plusieurs études ont clairement établi la relation directe entre l'homocystéine et certaines affections vasculaires [23, 24, 25]. De nombreuses études ont démontré l'effet de l'acide folique et des vitamines du groupe B sur la diminution du taux sanguin d'homocystéine mais le bénéfice en termes de diminution de la morbidité-mortalité cardio-vasculaire n'est pas connu à ce jour [24, 25]. Les mécanismes moléculaires impliqués dans sa pathogénicité sont multiples, et il est bien établi que l'homocystéine augmente d'une part le stress oxydatif et d'autre part la dysfonction endothéliale [23]. L'analyse de ces mécanismes ouvre des perspectives pour la prévention de la toxicité de l'Hcy sur la fonction vasculaire tant sur le plan de la normalisation de taux d'homocystéinémie que sur celui de la protection des cibles moléculaires de l'homocystéine.

III.2. Métabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé soufré dont la synthèse est issue du métabolisme d'un autre acide aminé essentiel, la méthionine, apportée par les protéines alimentaires. Sa régulation fait intervenir plusieurs systèmes enzymatiques en présence de cofacteurs vitaminiques. Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme et peut être catabolisée selon deux voies métaboliques (Figure 24) : la voie de la transulfuration et la voie de la reméthylation [236]. La voie de la transulfuration permet à la méthionine, indispensable chez l'homme, d'apporter un atome de soufre pour la formation de la cystéine. L'activation de la méthionine en S-adenosyl-L-méthionine (SAM) se fait sous l'influence de la méthionine-adenosyl -transférase. La SAM, principal donneur de groupement méthyle de l'organisme, cède ensuite ce groupement pour donner naissance à la S-adenosyl-L-homocystéine, qui est hydrolysée en adénosine et en Hcy par la S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase. Sous l'influence de la cystathionine bêta-synthase

(CBS) dont le cofacteur est le phosphate de pyridoxal (vit B6), l'Hcy se condense ensuite avec la sérine pour former la cystathionine, elle-même clivée et désaminée en cystéine et en alpha cétone- butyrate. La voie de la reméthylation assure la reméthylation de l'Hcy en méthionine selon deux réactions enzymatiques distinctes. La principale réaction fait intervenir la 5-méthyltétrahydrofolate-homocystéine méthyltransférase (méthionine synthase) dont le cofacteur est la méthyl-cabalamine (dérivé de la vitamine B12). Dans cette voie, le groupement méthyl est apporté par le 5 méthyl tétrahydrofolate, dont la formation est sous la dépendance de la 5, 10 méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR). L'autre réaction fait intervenir la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase. L'importance relative de ces deux voies de reméthylation varie en fonction du tissu considéré. Par exemple, la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase est très exprimée par les cellules hépatiques et, selon certains auteurs, par les cellules rénales; elle l'est beaucoup moins au niveau de la paroi vasculaire où la 5-méthyl tétrahydrofolate- homocystéine méthyltransférase prédomine [237]. La SAM constituant un régulateur allostérique des enzymes impliquées dans les voies de la transsulfuration et de la reméthylation, un déficit enzymatique portant initialement sur l'une de ces deux voies métaboliques entraîne indirectement une dérégulation de l'autre voie, ce qui a pour conséquence d'accroître l'accumulation d'Hcy [237].

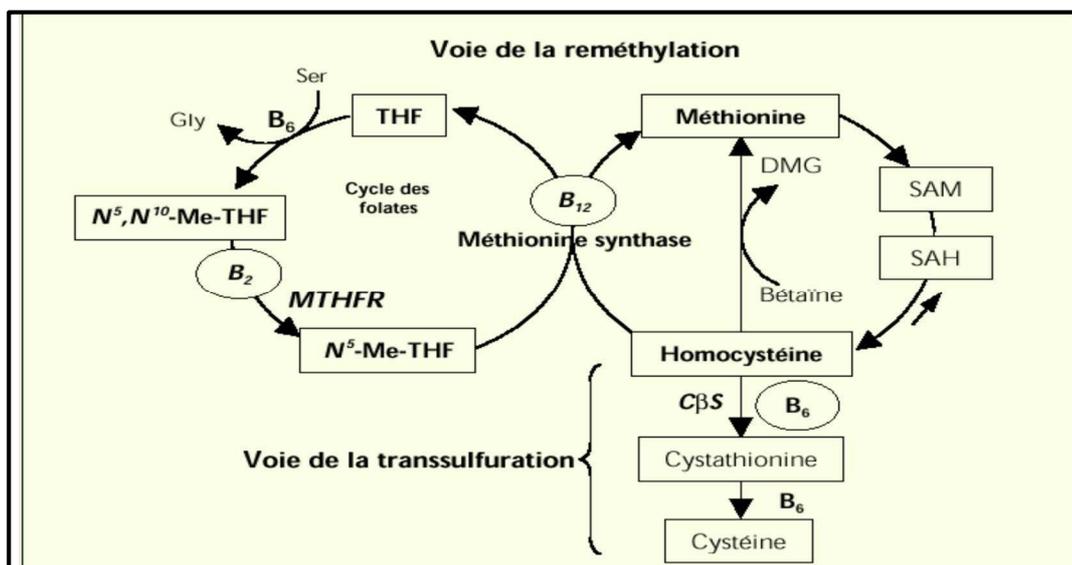
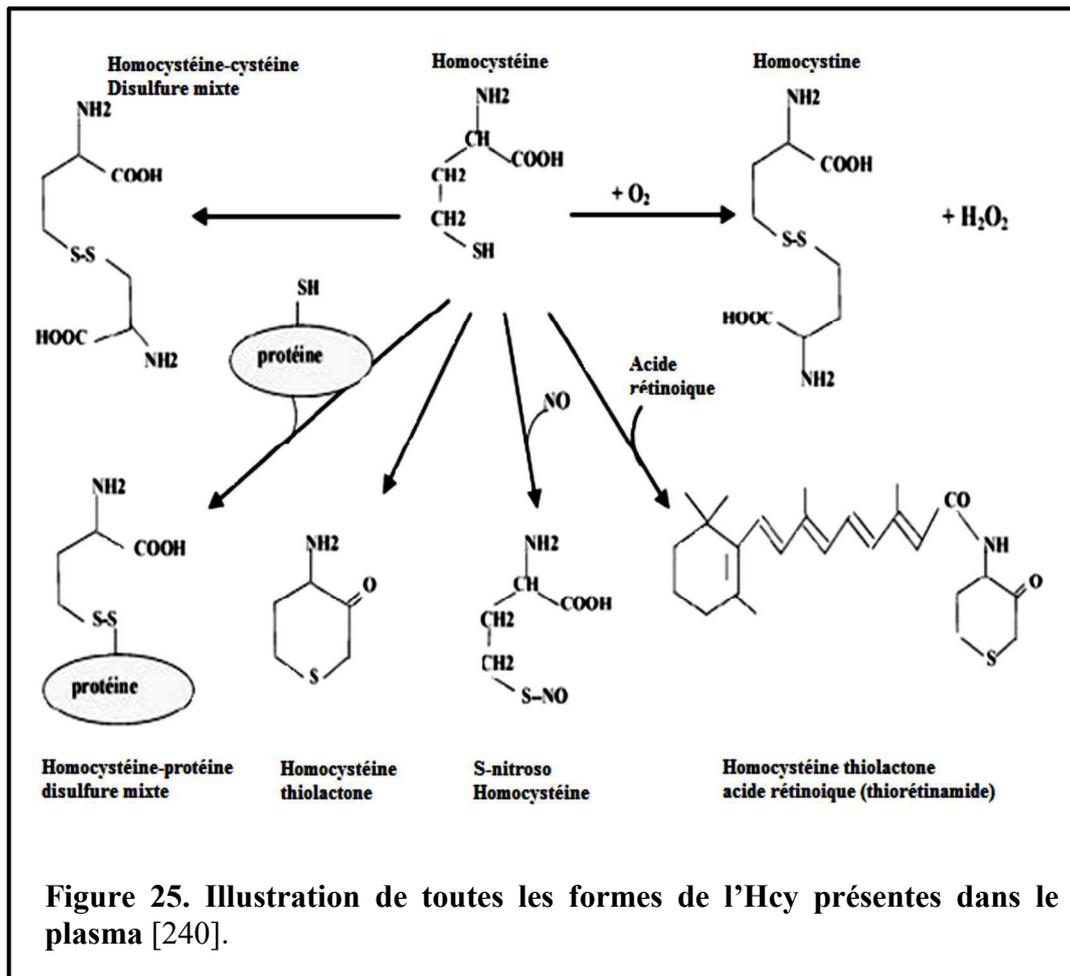


Figure 24: Métabolisme de l'homocystéine [238].

ser : serine, Gly : glycine, Me THF : méthylène tétrahydrofolate, MTHFR : N⁵,N¹⁰. Méthylène tétrahydrofolate reductase, THF : tétrahydrofolate, SAM : S- adénylméthionine, SAH : S- adénylhomocystéine, DMG : diméthylglycine, CβS : cystathionine – β- synthase.

III.2.1. Différentes formes de l'homocystéine circulante

L'Hcy circule dans le plasma sous forme liée aux protéines et sous forme libre (Figure 25). L'Hcy liée aux protéines, par l'intermédiaire de ponts disulfures réversibles ou de ponts peptidiques, représente 75% à 80 % de l'Hcy plasmatique totale. L'Hcy libre existe sous deux formes : une forme libre oxydée, et une forme libre réduite, correspondant à l'homocystéine proprement dite. La forme libre oxydée est principalement représentée par le disulfide homocystéine homocystéine (homocystine), par des disulfides mixtes (tels que le disulfide homocystéine-cystéine) et par l'homocystéine thiolactone [239].



III.3. Différents types d'hyperhomocystéinémie

Le dosage de l'Hcy plasmatique totale à jeun permet de définir la concentration physiologique normale de l'Hcy comprise entre 5 et 15 $\mu\text{mol/l}$. L'hyperhomocystéinémie est considérée comme modérée entre 15 et 30 $\mu\text{mol/l}$, intermédiaire entre 30 et 100 $\mu\text{mol/l}$ et sévère au-delà de 100 $\mu\text{mol/l}$ [241] (Tableau 5).

Tableau 5. Classification des hyperhomocystéinémies [241].	
Dosage moyen	10 μM (seuil 15 μM)
Hyperhomocystéinémie	modérée 15 à 30 μM
Hyperhomocystéinémie	intermédiaire 30 à 100 μM
Hyperhomocystéinémie	sévère ou majeure >100 μM

III.4. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

L'hyperhomocystéinémie peut avoir pour origine des troubles d'ordre génétique, nutritionnel et environnemental. Elle peut également être associée à différents états pathologiques. Les causes d'hyperhomocystéinémie sévère sont exclusivement génétiques et celle d'hyperhomocystéinémie intermédiaire ou modérée sont génétiques, nutritionnelles, thérapeutiques ou pathologiques (Tableau 6).

Tableau 6. Principales causes de l'HHcy [242, 243].			
	HHcy modérée	HHcy intermédiaire	HHcy sévère
Concentration Sanguine	12-30 $\mu\text{mol/L}$	31-100 $\mu\text{mol/L}$	>100 $\mu\text{mol/L}$
Nutrition	Carence en folate, B12, B6, choline et sérine Abus d'alcool	Carence en folate, B12, B6, choline et sérine Apport élevé en méthionine Alcool et Café	Carence sévère en folate B12, B6, choline et sérine
Mutations et polymorphisme	Mutation hétérozygote de la MTHFR Mutation hétérozygote de la CBS	Mutation hétérozygote de la MTHFR Carence en B12 due à une mutation génétique	Mutation hétérozygote de la MTHFR Mutation hétérozygote de la CBS Mutation de la Transcobalamine
Pathologies	Atteintes rénales Anémie pernicieuse Hypothyroïdisme Plusieurs cancers Psoriasis Diabète		
Médicaments	Antagonistes de folate Antagonistes de B6		
Autres	Tabac Ménopause Sexe masculin Age		

III.4.1. Facteurs nutritionnels

Il est clairement établi qu'un apport important de méthionine peut majorer le taux d'homocystéine, cette augmentation devrait être rapidement régulée, grâce aux voies intervenant dans le métabolisme de ce dernier. Les déterminants nutritionnels de l'Hcy les plus couramment cités sont les folates (vitamine B9), la vitamine B12, associées au métabolisme de l'Hcyt dans le cycle de reméthylation, et la vitamine B6 dans celui de transsulfuration. De déficits nutritionnels en ces vitamines bien souvent liés à un processus carenciel ou une mauvaise absorption d'origine digestive, conduisent à une élévation majeure de l'homocystéinémie en cas d'apport oral important de méthionine [244].

III.4.2. Facteurs génétiques

Il existe plusieurs polymorphismes ou variants génétiques des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine qui affectent le statut en Hcy. Il s'agit principalement de variants génétiques des enzymes 5,10- Méthyltétrahydrofolate réductase (MTHFR C677T, A1298C), Méthionine synthase (MTR A2756G), Méthionine synthase réductase (MTRR A66G) [245, 242]. Aussi une variante génétique portant sur une protéine de transport de la vitamine B12, la transcobalamine (TCN C776G), a été rapporté [245, 242].

Les mutations de la 5-10 MTHF sont les plus fréquentes, plus de 20 mutations sont décrites, dont la plus connue est celle en position 677 du gène codant pour la 5-10 MTHFR. Normalement, en position 677 du gène codant pour la 5-10 MTHFR se trouvent 2 cytosines (C677C). Chez les hétérozygotes, il existe une substitution de la thymine (T) à une cytosine (C677T), ce qui donne le variant thermolabile de la MTHFR avec une activité enzymatique réduite de 70% chez les homozygotes par rapport à son fonctionnement de base chez les homozygotes de la forme sauvage C, alors que les sujets hétérozygotes conservent environ 65% de l'activité [245, 242]. Les mutations de la CBS (cystathionine- β -synthétase), sont de l'ordre de 92 mutations décrites. Le sujet déficitaire homozygote (1/200.000) est atteint d'homocystinurie; il présente une hyperhomocystéinémie sévère ($>100\mu\text{mol/l}$) avec risque d'accidents vasculaires dès l'enfance, alors que la forme hétérozygote (environ 1%) pour laquelle l'augmentation de l'homocystéine est plus modérée et non systématique (environ 40% des cas). Sont associées à cette mutation des pathologies vasculaires, des épilepsies et des retards mentaux [245, 242].

III.4.3. Facteurs environnementaux

L'hyperhomocystéinémie modérée peut être causée par des facteurs environnementaux (Tableau 6) incluant l'âge, le sexe masculin, certains médicaments et différentes conditions pathologiques. Les personnes âgées ont de taux plus élevés d'Hcy, et les hommes ont une Hcy plus élevée que les femmes [246]. L'hyperhomocystéinémie modérée peut être liée à la prise de certains médicaments comme le méthotrexate, la phénytoïne, la carbamazépine qui interfèrent avec le métabolisme des folates, le monoxyde d'azote, qui inactivent la vitamine B12, l'azaribine qui empêche l'activité de la CBS, ainsi que la prise chronique de tabac, d'alcool ou de café [247]. Les contraceptifs, la pénicillamine ou les oestrogènes oraux, diminuent l'Hcy, [248]. Des conditions pathologiques comme l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale, les affections inflammatoires (notamment intestinales), l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète de type II, les maladies lymphoprolifératives et certains cancers (sein, ovaire, pancréas) [249, 250].

III.5. Hyperhomocystéinémie et maladies cardiovasculaires

La relation directe entre l'homocystéine et certaines affections vasculaires (coronaires, cérébrales ou périphériques) a été clairement établie par plusieurs études [251, 252]. Le rôle de l'hyperhomocystéinémie comme facteur de risque cardio-vasculaire a fait couler beaucoup d'encre depuis plusieurs décades. McCully en 1969, postulait déjà que l'accumulation d'homocystéine pouvait entraîner une athérosclérose [253]. Wilcken et Wilcken en 1976, montraient l'existence d'une association entre l'accumulation d'homocystéine plasmatique et la présence d'une atteinte coronaire [254]. Nygard et al en 1997, ont défini une relation entre le taux d'homocystéine plasmatique et la mortalité chez des patients souffrant de maladie coronaire [255]. Heijer et al en 1996, ont identifié l'hyperhomocystéinémie comme étant un facteur de risque de thromboses veineuses profondes dans la population générale [256]. Plus récemment, plusieurs études confirment bien la relation entre l'hyperhomocystéinémie et les affections cardio-vasculaires et thrombo-emboliques [257]. Les maladies cardiovasculaires constituent une des premières causes de mortalité et de morbidité dans le monde, elles posent un véritable problème de santé publique. Aujourd'hui, il est bien clair qu'une augmentation modérée de la concentration plasmatique d'homocystéine constituait un facteur de risque indépendant de mortalité cardiovasculaire, comparable à celui d'autres facteurs de risque comme le tabac, l'hypercholestérolémie ou l'hypertension artérielle [252].

III.5.1. Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie

Les mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie dans la maladie cardio-vasculaire sont multiples (Figure 26). Les expériences réalisées chez l'animal et les expérimentations in vitro [258] ont montré que l'homocystéine induisait un stress oxydatif qui conduit à un dysfonctionnement endothélial lié à une diminution de la production de monoxyde d'azote (NO), aboutissant entre autre à une diminution de la production des cellules endothéliales et leur desquamation entraînant l'exposition du sous-endothélium responsable de l'activation des processus de coagulation. Il induit aussi la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, la modification de la matrice extracellulaire et l'oxydation des lipoprotéines [258].

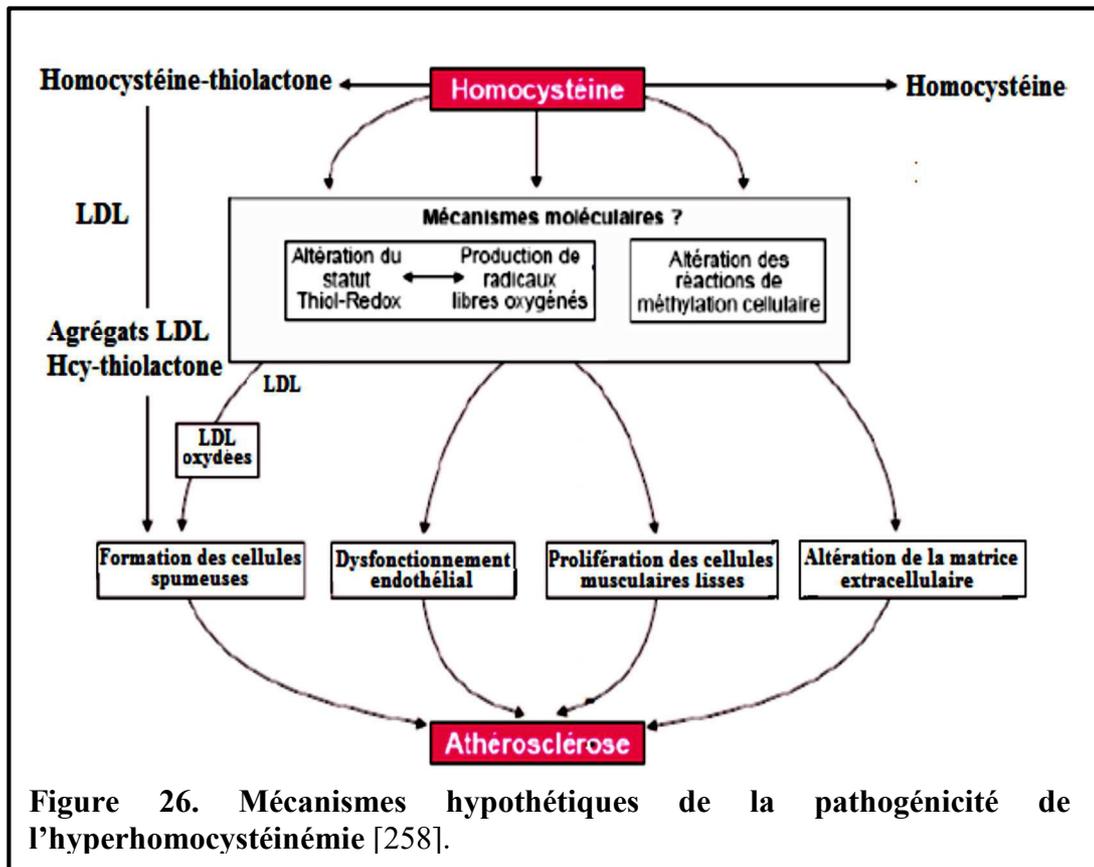


Figure 26. Mécanismes hypothétiques de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie [258].

III.5.1.1. Production d'un stress oxydatif

L'homocystéine possède in vitro une action pro-oxydante, son groupe thiol étant oxydé pour former des espèces réactives de l'oxygène ou ROS qui sont responsables de lésions et de dysfonctionnements cellulaires, essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN ou des lipides [259]. De nombreuses études ont rapporté qu'un taux élevé

d'homocystéine est à l'origine de la survenue des lésions tissulaires cardiaques et aortiques de rats hyperhomocystéinémiques, ainsi que la réduction de défenses antioxydantes [260, 261]. L'Hcy conduit à la dysfonction des cellules endothéliales et induit leur apoptose via les ROS produites par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (CML) [262]. Les ROS peuvent contribuer à la dépolymérisation de protéines comme le collagène ou l'élastine et encore altérer la fluidité membranaire en agissant au niveau des acides gras polyinsaturés et des phospholipides membranaires et participent à la peroxydation lipidique des lipoprotéines athérogènes présentes dans l'intima artérielle, et le développement de cellules spumeuses (Figure 27). Il a été montré que l'Hcy serait le principal composé soufré favorisant l'oxydation des LDL in vivo, elle induit une diminution de leur contenu en acides gras polyinsaturés, la formation de produits terminaux de la peroxydation lipidique (substances réagissant à l'acide thiobarbiturique ou TBARS), propriété à l'origine de sa pathogénicité vasculaire [264]. L'Hcy entraînerait aussi une hyperagrégabilité plaquettaire et exercerait enfin des effets procoagulants [265].

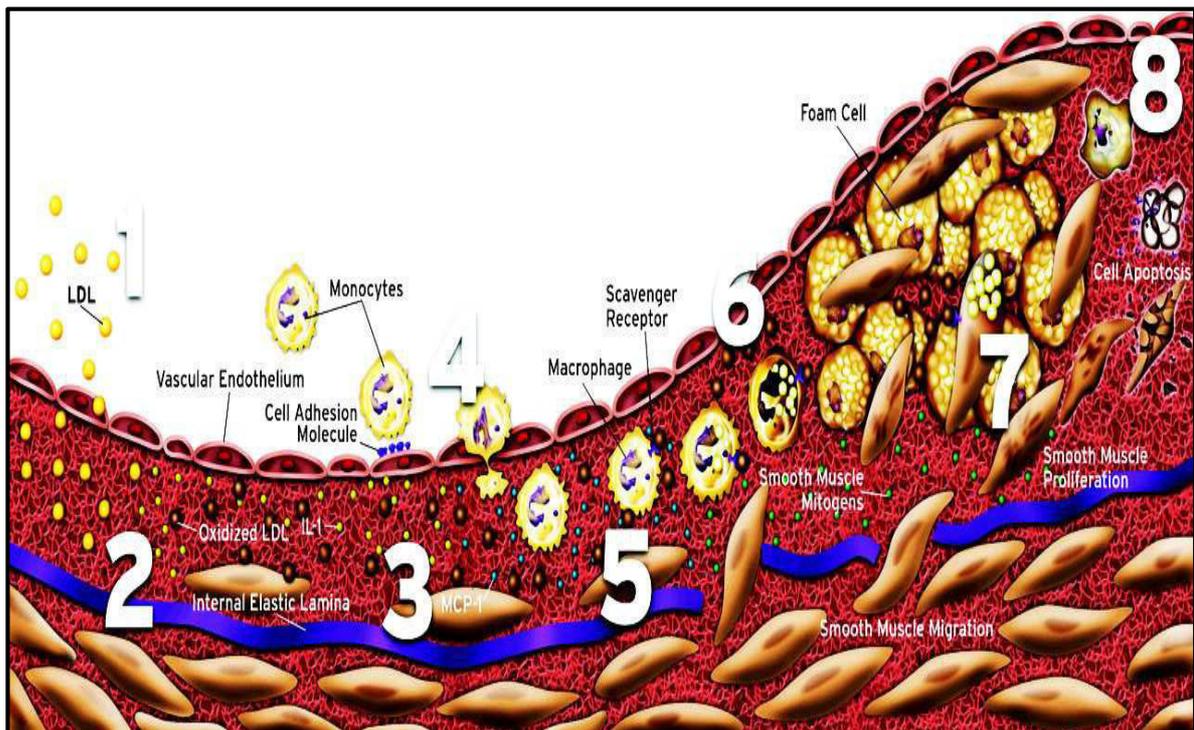


Figure 27. Les 7 étapes du développement de l'athérosclérose en plaque.

LDL sont infiltrés et oxydés dans l'espace sous-endothélial par les macrophages et les CML (1 et 2). Synthèse des facteurs de croissance et cytokines attirant de nouveaux monocytes (3 et 4). Récepteurs de macrophages captant les LDL oxydés (5). Accumulation de cellules spumeuses et prolifération de CML (6, 7 et 8) [263].

L'oxydation de l'homocystéine en homocystine libère du peroxyde d'hydrogène, H₂O₂. Le groupe thiol de l'homocystéine se lie aussi aux ions ferreux ou cuivreux pour former un mélange oxydant générant H₂O₂. Ce complexe participe à l'inactivation des enzymes [264]. L'homocystéine peut également sensibiliser les cellules au stress oxydatif en diminuant l'expression d'une large gamme d'enzymes anti-oxydantes. Des résultats indiquent notamment que l'expression et l'activité de l'hème oxygénase-1 et de la glutathion peroxydase étaient diminuées lors de cultures de cellules endothéliales après traitement par de l'homocystéine [266, 267]. Une hyperhomocystéinémie pourrait limiter le potentiel antioxydant de certaines cellules [268] et dans des modèles animaux génétiquement modifié [269]. Une diminution de la capacité antioxydante en SOD et Catalase a été rapportée chez le rat sous l'effet d'un haut taux d'Hcy [261]. Par contre d'autres études ont montré une augmentation de ces paramètres [270]. Le rôle de l'homocystéine sur l'activation de la voie NF-κB via le stress oxydatif a également été rapporté [271, 272].

III.5.1.2. Dysfonction endothéliale et diminution de la production de NO

Les mécanismes par lesquels l'Hcy induit le dysfonctionnement endothélial ne sont pas complètement définis. L'homocystéine provoque une atteinte des cellules endothéliales via probablement une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) [273]. Toutefois, des travaux expérimentaux montrent que l'altération de la fonction de relaxation endothélium-dépendante est médiée par le monoxyde d'azote (NO). L'endothélium des vaisseaux sanguins se sert du NO pour déclencher le relâchement de sa tunique de muscle lisse, provoquant ainsi une vasodilatation et un accroissement du débit sanguin, ainsi qu'une diminution de l'agrégation des plaquettes sanguines [274]. Sur le plan expérimental l'exposition de cellules endothéliales en culture à de l'homocystéine entraîne un stress oxydant prédominant qui diminue la production de NO [275].

III.5.1.3. Diminution de la fonction de thromborésistance endothéliale

Des travaux menés *in vitro* et chez l'animal suggèrent que l'hyperhomocystéinémie altère le phénotype antithrombotique physiologique des cellules endothéliales [276]. L'Hcy peut perturber la coagulation. Il a été suggéré que l'hyperhomocystéinémie peut favoriser la thrombose vasculaire par l'induction des procoagulants et aussi par l'inhibition des anticoagulants naturels [277, 278]. Ainsi que l'altération de la production de médiateurs

endothéliaux et la modification des interactions entre certaines protéines extracellulaires, telles que la lipoprotéine (a) et la fibrine [256].

III.5.1.4. Prolifération cellulaire de cellules musculaires lisses

La culture de cellules musculaires lisses ou CML en présence de l'homocystéine se traduit par une croissance et une prolifération accrue qui jouent un rôle dans l'athérogénèse [279]. L'action mitogène de l'Hcy sur les CML et sa toxicité sur le tissu conjonctif vasculaire ont été révélées par l'analyse histologique d'artères de patients homocystinuriques, puis confirmées expérimentalement chez l'animal et in vitro. L'action mitogène serait directement liée à l'induction de l'expression des gènes des cyclines D1 et A ainsi qu'à l'activation du facteur de transcription NF-kB dans les CML [280].

III.5.1.5. Inflammation

Plusieurs études ont montré que de taux élevés d'homocystéine pouvait intervenir dans l'activation du facteur de transcription NF-kB qui à son tour stimule la production de plusieurs facteurs pro-inflammatoires tels que MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), une chémokine pour les monocytes, et l'interleukine (IL)-8, une chémokine pour les lymphocytes T et les neutrophiles [271, 281]. L'homocystéine initie aussi la production de TNF- α et de nombreux signaux cellulaires impliqués dans le processus inflammatoire [282]. L'homocystéine est également capable de moduler la réponse inflammatoire en régulant la synthèse de molécules d'adhésion comme VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), ainsi que celle du PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) [283].

III.5.1.6. Apoptose

L'homocystéine induit l'apoptose ou la mort cellulaire programmée des cellules endothéliales humaines en culture sous l'effet du stress du réticulum endoplasmique [284]. L'homocystéine induit la mort cellulaire par un mécanisme UPR-dépendant (Unfolded Protein Response). En outre, l'Hcy provoque l'apoptose par l'activation de la caspase 3 [285].

III.5.1.7. Altération des réactions de méthylation intracellulaire

L'altération des fonctions cellulaires induite par l'hyperhomocystéinémie proviendrait non seulement de l'Hcy elle-même, mais aussi de la diminution des capacités de méthylation intracellulaire, liées à une diminution de la reméthylation intracellulaire de l'Hcy, qui est à l'origine de diverses pathologies, telles que les défauts de fermeture du tube neural ou certains troubles neurologiques [286]. Le rôle crucial des réactions de méthylation dans le maintien de l'homéostasie cellulaire peut être illustré par l'exemple des réactions de méthylation des protéines, dépendantes de la disponibilité en S-adenosyl-L-méthionine (SAM) qui est un donneur de groupes méthyles impliqués dans plus de 100 réactions de méthylations (dont celle de l'ADN) dans notre organisme. Ces réactions sont principalement catalysées par les carboxyl méthyltransférases, qui transfèrent le groupement méthyl de la SAM à certains groupes carboxyl des protéines. La S-adenosyl-L-homocystéine (SAH), formée lors du transfert du groupement méthyl de la SAM, agit comme un inhibiteur compétitif des méthyltransférases. L'inhibition de ces dernières par une hyperhomocystéinémie est donc responsable d'un état d'hypométhylation dans la cellule [287]. Cette hypométhylation pourrait alors avoir comme conséquence d'activer certains gènes pro-inflammatoires. L'altération des réactions de méthylation pourrait participer à l'athérogénicité propre de l'Hcy puisque, parmi les différents aminothiols, seule l'Hcy peut produire de la SAH, en présence d'adénosine et sous l'influence de la SAH synthétase [288].

III.5.1.8. Stress du réticulum

Dans les cellules eucaryotes, le réticulum endoplasmique (RE) est le site principal de synthèse et de maturation des protéines transmembranaires et des protéines résidentes du RE [289]. De nombreuses molécules chaperonnes du RE, telles que la GRP78 (glucose regulated protein-78) aussi appelée Bip125 assurent le repliement correct des protéines synthétisées. Le stress du réticulum endoplasmique est une condition pathologique où des protéines « mal repliées » ou non repliées s'accumulent et vont être dégradées par le protéasome [290]. A l'état normal, le RE active le système appelé unfolded protein response ou (UPR), qui va aboutir à la dégradation de ces protéines de mauvaise qualité [289]. Cependant, un stress prolongé du RE, comme cela est observé en cas d'hyperhomocystéinémie, peut causer une apoptose des cellules endothéliales [262].

III.6. Traitement de L'hyperhomocystéinémie et affections cardiovasculaires

De nombreuses études ont démontré l'effet de l'acide folique et des vitamines du groupe B sur la diminution du taux sanguin d'homocystéine [291, 292]. Un apport d'acide folique provoque, en moyenne, une diminution de 25 % de l'homocystéinémie et que l'addition de cyanocobalamine (vitamine B12) abaisse l'homocystéinémie de 7 % supplémentaires. L'acide folique produit son effet maximum à 0,5 mg/j, mais une dose de 0,2 mg/j pourrait suffire chez certains patients. La vitamine B6 administrée seule n'a aucun effet sur l'hyperhomocystéinémie modérée détectée à jeun; par contre, combinée à l'acide folique, elle peut réduire l'homocystéinémie jusqu'à 53 % en cas d'hyperhomocystéinémie détectée par test de charge en méthionine [238]. Il a été aussi considéré qu'une dose quotidienne de 0,8 mg d'acide folique permet d'atteindre la réduction maximale du taux d'homocystéine [293]. Les posologies réputées efficaces rencontrées le plus fréquemment dans la littérature sont : acide folique : 0,5-5 mg/j; B12 orale : 0,5 mg/j; B6 : 16 mg/j [294]. La façon de traiter l'hyperhomocystéinémie demeure encore sujette à la controverse. L'utilisation d'une thérapeutique à base de N-acétylcystéine (qui diminue directement l'homocystéinémie en augmentant l'élimination hépatique et rénale d'Hcy), pourrait représenter une alternative intéressante [295]. Le seuil pathologique fixé à 15 μ mol /l, devra être adapté, dans les années à venir, aux différentes situations pathologiques [296]. La recherche d'une hyperhomocystéinémie pourrait être justifiée chez les patients présentant des accidents vasculaires. Cependant le risque de survenue d'évènements cardiovasculaires reste à démontrer. En effet, Il est clairement admis que le traitement vitaminique combiné fait chuter le taux d'homocystéine mais le bénéfice en termes de diminution de la morbidité et mortalité cardio-vasculaire n'est pas connu à ce jour [252, 238]. Des résultats de trois études récentes similaires ont montré que la réduction des taux d'homocystéine par les traitements vitaminés n'apporte pas de bénéfice chez les patients porteurs d'une maladie cardio-vasculaire ou à risque d'en développer une [297, 298, 299]. Ce qui a fait une grande controverse, du fait de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie d'une part, et la triple association d'acide folique, vitamine B6 et B12, qui montre un effet négatif sur la survenue d'évènements cardio-vasculaires d'autre part [295]. La pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie ouvre des perspectives en matière de détection, de prévention et de traitement des pathologies cardio-vasculaires (CV) associées à l'hyperhomocystéinémie. Il a été récemment démontré qu'un prétraitement par la vitamine C et/ou la vitamine E, visant à prévenir les effets oxydants de l'Hcy, diminuait

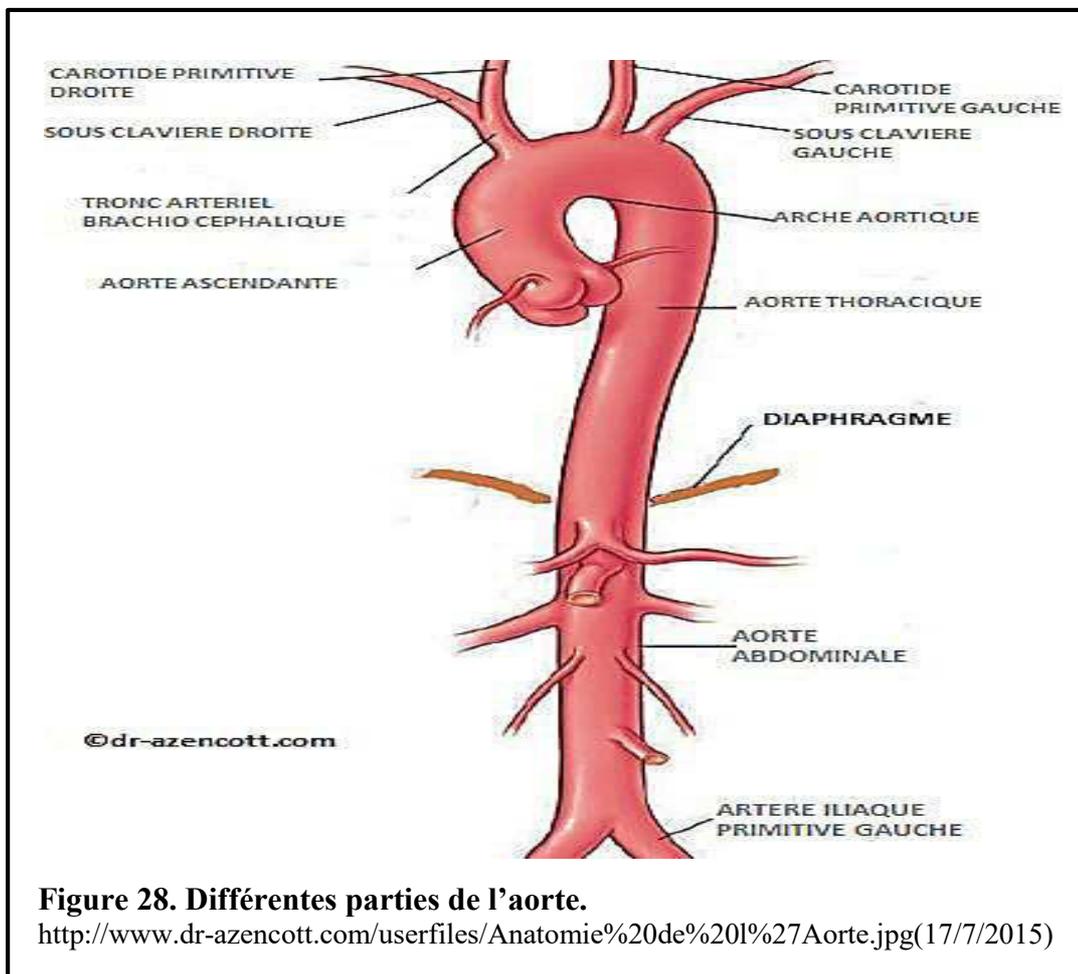
l'altération de la fonctionnalité endothéliale induite par une hyperhomocystéinémie consécutive à une charge en méthionine [300, 301]. De ce fait une prise en charge plus globale, visant à prévenir l'altération de la fonctionnalité endothéliale par l'Hcy et, éventuellement, par certains autres facteurs de risque cardiovasculaire pourrait correspondre à l'amélioration des défenses cellulaires en renforçant le statut antioxydant de l'organisme. Notre projet de recherche, en effet correspond à cette idée de vérifier le stress oxydatif induit par l'hyperhomocystéinémie par l'implication d'un système de défense, le protéasome, en vue d'une approche nouvelle en hyperhomocystéinémie. Il est à noter, que des recherches visant à préserver les capacités de méthylation cellulaire en cas d'altération du métabolisme de l'Hcy ou l'intégrité de telle ou telle fonction spécifique des cellules endothéliales en agissant directement au niveau de la transcription de certains gènes sont en cours [302].

III.7. Système cardiovasculaire

Le système vasculaire sanguin assure la distribution d'oxygène, de nutriments, et d'hormones, et la collecte des résidus métaboliques et du CO₂, ainsi que leur transport vers des organes à fonction excrétrice. Le système vasculaire est composé d'une pompe musculaire, le cœur, d'un système artériel permettant la distribution du sang aux organes et aux tissus, de réseaux capillaires assurant les échanges sang/cellules, et d'un système veineux permettant le retour du sang au cœur.

Le cœur est un muscle creux, séparé par une cloison médiane ou septum en une partie droite et une gauche. Chacune composée d'une oreillette et d'un ventricule [303]. L'aorte, émerge du ventricule gauche dont elle est séparée par la valve aortique dont va être expulsé le sang du cœur [303]. L'aorte est à l'origine de toutes les artères du corps et donne de nombreuses ramifications ou branches collatérales. On peut la diviser en 2 parties : aorte thoracique et aorte abdominale. L'aorte thoracique est elle-même divisée en 3 segments: l'aorte ascendante, segment initial de l'aorte, l'aorte horizontale ou crosse aortique d'où partent des artères irriguant la tête et les membres supérieurs, l'aorte descendante qui descend un peu plus dans le tronc, longe la colonne vertébrale tandis que la deuxième partie, l'aorte abdominale, donne naissance à des vaisseaux irriguant les membres inférieurs, elle descend le long de la colonne puis se divise en 2 artères iliaques au niveau du bassin. C'est de là que partent de nombreuses artères, qui vont irriguer

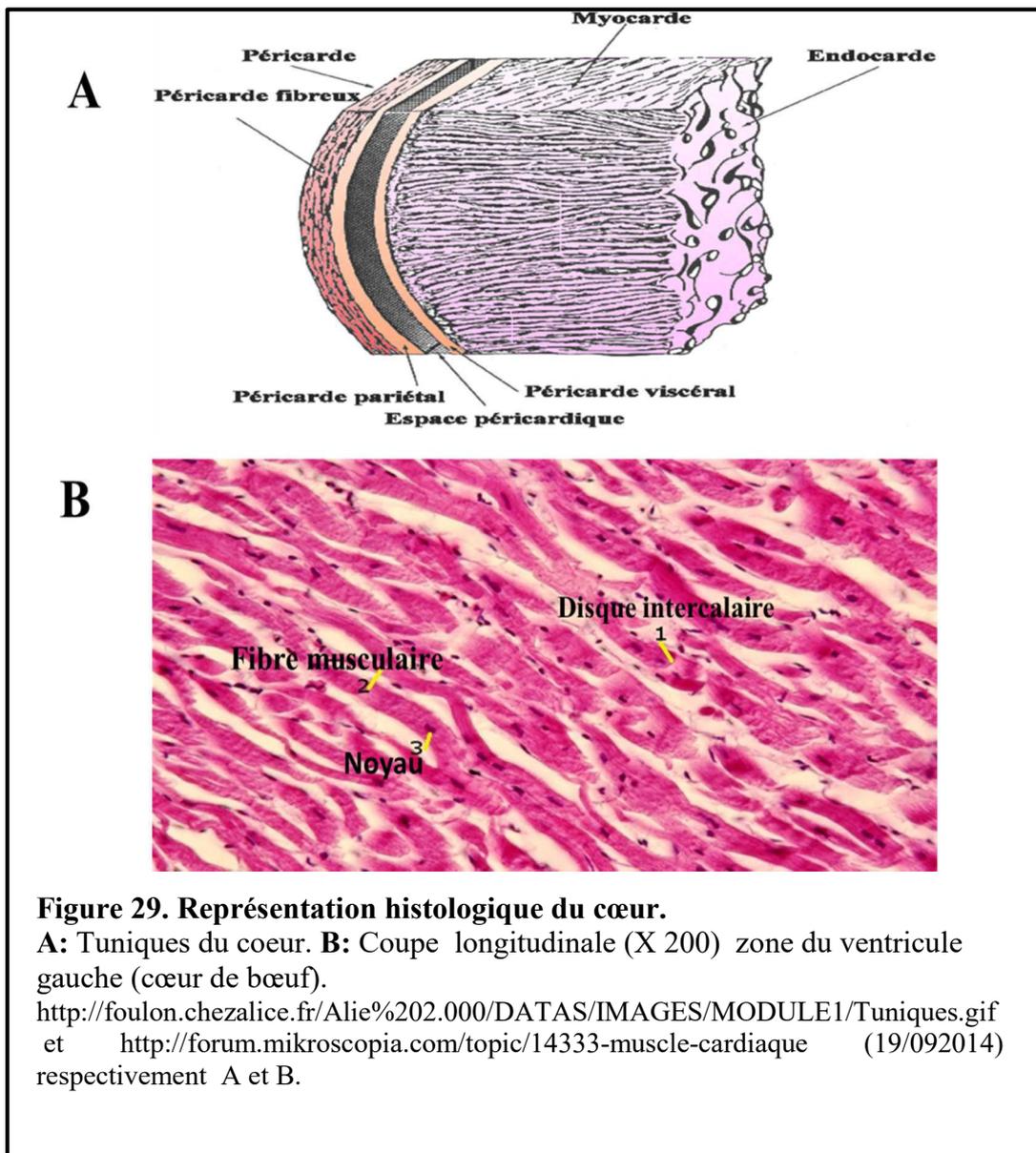
différents systèmes ou organes : par exemple artères digestives, rénales, génitales [304] (Figure 28).



III.7.1. Structure histologique du cœur

Le cœur est formé de 3 tuniques, qui sont du centre vers la périphérie : l'endocarde, le myocarde et le péricarde (Figure 29A) [303]. L'endocarde tapisse les cavités cardiaques, les valves et les cordages. Il comporte un endothélium (épithélium pavimenteux simple) en continuité avec celui des vaisseaux ; il est associé par l'intermédiaire de sa lame basale à une couche sous-endothéliale de tissu fibro-élastique auquel se mêlent des cellules musculaires lisses. Au niveau des cordages et des valvules, il est au contact d'un tissu conjonctif dense, tandis qu'au niveau des cavités il est séparé du myocarde par une couche sous endocardique de tissu conjonctif lâche bien vascularisé renfermant des fibres nerveuses, des vaisseaux sanguins de petit calibre [303]. Le myocarde constitue la paroi cardiaque la plus épaisse. Il est organisé sous forme de travées myocardiques constituées

de cellules musculaires cardiaques anastomosées entre ces travées (Figure 29B), l'environnement conjonctif est riche en capillaires sanguins et lymphatiques ainsi qu'en fibres nerveuses. Le péricarde tapisse l'extérieur du cœur et il est donc constitué d'un mésothélium (épithélium pavimenteux simple) reposant par l'intermédiaire de sa lame basale sur une couche sous-mésothéliale conjonctive comportant en particulier des fibres élastiques. L'épicarde reste séparé du myocarde par une couche sous-épicardique où l'on observe une épaisse couche de tissu adipeux, les vaisseaux coronaires (artères et veines coronaires) épicardiques et des nerfs [303].



III.7.2. Structure histologique de l'aorte

L'aorte fait partie des artères élastiques/conductrices qui ont le plus grand diamètre et la plus grande élasticité, il s'agit de vaisseaux de gros calibre, à lumière ronde, et dont la paroi est relativement peu épaisse [304]. On distingue classiquement trois couches concentriques de cellules, de la lumière à la périphérie: l'intima, la média et l'adventice (Figure 30).

III.7.2.1. Intima

L'intima est la tunique interne, composée principalement de collagène et d'une monocouche continue de cellules endothéliales, elle repose sur une fine couche de tissu conjonctif appelée la lame basale. Cette dernière est elle-même supportée par une lame élastique appelée la limitante élastique interne, agissant comme une frontière entre l'endothélium et la matrice extracellulaire (MEC) de la média [304, 305].

III.7.2.2. Média

La média est la tunique moyenne, et la plus épaisse de la paroi artérielle, constituée de cellules musculaires lisses (CML) et d'une MEC riche en fibres d'élastine et de collagène, elle est délimitée par deux limitantes élastiques ; une lame élastique interne du côté de la lumière vasculaire et une lame élastique externe. Cette couche est considérée comme la partie active de l'artère (élasticité, modification de calibre...) [304, 305].

III.7.2.3. Adventice

L'adventice est la tunique externe. Elle est constituée d'un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, et contenant des fibroblastes, des adipocytes, des cellules immunitaires, des terminaisons nerveuses et des vasa vasorum (vaisseaux nourriciers). Elle assure l'ancrage des artères aux structures environnantes [304, 305].

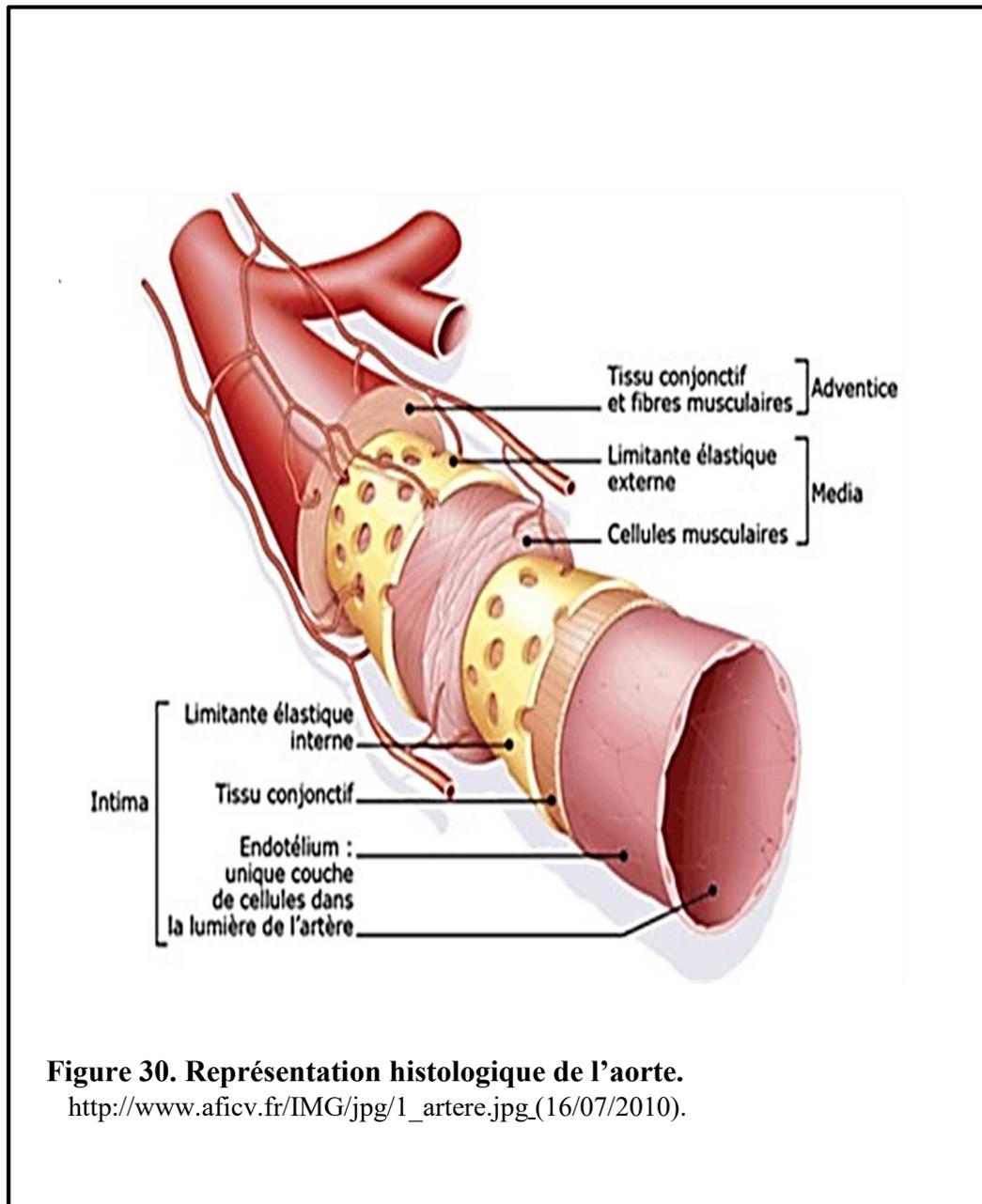
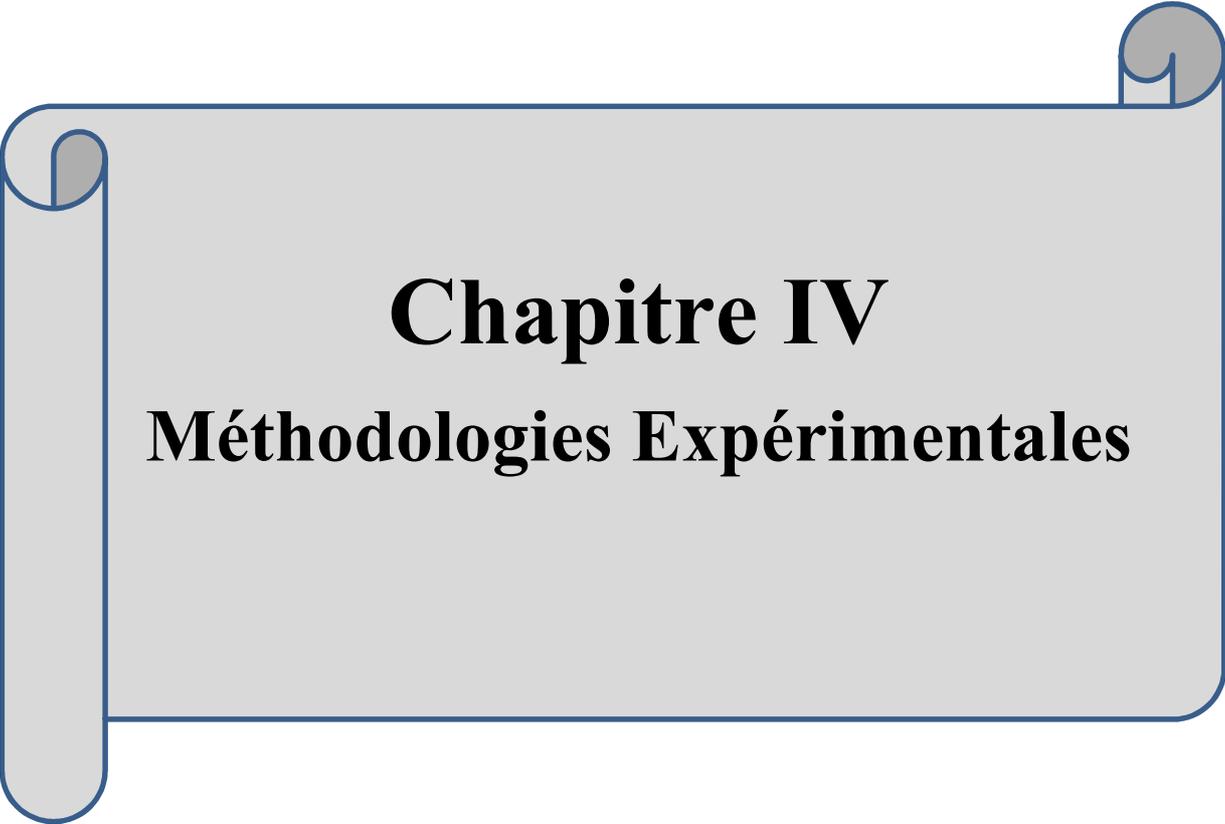


Figure 30. Représentation histologique de l'aorte.
http://www.aficv.fr/IMG/jpg/1_artere.jpg (16/07/2010).



Chapitre IV

Méthodologies Expérimentales

IV. Méthodologies expérimentales

IV.1. Modèle animal d'hyperhomocystéinémie

L'étude est réalisée sur des rats mâles de l'espèce Wistar albinos (n = 32 ; âgés de 03 mois et de 240 ± 10 g), de l'Institut Pasteur d'Alger. Les rats sont maintenus à 25 °C et 60 % d'humidité avec un éclairage circadien de 12 de lumière et 12 d'obscurité et ont accès libre à l'eau et à la nourriture équilibrée en protéines, lipides, glucides, vitamines et sels minéraux (ONAB- Ain M'Lila). Après une semaine d'adaptation, les rats sont traités selon le protocole [270] avec modification et le protocole [306] (Tableau 7).

Tableau 7. Protocole du modèle animal chez les rats témoins et traités [270, 306].				
Groupes (n=32rats)	Groupe 1 (n= 8 rats)	Groupe 2 (n= 8 rats)	Groupe 3 (n= 8 rats)	Groupe 4 (n= 8 rats)
	Témoins : (T) [270]	Traités par l'Hcy : (tHcy) [270]	Traités par l'Hcy- acide folique : (tHcy-F) [270]	Traités par l'Hcy- vitamine C: (tHcy-vit C) [270, 306]
Semaine 1 8h00min/ jour	Aucune dose	DL-Hcy : (ip) 0,6 µM/g: pc	DL-Hcy : (ip) 0,6 µM/g: pc	DL-Hcy :(ip) 0,6 µM/g: pc
Semaine 2 8h00min / jour	Aucune dose	DL-Hcy (ip) 0,8 µM/g: pc	DL-Hcy (ip) 0,8 µM/g: pc +F(ip) 0,011 µM/g: pc	DL-Hcy (ip) 0,8 µM/g: pc +vit-C (ip) 100 mg/kg: pc
Semaine 3 8h00min / jour	Aucune dose	DL-Hcy (ip) 1,2 µM/g: pc	DL-Hcy (ip) 1,2 µM/g: p +F(ip) 0,011 µM/g: pc	DL-Hcy (ip) 0,8 µM/g: pc +vit-C (ip) 100 mg/kg: pc
DL-Hcy : DL-Homocystéine (H4628 Sigma Aldrich, France) diluée dans de l'H ₂ O pure, ip : dose intrapéritonéale, pc : poids corporel, F : (acide folique: Sigma Aldrich, France) diluée dans de l'H ₂ O pure, vit C : (vitamine C: Sigma Aldrich, France) diluée dans de l'H ₂ O pure, Hcy : homocystéine.				

IV.2. Prélèvements des échantillons de sang et d'organes

Les rats sont anesthésiés après 12h de jeun par le chloroforme sous une cloche fermée. Le sang est prélevé par ponction du sinus caverneux du rat dans des tubes contenant de l'EDTA, puis centrifugé à 3000 tours/min pendant 20 minutes à 4°C. Les échantillons plasmatiques ainsi obtenus sont conservés dans des tubes eppendorfs à -80 °C pour les dosages ultérieurs de l'Hcy, MDA, PC et GSH. Le cœur et l'aorte sont prélevés, lavés au PBS (Phosphate Buffer Saline) glacial pH 7,4. Un petit fragment du cœur et de l'aorte (arch, iliaque, abdominale, thoracique) de chaque rat sont conservés dans le formol à 10%

pour les coupes histologiques. Les organes (cœur et aorte) sont ensuite pesés et immédiatement conservés à -80°C pour les dosages ultérieurs.

IV.3. Préparation des homogénats

Le cœur et l'aorte sont homogénéisés à l'aide de l'homogénéisateur (Janke – Kunkel, Inka-Labortechnik) respectivement dans (1 ml et 0,5 ml) de tampon de lyse glacial (30 mM Tris HCl, pH 7.2, 1 mM dithiothreitol (DTT, Sigma Aldrich), 1% Triton X 100) pendant 2 min sur la glace. Les suspensions sont ensuite centrifugées à 12,000 rpm pour 15 min à 4°C [307, 308]. Les surnageants obtenus sont aliquotés dans des tubes eppendorfs après la détermination de la concentration en protéines [309], puis immédiatement conservés à - 80°C pour les dosages des marqueurs du stress oxydatif tissulaire (MDA, PC, GSH, SOD, CAT et GPx), le NO, la caspase 3 et l'analyse des activités du protéasome, et sont supplémentés de 1% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases pour les western blots des sous unités du protéasome 20S, protéines ubiquitylées, protéines modifiées par l'HNE et le rapport 26S/20S protéasommal sur gel natif [307, 308].

IV.4. Dosage de l'homocystéine (Hcy)

Le dosage de l'homocystéine total (tHcy) plasmatique a été réalisé par technique immunoenzymatique en utilisant le Kit (Axis® Homocysteine EIA, IBL International, Germany). Le principe du dosage est basé sur la réduction de l'homocystéine liée aux protéines et à ses autres formes conjuguées (Prot-SS-Hcy, Hcy-SS-Hcy, *R1-SS-Hcy, *R1 est un résidu thiol) en homocystéine libre par le dithiothréitol (DTT), qui par la suite, est convertie enzymatiquement en S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) par une SAH-hydrolase en présence d'un excès d'adénosine (AD). Le SAH libéré est ensuite mesuré par test immunoenzymatique par compétition en phase solide avec le SAH immobilisé pour se lier à l'anticorps anti-SAH monoclonal. Après élimination de l'anti-SAH non lié, un anticorps secondaire rabbit anti-mouse marqué à la peroxydase (HRP) est couplé. L'activité peroxydase est mesurée dans l'échantillon par lecture de l'absorbance à 450 nm qui est inversement proportionnelle à la concentration totale de l'homocystéine dans l'échantillon. Le Kit est spécifique pour le dosage quantitatif de la L-homocystéine, la seule forme présente dans le sang.

V.4.1. Réactifs du Kit

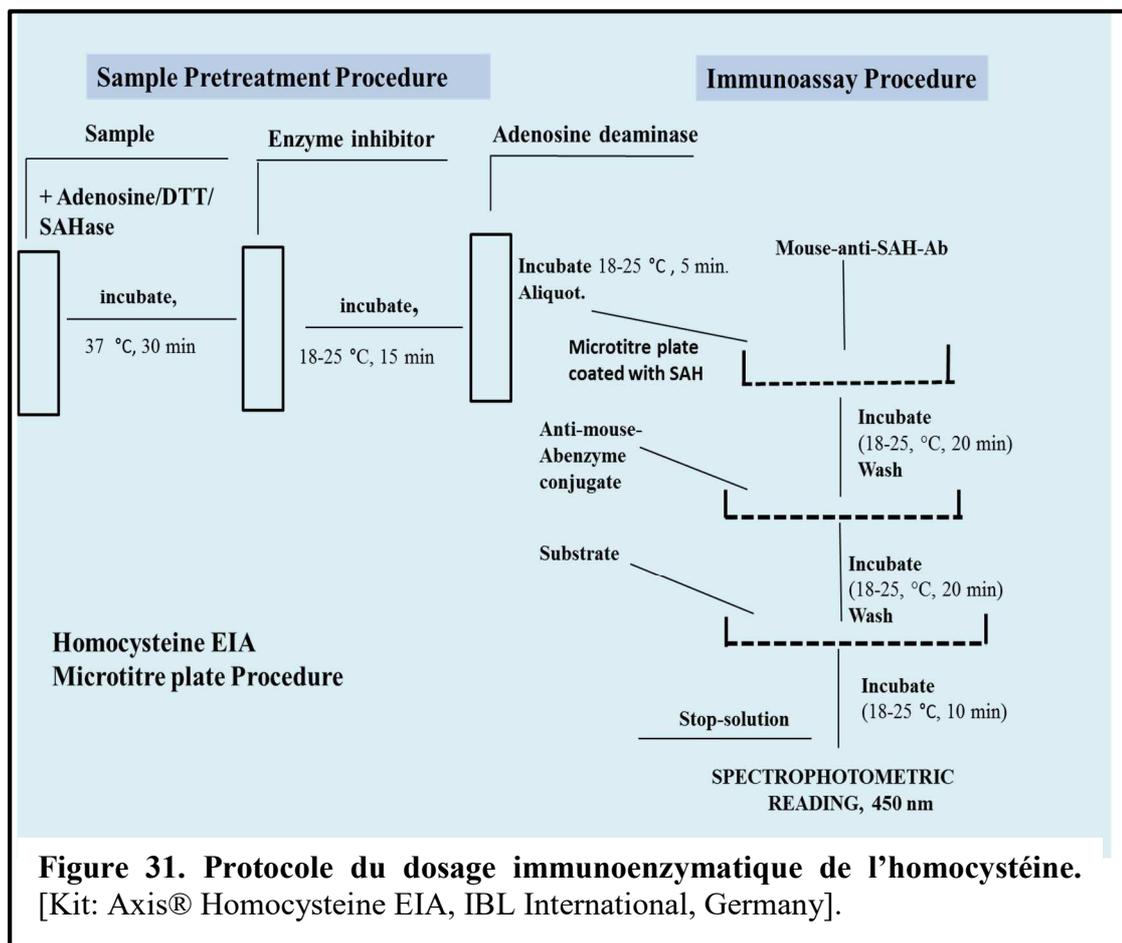
Les réactifs du Kit sont rassemblés dans le (Tableau 8). Ces réactifs sont prêts à l'emploi et ne doivent être ouverts qu'au moment d'utilisation et préparés en quantité selon le nombre des échantillons puis conservés à l'abri de lumière entre 2 à 8 °C.

Tableau 8. Réactifs du Kit: Axis® Homocysteine [EIA, IBL International, Germany].		
Reagents	Colour coded	Content
Reagent A Assay buffer	Brown	Phosphate buffer, 0.09% NaN ₃ .
Reagent B Adenosine/DTT	White	Adenosine / dithiothreitol, citric acid.
Reagent C SAH-Hydrolase White	White	BovineS-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, tris-buffer w/glycerol, methylparabene
Reagent D Enzyme inhibitor	Orange	0.15% Merthiolate, phosphate buffer.
Reagent E Adenosine deaminase	Red	Adenosine deaminase, phosphate buffer, BSA, 0.09% NaN ₃ , phenol-red dye.
Reagent F a-SAH antibody	Green	Monoclonal mouse-a nti-S- adenosyl L-homocysteine- antibody, BSA, 0.01% Merthiolate.
Reagent G Enzyme conjugate	Blue	Anti-mouse-antibody enzyme conjugate, BSA, horse radish peroxidase, blue dye
Reagent H Substrate solution	Violet	TMB+ (Tetramethylbenzidine)
Reagent S Stop solution	Yellow	0.8 M Sulphuric acid
Wash buffer	Black	Phosphate buffer, 0.01% Merthiolate, Tween 20, BSA.
Calibrators	White	S-adenosyl-L-homocysteine. 2 - 4 - 8 - 15 - 30 - 50 µmol/L in Assay buffer
Microtitre strips		Coated with BSA S-adenosyl-L-homocysteine
Controls		Diluted serum samples of human origin. Phosphate buffer, 0.09% NaN ₃ . Low, medium and high levels.

IV.4.2. Protocole

En suivant les instructions du Kit, un prétraitement de réduction des échantillons est réalisé par l'ajout de 500 µl de la solution SPS (Sample Preparation Solution) préalablement préparée (4.5 ml de réactif A, 0.25 ml de réactif B, 0.25 ml de réactif C)

à 25 µl de calibrateurs, de l'échantillon ou de contrôle (Tableau 8). Après homogénéisation, les tubes couverts par le parafilm sont placés pendant 30 min à 37 °C. Avant le refroidissement des tubes, 500 µl de réactif D sont additionnés, mixés et incubés pendant 15 minutes à 18-25 °C. Ensuite, 500 µL de réactif E sont ajoutés, et incubés durant 5 minutes à 18 - 25 °C. Pour le test immunoenzymatique, 25 µl des calibrateurs, contrôles et des échantillons traités, sont déposés dans les puits des plaques de microtitration revêtus de SAH, et sont immédiatement additionnés à 200 µl de réactif F et incubés pendant 30 min à 18 - 25 °C. Après lavage 3 fois avec 400 µl au tampon de lavage dilué, 100µl de réactif G sont couplés et incubés pendant 20 min à 18-25 °C, puis lavés au tampon de lavage dilué (3 × 400 µl). Ensuite 100 µl de réactif H sont déposés dans chaque puit et incubés pour 10 min à 18-25 °C. De même 100 µl de réactif S sont aussi distribués dans chaque puit de la plaque est balancée automatiquement pour assurer la mixture des échantillons. La densité optique est mesurée à 450 nm avec un lecteur ELISA. L'absorbance est inversement proportionnelle à la concentration totale de l'homocystéine dans le plasma. La concentration de l'homocystéine est déterminée dans l'échantillon à l'aide d'un courbe étalon réalisée par le calibrateur (S-adenosyl-L-homocysteine : 2.0 à 50.0 µmol/l). (Figure 31).



IV.5. Déterminations des concentrations en protéines totales

Les concentrations en protéines totales du cœur et aorte sont déterminées par la méthode de Bradford [309], en utilisant la BSA (bovine serum albumine) (Sigma Aldrich, France) comme standard. Le bleu de Coomassie (réactif de Bradford) réagit avec les protéines pour former un complexe de couleur bleu qui absorbe à 595 nm et dont l'intensité correspond à la concentration protéique. La gamme étalon est réalisée en utilisant la BSA (1mg/ml) à des concentrations connues et croissantes (0, 0,02, 0,03, 0,05, 0,07, 0,1 µg/µl) en double dosage. Les échantillons (préparés en double) sont dilués dans des tubes à hémolyse au 1/400^e pour l'aorte et 1/600^e pour le cœur dans un volume de 100 µl d'H₂O bidistillée, puis sont additionnés, de même pour les échantillons de BSA, à 1 ml de réactif de Bradford (35 mg de Brillant Blue G250 (Sigma Aldrich, France), 50 ml d'éthanol à 95%, 60 ml d'acide phosphorique, 890 ml d'H₂O bidistillée, sur agitateur à 4°C pendant 24 h), juste avant la lecture au spectrophotomètre à 595 nm. Les concentrations des échantillons sont calculées en utilisant l'équation de la partie linéaire de la courbe de BSA.

IV.6. Analyse des paramètres du stress oxydatif

IV.6.1. Analyse de la peroxydation lipidique par le dosage du malondialdéhyde

Les teneurs en malondialdéhyde (MDA) du plasma, cœur et aorte sont mesurées en utilisant l'acide thiobarbiturique (TBA) qui réagit avec le malondialdéhyde pour former un complexe rose qui absorbe à 532 nm [310]. Le dosage est réalisé sur 100 µl d'homogénat additionnés à 0,6 ml d'acide phosphorique (1M) et 0,2 ml d'acide thiobarbiturique (0,6%). L'ensemble dans des tubes fermés est incubé dans un bain d'eau bouillante à 95°C pendant 45 min, puis placé dans un bain glacé pendant 10 min. Après, 0,8 ml de n-butanol sont additionnés à ce mélange et l'ensemble est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 10 min. Les teneurs en MDA sont quantifiées par lecture de la différence d'absorbance de l'échantillon de couleur rose à 520 et 535 nm contre le blanc réactif et en se référant à une courbe standard de MDA préparée par hydrolyse du 1.1.3.3. tétrahydroxypropane. Les résultats sont exprimés en nmol/mg protéines (cœur et aorte) et en nmol/ml (plasma).

IV.6.2. Analyse de l'oxydation protéique par le dosage des protéines carbonylées

Les teneurs en protéines carbonylées (PC) au niveau du plasma, cœur et aorte sont déterminées par technique colorimétrique en utilisant le Kit : Oxi Select™ Protein Carbonyl Spectrophotometric Assay, Cell Biolabs, Inc, USA. Le principe du dosage repose sur la mesure de dérivés hydrazones de protéines, en utilisant le 2,4 dinitrophénylhydrazine (DNPH), réactif classique utilisé avec les protéines. En suivant les instructions du Kit, 125 µl de plasma ou d'homogénat (1-10 mg/ml) sont incubés avec 0,5 ml de DNPH (2 mg/ml) pendant 45 min à l'obscurité et en agitant occasionnellement. Pour chaque homogénat, le blanc échantillon (sans DNPH), est préparé par l'addition de diluent DNPH. Ensuite, 0,625 ml d'acide trichloroacétique (TCA) sont additionnés et après 10 min d'incubation sur glace, l'ensemble est centrifugé à 10000 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé 5 fois avec 0,5 ml d'éthanol-acétate d'éthyle (1:1, v/v). Après le dernier lavage le culot est remis en suspension dans 125 µl de solution de solubilisation protéique et incubé pendant 10 min à 37°C, puis centrifugé pendant 10 min à 10000 x g pour éliminer les débris insolubles. Les Concentrations en protéines sont estimées pour chaque échantillon [309]. Ensuite, le surnageant est transféré dans une minicuve de 1cm et l'absorbance est lue contre le blanc pour chaque échantillon au spectrophotomètre à 375nm. En utilisant le coefficient d'absorption molaire de DNPH à 375 nm, (ϵ) équivalent à $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, les protéines carbonylées sont mesurées et sont exprimées en nmol/mg protéines (cœur et aorte) et en nmol /ml (plasma), par l'équation : $[\text{Protein Carbonyl (M)} = A_{375 \text{ nm}} / 22000 \text{ M}^{-1}] = [\text{Protein Carbonyl (nmol/ml)} = A_{375 \text{ nm}} \times 45.45 \text{ (nmol/ml)}] = [\text{Protein Carbonyl (nmol/mg)} = \text{Protein Carbonyl (nmol/ml)} / \text{Protein Concentration (mg/ml)}]$.

IV.6.3. Analyse de l'activité antioxydante non enzymatique par le dosage du GSH

Les teneurs en glutathion (GSH) du plasma, cœur et aorte sont déterminées en se basant sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion [311]. Ainsi 80 µl d'homogénat (ou plasma) sont déprotéinisés sur glace avec 20 µl de la solution d'acide salicylique (0,25%) pendant 15 min pour conserver les groupements (-SH) du GSH, puis centrifugé à 1000 rpm pendant 5 min. Puis 50 µl de l'échantillon déprotéinisé sont mélangés au 100 µl du tampon Tris, pH 8,5 puis incubé pendant 5min avec 2,5 µl de DTNB (0,01 M). La densité optique est déterminée par

lecture d'absorbance à 412 nm contre le blanc réactif. La concentration en glutathion GSH est exprimée en nmol / mg protéine selon la formule suivante : $[GSH \text{ (nmol / ml)} = (DO \times 100 \times 152,5 / 13100 \times 80 \times 50) \text{ nmol / ml}]$. (où: DO: densité optique, 100: volume total d'homogénat déprotéinisé, 152,5: volume total d'échantillon à tester, 13100 : Coefficient d'absorbance du (-SH) à 412 nm, 80 : volume d'homogénat, 50 : volume d'échantillon déprotéinisé. Au niveau des tissus (cœur et aorte), le GSH est exprimé en (nmol / mg protéines).

IV.6.4. Analyse des activités antioxydantes des enzymes tissulaires SOD, CAT et GPx

Les activités des enzymes antioxydantes tissulaires sont déterminées au niveau du cœur et de l'aorte.

L'activité de la superoxyde dismutase est mesurée selon la capacité de l'inhibition de l'autooxydation du pyrogallol par la SOD [312]. Le dosage est réalisé dans un volume final de 3 ml par l'addition de 2.85 ml de tampon Tris HCL (0.1M, pH: 7.8) à 100 µl de la fraction cytosolique de l'échantillon, 25 µl de la catalase (30 µ mol / l préparés dans un tampon phosphate 0.1M, pH 9) et 25 µl de pyrogallol (24 mM préparés dans 1 mM de HCl). Le changement de l'absorbance est mesuré à 420 nm après chaque minute dans un intervalle de temps de trois minutes. L'activité de l'enzyme est exprimée en Unité/mg de protéine tissulaire. Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de 50 % de l'autoxydation de pyrogallol. L'activité de l'enzyme est calculée selon l'équation suivante : Inhibition totale = $[(\text{Densité optique du blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}) \times 100 / \text{Densité optique du blanc}]$. Ainsi : $[SOD \text{ (U / mg Pro)} = \text{L'inhibition totale} / n \times 50]$. (n: mg de protéines en mg présentent dans le volume de l'échantillon utilisé).

L'activité de la catalase (CAT) est déterminée selon le principe se reposant sur la disparition de l'H₂O₂ (sa dismutation en eau et en oxygène) à 25°C par la présence de la source enzymatique dans l'échantillon [313]. Le dosage est réalisé dans un volume final de 3 ml. De ce fait 2.95 ml d'une solution d'H₂O₂ (19mM) (préparée dans un tampon phosphate 0.1M, pH: 7.4) sont additionnés à 50 µl de la fraction cytosolique de l'échantillon. La réaction est contrôlée par lecture continue du changement d'absorbance à 240 nm après chaque minute dans un intervalle de temps de deux minutes. L'activité de l'enzyme est exprimée en Unité / mg de protéine tissulaire selon

l'équation suivante : $[CAT (U/mg) = K / n]$. Par le Calcul : $[K = (2,303 / T) \times \log (A1 / A2)]$. (K : Constant de vitesse de la réaction, T : Intervalle de temps, A1 : Absorbance dans le temps zéro, A2 : Absorbance après une minute), (n: mg de protéines dans le volume de l'échantillon utilisé). (UI/mg de Pro : μ mole d' H_2O_2 consommé/min/mg de protéine).

L'activité de la glutathion peroxydase (GP_x) est mesurée par la méthode de dosage basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de GSH en glutathion oxydé GSSG via la GP_x [314]. Ainsi 50 μ l d'homogénat tissulaire sont ajoutés à 100 μ l de GSH (0,1 mM), 50 μ l de tampon TBS pH 7,4 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) et incubés pendant 5 min à 25 °C. Puis 50 μ l de H_2O_2 (1.3 mM) sont ajoutés pour initier la réaction pendant 10 min. La réaction est arrêtée par l'ajout de 250 μ l de TCA (1%). Après 30 min d'incubation sur glace, l'homogénat est centrifugé à 3000 rpm durant 10 min. Ensuite 120 μ l de l'échantillon récupéré sont additionnés à 550 μ l de tampon TBS et 80 μ l de DTNB (1,0 mM) et la densité optique est lue après 5 min à 412 nm. L'activité de la GP_x est calculée par: $[GP_x (\mu mol / mg \text{ protéines}) = (DO \text{ échantillon} \times DO \text{ étalon}) \times 0,01 / DO \text{ étalon} \times mg]$. (DO échantillon : densité optique de l'échantillon. DO étalon : densité optique de l'étalon. 0.01 concentration du (GSH).

IV.7. Détermination de la concentration en monoxyde d'azote (NO)

Les teneurs en monoxyde d'azote (NO) des échantillons cardiaques et aortiques sont déterminées selon la réaction de Griess basée sur la réduction du nitrate (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-) [315]. Le nitrite forme avec l'acide sulfanilique un sel de diazonium qui est ensuite couplé avec le N-naphtyléthylène diamine pour donner un dérivé azoté stable, et en présence de cadmium (agent réducteur) couplé au $CuSO_4$, les nitrates sont réduits en nitrites. Le chromophore produit par cette réaction, permet la mesure des nitrites par lecture de l'absorbance à 540 nm. Pour faire, 300 μ l d'homogénat déprotéinisé avec le sulfate de Zinc ($ZnSO_4$), sont incubés avec 100 μ l d'acide sulfanilique (25 mM) dissous dans HCl (1mM) et 100 μ l de la N- naphtyléthylène diamine (1,5 mM) à 37°C pendant 10 min. Ensuite l'échantillon est mis en agitation rotative pendant 5 min en contact avec 1g de granules de cadmium formés avec une solution de $CuSO_4$ tamponnée dans le glycine- NAOH (pH 9,7). Les concentrations en NO sont calculées en utilisant le coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 38 \cdot 10^3 M^{-1}cm^{-1}$). Les résultats sont exprimés en nmol / mg protéines.

IV.8. Analyse de l'apoptose par le dosage de la caspase 3

L'activité de la caspase 3 est effectuée par méthode colorimétrique en utilisant le Kit (Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit, BioVisio, USA). Le dosage est basé sur la détection d'un chromophore pNA (*p*-nitroaniline) après clivage des séquences du peptide substrat de la caspase DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) marqué au pNa (DEVD-pNA) qui est reconnu par la caspase 3. Le pNA est quantifié par absorbance au spectrophotomètre à 405 nm. La comparaison de l'absorbance entre échantillon induit et non induit qui sert de contrôle permet la détermination de l'augmentation en activité de la caspase 3. Ainsi 50 µg d'homogénat sont dilués dans 50 µl de tampon de lyse, puis 50 µl de tampon de réaction contenant 10 mM DDT sont supplémentés et ensuite 5 µl de substrat DEVD-pNA (4 mM) sont additionnés à une concentration finale de 200 µM. Le blanc servant à calibrer l'appareil entre chaque lecture est composé de 100 µl de tampon réaction et 5 µl de substrat. Après incubation pendant 2 heures à 37°C, les échantillons sont dilués à 1ml au tampon de dilution au spectrophotomètre à 405 nm.

IV.9. Réalisation des coupes histologiques

Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomie pathologique à l'hôpital de Guelma en suivant la technique [316]. Un fragment du cœur et un fragment de l'aorte (crosse, thoracique, abdominale et iliaque) (surface : 1 à 2 cm², épaisseur : 1 mm de chaque rat témoin et traité ($n = 5$) par groupe ont été d'abord fixés dans le formol à 10% à fin d'immobiliser les structures cellulaires. Après une semaine (moins ou plus) de fixation, les fragments tissulaires (ou pièces) sont retirés du formol, rincés à l'eau distillée, puis placés dans des cassettes spéciales à inclusion. Les pièces sont ensuite déshydratées via un automate pendant 12 à 18 heures par le passage des tissus dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70 %, 95 % et 100 %), puis dans des bains d'xylène pour l'éclaircissement. Pour l'inclusion dans la paraffine, les pièces sont prolongées dans des bains de paraffine liquide sous chaleur, puis enrobées de manière automatique par un appareil à inclusion dans des blocs de paraffine qui, une fois solidifiés vont permettre les coupes des tissus. Les blocs de paraffine sont coupés au moyen d'un microtome en pièces minces de 3 à 5 µm d'épaisseur, ensuite ces coupes sont étalées sur des lames et fixées par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C, puis séchées pendant 1h à 100°C. Avant la coloration à hématoxyline-éosine (H-E), les coupes sont déparaffinées dans 2 bains successifs d'xylène pendant 20 min, ensuite sont passées 3 fois dans un bain d'alcool

absolu pendant 5 min pour 3 fois, puis rincées à l'eau distillée. Les coupes sont colorées par émergence dans un bain d'hématoxyline pendant 20 min, lavées à l'eau distillée et après sont plongées dans un bain d'éosine pendant 2 min, lavées à l'eau distillée et déshydratées dans l'alcool absolu et enfin passées dans un bain d'xylène pendant 10 min, lavées et séchées. L'échantillon coloré est placé entre lame et lamelle pour l'observation au microscope optique couplé à un appareil photo.

IV.10. Evaluation des activités catalytiques du protéasome

Les trois activités protéolytiques du protéasome 20S, chymotrypsin-like, trypsin-like, caspase-like, de même que l'activité peptidases sont mesurées par méthode fluorescente en utilisant respectivement, les peptides fluorogénique synthétiques : Suc-LLVY-AMC (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-methylcoumarin/ Calbiochem, USA), Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (Boc-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride /Sigma-Aldrich, France), Z-Leu-Leu-Glu-AMC (Z-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-methylcoumarin/ Sigma-Aldrich, France), Z-Leu-Leu-Leu-AMC (Z-Leu-Leu-Leu-7-amido-4-methylcoumarin/ Sigma Aldriche, France) [307]. Les valeurs d'activités sont obtenues par mesure de la différence de fluorescence en absence et en présence d'inhibiteur spécifique du protéasome le MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al/ Sigma Aldrich, France) grâce à un spectrofluoromètre micro-plaque (Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wilbad, Germany) à une longueur d'onde d'excitation de 355 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm [307]. Dans une plaque de 96, 25 µg de protéines cytosoliques (cœur ou aorte) des rats témoins (T) et traitées (n = 8, chacun), sont déposés dans l'ordre dans chaque puits, après le tampon d'activité (200 mM Tris HCl Ph 7,4, 0,5 mM EDTA, 0,035% SDS (Sigma Aldrich, France)) dans un volume final de 100 µl, le DMSO (Sigma Aldrich, France) dans certains puits, l'inhibiteur MG132 (10 µM) dilué en DMSO dans certains puits, le substrat fluorogénique (70 µM) dilué en DMSO en dernier dans chaque puit (Tableau 9). Ensuite, la plaque est recouverte de papier aluminium, puis incubée pendant 60 min à 37°C. Après lecture au spectrofluoromètre (355 excitation /460 émission), l'activité du protéasome en présence et en absence d'inhibiteur est exprimée en (RFU)/60 min/mg protein. RFU (Relative fluorescent units) ou unités fluorescentes relatives. Les rats (tHcy-F) et (tHcy-vitC) sont testés pour l'activité chymotrypsin-like (activité de référence).

Tableau 9. Mesure de l'activité protéolytique du protéasome sur microplaque [307].

PSIII = Suc-LLVY: Substrat pour activité chymotrypsin-like					Volume (µl)				
Echantillons	[] pro(µg/ µl)	Vol pour 25µg	Conditions	Position sur la plaque	Tampon activité	Protéines	DMSO	PSIII	MG 132
Rien				1A	0,0	0,0	0	0	0
Tris HCl				1B	100,0	0,0	0	0	0
DMSO				1C	90,0	0,0	10	0	0
				1D	90,0	0,0	10	0	0
PSIII				1E	95,0	0,0	0	5	0
				1F	95,0	0,0	0	5	0
MG 132				1G	95,0	0,0	0	0	5
				1H					
1	39,62	0,63	PSIII	2A	89,4	0,6	5	5	0
			MG 132	2B	89,4	0,6	0	5	5
2	30,92	0,81	PSIII	2C	89,2	0,8	5	5	0
			MG132	2D	89,2	0,8	0	5	5

IV.11. Evaluation de l'expression des sous unités du protéasome et des protéines ubiquitylées par SDS-PAGE et Western blot (WB)

Le Western blot (WB) est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection d'une protéine spécifique dans un échantillon biologique à l'aide d'un anticorps spécifique de cette protéine. Les protéines préalablement dénaturées sont d'abord séparées selon leur taille fréquemment par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ou électrophorèse sur gel de polyacrylamide et ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (ou autre), où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt, qui est ensuite détectée et quantifiée. L'évaluation des sous unités du protéasome 20S : 20S β 1, 20S β 2, 20S β 5, 20S α 1, 20S Core et des protéines liées à la chaîne d'ubiquitine sont réalisées en utilisant (WB Kit, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) [308].

IV.11.1. Séparation des protéines par SDS-PAGE

Les protéines (25µg) de chaque échantillon (cœur et aorte) de 7 rats témoins et 7 traités (tHcy) sont déposées dans des tubes eppendorfs dans un volume de 10 µl H₂O, puis additionnées à 3,75 µl NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (bleu) (1X final) et 1,5 µl DTT (500 mM). Le mélange est chauffé pendant 5 min à 100°C dans l'eau à ébullition, ensuite, les tubes sont directement placés dans la glace, puis, les tubes refroidis sont centrifugés (juste un coup). Pour la migration des protéines, le peigne est retiré de l'autocollant sur le gel (NuPAGE 4-12% Bis-Tris GEL), après rinçage à l'eau distillée, les gels sont installés sur le support (puits face à face) bien au fond de la cuve d'électrophorèse et serrage du dispositif. 200 ml du tampon d'électrophorèse de séparation dilué au 1/20^{ème} (NuPAGE MES running Buffer 20X) ou (NuPAGE MOPS running Buffer 20X) (cela dépend de l'anticorps) et 500 µl de l'antioxydant (NuPAGE antioxydant) sont versés entre les 2 gels jusqu'à recouvrir avec vérification qu'il n'y a pas de fuite, puis le tampon de migration est versé à l'extérieur en remplissant la cuve. 4 µl de marqueur de poids moléculaire (See Blue[®] Plus 2) sont déposés dans le premier puit et les échantillons à la suite. La migration est conduite à 200 V (200 volts) pendant 30 min si tampon MES ou 50 min si tampon MPOS. (MES: 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, MOPS: 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid). En tampon MES: (20S β1, 20S β2, 20S α 1, 20S Core, Ubiquitine), en tampon MOPS: (20S β5, β- actine) [308]. .

IV.11.2. Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines séparées sur gel se fait en milieu liquide avec l'appareil Biorad. Dans le tampon de transfert 1X (dilué à une fois et supplémenté de l'éthanol 10%), pour un gel, sont imbibés 4 papiers Whatman 3MM Chr, 2 éponges et une membrane de nitrocellulose (10 × 8 cm). Le tampon de transfert 1X est préparé à partir du tampon transfert 10X (500 mM Tris, 400 mM glycine, 3,8% SDS). Ensuite, sur une cassette de transfert sont déposés du côté noir en haut, une éponge / 2 papiers Whatman / le gel / la membrane / 2 papiers Whatman / une éponge. Ce sandwich est ensuite refermé et déposé dans le portoir (rouge et noir), le côté noir du sandwich sur le côté noir du portoir, puis dans la cuve de transfert remplie de tampon de transfert 1X. La cuve est fermée avec son couvercle, placée dans une bassine remplie de glace ou dans la chambre froide, puis le sandwich est branché sur le générateur à 100 V pendant 60 min. Après l'arrêt du transfert, le sandwich est démoulé, le gel et les papiers sont jetés dans la

poubelle « acrylamide » et la membrane récupérée et directement annotée avant qu'elle sèche [308].

IV.11.3. Blocage de la membrane

Après transfert, la membrane est incubée pendant 1h au minimum avec la solution de blocage, composée de tampon de lavage : TBST 0,1% (tween) (TBS 1X supplémenté à 0,1% tween 20) et 5% lait écrémé ou 5% BSA à température ambiante et agitation douce. Le tampon de lavage TBS 1X est préalablement préparé par dilution de TBS 10X (100 mM Tris (Trisma base 12,2g), 1500 mM NaCl (87,6 g), puis ajuster à pH 8 (+ 5 ml environ de HCl) [308].

IV.11.4. Incubation de l'anticorps primaire

Après saturation dans la solution de blocage, la membrane est incubée à une agitation douce avec l'anticorps primaire (la dilution dépend de l'anticorps utilisé) toute la nuit à 4°C (chambre froide) dans la solution de blocage (TBST 0,1% (tween), 5% lait écrémé ou BSA). Ensuite la membrane est lavée 3 fois pendant 10 min à une agitation rapide dans le tampon TBST 0,1%(tween) [308]. L'anticorps peut être récupéré et congelé pour le réutiliser. Pour nos échantillons ou blots (cœur et aorte), les anticorps primaires utilisés : anti 20S β 1, anti 20S β 2, anti 20S β 5, anti 20S α 1, anti 20S Core, et anti ubiquitine pour la détection des sous unités protéiques du protéasome 20S et protéines ubiquitylées, ainsi que l'anti β - actine utilisée pour la quantification des blots aortiques sont résumés sur le (Tableau 10). Les blots cardiaques sont quantifiés par rapport au gel coloré au bleu de Coomassie. Pour faire, après SDS PAGE (comme décrit précédemment), le gel est lavé 2 fois à l'eau distillée, puis émergé dans 250 ml d'une solution de fixation (10% acide acétique, 40% éthanol) et laissé sous agitation douce pendant 30 min. Le gel est ensuite lavé 2 fois à l'eau distillée et incubé pendant une nuit avec le colorant (solution de brillant bleu G-acide perchlorique), composée de (0,04% (w/v) Coomassie[®] Brilliant Blue G250 dans 3,5% (w/v) acide perchlorique.

Tableau 10. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection des protéines cibles en western-blot.			
Anticorps primaires	Dilution	Type	Référence
anti 20S β 1	1: 1000	Mouse IgG monoclonal	BML-PW8140, Enzo, France
anti 20S β 2	1: 1000	Mouse IgG monoclonal	BML-PW8145, Enzo, France
anti 20S β 5	1: 1000	Rabbit polyclonal	BML-PW8895, Enzo, France
anti 20S α 1	1: 1000	Rabbit IgG polyclonal	Calbiochem-539145, USA
anti 20S Core	1: 1000	Rabbit polyclonal	BML-PW8155, Enzo, France
anti ubiquitine	1: 1000	Rabbit polyclonal (FL-76)	Santa Cruz Biotechnology, 9133
anti β -actine	1: 1000	Mouse IgG monoclonal	A5441, Sigma Aldrich, France
Anticorps secondaires			
anti mouse IgG	1 : 5000	Goat anti –mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, 2500
anti rabbit IgG	1 : 5000	Goat anti –rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, 2030

IV.11.5. Incubation de l'anticorps secondaire

La membrane est incubée avec l'anticorps secondaire dans la solution de blocage (TBST 0,1% (tween), 5% lait écrémé ou BSA) pendant 1h à température ambiante. La dilution dépend de l'anticorps utilisé (Tableau 9). Ensuite la membrane est lavée 3 fois pendant 10 min dans le tampon TBST 0,1% (tween) à une agitation rapide dans le tampon TBST 0,1% (tween) [308]. L'anticorps secondaire est jeté. Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase HRP (horseradish peroxidase) utilisés sont: Goat anti –mouse IgG –HRP et Goat anti –rabbit IgG-HRP, les deux dilués au 1/5000^{ème} (Tableau 10).

IV.11.6. Révélation par chimioluminescence ou ECL

La détection par chimioluminescence (Enhanced chemiluminescent, ou ECL) est considérée comme l'une des méthodes de détection les plus sensibles pour l'analyse des western blots. Dans la chambre noire, la membrane est déposée sur une plaque de verre, puis sur cette dernière 2 ml des 2 réactifs (le noir et le blanc) ECL (volume à volume) sont versés pour 1min, le réactif ECL (GE Healthcare), ensuite est retiré au maximum avec du papier absorbant et la membrane est recouverte avec un film étirable en évitant les bulles. La plaque ayant la membrane est déposée à l'inverse sur une autre plaque ou un film (Kodak) encoché pour l'orientation est déposé, après 5 min en contact ou 1h dans une plaque fermée (le temps dépend de l'anticorps), un trait de marqueur sur le film est fait autour de la plaque de verre possédant la membrane, puis le film est retiré pour révélation

dans le révélateur photo dilué au 1/5^e (Révélateur LX 24, Kodak) pour environ 1 min, puis rincé à l'eau du robinet, plongé dans le fixateur photo dilué au 1/5^e (Fixateur AL4, Kodak) et rincé de nouveau dans l'eau et enfin séché et scanné pour l'analyse de l'image [308].

IV.11.7. Expression des résultats

Pour l'étude qualitative, La présence ou l'absence de la protéine recherchée est visualisée à l'aide du marqueur de taille. La quantification des bandes d'expression a été réalisée par analyse densitométrique des images en utilisant : Image scanner III et Image Quant TL software (GE Healthcare, Orsay, France) [308]. Les bandes des échantillons de l'aorte ont été normalisées par rapport à la β -actine et celles du cœur par rapport au gel coloré au bleu de Coomassie (le rouge Ponceau peut être aussi utilisé), vu qu'au niveau du cœur aucune β ou α -actine n'ont pu être révélées, de même pour les tubulines.

IV.11.8. Déshybridation ou (décapage) de la membrane

La membrane est parfois décapée selon la nécessité pour révéler une autre protéine, dans ce cas la solution de déshybridation (0,5 M Tris pH 6,8, 10% SDS) stockée à 4°C est utilisée pendant 30 min à 50°C au bain- marie, sous la sorbonne, dans une boîte fermée hermétiquement et sans oublier d'ajouter au moment d'utilisation le 2-mercaptoéthanol (Sigma) (700 μ l pour 100 ml) à la solution de déshybridation. Après 30 min, la membrane est rincée à l'eau distillée.

IV.12. Analyse du rapport 26S/ 20S protéasomal cardiaque par native électrophorèse

Le rapport ou (distribution relative) du protéasome 26S/20S est évalué dans des conditions non dénaturantes par électrophorèse sur gel natif de séparation (le gel de concentration n'est pas nécessaire) 1,5 mm d'épaisseur et 4% polyacrylamide et en utilisant le peptide fluorogénique Suc-LLVY-AMC de l'activité chymotrypsin-like [317]. Le mini gel natif est préparé dans un tube de 15 ml par l'ajout de 3 ml de tampon de gel natif 5 X (5 fois concentré, composé de 54 g Tris, 27,5 g acide borique, 1ml EDTA à 1mM, 25 ml MgCl₂ à 1M), 1,5 ml de bisacrylamide à 40%, ATP et DTT à une concentration finale de 0,5 mM chacun, 120 μ l APS (Amonium persulfate) à 10%, 12 μ l TEMED (N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamine), puis ajusté à 15 ml par H₂O pure, le tout est mélangé en renversant le tube 15ml, 3 fois. Le gel natif est ensuite coulé entre 2 plaques bien fermées, en utilisant les joints d'étanchéité ou espaceurs (spacers) et en

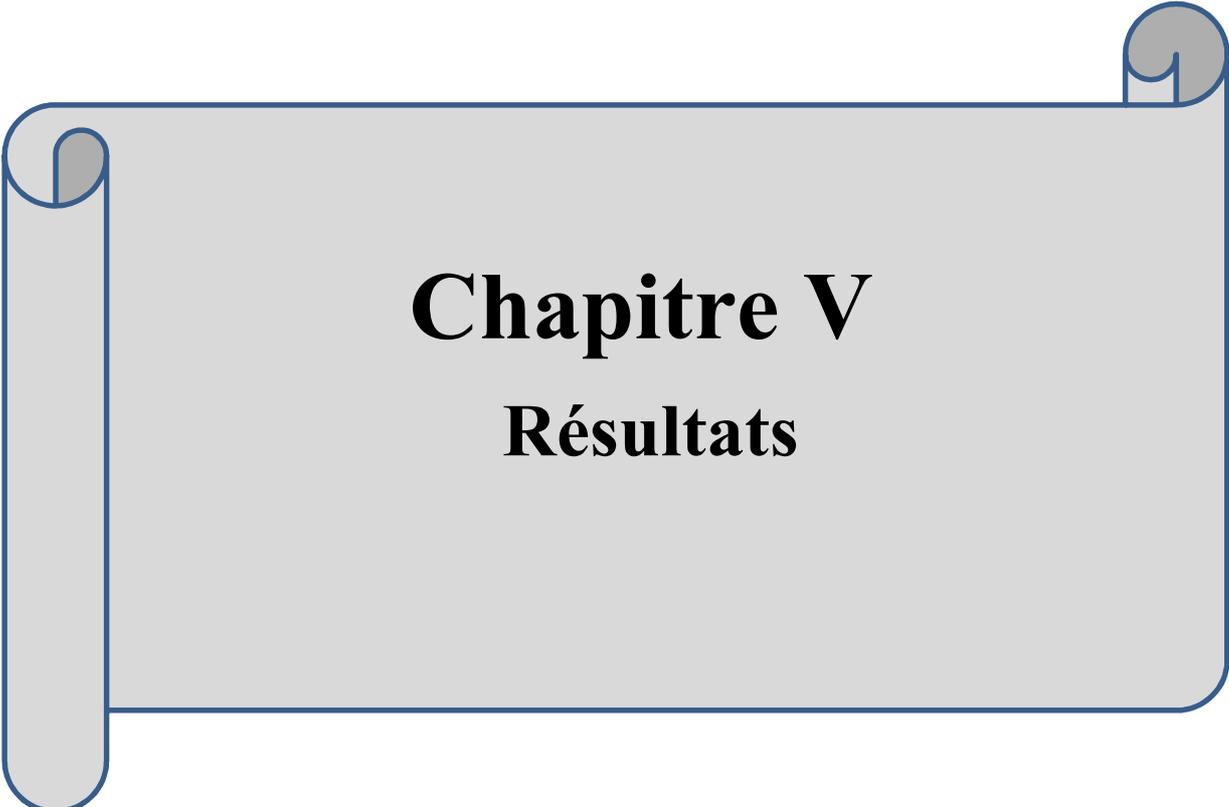
mettant le peigne rapidement. Après polymérisation, le peigne est enlevé et le gel est placé dans la chambre froide dans le tampon de gel natif 1 X (concentré une fois), puis 20 µg du protéasome 26 S purifié (BML-PN9310-0050, Enzo-Life Science, INC, USA) qui sert de référence et des protéines cytosoliques du cœur et aorte des rats témoins (T) et traités (tHcy) (pool de 8 rats chacun) sont colorés par 2 µl de tampon de gel natif bleu foncé (500 µl tampon de gel natif, 500 µl glycérol, traces de colorant xylène cyanol), ajustés par le tampon de lyse (50 mM Tris pH 7,8, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 10% glycérol dans 50 ml H₂O) à un volume total de 20 µl et ensuite sont introduits dans les puits de gel. Le gel natif est incubé à 40 V pendant une nuit (15h) (ou à 100V pendant 4h) à 4° C. Le démontage du gel de deux plaques après électrophorèse doit se faire avec attention, en l'enroulant, vu qu'il se casse facilement. Le gel natif est ensuite incubé dans 10 ml de tampon d'activité (20 mM Tris pH 7,5, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 10 µM Suc-LLVY-AMC, ajuster à 10 ml d' H₂O pure) à 37° C pendant 20 min (étuve ou bain marie) en le basculant de temps à autre. La révélation des bandes fluorescentes (de couleur bleu) sur gel dont l'intensité correspond à l'activité qualitative chymotrypsin-like, se fait à (440 nm) en utilisant une lampe à UV (ultraviolet), puis l'image du gel est prise par un camera adapté.

IV.13. Evaluation de l'expression des protéines modifiées par HNE

Les protéines modifiées par adduit du dérivé d'oxydation lipidique, le 4-hydroxy-2-nonéal (HNE) au niveau du cœur sont analysées par SDS PAGE et western blot (WB) à partir d'un pool de 7 fractions cytosoliques des rats témoins (T) et traités par l'homocystéine (tHcy), comme décrit précédemment [308]. L'anticorps primaire utilisé est l'anti-4-hydroxy-2-nonéal Michael Adducts, reduced Rabbit IgG polyclonal (Cat.No.393207, Calbiochem, USA). L'anti HNE est dilué au 1 :1000 et ensuite couplé à l'anticorps secondaire Goat anti -rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, 2030, France) dilué au 1 :5000. Les bandes des protéines cytosoliques liées au HNE sont identifiées en fonction de marqueur de poids moléculaire (Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas) et quantifiées par rapport au gel coloré au bleu de Coomassie en utilisant : Image scanner III et Image Quant TL software (GE Healthcare, Orsay, France).

IV.14. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés sous forme de Moyenne \pm SE. L'analyse statistique des données est conduite en utilisant Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad software Inc, San Diego, CA). Pour la comparaison des moyennes entre deux groupes, le test t de Student ou test de Mann-Whitney sont utilisés. Le test two-way ANOVA pour les mesures répétées est effectué par Bonferroni post tests. Les différences sont considérées comme très hautement significatives lorsque ($P < 0.001$), hautement significative ($P < 0.01$), significative ($P < 0.05$), (non significative) ($P > 0,05$).



Chapitre V
Résultats

V. Résultats

V.1. Modèle animal d'hyperhomocystéinémie

Les résultats révèlent que l'administration de la DL-homocystéine pendant 03 semaines entraîne une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) du taux d'homocystéine plasmatique chez les groupes des rats traités (traités par l'Hcy (tHcy), traités par l'Hcy et acide folique) (tHcy-F) et traités par l'Hcy et vitamine C (tHcy-vit C) par rapport aux rats témoins (T) (Tableau 11). Une diminution significative ($p < 0,05$) du groupe tHcy-F par rapport au groupe tHcy, en revanche la différence est non significative ($p > 0,05$) du groupe tHcy-vit C en comparaison au groupe Hcy.

Tableau 11 . Valeurs du Taux d'homocystéine (Hcy) total plasmatique (μM) chez les rats témoins et traités.

Groupe expérimentaux	T	tHcy	tHcy-F	tHcy-vit C
Homocystéine (μM)	$5,6 \pm 1,8$	$42,2 \pm 3,4$ ^{a***}	$32,18 \pm 2,02$ ^{a***, b*}	$41,75 \pm 3,2$ ^{a***, bns}

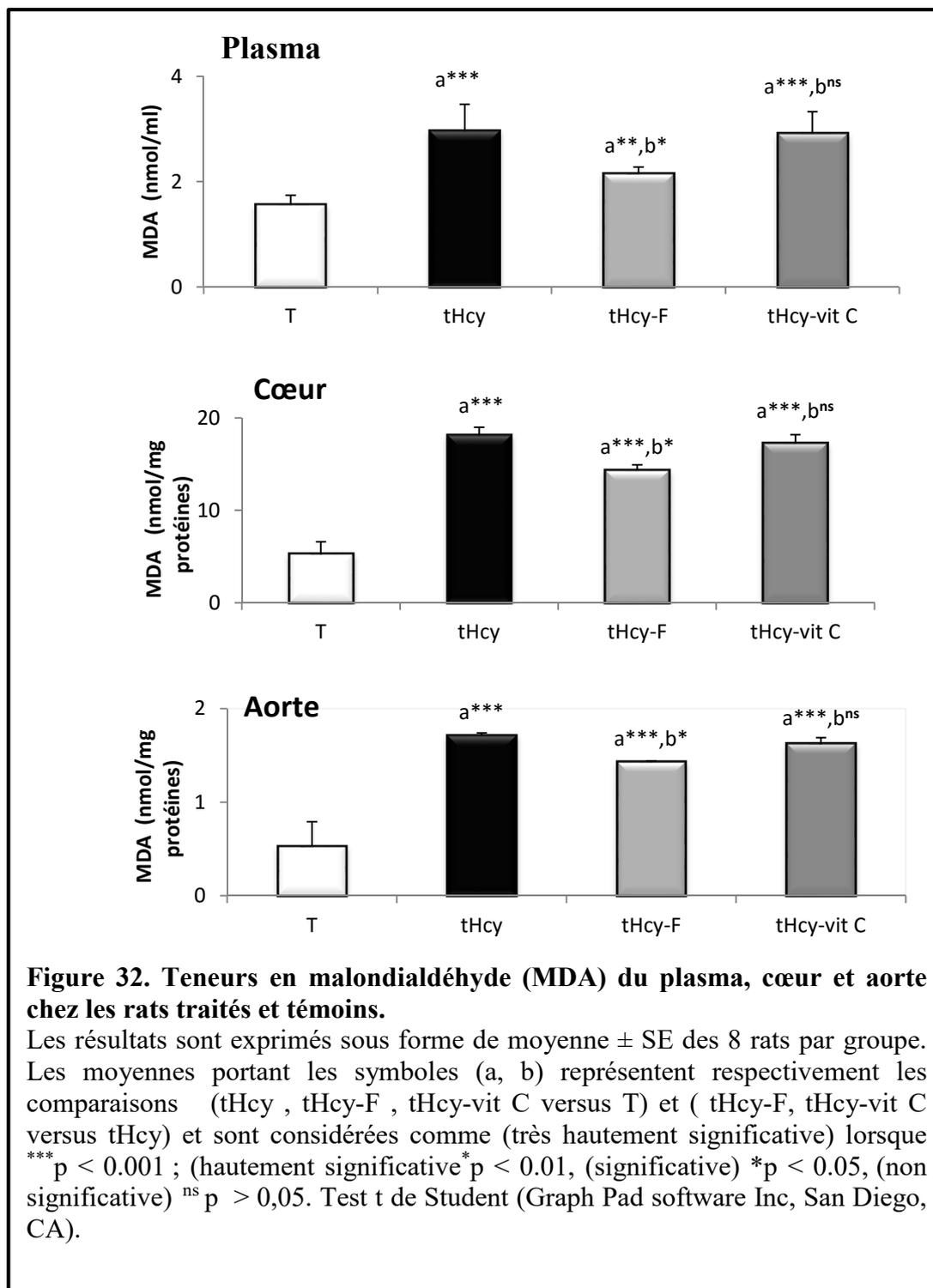
T : Témoins, tHcy: traités par l'Hcy, tHcy-F : par l'Hcy-acide folique, tHcy-vit C : par l'Hcy et vitamine C. Chaque valeur représente la moyenne \pm SE, n= 08 rats. a : comparaison (tHcy, tHcy-F, tHcy-vit C versus T), b : comparaison (tHcy-F, tHcy-vit C versus tHcy). *** $p < 0.001$ (très hautement significative) ; ** $p < 0.01$ (hautement significative). * $p < 0.05$ (significative), ^{ns} $p > 0,05$ (non significative). L'analyse statistique est effectuée par le test t de Student (Graph Pad Prism 5.0)

V.2. Paramètres du stress oxydatif

V.2.1. Teneurs en malondialdéhyde (MDA)

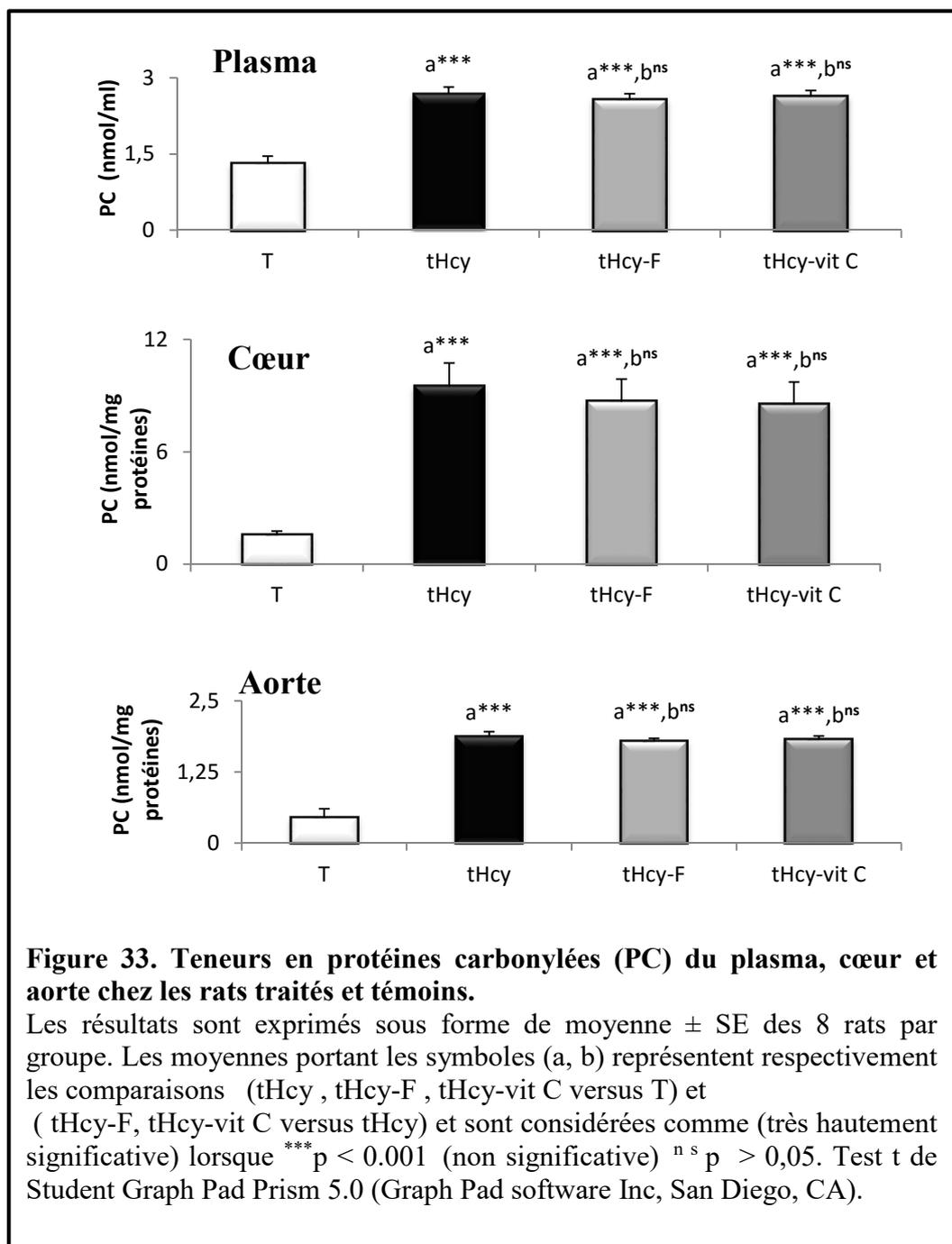
Les teneurs en MDA, marqueur de la peroxydation lipidique au niveau du plasma, cœur et aorte sont résumés dans la (figure 32). Nous constatons une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) de la teneur en MDA plasmatique des rats traités (tHcy et tHcy- vit C) et hautement significative ($p < 0.01$) du groupe (tHcy-F), comparativement aux rats témoins (T). La différence est non significative chez les rats tHcy-vit C par contre une diminution significative ($p < 0.05$) chez les rats tHcy-F par rapport aux tHcy. Les teneurs en MDA au niveau du cœur et aorte révèlent une augmentation très hautement significative ($p < 0.01$) chez tous les rats traités par rapport aux témoins, par contre une

diminution significative ($p < 0.05$) chez tHcy-F et une différence non significative ($p > 0,05$) chez tHcy-vit C comparés aux tHcy.



V.2.2. Teneurs en protéines carbonylées (PC)

La (figure 33) illustre, les teneurs en protéines carbonylées (PC), marqueur de l'oxydation protéique, au niveau du plasma, cœur et aorte. Une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) de la teneur en PC plasmatique, cardiaque et aortique de tous les rats traités (Hcy, tHcy-F et tHcy- vit C) comparativement aux rats témoins (T). Les différences sont non significatives ($p > 0,05$) chez tHcy-F et tHcy-vit C comparés aux tHcy.



V.2.3. Teneurs en glutathion (GSH)

Les résultats (Figure 34) indiquent que le GSH plasmatique, cardiaque et aortique est augmenté de manière hautement significative ($p < 0.01$) chez les rats (tHcy, tHcy-vit C), mais de manière significative ($p < 0.05$) chez tHcy-F au niveau du plasma comparativement aux rats témoins. La comparaison dans tous les cas est non significative ($p > 0,05$). Chez (tHcy-vit C) en comparaison avec (tHcy). En revanche une augmentation significative ($p < 0.05$) au niveau du plasma et cœur chez tHcy-F comparativement aux tHcy, mais non significative au niveau de l'aorte.

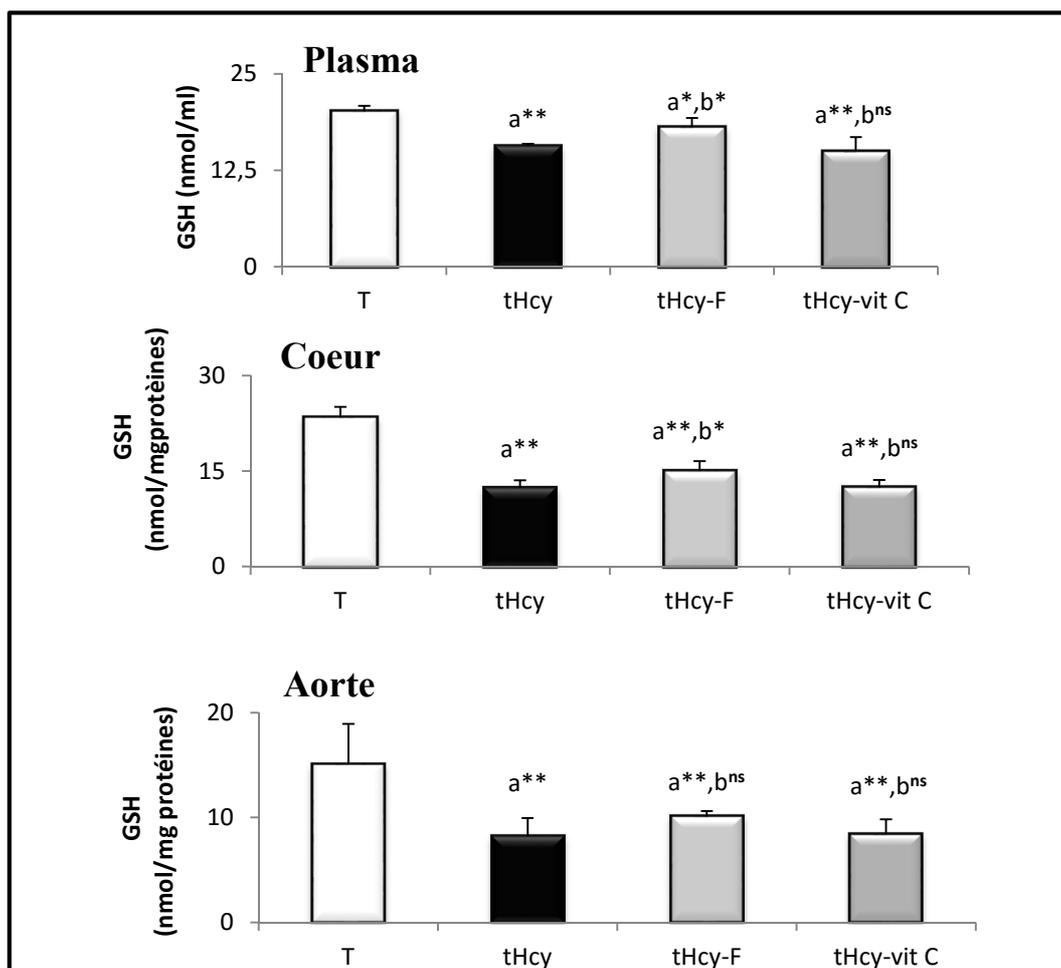


Figure 34. Teneurs en glutathion (GSH) du plasma, cœur et aorte chez les rats traités et témoins.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE des 8 rats par groupe. Les moyennes portant les symboles (a, b) représentent respectivement les comparaisons (tHcy, tHcy-F, tHcy-vit C versus T) et (tHcy-F, tHcy-vit C versus tHcy) et sont considérées comme (hautement significative) lorsque $p < 0.01$; (significative) $p < 0.05$; (non significative) $p > 0,05$. Test t de Student (Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad software Inc, San Diego, CA).

V.2.4. Activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx) du cœur et aorte

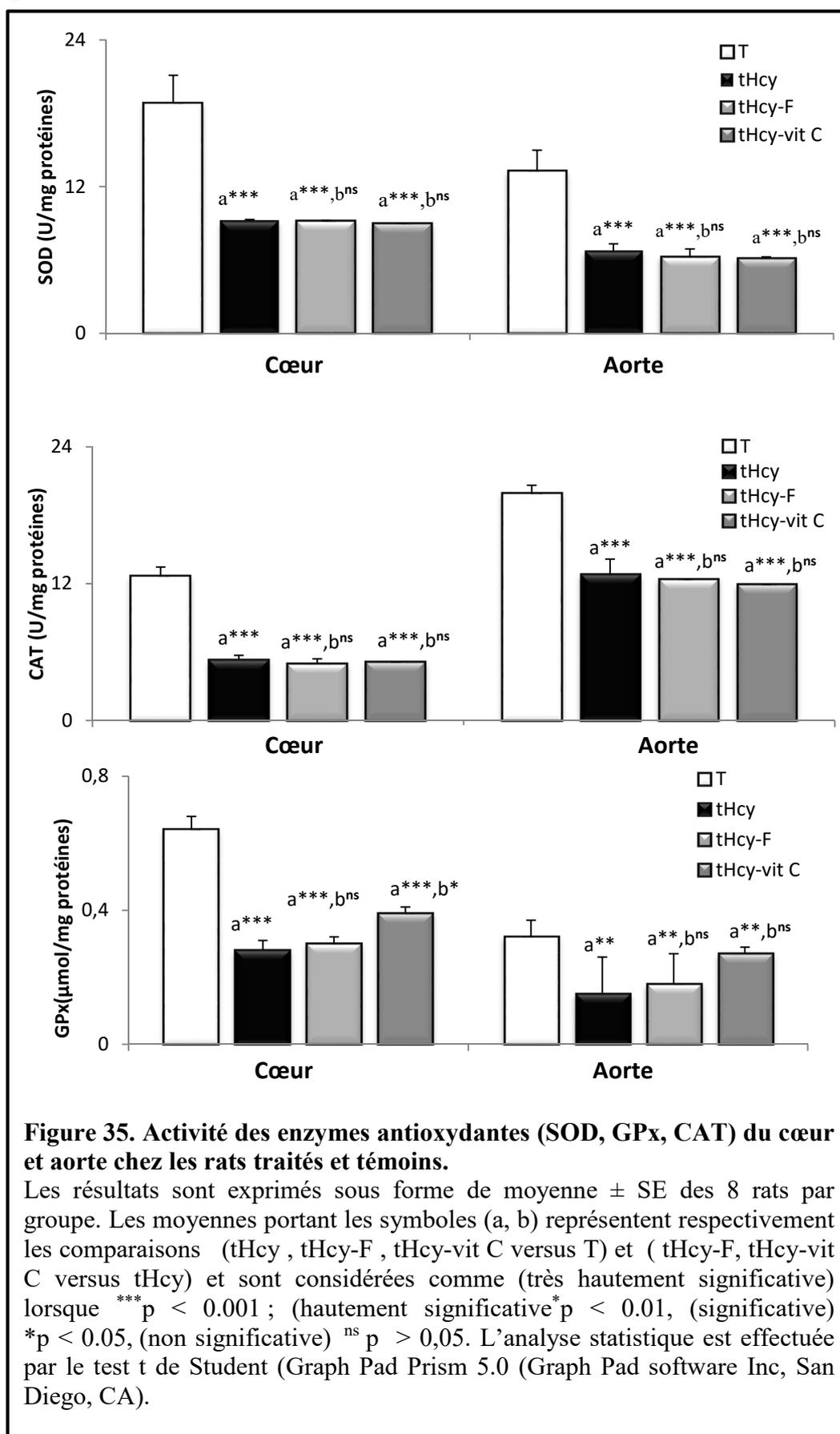
Les résultats de l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx cardiaques et aortiques sont illustrés dans la (figure 35).

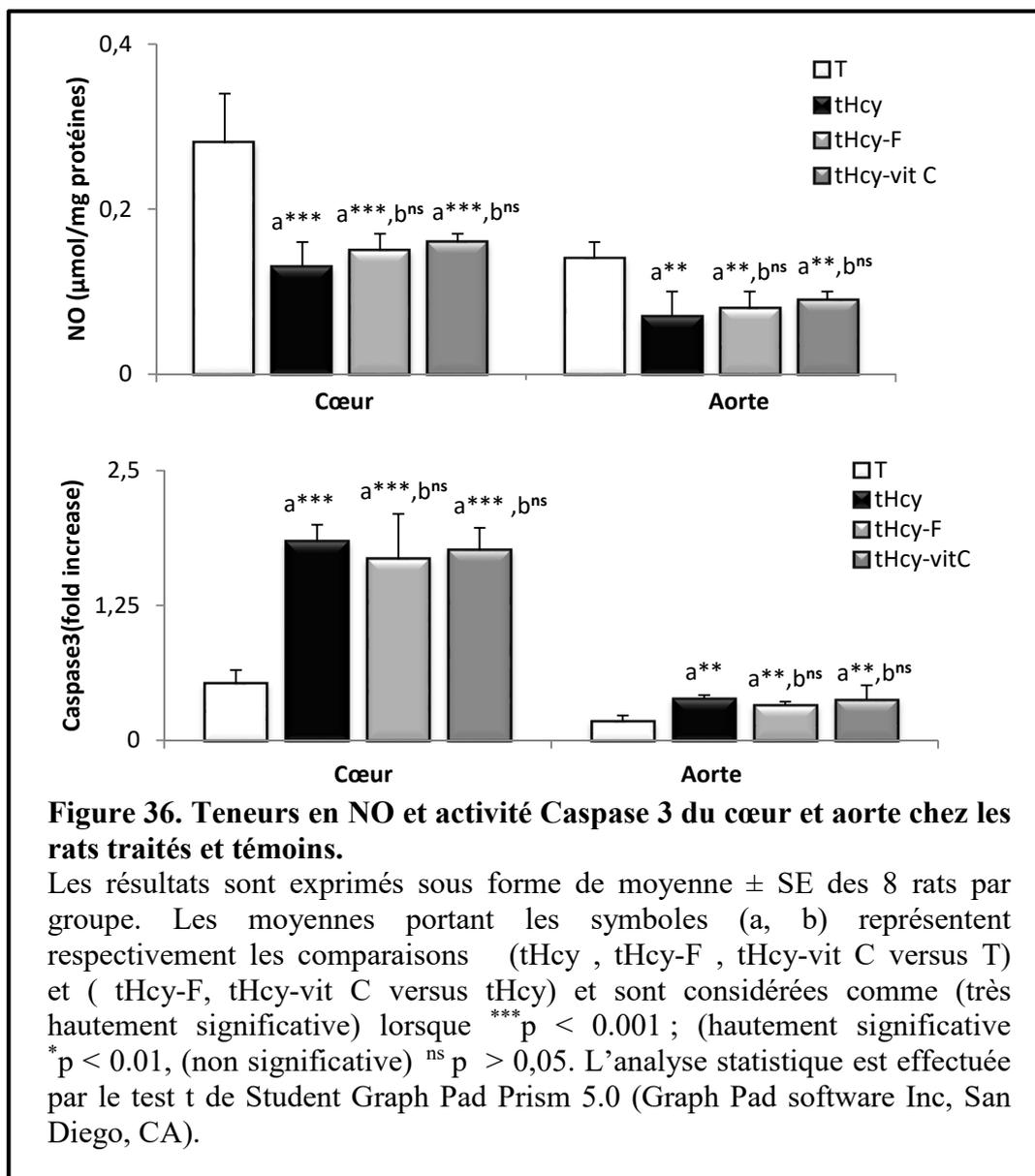
L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) au niveau de deux organes (cœur et aorte) sont diminuées de manière très hautement significative ($p < 0,001$) chez les rats traités par rapport aux témoins. Les diminutions ne sont pas significatives ($p > 0,05$) chez les rats (tHcy-F et tHcy-vit C) en comparaison avec les rats (tHcy). Au niveau du cœur la diminution de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) des rats traités en comparaison aux témoins est très hautement significative ($p < 0,001$) et hautement significative ($p < 0,01$) au niveau de l'aorte. Une augmentation significative ($p < 0,05$) chez les rats (tHcy-vit C versus tHcy) au niveau du cœur, mais la différence est non significative au niveau de l'aorte. En revanche les différences sont non significatives ($p > 0,05$) au niveau de deux organes des rats (tHcy-F versus tHcy).

V. 3. Teneurs en NO et activité Caspase 3

Après 3 semaines d'expérimentation, les résultats montrent que les teneurs en monoxyde d'azote (NO) au niveau du cœur (Figure 36) sont diminuées de façon très hautement significative ($p < 0,001$) et hautement significative ($p < 0,01$) au niveau de l'aorte chez les rats traités par rapport aux témoins. Les différences sont non significatives ($p > 0,05$) en comparaison des rats (tHcy-F et tHcy-vit C) avec (tHcy) au niveau de deux organes.

Des augmentations très hautement significatives ($p < 0,001$) et hautement significatives ($p < 0,01$) de l'activité Caspase 3 respectivement du cœur et de l'aorte sont observées chez les traités en comparaison avec les témoins, mais les différences sont non significatives ($p > 0,05$) chez les rats (tHcy-F et tHcy-vit C versus tHcy) au niveau de deux organes (Figure 36).

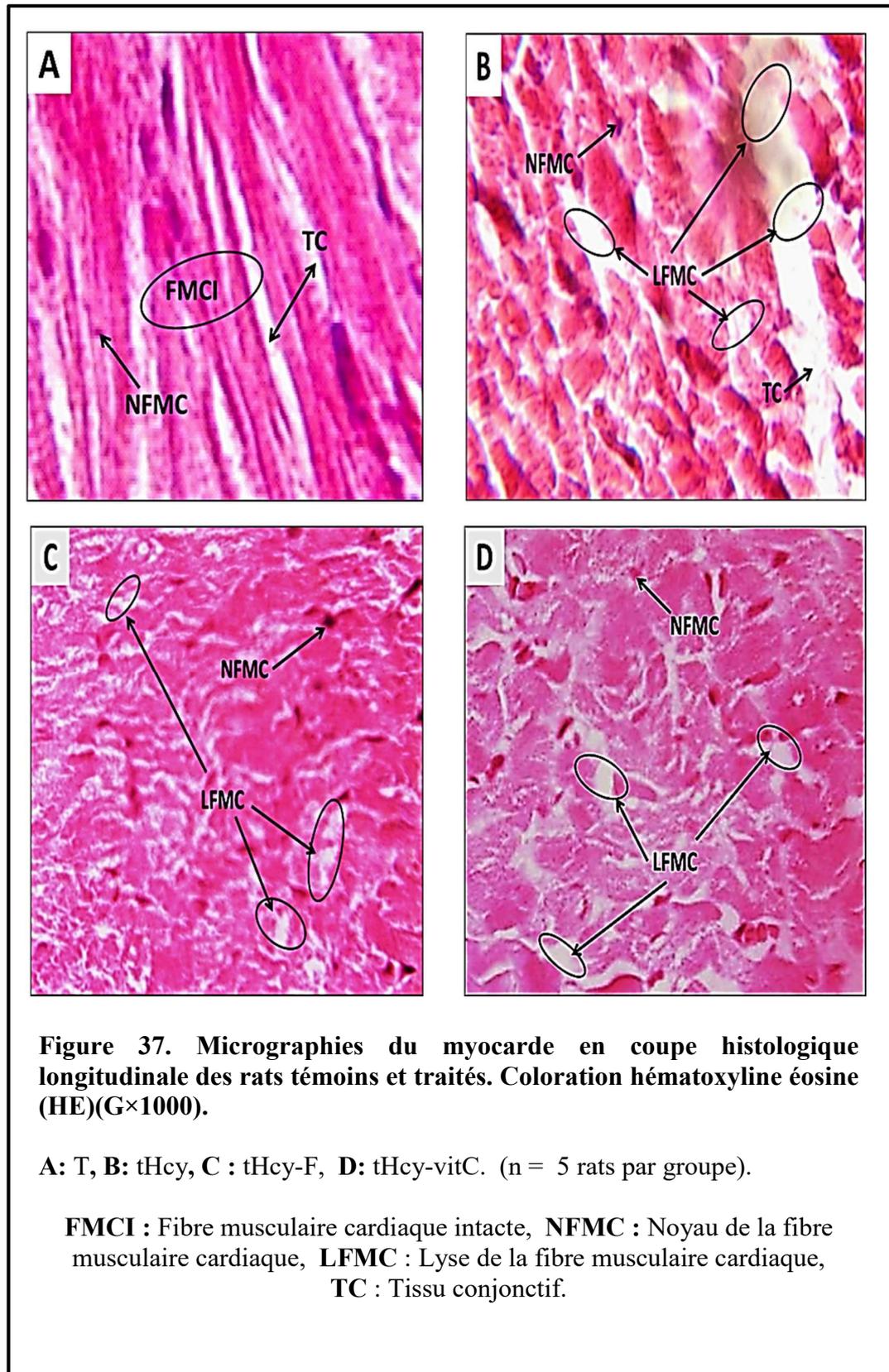




V. 4. Étude histologique

V.4.1. Histologie du cœur

L'étude histologique du myocarde pour les rats témoins (T) montre une morphologie normale avec des fibres musculaires intactes (Figure 37. A). Par contre l'observation microscopique pour les traités révèle une lyse dans la structure des fibres musculaires (Figure 37. B, C, D). Néanmoins la lyse est plus provoquée chez les traités par l'homocystéine (tHcy) conduisant à une désorganisation tissulaire plus avancée (Figure 37. B) par rapport aux traités par l'homocystéine et acide folique (tHcy-F) et l'homocystéine et vitamine C (tHcy-vitC) (Figure 37. C, D) respectivement.



V.4.2. Histologie de l'aorte

V.4.2.1. Histologie de l'arc aortique ou (crosse aortique)

La microscopie optique chez les rats témoins (T) (Figure 38. A) montre un intima bordée d'un endothélium intact. Les cellules musculaires lisses ont des noyaux fusiformes au niveau de la media épaisse avec des fibres élastiques concentrées. Le tissu conjonctif de l'adventice mince renferme des fibroblastes aux noyaux visibles. En revanche, chez les rats traités par l'homocystéine (tHcy), par l'homocystéine et acide folique (tHcy-F) et par l'homocystéine et vitamine C (tHcy-vitC) respectivement (Figure 38. B, C, D), on révèle une perte de l'intégrité de l'endothélium suite à une lyse et présence dans la média des cellules musculaires lisses aux noyaux arrondis et d'autres aux noyaux fusiformes.

V.4.2.2. Histologie de l'aorte thoracique

L'observation microscopique présente chez les témoins et les traités (Figure 39. A, B, C, D) la même organisation structurale rencontrée au niveau de l'arc aortique, mais avec la formation de quelques cellules spumeuses (SC) au sein de la media et répartition presque égale des cellules musculaires lisses aux noyaux arrondis et fusiformes dans l'intima et la média chez les traités (Figure 39. B, C, D).

V.4.2.3. Histologie de l'aorte abdominale

L'intima chez les rats (T) au niveau de l'aorte abdominale (Figure 40. A)) montre un endothélium intact et des noyaux fusiformes des cellules musculaires lisses dans la média. Par contre chez les (tHcy) (Figure. 40 B), on observe une discontinuité de l'endothélium, une desquamation des cellules épithéliales. Un changement de l'aspect fusiforme du noyau des cellules musculaires vers un aspect arrondi, une formation des cellules spumeuses dans l'intima et la média et une lyse musculaire bien marquée. La modification tissulaire est respectée chez les (tHcy-vitC) et (tHcy-F) (Figure 40. C, D), avec des cellules musculaires lisses aux noyaux arrondis et aux noyaux fusiformes et une lyse musculaire moins marquée.

V.4.2.4. Histologie de l'aorte iliaque

La morphologie est similaire à celle de l'aorte abdominale chez les témoins et les traités tHcy) (Figure 41. A, B, C, D), mais la lyse musculaire est beaucoup plus marquée surtout chez les (tHcy) et (tHcy-vitC) (Figure 41. B, D).

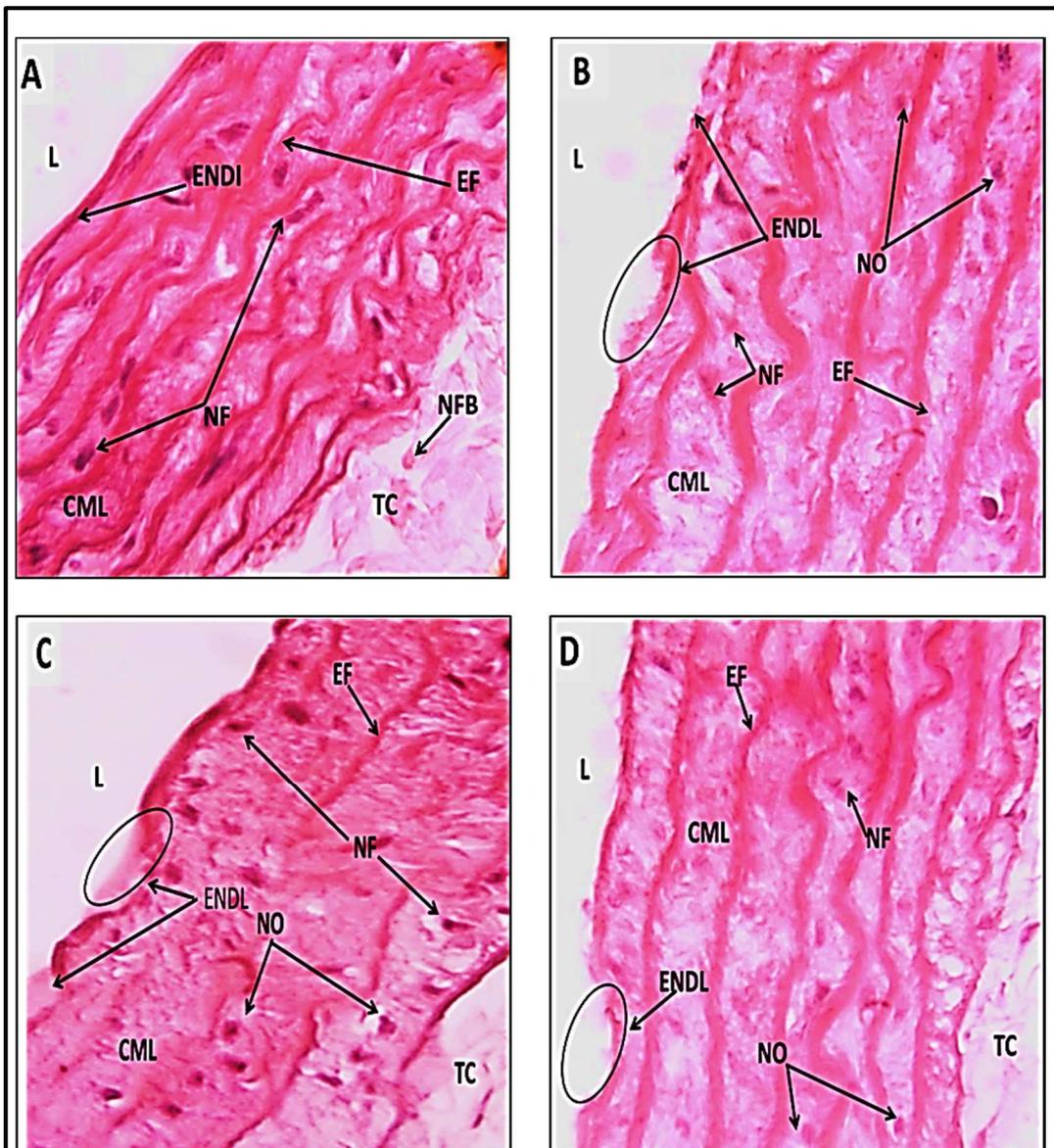


Figure 38. Micrographies de l'arc aortique en coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités. Coloration hématoxyline éosine (G×1000).

A: T, B: tHcy, C : tHcy-F, D: tHcy-vitC. (n= 5 rats par groupe).

ENDI : Endothélium intact, NF : Noyau fusiforme, NO : Noyau ovale, ENDL : Endolyse, CML : Cellule musculaire lisse, EF : Fibre élastique, TC : Tissu conjonctif. L : Lumière.

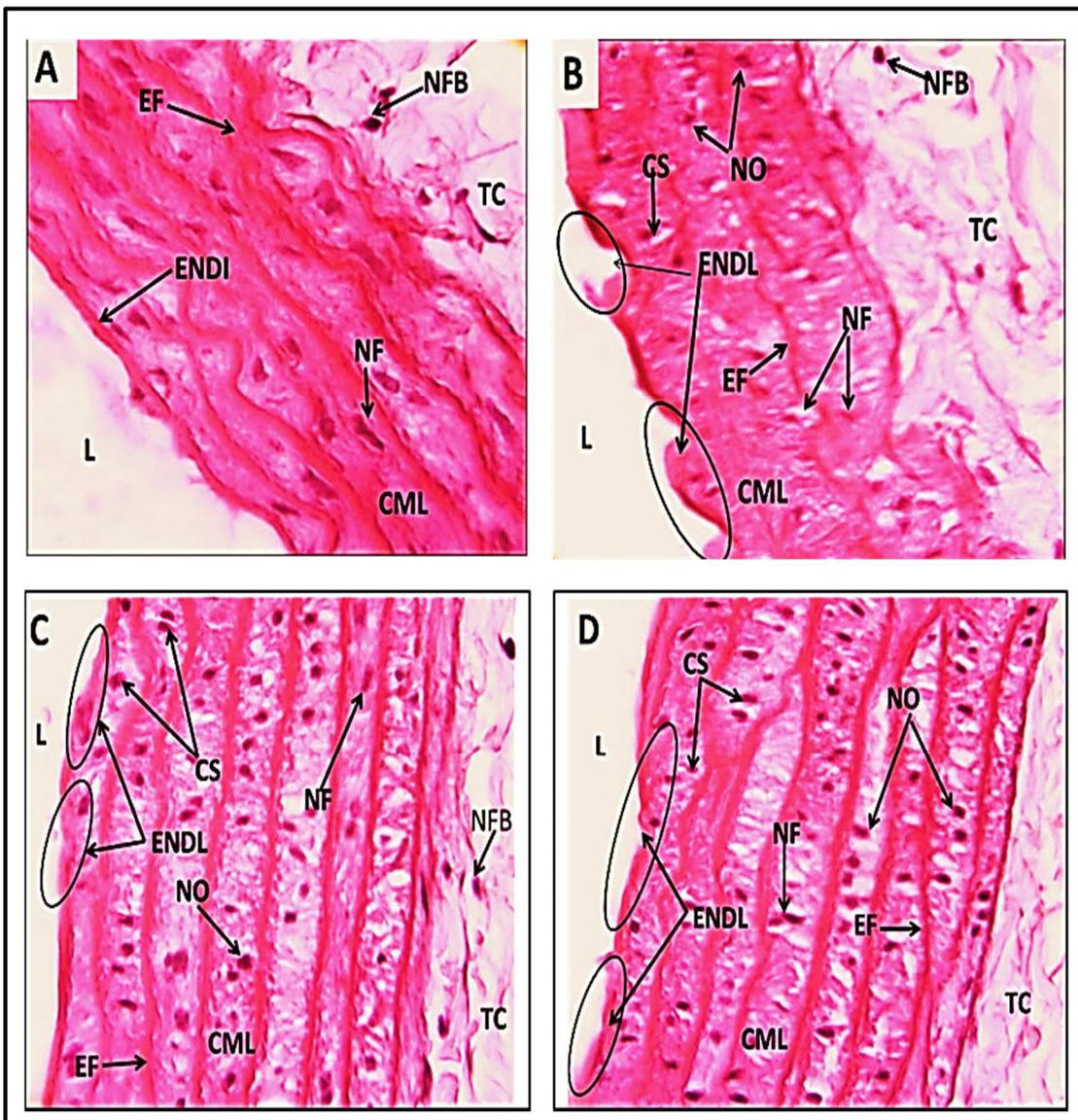


Figure 39. Micrographies de l'aorte thoracique en coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités. Coloration hématoxyline éosine (HE) (G×1000).

A: T, B: tHcy, C : tHcy-F, D: tHcy-vitC. (n= 5 rats par groupe).

**ENDI : Endothélium intact, NF : Noyau fusiforme, NO : Noyau ovale,
ENDL : Endolyse, CS : Cellule spumeuse, CML : Cellule musculaire lisse,
EF : Fibre élastique, NFB : Noyau du fibroblaste, TC : Tissu conjonctif.
L Lumière.**

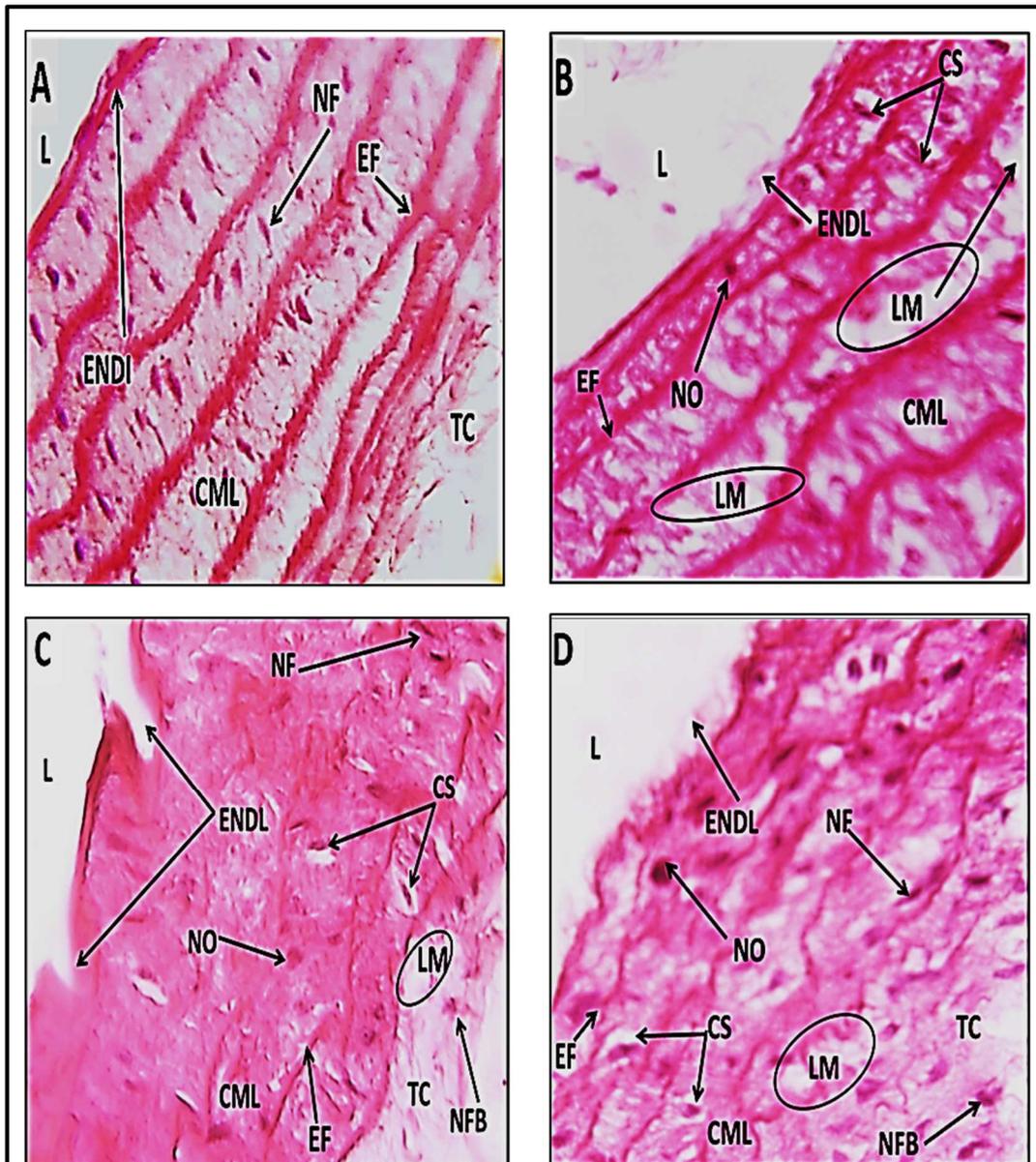


Figure 40. Micrographies de l'aorte abdominale en coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités. Coloration hématoxyline éosine (HE) (G×1000).

A: T, B: tHcy, C: tHcy-F, D: tHcy-vitC. (n= 5 rats par groupe).

**ENDI : Endothélium intact, NF : Noyau fusiforme, NO : Noyau ovale,
 ENDL : Endolyse, LM : Lyse musculaire, CS : Cellule spumeuse,
 CML : Cellule musculaire lisse, EF : Fibre élastique,
 NFB : Noyau du fibroblaste, TC : Tissu conjonctif. L : Lumière.**

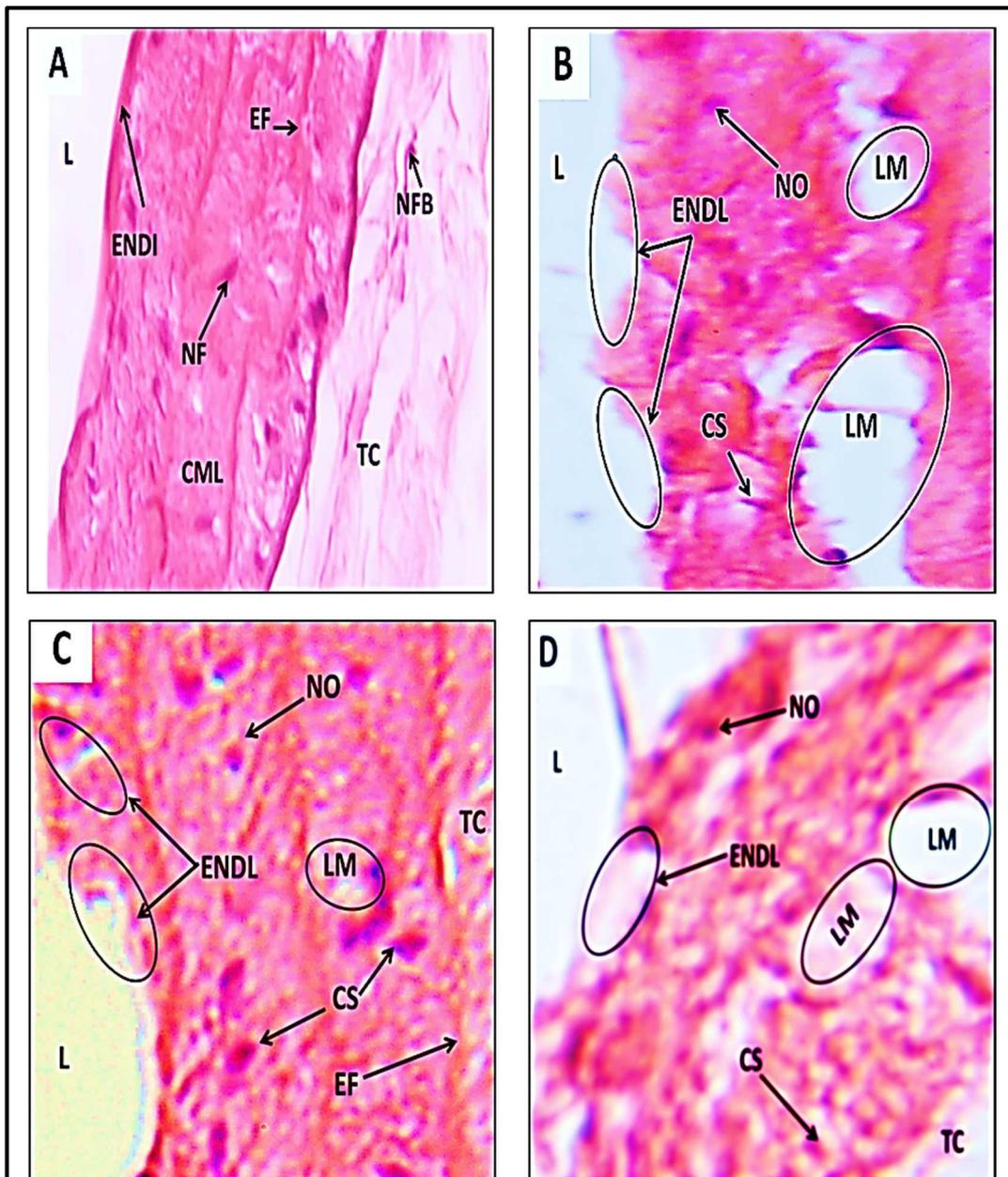


Figure 41. Micrographies de l'aorte iliaque en Coupe histologique longitudinale des rats témoins et traités. Coloration hématoxyline éosine (HE) (G×1000).

A: T, **B:** tHcy, **C :** tHcy-F, **D:** tHcy-vitC. (n= 5 rats par groupe).

ENDI : Endothélium intact, **NF :** Noyau fusiforme, **NO :** Noyau ovale,
ENDL : Endolyse, **LM :** Lyse musculaire, **CS :** Cellule spumeuse,
CML : Cellule musculaire lisse, **EF :** Fibre élastique,
NFB : Noyau du fibroblaste, **TC :** Tissu conjonctif. **L :** Lumière.

V.5. Étude du système ubiquitine protéasome

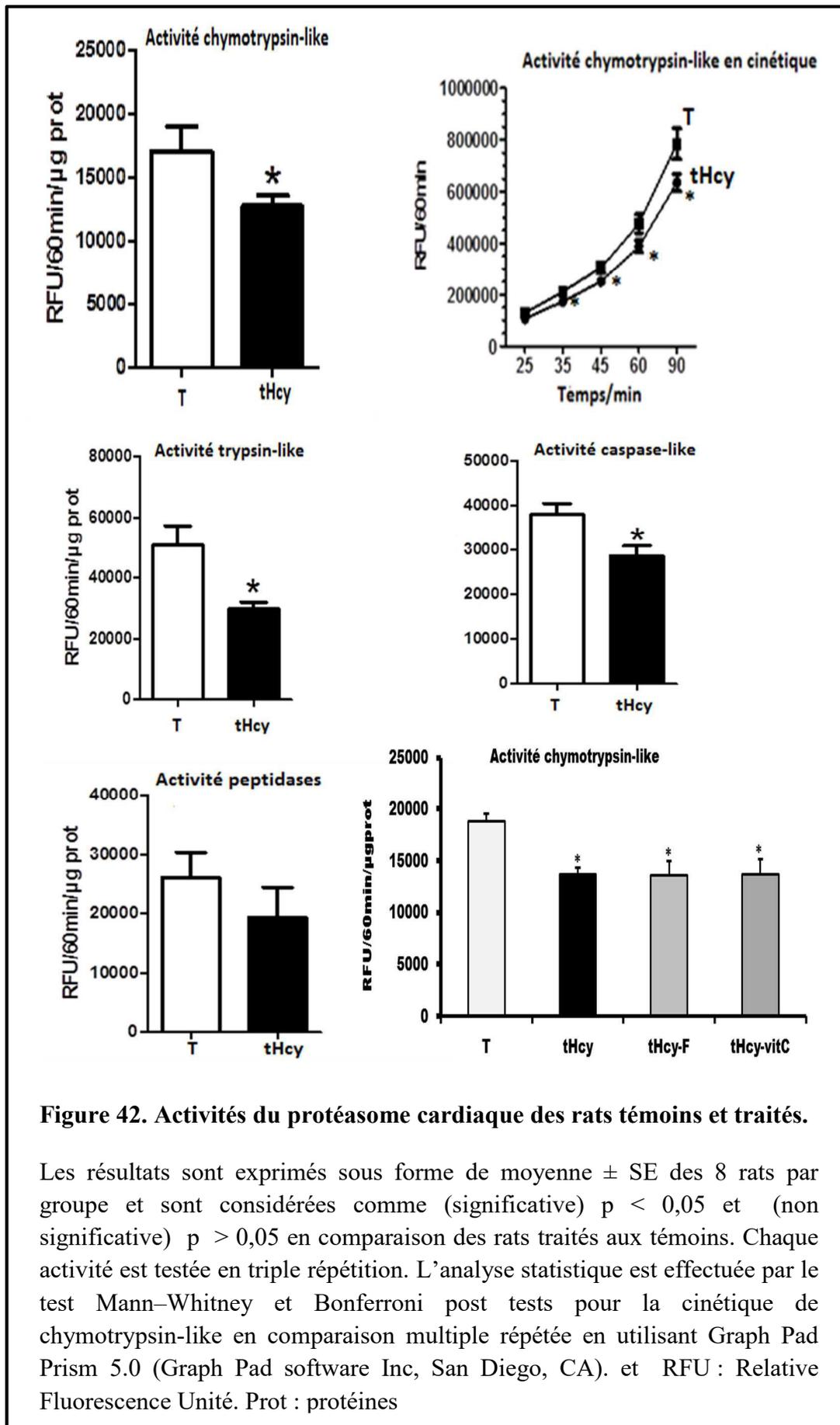
V.5.1. Activités peptidasiques du protéasome 20S

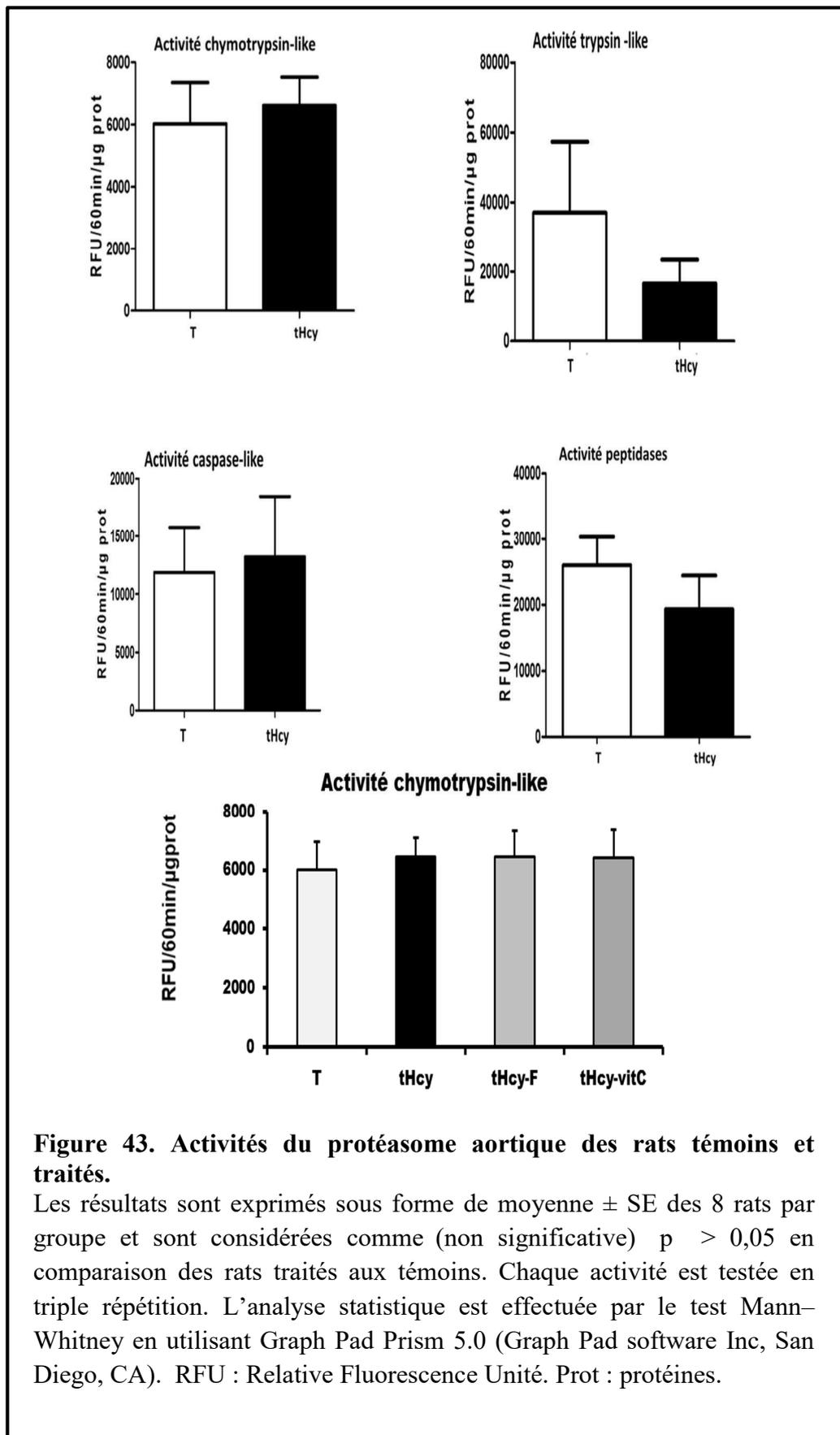
V.5.1.1. Activités peptidasiques du protéasome 20S cardiaque

Les trois activités protéasomales du Core 20S cardiaque ainsi que l'activité des peptidases, évaluées par les peptides fluorogéniques spécifiques après incubation pendant 60 min en présence et en absence d'inhibiteur spécifique le MG 132 sont rassemblées dans la (Figure 42). L'administration de la DL-homocystéine chez les rats traités (tHcy) induit une diminution significative ($p < 0,05$) de trois activités catalytiques : chymotrypsin-like, trypsin-like et caspase-like en comparaison aux témoins (T). L'activité chymotrypsin-like testée en cinétique pour les (tHcy) a montré aussi une diminution significative ($p < 0,05$) entre 35 min à 90 min d'incubation avec le substrat par rapport aux témoins. De même cette activité demeure significativement ($p < 0,05$) diminuée pour les (tHcy-F) et (tHcy-vitC) comparativement aux témoins (T), mais elle est non significative en comparaison aux (tHcy). L'activité peptidases n'a montré aucun changement significatif ($p > 0,05$) pour les (tHcy) par rapport aux (T).

V.5.1.2 Activités peptidasiques du protéasome 20S aortique

La (Figure 43) illustre les trois activités protéasomales du Core 20S aortique de même que l'activité peptidases après 60 min d'incubation avec les peptides fluorogéniques spécifiques en présence et en absence d'inhibiteur MG 132. Les résultats montrent que contrairement au cœur, aucune modification significative ($p > 0,05$) n'a été révélée pour toutes les activités (chymotrypsin-like, trypsin-like, caspase-like et peptidases) chez les rats traités par l'homocystéine (tHcy) en comparaison aux témoins (T). La comparaison de l'activité chymotrypsin-like chez (tHcy-F et tHcy-vitC) par rapport aux (T) et aux (tHcy) n'a pas aussi changée ($p > 0,05$).





V.5.2. Expression relative des sous unités protéasomales et des protéines ubiquitylées

V.5.2.1. Expression au niveau du cœur

L'expression relative des sous unités protéasomales : 20S α 1, 20S β 1, 20S β 2, 20S β 5, 20S Core et des protéines ubiquitylées des fractions cytosoliques cardiaques, analysée par western blot (WB) (Figure 44) et après quantification par le gel de bleu de Coomassie est illustrée dans la (figure 46). Une diminution significative ($p < 0.05$) de l'expression des sous unités 20S α 1, 20S β 1 et 20S core a été observée, ainsi que la sous unité 20S β 2 qui semble avoir diminuée chez les rats traités par la DL-homocystéine (tHcy) par rapport aux rats témoins (T). Par contre la sous unité 20S β 5 reste inchangée ($p > 0,05$). L'expression des protéines ubiquitylées a augmentée de manière significative ($p < 0.05$) pour les (tHcy) par rapport aux rats témoins (T).

V.5.2.2. Expression au niveau de l'aorte

Les fractions cytosoliques aortiques analysée par western blot (WB) (Figure 45) et après quantification par B-actine n'ont montré aucune modification significative ($p > 0,05$) de l'expression relative des sous unités protéasomales : 20S α 1, 20S β 2 et 20S β 5 chez les rats traités par la DL- homocystéine (tHcy) par rapport aux rats témoins (T) (Figure 47). Par contre le 20S Core a exprimé une diminution significative ($p < 0.05$) en comparaison aux témoins (T) (Figure 47). L'expression de la sous unité 20S β 2 n'a pas pu être révélée sur gel. L'expression des protéines ubiquitylées comme au niveau du coeur a montré une augmentation significative ($p < 0.05$) pour les (tHcy) par rapport aux rats témoins (T).

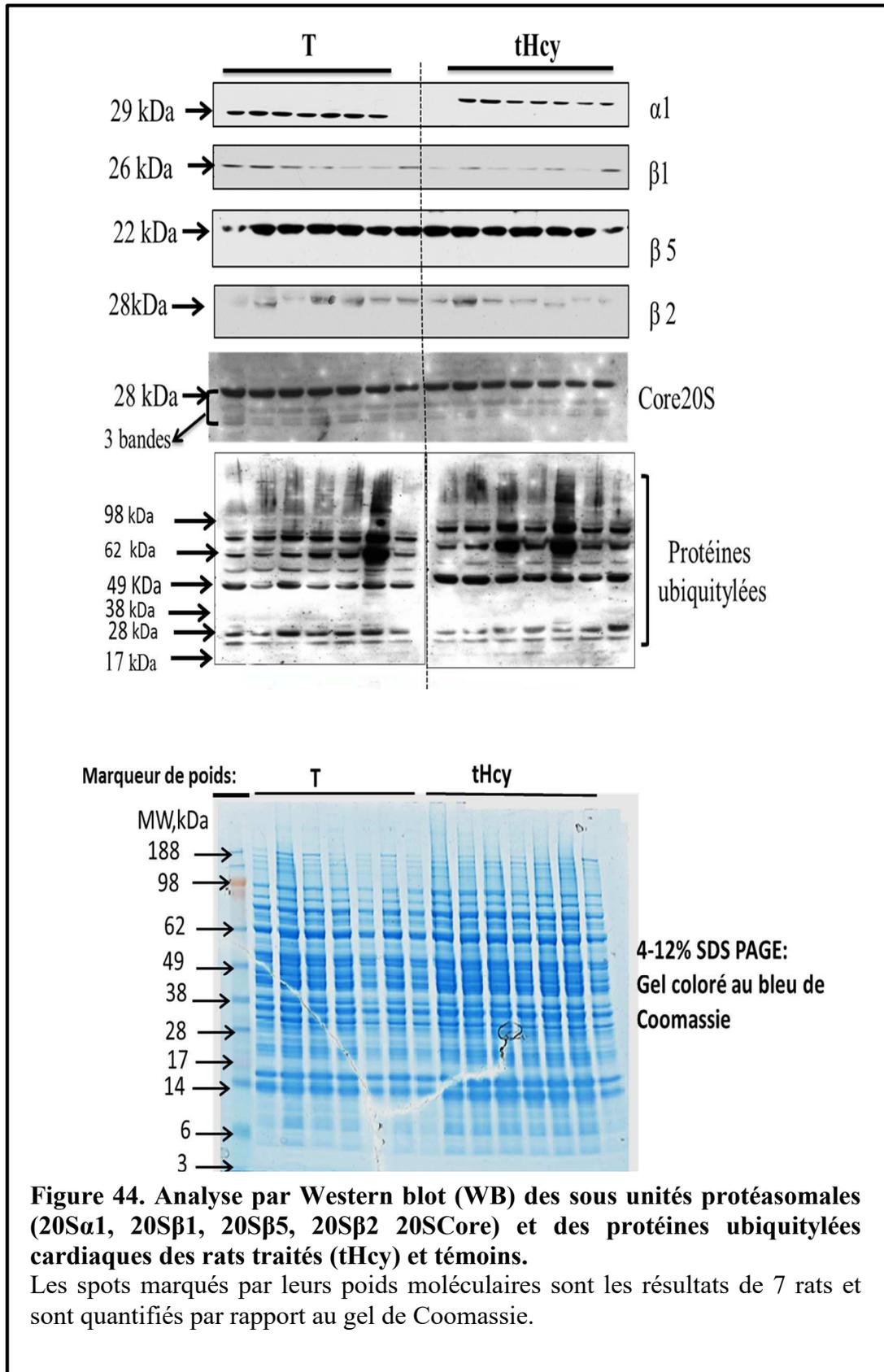
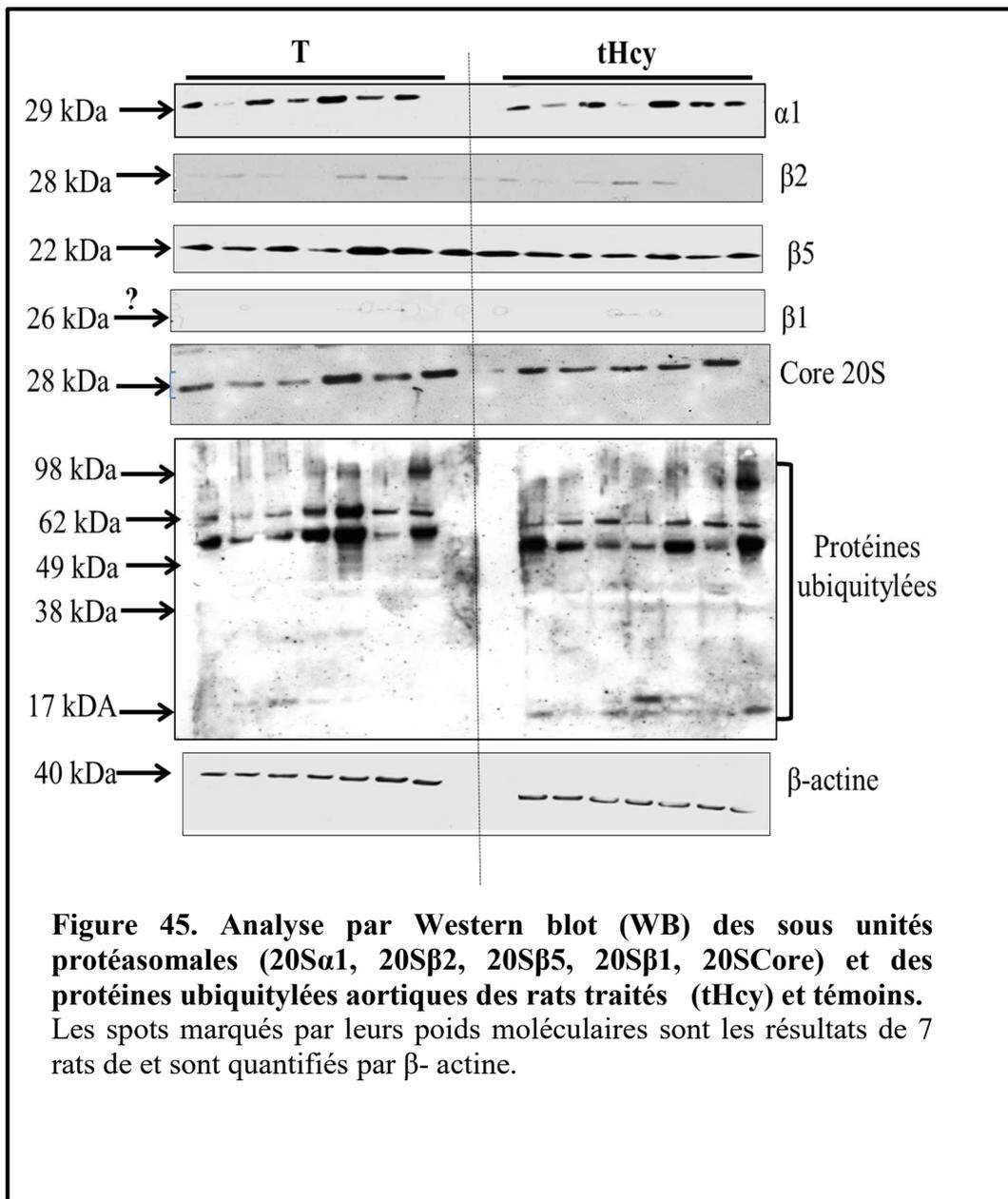
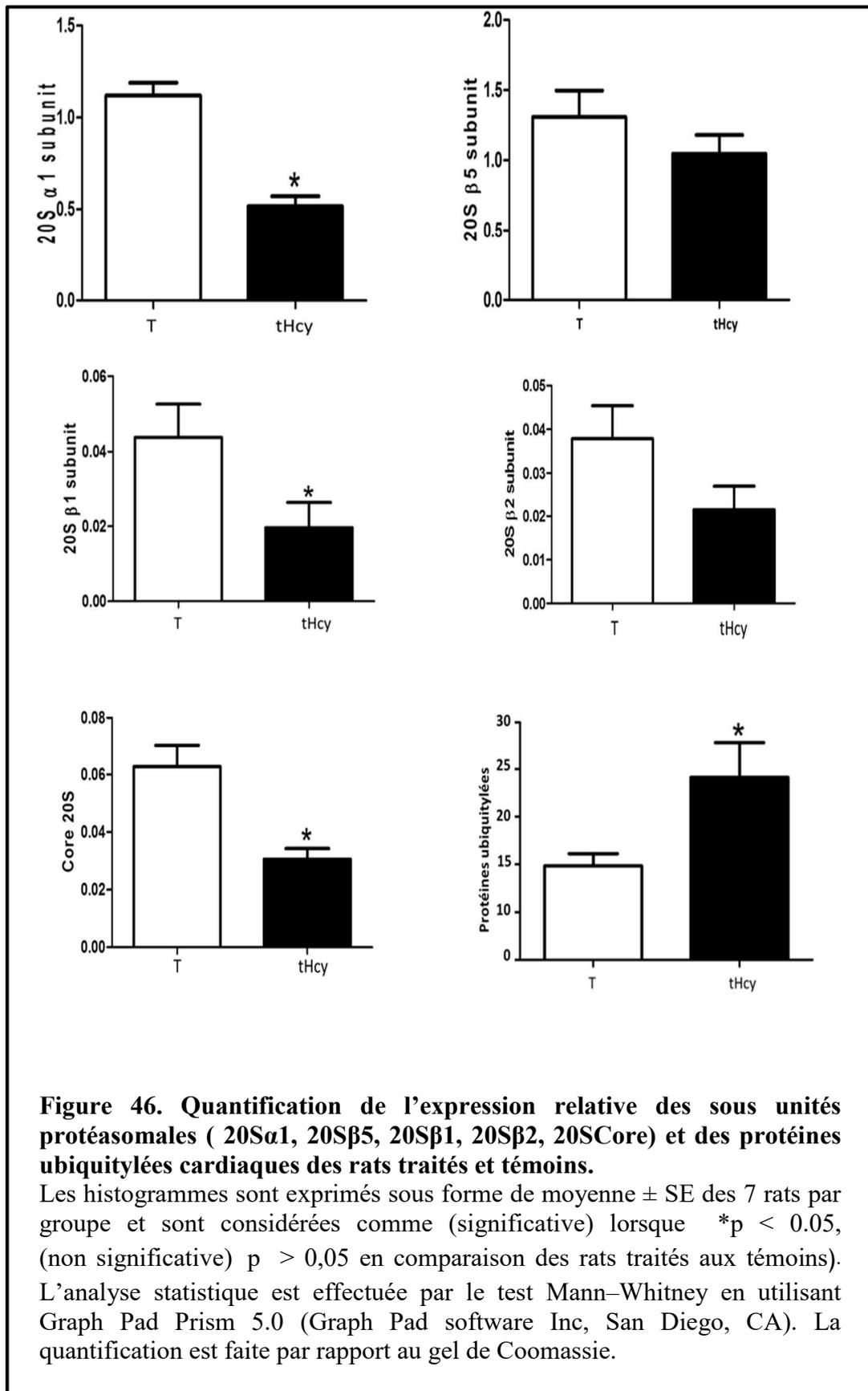


Figure 44. Analyse par Western blot (WB) des sous unités protéasomales (20S α 1, 20S β 1, 20S β 5, 20S β 2 20SCore) et des protéines ubiquitylées cardiaques des rats traités (tHcy) et témoins.

Les spots marqués par leurs poids moléculaires sont les résultats de 7 rats et sont quantifiés par rapport au gel de Coomassie.





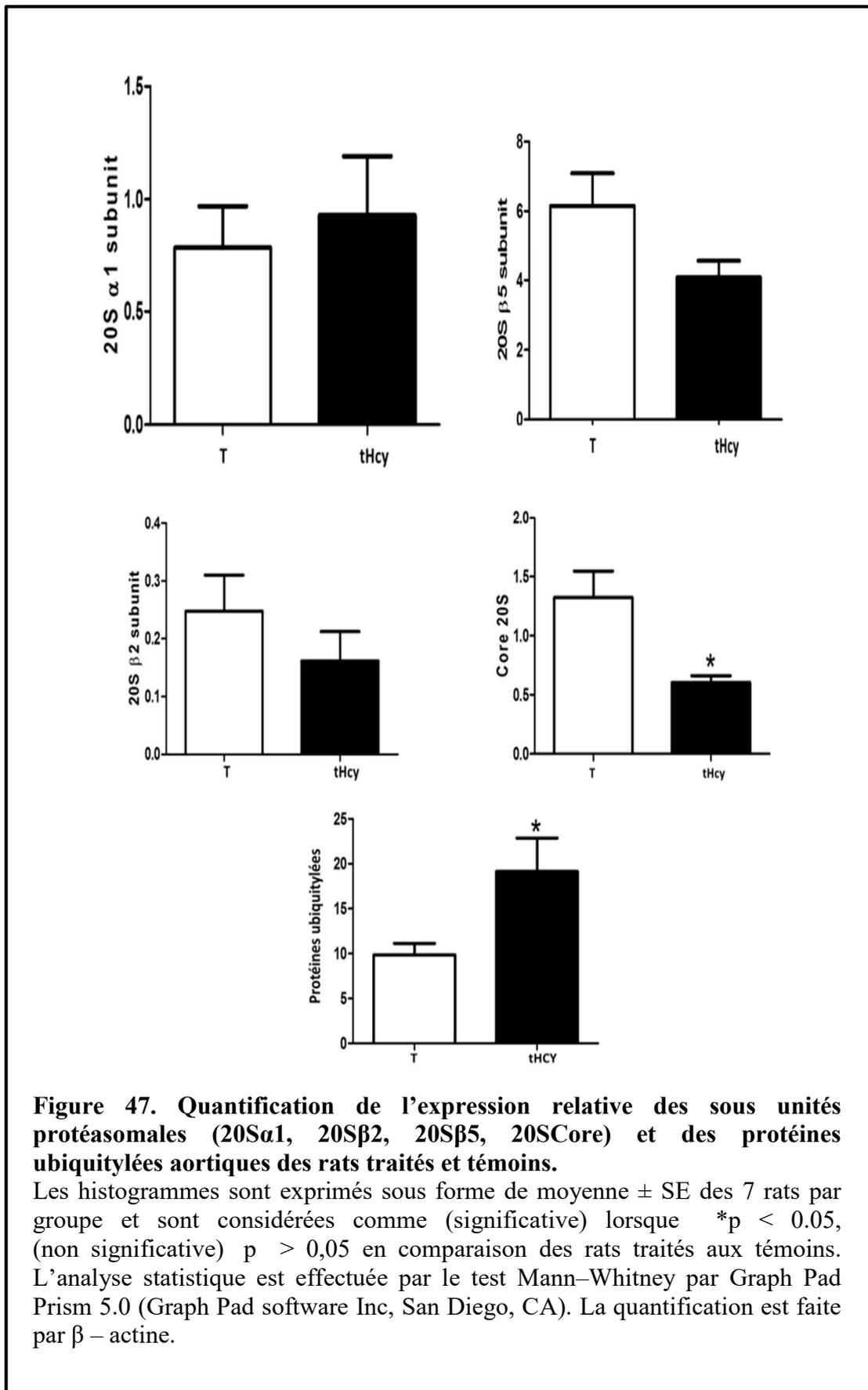
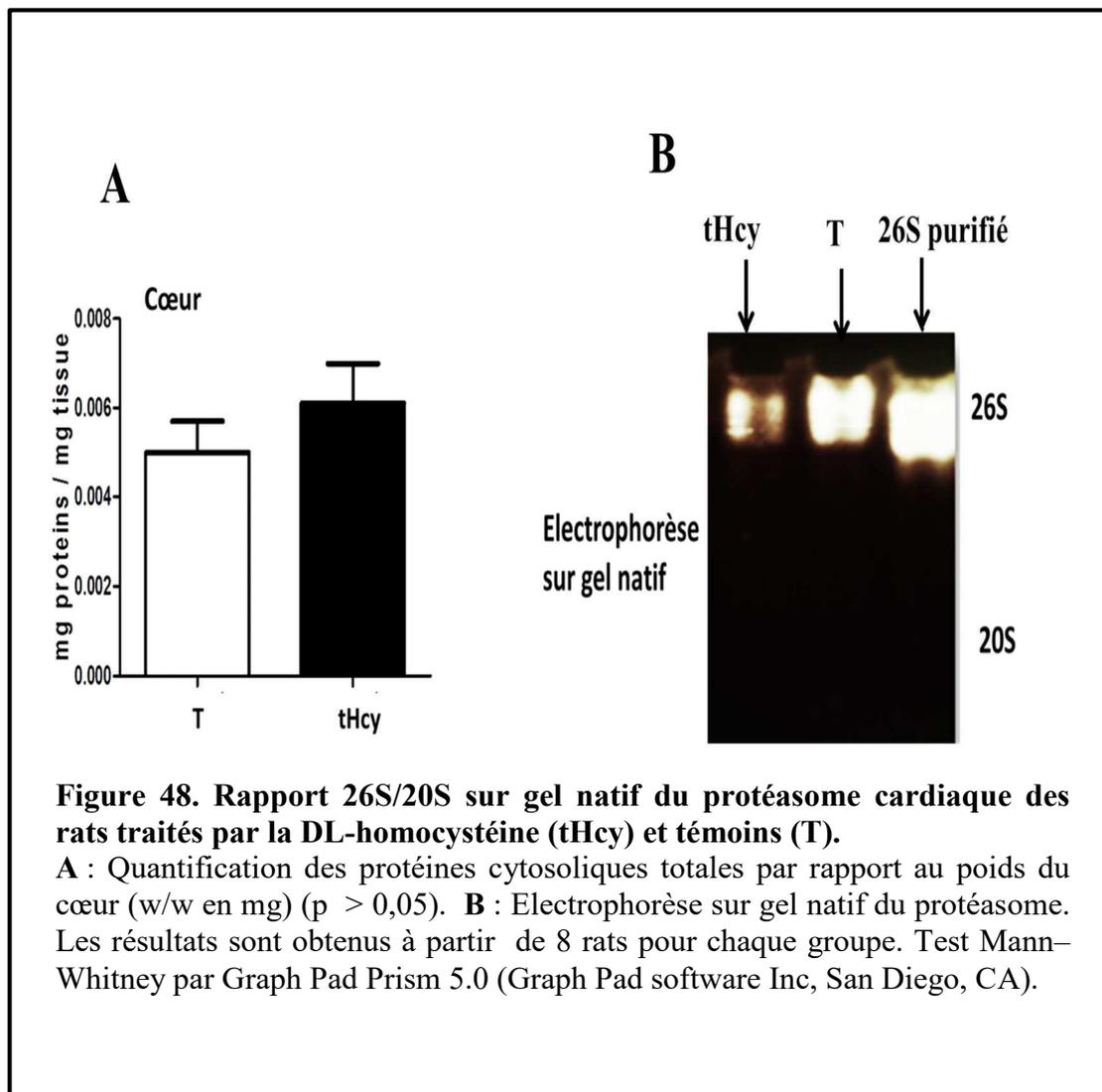


Figure 47. Quantification de l'expression relative des sous unités protéasomales (20S α 1, 20S β 2, 20S β 5, 20SCore) et des protéines ubiquitylées aortiques des rats traités et témoins.

Les histogrammes sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE des 7 rats par groupe et sont considérées comme (significative) lorsque * $p < 0.05$, (non significative) $p > 0,05$ en comparaison des rats traités aux témoins. L'analyse statistique est effectuée par le test Mann-Whitney par Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad software Inc, San Diego, CA). La quantification est faite par β - actine.

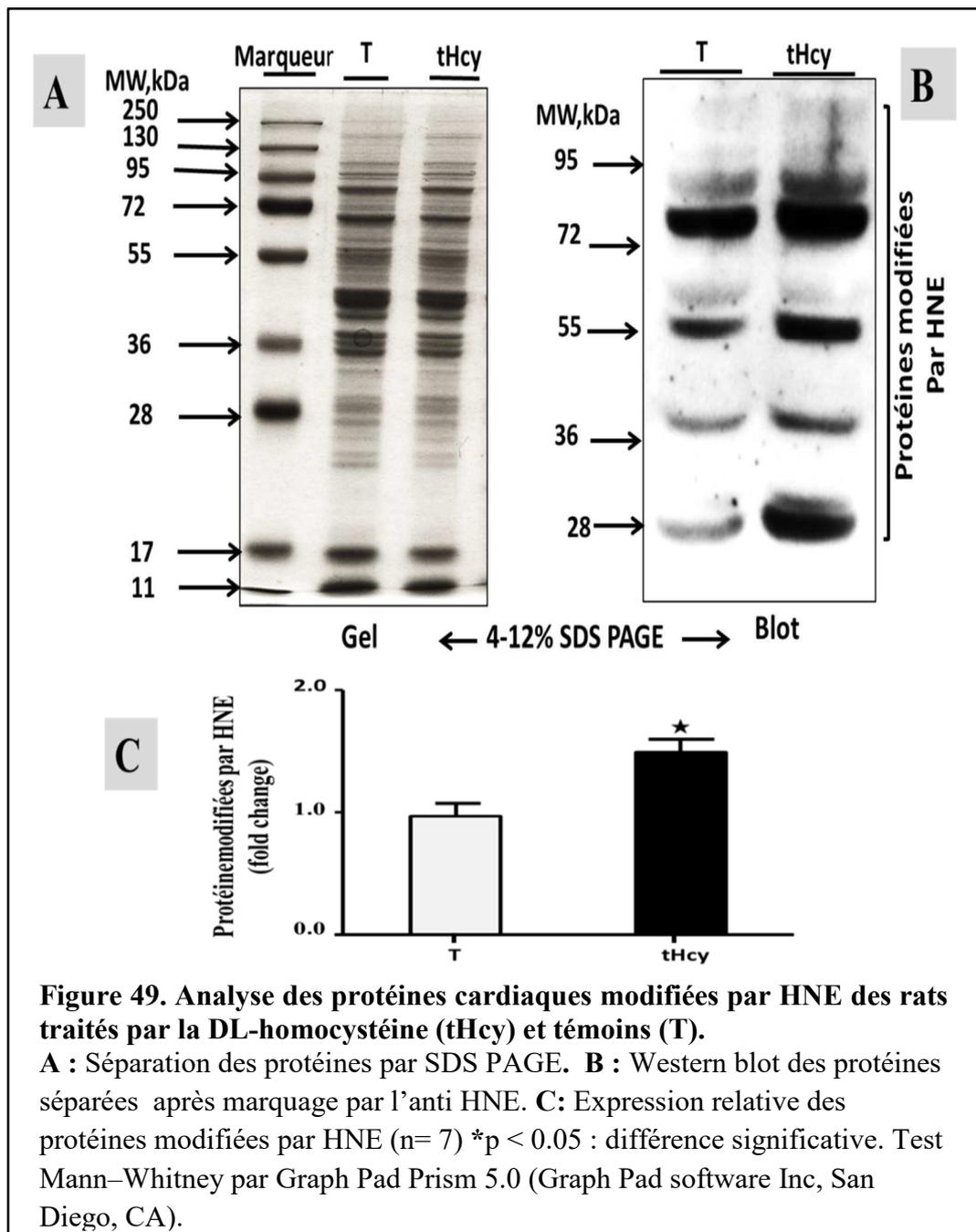
V.5.3. Analyse du rapport 26S/20S protéasomal cardiaque

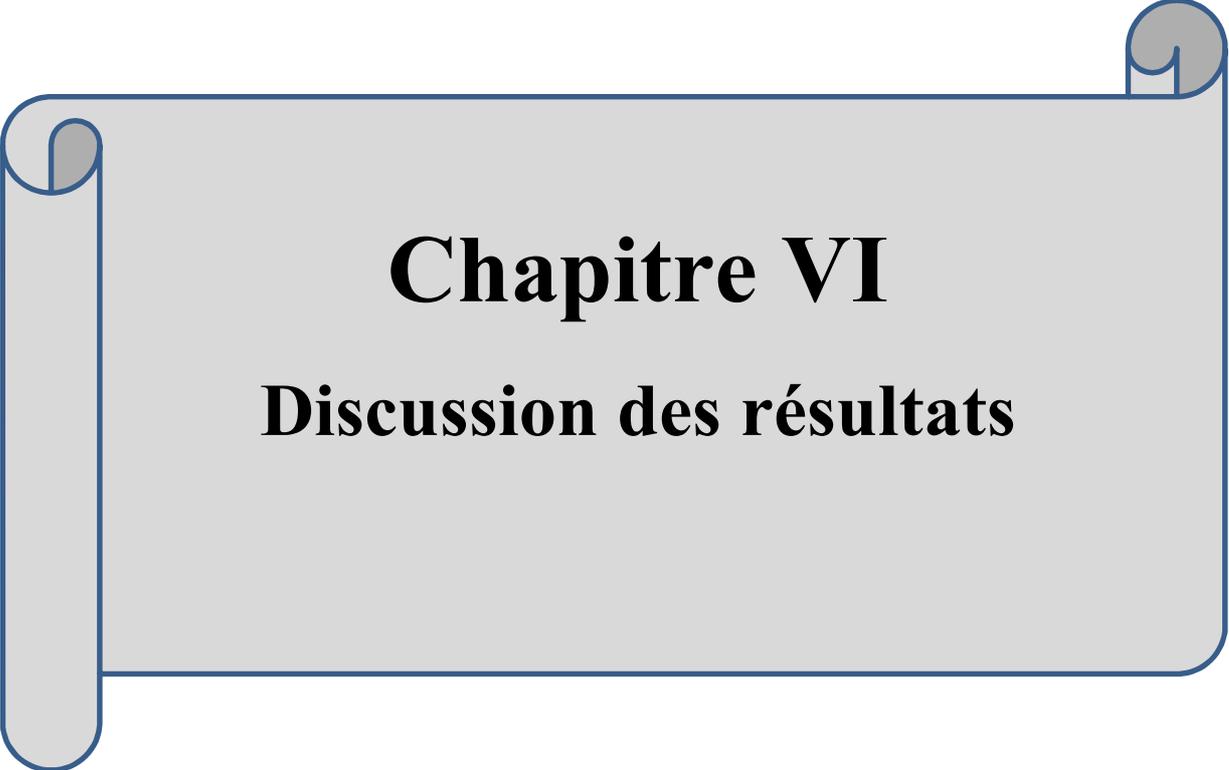
La distribution relative du protéasome par électrophorèse sur gel natif au niveau du cœur à partir des protéines cytosoliques chez les rats traités par l'homocystéine (tHcy) et les rats témoins (T) est illustrée dans la (Figure 48 B). Le protéasome 26S est bien détecté sur le gel avec une fluorescence moins intense chez les rats traités par l'homocystéine (tHcy) par rapport aux témoins (T). La comparaison est conduite par le protéasome 26S purifié. Par contre aucune révélation du 20S sur le gel. La fluorescence due au tanpon d'activité LLVY-BOC témoin aussi l'activité qualitative protéasomale chymotrypsin-like réduite chez les traités (tHcy) comparativement aux témoins. La quantité des protéines cytosoliques totales par rapport au poids tissulaire de l'organe coeur est non significative entre traités et témoins ($p > 0,05$) (Figure 48 A).



V.6. Évaluation des protéines modifiées par HNE au niveau du cœur

La (Figure 49 B) montre l'accumulation du HNE sur les protéines cytosoliques cardiaques analysées par western blot (WB) chez les traités et les témoins. Les protéines modifiées par HNE ont été révélées par le marqueur de poids moléculaire entre 95 kDa et 28 kDa. la quantification par gel de Coomassie à partir d'un pool de 7 rats pour chaque groupe des traités et témoins (Figure 1C) a montré une augmentation significative ($p < 0.05$) de l'expression des protéines liées aux HNE chez les traités par l'homocystéine en comparaison aux témoins (Figure 49 C).





Chapitre VI

Discussion des résultats

VI. Discussion des résultats

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'évaluer le statut du protéasome par l'analyse de sa fonction et de sa composition respectivement vis-à-vis de ses 3 activités protéolytiques comportées par son corps catalytique 20S et l'expression des certaines de ses sous-unités structurales durant le stress oxydatif endogène, généré dans un modèle expérimental d'hyperhomocystéinémie chez le rat par l'administration intrapéritonéale de la DL-homocystéine. Les organes cibles visés sont le cœur et l'aorte, vu leur relation directe avec les maladies cardiovasculaires liées à la physiopathologie de l'HHcy considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant. [256, 251, 252]. Nous avons montré pour la première fois dans ce modèle d'étude d'HHcy chez le rat Wistar albinos l'altération du protéasome.

Le modèle d'étude élaboré après une durée d'intervention de 3 semaines a conduit chez les rats traités (tHcy) par la DL-Hcy (0.6–1.2 $\mu\text{M/g}$ poids corporel) selon nos résultats à une hyperhomocystéinémie intermédiaire. Le niveau de l'homocystéine total plasmatique a été élevée à une valeur de $42,2 \pm 3,4 \mu\text{M}$ qui est dans la gamme de concentrations intermédiaires physiopathologiques de l'HHcy (20- 60 μM) trouvées chez l'homme [241, 255], et aussi dans certains modèles expérimentaux [21, 260, 270]. De même l'administration intrapéritonéale d'acide folique (0,011 $\mu\text{M/g}$ poids corporel) ou de vitamine C (100 mg/kg poids corporel) en vue d'une correction possible de ce modèle, c'est-à-dire, faire chuter le taux d'homocystéine ont aussi conduit à une HHcy intermédiaire par l'augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) du taux d'Hcy par rapport aux rats témoins (T). En outre l'acide folique a diminué le taux d'Hcy de manière significative ($p < 0,05$) à une concentration de $32,18 \pm 2,02 \mu\text{M}$ par rapport aux rats traités (tHcy). Des nombreuses études ont démontré l'effet de l'acide folique et des vitamines du groupe B sur la diminution du taux sanguin d'homocystéine [290, 291]. En revanche, la vitamine C qui est un antioxydant puissant [318, 319], par notre dose utilisée en comparaison aux rats traités (tHcy) n'a pas diminué le taux d'Hcy ($p > 0,05$), la concentration a été élevée à $41,75 \pm 3,2$. En effet une étude a rapporté l'effet réducteur de vitamine C face au stress oxydatif durant l'hyperhomocystéinémie chronique mais la chute du taux d'Hcy n'a pas été rapportée [306]. Dans l'ensemble, nous avons conçu un modèle d'HHcy intermédiaire chez tous les groupes de rats traités.

Plusieurs études ont mis en évidence que l'homocystéine induisait un stress oxydatif [258, 259]. Par ailleurs, l'étude de l'impact de notre modèle d'hyperhomocystéinémie sur l'induction du stress oxydatif au niveau du plasma, cœur et aorte, indique l'établissement de ce dernier par l'augmentation du MDA et PC, la diminution du GSH et de l'activité des enzymes antioxydantes : la SOD, la CAT et la GPx. Nos résultats sont en accord avec les études qui ont rapportés qu'un taux élevé d'homocystéine est à l'origine de la survenue des lésions tissulaires cardiaques et aortiques de rats hyperhomocystéinémiques, ainsi que la réduction de défenses antioxydants [260, 261]. Par contre une autre étude a rapporté une augmentation en SOD et CAT [270].

Notre investigation histologique du cœur et de l'aorte a confirmé l'altération de la structure tissulaire de ces deux organes sous l'effet de l'homocystéine. En effet, une lyse de fibres musculaires cardiaques a été observée, ainsi qu'une desquamation de l'endothélium au niveau de l'aorte, une endolyse dans la média avec un changement de l'aspect fusiforme des noyaux des cellules musculaires lisses vers un aspect arrondi et une formation des cellules spumeuses. Ces observations sont en similarité avec d'autres travaux [320, 321], de plus, ces changements sont plus marqués chez les rats traités (tHcy) et (tHcy-vitC) que chez les rats (tHcy-F) probablement à cause du taux d'Hcy moins élevé chez ces derniers. Il a été suggéré que la transformation de l'aspect fusiforme des noyaux des cellules musculaires lisses vers un aspect arrondi résulte des modifications apportées sur les protéines du cytosquelette intranucléaire (oxydation par les ROS, homocystéinylation par incorporation de l'Hcy et/ou hypométhylation) [322]. Il est aussi à signaler que les dommages sont plus provoqués au niveau de l'aorte iliaque suivie de l'abdominale par rapport à l'aorte thoracique suivie de l'arch. Il a été rapporté que l'aorte iliaque est la partie la plus sensible aux effets toxiques de l'HHcy à cause de sa ramification en deux branches [323]. Par ailleurs, les embranchements des vaisseaux sont les sites privilégiés de formation des lésions qui correspondent aux zones de turbulence du courant sanguin qui rend l'endothélium plus perméable aux LDL circulants ciblés par l'oxydation via les ROS [324].

L'homocystéine possède in vitro une action pro-oxydante, son groupe thiol étant oxydé pour former des espèces réactives de l'oxygène ou ROS qui sont responsables de lésions et de dysfonctionnements cellulaires, essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN ou des lipides [259]. Par ailleurs, l'homocystéine a induit dans notre étude

des dommages oxydatifs en augmentant la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines depuis que le MDA, un biomarqueur de la peroxydation lipidique et les PC, un paramètre de dommages des protéines étaient plus élevés. De ce fait, le stress oxydatif est augmenté par les ROS générées en une partie par l'auto-oxydation de l'Hcy et également par la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie en réponse au stress oxydatif [265]. L'Hcy a créé un déséquilibre entre la génération de ROS et la production d'antioxydants. En effet, le GSH, le premier antioxydant de défense, en réagissant en synergie avec les enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx) [325] a été réduit. De plus les enzymes antioxydantes responsables de la suppression du stress ont probablement été cibles à l'oxydation par les ROS qui ont réduit leur activité. Des résultats indiquent notamment que l'expression et l'activité de la glutathion peroxydase était diminuée lors de cultures de cellules endothéliales après traitement par l'homocystéine [266, 267], et dans des modèles animaux génétiquement modifié [269]. Le stress oxydatif induit dans notre modèle expérimental n'a pas été réduit dans l'ensemble chez les rats traités par l'acide folique (tHcy-F) ou la vitamine C (tHcy-vitC), malgré que l'acide folique a réduit la peroxydation lipidique par la diminution du MDA plasmatique, cardiaque et aortique et le GSH sauf au niveau de l'aorte, mais non pas l'oxydation protéique par rapport aux rats (tHcy), de même la vitamine C a augmenté la GPx au niveau du cœur par rapport aux rats (tHcy). Nous suggérons dans cette condition que le stress oxydatif est généré en synergie de ses différents paramètres connus via la réaction des ROS en excès. En fait la chute de l'Hcy par l'acide folique est bien démontrée cependant sans influence sur le stress oxydatif et la survenue de risque cardiovasculaire [252, 238]. En addition, si l'on compare les paramètres du stress chez les rats témoins et les rats traités (tHcy) entre cœur et aorte, il semble que et le cœur est plus touché par l'oxydation. Comme nos résultats l'indiquent, le MDA et PC respectivement sont augmentés dans le cœur (3,43 et 6,08 fois versus 3,22 et 4,15 fois) dans l'aorte. Le GSH cardiaque est diminué (1,9 fois versus 1,5 fois) dans l'aorte. La SOD, la CAT et la GPx respectivement dans le cœur (2,04, 1,86 et 2,28 fois versus 1,95, 1,55 et 2,13 fois) dans l'aorte. Nous proposons que l'Hcy à un taux élevé, était plus accumulé dans le tissu cardiaque comme a été rapporté [260], ce qui a conduit à une production excessive en ROS probablement en conséquence de plus de formes d'Hcy auto- oxydées.

Nos résultats ont montré que l'Hcy a induit une diminution de la teneur en monoxyde d'azote (NO) chez tous les rats traités dans les deux organes. Par ailleurs, il est bien établi que l'homocystéine provoque une atteinte des cellules endothéliales probablement via une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) et affecte ainsi la vasomotricité dépendante de l'endothélium qui rend ce dernier plus vulnérable aux radicaux libres. [273, 258]. A l'état normal, les cellules endothéliales exposées à court terme à l'Hcy libèrent du NO qui génère à son tour du S-nitrosohomocystéine et par conséquent la détoxification de l'Hcy. A long terme d'exposition à l'Hcy cet effet protecteur est dépassé [326].

Il a été montré que l'homocystéine conduit au dysfonctionnement des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (CML) et induit leur apoptose via les ROS produites au sein de ces cellules [262, 283]. En outre, l'Hcy provoque l'apoptose par l'activation de la caspase 3 [285]. Nos résultats sont en accord parfait avec ces données bibliographiques. En effet l'activité de la caspase 3, une des enzymes de la voie apoptotique est augmentée chez les rats traités comparativement aux rats témoins dans les deux organes. Nous constatons ici que le stress oxydatif induit par un taux élevé en ROS d'une part et une diminution en antioxydants enzymatiques et non enzymatiques d'autre part, conduisant au dysfonctionnement des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses au niveau du cœur et de l'aorte par la réduction de la biodisponibilité du NO (un des facteurs étudié dans ce travail) a conduit à l'apoptose de ces cellules par l'activation de la caspase 3 (un des facteurs étudié dans ce travail). De plus l'altération structurale démontrée par l'histologie de deux organes (cœur et aorte) est en faveur des résultats biochimiques précédents, de même elle confirme la pathogénicité de l'HHcy dans l'altération cardiovasculaire déjà bien démontrée par plusieurs études [258, 295, 276, 299, 298].

La présente étude a donc bien démontré l'induction du stress oxydatif dans notre modèle expérimental d'HHcy intermédiaire. Ce modèle a abouti selon nos résultats précédents à l'accumulation des protéines oxydées (dans le cœur et l'aorte) qui sont normalement éliminées par le système ubiquitine protéasome ou (UPS), machinerie très sophistiquée de protéolyse intracellulaire pour prévenir leur toxicité [1, 11, 18,19, 20]. De ce fait, nous avons vérifié la fonction et la composition de ce système durant ce stress induit par cette HHcy intermédiaire.

Dans notre analyse, les trois activités protéosomales, chymotrypsin-like, trypsin-like et caspase-like ont été significativement ($p < 0,05$) réduites au niveau du cœur chez les rats traités (tHcy). (tHcy-F et tHcy-vitC sont testés pour l'activité chymotrypsin-like qui a été aussi diminuée). Ces modifications sont associées à la diminution de l'expression des sous-unités, 20S $\alpha 1$, 20S $\beta 1$, 20S $\beta 2$ et 20S Core chez les (tHcy) tandis que l'expression 20S $\beta 5$ a été inchangée. Les sous-unités catalytiques $\beta 1$ et $\beta 2$ diminuées peuvent respectivement expliquer l'inhibition de l'activité caspase-like et l'activité trypsin-like. En outre l'inhibition des trois activités pourrait également être liée à la diminution de la sous-unité régulatrice $\alpha 1$ et le complexe 20S Core qui est conçu pour reconnaître plusieurs sous-unités du corps catalytique 20S. La sous unité catalytique $\beta 5$ associée à l'activité chymotrypsin-like, considérée comme activité de référence a pu être masquée par d'autres sous-unités, autrement dit on peut suggérer que cette activité chymotrypsin-like est liée à d'autres sous-unités, du fait qu'en cinétique, elle a demeurée significativement inactive entre 35 à 60 min d'incubation avec le peptide fluorogénique approprié. L'expression des protéines ubiquitylées a été significativement augmentée. Ces modifications en fonction et en composition du protéasome peuvent être dues aux protéines oxydées et ubiquitylées accumulées durant le stress oxydatif induit par l'HHcy. Il a été rapporté que la réduction de l'activité du protéasome peut se produire par l'apparition de protéines oxydées et ubiquitylées dans le cytosol, [11, 12, 165, 327]. De plus, il nous paraît intéressant de noter que l'activité peptidases n'a pas été activée, de même que l'ubiquitine n'a pas été détecté sur gel, ce qui est en accord avec l'inhibition du protéasome dans notre modèle d'étude. A l'état actif, le protéasome recycle l'ubiquitine et active les peptidases [129].

En revanche, au niveau de l'aorte, les trois activités protéosomales de même que l'activité peptidases n'ont pas été changées chez les rats traités (tHcy) de même que l'activité chymotrypsin-like chez les (tHcy-F et tHcy-vitC). Ces résultats sont en accord avec l'étude qui n'a signalé aucune activation de trois activités du protéasome dans le foie de souris déficiente en cystathionine bêta-synthase et développante d'HHcy [21], et l'autre étude qui a aussi montré que l'activité trypsin-like et caspase-like ont été inchangées avec l'inhibition de l'activité chymotrypsin-like dans l'aorte de souris hyperglycémique [328]. L'expression des sous-unités 20S $\alpha 1$, 20S $\beta 2$, 20S $\beta 5$ n'ont pas été changées, par contre la sous unité 20S $\beta 2$ n'a pas pu être révélée sur gel, du fait qu'elle a peut-être été modifiée durant l'expérimentation. L'expression des protéines ubiquitylées a également été

augmentée comme dans le cœur de manière significative. Cependant l'une des observations les plus marquantes a été la diminution de l'expression du 20S Core et par condition, il paraît que l'aorte semble avoir des propriétés spécifiques pour répondre aux conditions du stress induit par l'HHcy, les sous-unités du protéasome aortique probablement n'ont pas pu faire face aux protéines oxydées et ubiquitylées accumulées. Il est à suggérer que l'aorte possède des sous-unités inductibles spéciales qui ont gardé les activités inchangées. La même proposition a été rapportée pour le protéasome cardiaque de souris hyperglycémique [329].

Le protéasome est altéré dans notre présente étude de manière différente entre cœur et aorte, nous pensons que la fonction du protéasome aortique dépend de type cellulaire (cellules musculaires lisses et cellules endothéliales) et aussi du temps d'exposition aux dommages oxydatifs par rapport au cœur. Le protéasome est impliqué dans la régulation de l'apoptose [189]. Ainsi le dysfonctionnement du protéasome dans ces conditions pourrait être la cause de l'apoptose estimée par l'activation de la caspase 3 et par la suite la diminution du NO. De ce fait l'activité du protéasome se trouvant ainsi diminuée contribue au développement sévère de la pathologie cardiovasculaire durant l'HHcy en perturbant la fonction et la survie cellulaire des organes cibles. Le protéasome est impliqué dans l'activation de la voie de signalisation NF- κ B par la dégradation du substrat I κ B [166]. De ce fait, il serait important d'analyser ce facteur NF κ B, (non analysé ici, faute de temps et moyens) connu déclenché par l'Hcy durant l'inflammation d'une part et en relation étroite avec l'apoptose, le NO et le protéasome d'autre part.

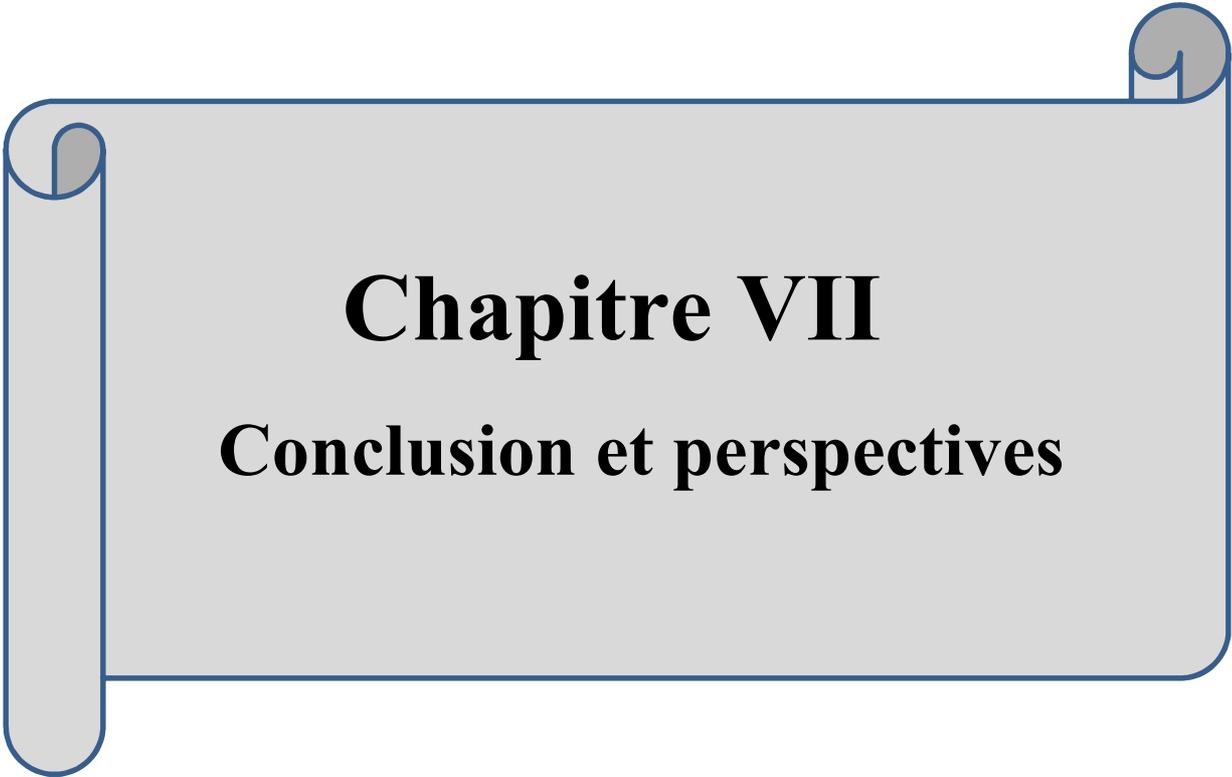
Plusieurs études ont démontré que l'inactivation directe des sous-unités du protéasome 19S et 20S in vivo et in vitro par la présence d'inhibiteurs endogènes telles que des protéines fortement modifiées chez le rat et dans plusieurs types cellulaires durant certaines maladies [11, 12, 13, 14,15]. Certaines sous unités du protéasome 20S et 26S étaient modifiées au niveau du cœur et du foie de rat âgé par glycoxylation et par conjugaison avec les produits de peroxydation lipidique tel que le 4-HNE qui entraîne une inactivation protéolytique du protéasome 20S in vitro [161,163]. Dans ce contexte, nous avons analysé au niveau des fractions cardiaques les protéines modifiées par adduit du HNE, pour mieux expliquer nos résultats. En effet l'expression des protéines modifiées par HNE, analysée par WB a été significativement augmentée chez les rats traités par l'Hcy (tHcy). Nous développons ici l'hypothèse que les sous-unités du protéasome ont été fortement modifiées par HNE et ont

conduit à l'inhibition des activités catalytiques du 20S. Néanmoins, il se pourrait aussi que l'inhibition des activités est due à la dissociation du complexe 26S en 20S et 19S [12]. Dans ce deuxième contexte, nous avons vérifié la distribution relative du protéasome 26S/20S sur gel natif. Nos résultats ont confirmé l'association du complexe 26S. En plus le contenu en protéines totales analysé par rapport au poids d'organe (cœur) n'était pas réduit. Ce qui confirme que l'inhibition d'activité du protéasome dans notre étude n'est pas due à la dissociation du complexe ou à sa perte en protéines.

L'implication du protéasome dans la dégradation des protéines endommagées par oxydation durant l'hyperhomocystéinémie (HHcy) dans le cœur et l'aorte ou autrement dit le statut du protéasome suite à un stress oxydatif induit par l'HHcy reste à notre connaissance peu ou presque pas étudié. Une étude a montré, l'inactivation des activités du protéasome sans analyse de l'expression des sous-unités au niveau du foie chez la souris hyperhomocystéinémique par déficience en cystathionine beta synthase [21]. Une autre étude a également montré que l'inhibition du protéasome conduit à la diminution du NFkB dans des cellules endothéliales cultivées in vitro après traitement par l'Hcy et des polyphénols [22].

L'altération de la fonction et de la composition du protéasome cardiaque et aortique durant le stress oxydatif induit dans notre modèle d'HHcy intermédiaire est due à l'accumulation des produits d'oxydation protéique fortement modifiés par l'accumulation des ROS (protéines endommagées : oxydées, ubiquitylées, modifiées par HNE, dans cette étude) qui ont probablement réduit l'expression des sous-unités du complexe 19S qui n'ont pas pu faire lier les protéines polyubiquitylées accumulées pour leur passage dans le pore étroit du 20S en vue leur dégradation par les activités peptidasiques du complexe 20S, elles même inhibées par diminution de l'expression des sous-unités du 20S (certaines sous-unités sont testées dans cette étude) en relation à cause du stress oxydatif.

L'utilisation d'antioxydants qui, en diminuant l'intensité du stress, vont permettre de réduire le déclin du protéasome est une approche prometteuse. Certaines études ont montré que la surexpression de protéines chaperonnes comme l'Hsp40 dans des cellules neuronales permet de préserver l'activité du protéasome suite à un stress oxydatif [330] et des autres approches ont été consistées à augmenter l'expression des sous-unités catalytiques $\beta 5$ et $\beta 1$ dans des fibroblastes humains [331] ou à stimuler les activités protéolytiques [17, 332].



Chapitre VII

Conclusion et perspectives

VII. Conclusion et perspectives

Cette thèse a permis d'évaluer le statut du protéasome cardiaque et aortique durant le stress oxydatif induit par un taux élevé de la DL-homocystéine chez le rat Wistar albinos. Des modifications de la fonction et de la composition ont été mises en évidence au niveau de ce système ubiquitine protéasome.

L'altération du protéasome est bien démontrée par la diminution de ses trois activités catalytiques et l'expression de ses sous-unités structurales associées à sa fonction. Dans l'ensemble le déclin du système peut être contribué à l'inactivation directe des sous unités par l'accumulation des protéines endommagées (oxydées et ubiquitylées), générées dans des conditions du stress oxydatif induit en une part par l'auto-oxydation de l'Hcy, conduisant à la production excessive des ROS qui causent l'augmentation de la peroxydation lipidique, l'oxydation protéique et la diminution des capacités antioxydantes de défense, ainsi que la modification histologique des tissus. L'identification des protéines cibles de modification durant l'HHcy au niveau du cœur et aorte permettront de mieux cerner l'impact de ces modifications dans le processus d'altération cardiovasculaires (ou de sa physiopathologie).

Le rôle du protéasome est l'élimination des protéines oxydées accumulées lors du stress oxydatif. Le protéasome dans notre étude a été probablement cible à l'oxydation. Les protéines oxydées sont préférentiellement dégradées par le protéasome 20S de façon indépendante de l'ATP et de l'ubiquitine, mais aussi le système ubiquitine protéasome 26S pourrait également être impliqué dans leur dégradation. Le protéasome évalué dans notre modèle d'étude est le 26S non dissocié. Des molécules activatrices n'agissant pas nécessairement au niveau des sites actifs mais permettant par exemple l'ouverture du pore de la particule 20S peuvent être utiles. Ce domaine est encore peu exploré.

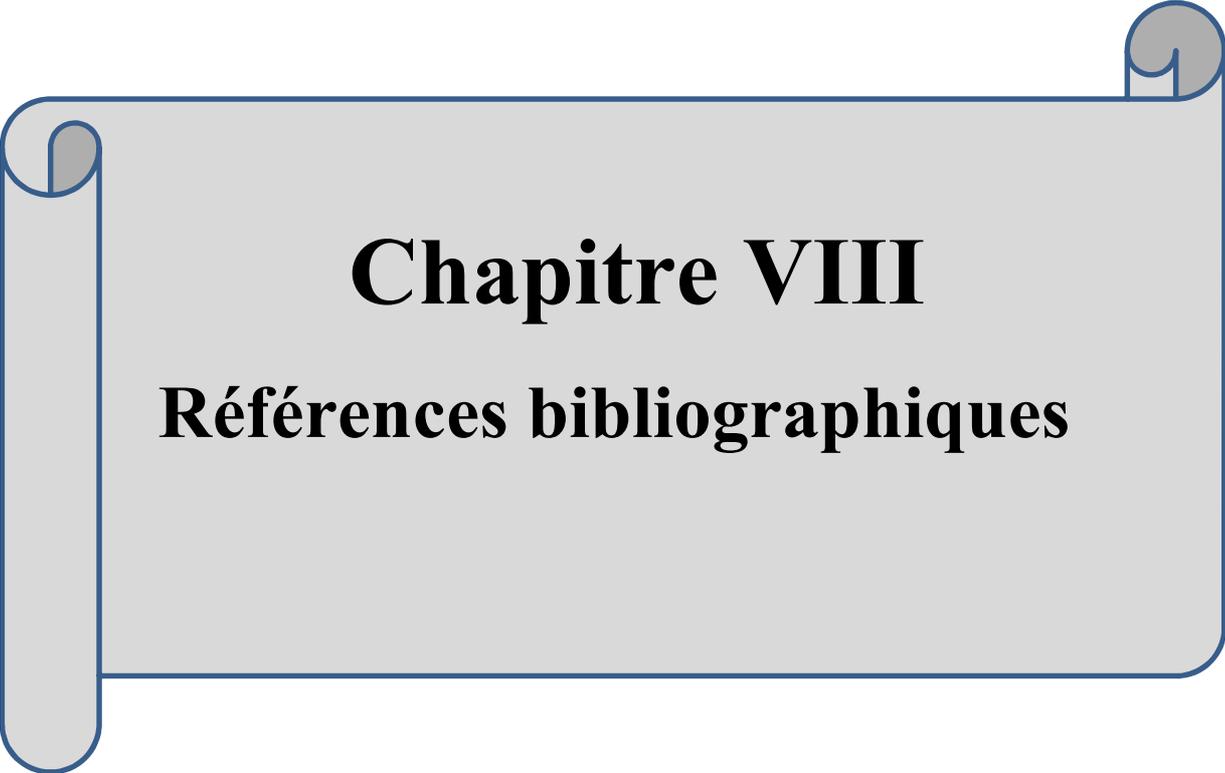
Le dysfonctionnement du protéasome peut conduire à la perturbation de l'homéostasie cellulaire et par conséquent à l'augmentation de la physiopathologie de l'HHcy, notamment dans les maladies cardiovasculaires par l'augmentation du stress oxydatif qui conduit à l'altération cellulaire et fonctionnelle des tissus et par la suite à leur apoptose. L'analyse approfondie des causes et des conséquences du déclin fonctionnel du protéasome durant l'hyperhomocystéinémie permet de mieux définir son rôle dans l'HHcy. Ceci permettra peut-être d'envisager le développement de stratégies visant à ralentir les effets de l'HHcy

qui pourraient être utiles notamment à ralentir l'apparition de certaines maladies associées à l'HHcy.

Le rôle de l'hyperhomocystéinémie comme un facteur de risque indépendant de maladies cardiovasculaires et sa relation directe à certaines affections vasculaires n'est plus à démontrer. Cependant son traitement par l'acide folique ou des vitamines n'ont réduit pas à ce jour la morbidité-mortalité cardio-vasculaire. Les mécanismes moléculaires impliqués dans sa pathogénicité sont multiples, et il est bien établi que l'homocystéine augmente d'une part le stress oxydatif et d'autre part la dysfonction endothéliale. L'analyse de ces mécanismes ouvre des perspectives pour la prévention de la toxicité de l'Hcy sur la fonction vasculaire tant sur le plan de la normalisation de taux d'homocystéinémie que sur celui de la protection des cibles moléculaires de l'homocystéine.

Le rôle préventif du protéasome contre le stress induit par l'HHcy en vue d'une approche thérapeutique nouvelle de cette pathologie en relation avec les maladies cardiovasculaires ou autres est nécessaire en prévenant, au moins en partie, l'augmentation de la production de ROS et la baisse d'activité de l'UPS. De ce fait, il serait intéressant: d'analyser les sous unités du protéasome 19S pour comprendre sa contribution, de purifier le protéasome pour tester la fonction du 26S et 20S séparément pour comprendre leur relatif rôle dans la protéolyse des protéines oxydées, d'identifier les protéines ubiquitylées, et les protéines modifiées sur le protéasome purifié, d'envisager des modèles d'HHcy modérée et chronique in vivo chez l'animal et in vitro sur des cultures de cellules endothéliales ou de cellules musculaires lisses pour comparer l'étude, de tester d'autres voies de signalisation comme le NFkB qui pourrait être impliqué, de tester l'effet combiner d'acide folique et vitamine C sur la fonction du protéasome, d'utiliser des antioxydants ou de chercher des activateurs du protéasome pour prévenir ce déclin de fonction. Nous pensons que l'UPS, pourrait jouer un rôle dans la protection contre le stress oxydatif et la régulation des voies de signalisation impliquée dans la survie cellulaire, en vue d'une approche thérapeutique nouvelle en hyperhomocystéinémie.

En conclusion, nous avons prouvé par cette étude originelle, l'altération du protéasome cardiaque et aortique durant le stress oxydatif dans un modèle d'HHcy intermédiaire en mettant les points sur quelques indices de compréhension de ce système ubiquitine protéasome. Néanmoins des études complémentaires pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels le protéasome est régulé durant l'hyperhomocystéinémie restent à élucider.



Chapitre VIII
Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Glickman M H, Ciechanover A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82 (2): 373-428.
2. Burkhardt D. (2007). Role of proteasomes in disease. *BMC Biochemistry.* 8 (1) S3: 1-12.
3. Baldin V, Coux O. (2004). L'étiquette de la mort. *Med Sci, Paris,* 20: 1156- 1157.
4. Reboud- Ravaux M. (2002). Proteasome inhibitors. *Prog Mol Subcell Biol.* 29:110-125.
5. Lenz H J .Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors. (2003). *Cancer Treat Rev.* 29 (1): 41-8.
6. Adams J. (2004). The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell.* 5: 417-427.
7. Di-Napoli M, Papa F. (2003). The proteasome system and proteasome inhibitors in stroke: Controlling the inflammatory response. *Curr Opin Invest Drugs* 4: 1333-1342.
8. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. (1996). Structure and Function of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem.* 65: 861-847.
9. Hershko A, Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67: 425-479.
10. Lee DH, Goldberg AL. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8 (10): 397-403.
11. Friguet B. (2002). Protein repair and degradation during aging. *Scientific World Journal.* 2: 248-254.
12. Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM, Sadek HA, Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. (2001). Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/ reperfusion. *J Biol Chem.* 276: 30057-30063.
13. Keller J N, Huang F F, Markesbery WR. (2000). decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord. *Neuroscience.* 98 (1): 149–156.
14. Höglinger G U, Carrard G, Michel P P, Medja F, Lombès A, Ruberg M, Friguet B, Etienne C, Hirsch E C.(2003). Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry.* 86 (5): 1297–1307.

15. Concomi M, Petropoulos I, Enod I, Turlin E, Brivile F, Friguet B. (1989). Protection from oxydative inactivation of the 20S proteasome by heat- shock protein 90. *Biochem J.* 333: 407-415.
16. Das R, Ponnappan S, Ponnapan V. (2007). Redox regulation of the proteasome in T lymphocytes during aging. *Free Radic Biol Med.* 42: 541-551.
17. Bulteau AL, Moreau M, Nizad C, Friguet B. (2002). Impairment of proteasome function upon UVA and UVB-inactivation of human keratinocytes. *Free Radic Biol Med.* 32:1157-1170.
18. Davies K J. (2001). Degradation of oxidized proteins by 20S proteasome. *Biochimie.* 83: (3- 4) 301-310.
19. Jung T, Grune T. (2008). The proteasome and its roles in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life.* 60: 743- 52.
20. Shang F, Nowell TR Jr, Taylor A. (2001). Removal of oxidatively damaged proteins from lens cells by the ubiquitin-proteasome pathway. *Exp Eye Res.* 73(2):229-38.
21. Hamelet J, Noll C, Ripoll C, Paul J.-L, Janel N, Delabar J.-M. (2009). Effect of hyperhomocysteinemia on the protein kinase DYRK1A in liver of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378: 673–677.
22. Carluccio A M, Massaro M, Carluccio M, Egeria S, Storelli C, Distanto A, De Caterina R, d'Annunzio G. (2006). Homocysteine Induces Endothelial Activation Through Proteasome Dependent Pathway: Protective Role of Natural Polyphenolic antioxidant. *Circulation.* 114:II_267.
23. Loscalzo J. (1996). The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest.* 98: 5-7.
24. Borson-Chazot F, Guadagnino L, Bernard S, Moulin Ph. (1999). Hyperhomocystéinémie et risque vasculaire. *Act. Méd. Int. - Métabolismes - Hormones – Nutrition.* 1: 31- 34.
25. Booth GL, Wang EE, the Canadian Task Force on Preventive Health Care. Preventive healthcare. (2000). update: screening and management of hyperhomocysteinemia for the prevention of coronary artery disease events. *CMAJ.* 163: 21-29.
26. Chapman R L, Kane S E, Erickson A H. (1997). Abnormal glycosylation of procathepsin L due to N-terminal point mutations correlates with failure to sort to lysosomes. *J Biol Chem.* 272: 8808-16.
27. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem J.* 328 (Pt 3): 721-32.

28. Creagh E M, Martin S J. (2001). Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans.* 29: 696-702.
29. Schimke RT, Doyle D. (1970). Control of enzyme levels in animal tissues. *Annu Rev Biochem.* 39: 929-976.
30. Goldberg AL, St John AC. (1976). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Annu Rev Biochem.* 45: 747-803.
31. Simpson MV. (1953). The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. *J Biol Chem* 201(1): 143-154.
32. Hershko A, Tomkins GM. (1971). Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence. *J Biol Chem.* 246 (3): 710-714.
33. Etlinger JD, Goldberg AL. (1977). A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74 (1): 54-58.
34. Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 81(4): 1100- 1105.
35. Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(3): 1365-1368.
36. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATPdependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(4): 1783-1786.
37. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.* 68: 1015-1068.
38. Wolf DH, Hilt W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta .*1695 (1-3): 19-31.
39. Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. (2008). Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 1786 (Issue 2): 153–177.
40. Bohn S, Beck F, Sakata E, Walzthoeni T, Beck M, Aebersold R F, Baumeister W, Nickell S. (2010). Structure of the 26S proteasome from *Schizosaccharomyces pombe* at subnanometer resolution. *Proc Natl Acad Sci USA.*107: 20992–20997.

41. Groll M, Bochtler M, Brandstetter H, Clausen T, Huber R. (2005). Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem*. 6(2): 222-256.
42. Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*. 268(5210): 533-539.
43. Heinemeyer W, Troendle N, Albrecht G, Wolf DH. (1994). PRE5 and PRE6, the Last Missing Genes Encoding 20S Proteasome Subunits from Yeast? Indication for a Set of 14 Different Subunits in the Eukaryotic Proteasome Core. *Biochemistry*. 33 (40): 12229–12237.
44. Akopian, T.N, Kisselev A.F, Goldberg A.L. (1997). Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Biol. Chem*. 272: 1791- 1798.
45. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 386 (6624): 463-471.
46. Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, Tsukihara T. (2002). The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure*. 10(5): 609-618.
47. Rechsteiner M, Hill C. P. (2005). Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* 15: 27-33.
48. Orłowski M, Cardozo C, Eleuteri A M, Kohanski R. et al. (1997). Reactions of [14C]-3, 4-dichloroisocoumarin with subunits of pituitary and spleen multicatalytic proteinase complexes (proteasomes). *Biochemistry*. 36: 13946-53.
49. Seemuller E, Lupas A, Baumeister W. (1996). Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature*. 382: 468-71.
50. Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf D H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* .272 : 25200-9.
51. Nandi D, Tahiliani P, Kumar, A, Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 31: 137-55.
52. Wenzel T, Baumeister W. (1995). Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nature Struct. Biol*. 2: 199-204.

- 53.** Ma CP, Willy PJ, Slaughter CA, DeMartino GN. (1993). PA28, an activator of the 20 S proteasome, is inactivated by proteolytic modification at its carboxyl terminus. *J Biol Chem.* 268 (30): 22514-22519.
- 54.** Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7 (11): 1062-1067.
- 55.** Kisselev AF, Kaganovich D, Goldberg AL. (2002). Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings. *J Biol Chem.* 277 (25): 22260-22270.
- 56.** Chen P, Hochstrasser M. (1995). Biogenesis, structure and function of the yeast 20S proteasome. *Embo J.* 14: 2620- 30.
- 57.** Arendt C S, Hochstrasser M. (1999). Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *Embo J.* 18: 3575-85.
- 58.** Jager S, Groll M, Huber R, Wolf D H, Heinemeyer W. (1999). Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol.* 291: 997- 1013.
- 59.** Baumeister W, Dahlmann B, Hegerl R, Kopp F. et al. (1988). Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett.* 241: 239-45.
- 60.** Ramos P C, Hockendorff J, Johnson E S, Varshavsky A, Dohmen R J. (1998). Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* 92 : 489-99.
- 61.** Hirano Y, Hendil K B, Yashiroda H, Iemura S. et al. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature.* 437: 1381-5.
- 62.** Li X, Kusmierczyk A R, Wong P, Emili A, Hochstrasser M. (2007). Beta-Subunit appendages promote 20S proteasome assembly by overcoming an Ump1-dependent checkpoint. *Embo J.* 26 : 2339-49.
- 63.** Hirano Y, Hayashi H, Iemura S, Hendil K B et al. (2006). Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell.* 24 : 977-84.

64. Le Tallec B, Barrault M B, Courbeyrette R, Guerois, R et al. (2007). 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol Cell*. 27: 660-74.
65. Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. (1998). The proteasome: paradigm of a self compartmentalizing protease. *Cell*. 92(3): 367-380.
66. Ortega J, Bernard Heymann J, Kajava AV, Vicença Ustrell V, Rechsteiner M, AC. (2005). The Axial Channel Of The 20 S Proteasome Opens Upon Binding Of The Pa200 Activator. *Journal of Molecular Biology*, 346 (5): 1221–1227.
67. Tanahashi, N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N et al. (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferongamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem*. 275 : 14336-45.
68. Coux O. (2011). Protéasome, ubiquitine et protéines apparentées à l'ubiquitine. Editors TEC ET DOC Lavoisier – Paris. 482 p.
69. Glickman M H, Rubin D M, Fried V A, Finley D. (1998). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* .18: 3149-62.
70. Adams G M, Falke S, Goldberg A L, Slaughter C A et al. (1997). Structural and functional effects of PA700 and modulator protein on proteasomes. *J Mol Biol*. 273: 646-57.
71. Peters JM, Cejka Z, Harris JR, Kleinschmidt JA, Baumeister W. (1993). Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol* 234 (4): 932-937.
72. Walz J, Erdmann A, Kania M, Typke D, Koster AJ, Baumeister W. (1998). 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol*. 121(1): 19-29.
73. Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried. VA, Finley D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*. 94(5): 615-623.
74. Verma R, Deshaies R J. (2000). A proteasome how unit: the case of the missing signal. *Cell*. 101: 341-344.
75. Qiu XB, Ouyang SY, Li CJ, Miao S, Wang L, Goldberg AL. (2006). hRpn13/ADRM1/GP110 is a novel proteasome subunit that binds the deubiquitinating enzyme, UCH37. *EMBO J*. 25 (24): 5742- 5753.

76. Tsukamoto O, Minamino T, Kitakaze M. (2010). Functional alterations of cardiac proteasomes under physiological and pathological conditions. *Cardiovascular Research*. 85: 339–346.
77. Hook B, Schagat T. (2011). *Functional Proteomics Techniques to Isolat and Characterize the Human Proteasome*. Promega Corporation. 1- 11.
78. Kohler A, Cascio P L, Eggett DS, Woo K.M. et al. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell*. 7: 1143-52.
79. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH. et al. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*. 298: 611-5.
80. Pickart CM, Cohen RE. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(3): 177-187.
81. Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M. (1994). A 26S protease subunit that binds ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem*. 269: 7059-7061.
82. Fu H, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, van Nocker S, Finley D, Vierstra RD. (1998). Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *J Biol Chem*. 273(4): 1970-1981.
83. Hofmann K, Falquet L. (2001). A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* 26(6): 347-350.
84. Fu H, Reis N, Lee Y, Glickman MH, Vierstra RD. (2001). Subunit interaction maps for theregulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J*. 20 (24): 7096-7107.
85. Deveraux Q, Jensen C, Rechsteiner M. (1995). Molecular cloning and expression of a 26 S protease subunit enriched in dileucine repeats. *J Biol Chem*. 270 (40): 23726-23729.
86. Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*. 416 (6882): 763-767.
87. Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, Hofmann K, Walters KJ, Finley D, Dikic I. (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*. 453 (7194): 481-488.

- 88.** Schreiner P, Chen X, Husnjak K, Randles L, Zhang N, Elsasser S, Finley D, Dikic I, Walters KJ, Groll M. (2008). Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin homology domain interaction. *Nature*. 453 (7194): 548-552.
- 89.** Boutet SC, Disatnik MH, Chan LS, Iori K, Rando TA. (2007). Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. *Cell*. 130 (2): 349-362.
- 90.** Elsasser S, Finley D. (2005). Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol*. 7(8): 742-749.
- 91.** Verma R, Oania R, Graumann J, Deshaies RJ. (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell*. 118(1): 99-110.
- 92.** Bossis G, Malnou C E, Farras R, Andermarcher E, Hipskind R, Rodriguez M, Schmidt D, Muller S, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M. (2005). Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol. Cell. Biol*. 25 (16): 6964-79.
- 93.** Braun B C, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell. Biol*. 1: 221-226.
- 94.** Strickland E, Hakala K, Thomas P J, DeMartino G. (2000). Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26S proteasome. *J. Biol. Chem*. 275: 5565-5572.
- 95.** Beararoudj N, Goldberg A L. (2000). PAN, the proteasome-activating nucleatidase from archaeobacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone. *Nat. Cell. Biol*. 2: 833-839.
- 96.** Lee C, Schwartz MP, Prakash S, Iwakura M, Matouschek A. (2001). ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol Cell*. 7(3): 627-637.
- 97.** Prakash S, Tian L, Ratliff KS, Lehotzky RE, Matouschek A. (2004). An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat Struct Mol Biol*. 11(9): 830-837.
- 98.** Coux O. (2002). The 26S proteasome. *Prog. Mol. Subcell. Bio*. 129: 85-107.
- 99.** Yao T, Cohen R E. (2002). A crytic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*. 419 : 403-7.

- 100.** Isono E, Nishihara K, Saeki Y, Yashiroda H, Kamata N, Ge L, Ueda T, Kikuchi Y, Tanaka K, Nakano A, Toh-e A. (2007). The assembly pathway of the 19S regulatory particle of the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell*. 18(2): 569-580.
- 101.** Le Tallec B. (2008). Identification et caractérisation de nouveaux facteurs d'assemblage du protéasome 26S chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Life Sciences. Université Paris Sud - Paris XI, French. 299 p.
- 102.** Saeki Y, Toh-e A, Kudo T, Kawamura H, Tanaka K. (2009). Multiple Proteasome-Interacting Proteins Assist the Assembly of the Yeast 19S Regulatory Particle. *Cell*. 137(5): 900–913.
- 103.** Kaneko T, Jun Hamazaki, Shun-ichiro Iemura, Katsuhiro Sasaki, Kaori Furuyama, Tohru Natsume, Keiji Tanaka, Shigeo Murata. (2009). Assembly pathway of the mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell*. 137 (5):914-25.
- 104.** Demartino GN, Gillette TG. (2007). Proteasomes: machines for all reasons. *Cell*. 129(4): 659-662.
- 105.** Baldin V, Militello M, Thomas Y, Doucet C et al. (2008). A novel role for PA28gamma-proteasome in nuclear speckle organization and SR protein trafficking. *Mol Biol Cell*. 19: 1706-16.
- 106.** Cascio P, Call M, Petre BM, Walz T, Goldberg A L. (2002). Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *EMBO J*. 21: 2636-45.
- 107.** Ustrell V, Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M. (2002). PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *Embo J*. 21: 3516-25.
- 108.** Kajava A V, Gorbea C, Ortega J, Rechsteiner M, Steven A C. (2004). New HEAT-like repeat motifs in proteins regulating proteasome structure and function. *J Struct Biol*. 146: 425-30.
- 109.** Ozkaynak E, Finley D, Varshavsky A. (1984). The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature*. 312 (5995): 663-666.
- 110.** Finley D, Chau, V. (1991). Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol*. 7: 25-69.
- 111.** Wilkinson K D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 11: 141-8.

- 112.** Vijay-Kumar S, Bugg, C.E, Cook W.J. (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 194: 531-544.
- 113.** Hicke L, Schubert H.L, Hill C.D. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Biol.* 6: 610-21.
- 114.** Pickart CM. (2001). Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 503-533.
- 115.** Ravid T, Hochstrasser M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (9):679-90.
- 116.** Petroski M D, Deshaies R J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6: 9-20.
- 117.** Ardley H C, Robinson PA.(2004).The role of ubiquitin-protein ligases in neurodegenerative disease. *Neurodegener Dis.* 1(2-3): 71-87.
- 118.** Robinson P A, Ardley H C. (2004). Ubiquitin-protein ligases. *J Cell Sci.* 117: 5191-5194.
- 119.** Scheffner M, Nuber, U, Huibregtse J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature.* 373: 81-3.
- 120.** Hoppe T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci.* 30: 183-7.
- 121.** Swilkinson K D, Ventii K H, Friedrich K L, Mullally J E. (2005). The ubiquitin signal: assembly, recognition and termination. *Symposium on ubiquitin and signaling. EMBO Rep.* 6: 815-20.
- 122.** Pickart CM. (1998). Polyubiquitin chains. In: *Ubiquitin and the biology of the cell.* Ed by Peters JM Harris JR, Finley D. Plenum press, New York. 19 -63.
- 123.** Pickart CM. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends Biochem. Sci.* 25: 544 - 548.
- 124.** Hjerpe R, Rodriguez M S. (2008). Alternative UPS drug targets upstream the 26S proteasome. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 1126-40.
- 125.** Haglund K, Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J.* 24: 3353-9.
- 126.** Hicke L, Dunn R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 141-72.

- 127.** Glockzin S, Ogi F. X, Hengstermann A, Scheffner M, Blattner C. (2003). Involvement of the DNA repair protein hHR23 in p53 degradation. *Mol. Cell. Biol.* 23: 8960-9.
- 128.** Herrmann J, Lerman L O, Lerman, A. (2007). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res.* 10:, 1276-91.
- 129.** Amerik A Y, Hochstrasser M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695: 189-207
- 130.** Kisselev A F, Goldberg A L. (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 8: 739-58.
- 131.** Naujokat C, Fuchs D, Berges C. (2007). Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochim Biophys Acta.* 1773: 1389-97.
- 132.** Fenteany G, Standaert R F, Lane W S, Choi S et al. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunitspecific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science.* 268: 726-31.
- 133.** Glas R, Bogyo M, McMaster J S, Gaczynska M, Ploegh H L. (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature.* 392: 618-22.
- 134.** Kuhn D J, Chen Q, Voorhees P M, Strader J S et al. (2007). Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood.* 110: 3281-90.
- 135.** Gao Y, Lecker S, Post M J, Hietaranta A J et al. (2000). Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I kappa B alpha degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. *J Clin Invest.* 106: 439-48.
- 136.** McCutchen-Maloney S L, Matsuda K, Shimbara N, Binns D D et al. (2000). cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. *J Biol.* 275: 18557-65.
- 137.** Hu Z, Zhang Z, Doo E, Coux O. et al. (1999). Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol.* 73: 7231-40.
- 138.** Apcher G S, Heink S, Zantopf D, Kloetzel P M. et al. (2003). Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal alpha and beta subunits. *FEBS Lett.* 553: 200-4.

- 139.** Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S. (1996). Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem.* 119:572-6.
- 140.** Mathes E, O'Dea E, Hoffmann A, Ghosh G. (2008). NF-kappaB dictates the degradation pathway of IkappaB alpha. *EMBO J.* 27:1357-67.
- 141.** Shembade N, Ma A, Harhaj E. (2010). Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science.* 327:1135-1139.
- 142.** Schwartz AL, Aaron Ciechanover A. (1999). The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases *Annual Review of Medicine.* 50: 57-74.
- 143.** Zolner TM, Pien C, Elliot PJ, Kaufman R, Boehncke WH. (2002). Protéasome inhibition reduces superantigen-mediated T cell activation and the severity of psoriasis in a SCID-hu model. *J Clin Invest.* 109: 671-679.
- 144.** Elliott PJ, Zolner TM, Boehncke WH. (2003). Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *J Mol Med,* 81: 235- 245.
- 145.** Khor R, Mc Elroy LJ, Whitaker GR. (2003). The ubiquitin vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of influenza virus into host cells. *Traffic.* 4: 857-868.
- 146.** Staehner H, Capell A, Pesold B, Citron M, Kloetzel P M, Selkoe, DJ, Roming H, Mendla, K, Haass C. (1998). Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J. Biol. Chem.* 273: 32322-32331.
- 147.** Ohkita M, Kobayashi Y, Itoh E, Uemachi H, Matsumura Y. Involvement of Proteasome in Endothelin-1 Production in Cultured Vascular Endothelial Cells. (2002). *The Japanese Journal of Pharmacology.* 88 (2): 197-205.
- 148.** Hayashi T, Faustman D. (1999). NOD mice are effective in proteasome production and activation of NF-kappaB. *Mol Cell Biol.* 19(12):8646-59.
- 149.** Perrin A J, Xiuju Jiang, Birmingham CL, .Y So NS, Brumel JH. (2004). Recognition of bacteria in the cytosol of mammalian cells by the ubiquitin system. *Current Biology.* 14 (9): 806–811.
- 150.** Goldberg A L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 426: 495-499.

- 151.** Brot N, Weissbach H. (2000). Peptide methionine sulfoxide reductase: Biochemistry and physiological role. *Biopolymers*. 55: 288 – 296.
- 152.** Holmgren A. (2000). Antioxidant Function of Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2(4): 811-820.
- 153.** Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 233:346-357.
- 154.** Dalle-Donnea I, Rossib R , Giustarinib D , Aldo Milzania A , Roberto Colombo R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. 329 23 – 38.
- 155.** Davies K J. (1993). Protein modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes. *Biochem Soc Trans*. 21: 346- 353.
- 156.** Dean R T, Fu S, Stoker R, Davies M J. (1997). Biochemistry and pathology of radical - mediated protein oxidation. *Biochem J*. 324: 1-18.
- 157.** Stadtman, ER, Levine, R L. (2000). Protein oxidation. *Ann Ny ACad Sci* , 899: 191-208.
- 158.** Thorpe SR, Baynes JW. (2003). Proteasome inhibition enhances lipofuscin formation. *Ann NYAcad Sci*, 973: 309-312.
- 159.** Friguet B, Stadtman ER, Szweda LI. (1994). Modification of glucose-6- phosphate dehydrogenase by 4- hydroxy 2- nonenal. Formation of cross- linked protein that inhibits the multicatalytic protease. *J Biol Chem*. 269: 21639- 21643.
- 160.** Szweda, PA, Friguet B , Szweda L I. (2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radical Biology and Medzcin*. 33 (1) :29–36.
- 161.** Bluteau AL, Verbeke P, Petropoulos I, Chaffotte AF, Friguet B .(2001). Proteasome inhibition in glyoxal – treated fibroblasts and resistance of glycated glucose 6- phosphate dehydrogenase in vitro. *J Biol Chem*. 276: 45662- 45668. *Gerontology*. 36: 1495-1502.
- 162.** Levine RL, Stadtman ER. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*. 36: 1495- 1502.
- 163.** Anselmi B. Concomi M. Veyrat-Durebex C. Turlin E. Brivile F. Alliot J. Friguet B. (1998). Dietary self- selection can compensate an age- related decrease of rat liver 20S proteasome activity observed with standard diet. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 53: B 173- 9.
- 164.** Friguet B, Szweda LI. (1997). Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein. . *FEBS Letters*. 17: 21–25.

- 165.** Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJ. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36: (12) 2519–2530.
- 166.** Coux O, Goldberg A L. (1989). Enzymes catalyzing ubiquitination and proteolytic processing of the p105 precursor of nuclear factor kappaB1. *J Biol Chem*. 273: 8820-8.
- 167.** Sen R, Baltimore D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 46: 705- 716.
- 168.** Baeuerle PA , Henkel T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 12:141-79.
- 169.** Aggarwal B B. (2000). Apoptosis and nuclear factor-kappaB : atale of association and dissociation[In Pross Citation] *Biochem Pharmacol*. 60: 1033- 1039.
- 170.** Bours V, Bentires- Alj M, Hellin A , Viatour P , Robe P , Delhalle S , Benoit V, Merville M. (2000). Nuclear factor- kappa B cancer and apoptosis [In Pross Citation] *Biochem Pharmacol*, 60: 1085- 1089.
- 171.** Courtoi G, Gilnuoe TD. (2006).Mutation in the NFkB signaling pathway: implication for human disease. *Oncogène Octo 30, 25: (51)-6831-43*.
- 172.** Zhijian J. Chen ZJ. (2005). The NF-κB signaling pathways. *Nat Cell Biol*. 7 (8): 758–765.
- 173.** Pomerantz J L, Denny E M, Baltimore D. (2002). CARD11 mediates factor-specific activation of NFkB by the T cell receptor complex. *The EMBO journal*. 21: (19) 5184- 5194.
- 174.** Hayden MS, Ghosh S. (2004). Signaling to NFkappaB. *Genes Dev*. 18: 2195- 2224.
- 175.** Chen Z J, Hagler J, PalJombella V J, Melandri F, Seherer D, Ballard D, Maniatis T. (1995). Signal-induced site- specific phosphorylation targets IKB x to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*. 9: 1586-1597.
- 176.** Ciechanover A, Gonen H, Bercovich B, Cohen S, Fajerman I, Israël A, Mercurio F, Kahana C, Schwartz AL, Iwai K, Orian A. (2001). Mechanisms of ubiquitin-mediated, limited processing of the NF-kappaB1 precursor protein p105. *Biochimie*. 83:341–9.
- 177.** Li N, Karin M. (1999). Is NF- Kappa B the sensor of oxidative stress? *Faseb J* 13: 1137-1143.

- 178.** Pahl HL. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Oncogene*, 18: 6853-6866.
- 179.** Orlowski R Z, Kuhn D J. (2008). Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res* .14, 1649-57.
- 180.** Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. (2000). Apoptosis in Neural Development and Disease. *Annu Rev Neurosci*. 23: 73-87.
- 181.** Stennicke H, Salyesen G. (1997). Biochemical Characteristics of Caspases3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem*. 41: 25719-25723.
- 182.** Layrik I N, Golks A, Krammer PH. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 115: 2665-2672.
- 183.** Wang Z, Liu Y, Cui Y. (2005). Pathways to caspase activation. *Cell Biology Internationa*. 129: 489-496.
- 184.** Chipuk J.E, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer D D, Green D R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science*. 309: 1732-1735.
- 185.** O'Neil-L, Kaltschmidt C. (1997). NF-KB: a Crucial Transcription Factor for Glial and Neuronal Cell Function. *Trends Neurosci*. 20: 252-258.
- 186.** Wang C Y, Mayo M W, Korneluk R G, Goeddel DV, Baldwin A S Jr. (1998). NF-Kappa B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and CIAP1 and CIAP2 to caspase 8 activation. *Science*. 281: 16806 1683.
- 187.** Reed JC. (1998). Bcl2 family protein. *Oncogene*. 17: 3225 – 3236.
- 188.** Ravi R, Bedi A, Fuchs EJ, Bedi A. (1998). CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB. *Cancer Res*. 58: 882-886.
- 189.** Jesenberg V, Jentsch S (2002). Deadly en counter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3: 112- 121.
- 190.** Lee J C, Peter ME. (2003). Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol Rev*. 193: 39 - 47.
- 191.** Galban S, Duckett CS. (2010). XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Differ*. 17: 54- 60.
- 192.** Marivin A, Berthelet J, Plenchette S, Dubrez L. (2012). The Inhibitor of Apoptosis (IAPs) in Adaptive Response to Cellular Stress. *Cells*. 1(4): 711-737.
- 193.** Hu S, Yang X. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/ DIABLO. *J.Biol Chem* . 278: 10055- 10060.

- 194.** Wertz I E , O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Arawind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone D L, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A 20 down-regulated NF kappa B signaling. *Nature*. 430: 694- 699.
- 195.** Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM. (1999). Dephosphorylation Targets Bcl2 for Ubiquitin- dependent Degradation: A link between the Apoptose and the proteasome Pathway. *JEM*. 189: 18156- 1822.
- 196.** Bredt DS, Snyder SH. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 682-685.
- 197.** Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 256: 225-228.
- 198.** Knowles RG, Moncada S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*. 298 (Pt 2):249- 258.
- 199.** Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007: 87:315-424.
- 200.** Balligand JL, Feron O, Dessy C. (2009). Enos activation by physical forces: From short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev*. 89: 481-534.
- 201.** Jiang J, Cyr D, Babbitt RW, Sessa WC, Patterson C. (2003). Chaperone-dependent regulation of endothelial nitric-oxide synthase intracellular trafficking by the co-chaperone/ ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem*. 278: 49332-49341.
- 202.** Musial A, Eissa NT. (2001). Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem*. 276:24268-24273.
- 203.** Rizza S, Montagna C, Di Giacomo G. (2014). S-Nitrosation and Ubiquitin-Proteasome System Interplay in Neuromuscular Disorders In Neuromuscular Disorders. *International Journal of Cell Biology*. ID 428764 : 1-10.
- 204.** Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. (2003) Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique. 91-96.
- 205.** Favier A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. *L'actualité Chimique*. 108-115.

- 206.** Durackova Z, Djrolo F, Hougbe, H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M. (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdzakova A (ed). 19-43.
- 207.** Abuja PM, Albertini R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipidperoxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 306:1-17.
- 208.** Lehucher-Michel M P, Lesgards J F, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. 30: 1076 -1081.
- 209.** Bartosz, G. (2003) Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9: 5-21.
- 210.** Halliwell B, Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*. 142: 31-2.
- 211.** Kohen R, Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30: 620-650.
- 212.** Halliwell B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine* 46: 531–542.
- 213.** Halliwell B, Gutteridge J M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 219(1): 1–14.
- 214.** Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Delattre J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. IN : *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Delattre J, Durand G, Jardillier J.C. Eds: Médecine-sciences. Flammarion (Paris). Pp: 59-81.
- 215.** Valko M, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160: 1-40.
- 216.** Sachdev S, Davies KJA. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*. 44: 215–223.
- 217.** Martínez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 77: 147-161.
- 218.** Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med*13, p. 341.

- 219.** Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. (2006). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta.* 367 : 36-47.
- 220.** Saad A, Virella G, Chassereau Ch et al. (2006). OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res.* 47: 1975-1983.
- 221.** Levine R L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free. radic. Biol. Med.* 32: 790-796.
- 222.** Jung T, Bader N, Grune T. (2007) Oxidized proteins : intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 462: 231-237.
- 223.** Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat A G, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat J.L, Sauvaigo S. (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem.* 383(6): p. 93.
- 224.** Montagnier L, Olivier R, Pasquier C. (1998). Oxidative stress in cancer. AIDS, and neurodegenerative diseases. *Free. Radic. Biol. Med.* 22: 359-378.
- 225.** Sohal R S, Mockett R J, Orr WC. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free Rad. Biol. Med.* 33(5): 575-586.
- 226.** Urban Th, Hurbain I, Urban M, Clément A, Housset B. (1995). Oxydants et antioxydants. Effets biologiques et perspectives thérapeutiques. *Ann. Chir.* 49: 427-434.
- 227.** Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne J.O. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 16: 233-239.
- 228.** Jacob C, Knight I, Winyard P G. (2006). Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signaling pathways. *Biol. Chem.* 387: 1385-97.
- 229.** Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ. (2002). Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine.* 33: 337-349.
- 230.** Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies.* 327: 649-662.
- 231.** Mates J M, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32: 595-603.

- 232.** Jones DP, Mody VC, Carlson JL et al. (2002). Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Rad Biol Med.* 33:1290-1300.
- 233.** Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, et al. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*, 52: 601-623.
- 234.** J. Haleng J, Pincemail J O, Defraigne C, Charlier J P C. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege.* 62: 10: 628-638.
- 235.** Rom G M, Rauckman E L. (1984). Spin mpping of superoxide and hydroxyl radicals. *Meth. Enzymol.* 105: 283-293.
- 236.** Mudd SH, Levy HL, Skovby F. (1995). Disorders of transsulfuration. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 7th ed. Vol.1. New York: Mc Graw-Hill Book Co. 1270-327.
- 237.** Demuth K, Drunat S, Paul J-L, Moatti N. (2000). Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. *Médecine/sciences.* 16: 1081-90.
- 238.** Booth GL, Wang EE, the Canadian Task Force on Preventive Health Care. Preventive health care, (2000) update: screening and management of hyperhomocysteinemia for the prevention of coronary artery disease events. *CMAJ.* 163: 21-29.
- 239.** Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. (2006). *J Nutr.* 136:1741S-1749S.
- 240.** Selhub J. (1999). Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 19: 217-46.
- 241.** Buysschaert M. (2004). L'homocystéine : un paramètre à suivre ? *Journal du médecin (Belgique).* n°1563.
- 242.** Bottiglieri T. (2005). homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29: 1103-1112.
- 243.** Mouchabac S. (2008). Homocystéine, hyperhomocystéinémie et dépression. *Neuropsychiatrie: Tendances et Débats.* 2008. 32: 9-18.
- 244.** De Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. (2001). Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr.* 73: 1027- 1033.

- 245.** Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant J. (2001). Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood*. 97:1092-1098.
- 246.** Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor LM, Jr. (1994). Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem*. 40:873-81.
- 247.** Ueland PM, Refsum H, Brattström L. (1992). Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis Jr RB Ed. *Atherosclerotic cardiovascular disease Marcel Dekker, Inc. hemostasis, and endothelial function*. New York. 183-236.
- 248.** Ueland PM, Refsum H. (1989). Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med*. 114:473-501.
- 249.** Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. (1992). Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 22:79-87.
- 250.** De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. (2002) Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev*. 54: 599-618.
- 251.** Welch G N, Loscalzo J. (1998). Homocysteine and atherothrombosis. *N Eng J Med*. 338: 1042-50.
- 252.** Refsum H, Ueland M, Nygaard O et al. (1998). Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med*. 49: 31-62.
- 253.** McCully KS. (1969). Vascular pathology of homocysteinemia : implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol*. 56: 111-112.
- 254.** Wilcken D, Wilcken B. (1976). The pathogenesis of coronary artery disease: a possible role for the methionine metabolism. *J Clin Invest*. 57: 1079-1082.
- 255.** Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland P M, Vollsted S E. (1997). Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl Med*. 337:220-236.

- 256.** Harpel PC, Chang VT, Borth W. (1992). Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein (a) to fibrin : a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 10193-7.
- 257.** The homocysteine Studies Collaboration. (2002). Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke : a meta-analysis. *JAMA.* 288 : 2015-2022.
- 258.** Demuth K, Drunat S, Paul JL, Moatti N. (2000). Hyperhomocystéine et athérosclérose. *M/S* 16:1081-90
- 259.** Loscalzo J. (1996). The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 98:5-7.
- 260.** Miller A, Mujumdar V, Shek E, Guillot J, Angelo M, Palmer L et al. (2000). Hyperhomocysteinemia induced multiorgan damage, *Health Vessels.* 15: 135–143.
- 261.** Vahabzed Z, Abolfathi A, Ansari M K, Safaiyan A. (2008). Effect of dietary Taurine on lipid profile and oxidative stress in tissues of homocysteine-treated rats, *Res. J. Biol. Sci.* 3 (11): 1271–1275.
- 262.** Zhang C Y, Cai M.T, Adachi S, Oshiro T, Aso R.J K, et al. (2001). Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response, *Biol.Chem.* 276: 35867–35874.
- 263.** Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, Fabunni RP, Robeston RM, Loscalzo J. (2004). Atherosclerotic vascular disease conference: writing group III: pathophysiology. *Circulation* 109 (21): 2617-2625.
- 264.** Olsewski A, McCully K. (1993). Homocysteine, metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. *Free Radic Biol Med.* 14: 683-93.
- 265.** Faraci FM, Lentz SR. (2004). Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke.* 35, 345-347.
- 266.** Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC. (1999). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood.* 94: 959-67.
- 267.** Upchurch GR, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF, Loscalzo JR. (1997). Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 272:17012-7.

- 268.** Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Lentz SR. (2002). Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22: 1996-2002.
- 269.** Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C, Loscalzo J. (2001). Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 12503-8.
- 270.** Matté C, Mackdanz V, Stefanelo FM. (2009). Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA Damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid, *Neurochem. Int.* 54: 7-13.
- 271.** Collins T, Cybulsky MI. (2001). NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest.* 107: 255-64.
- 272.** Au-Yeung KK, Woo CW, Sung FL, Yip JC, Siow YL, O K. (2004). Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells via oxidative stress. *Circ Res.* 94: 28-36.
- 273.** Hankey GJ, Eikelboom JW. (1999). Homocysteine and vascular disease. *Lancet.* 354: 407-413.
- 274.** Ross R. (1999). Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340: 115-26.
- 275.** Stamler J, Osborne J, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, et al. (1993). Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest.* 91: 308-18.
- 276.** Cacoub P, Gatel A, Sbai A, et al. (1996). Hyperhomocystéinémie, athérosclérose et thromboses artérielles et veineuses. *Ann Méd Interne.* 147: 352-360
- 277.** Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. (1993). Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 13:1327-1333.
- 278.** Rodgers GM, Kane WH. (1986). Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest.* 77:1909-1916.
- 279.** Beaudoux J-L, Jacob N, Giral P et al. (2001). Nouveaux marqueurs biologiques non lipidiques de l'athérosclérose. *Ann Med Interne.* 152, 169-179.

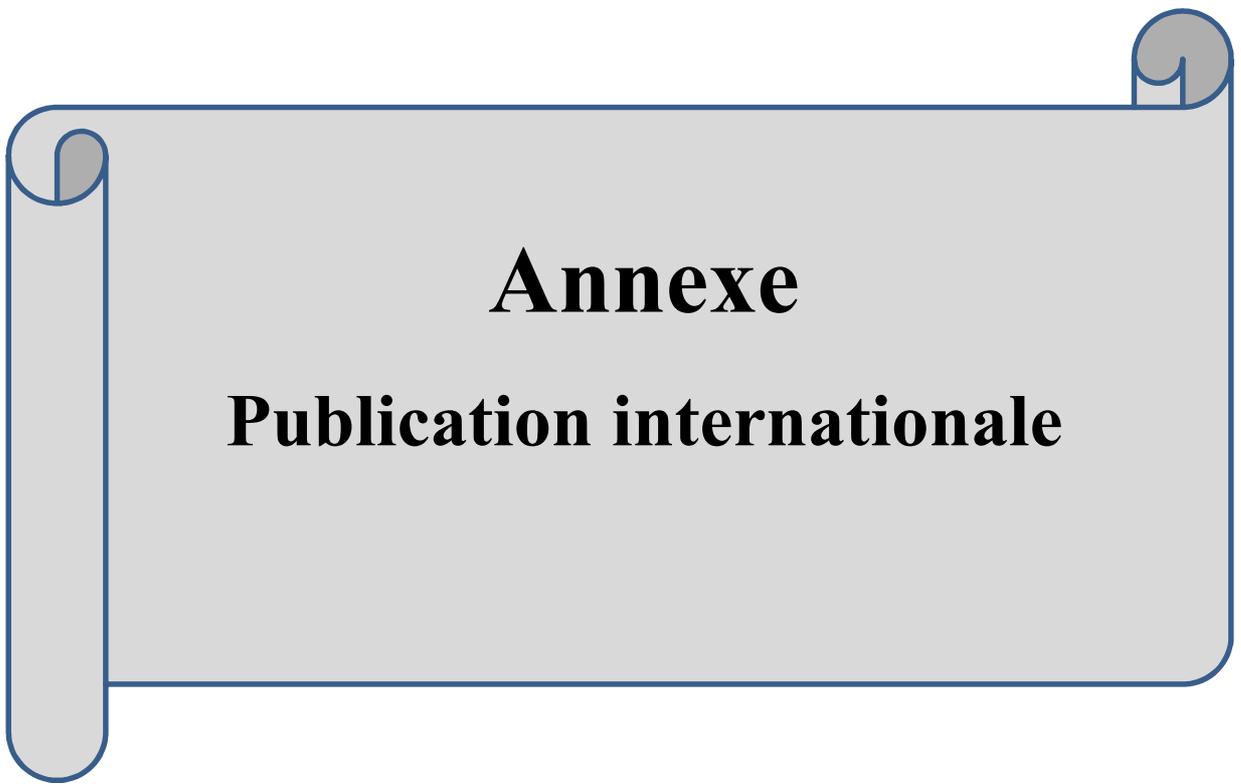
- 280.** Tsai JC, Wang H, Perrella MA, et al. (1996). Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 97: 146-53.
- 281.** Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. (2001). Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein- 1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation.* (103: 2717-23.
- 282.** Hofman MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ Jr, Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM, Schmidt AM. (2001). Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest.* 107: 675-83.
- 283.** Xu D, Neville R, Finkel T. (2000). Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Lett.* 470:20- 4.
- 284.** Zhang G and Dai C. (2001). Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases. *Thromb Res.* 104: 187-95.
- 285.** Tyagi N, Ovechkin AV, Lominadze D, Tyagi SC. (2006). Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem* 98: 1150-62.
- 286.** Lee ME, Wang H. (1999). Homocysteine and hypomethylation. A novel link to vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 9: 49-54.
- 287.** Laird PW. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* 3: 253-66.
- 288.** Tinton S, Buc-Calderon P. (1995). Inhibition of protein synthesis induced by adenine nucleotides requires their metabolism into adenosine. *Biochem Pharmacol.* 50: 481-8.
- 289.** Schroder M, Kaufman RJ. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 74:739 -89.
- 290.** Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM. (2002). The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 411-21.
- 291.** Pearson TA. (2002). New tools for coronary risk assessment: what are their advantages and limitations?. *Circulation.* 105, 886-892.

- 292.** Conri C, Constans J, Parrot F, et al. (2000) Homocystéinémie : rôle en pathologie vasculaire. *La Presse Médicale*. 29: 737-741.
- 293.** Wald DS, Law M, Morris JK. (2002). Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a metaanalysis. *BMJ*, 325: 1202-1206.
- 294.** Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, et al. (2003). German, Austrian and Swiss Homocysteine Society: Consensus Paper on the rational Clinical Use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases – Guidelines and Recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 41: 1392-1403.
- 295.** Loscalzo J. (2006). Homocysteine trials – Clear outcomes for complex reasons. *N Engl J Med*. 354: 1629-1632.
- 296.** Borson-Chazot F, Guadagnino L, Bernard S, Moulin Ph. (1999) Hyperhomocystéinémie et risque vasculaire. *Act. Méd. Int. - Métabolismes - Hormones – Nutrition*. III (1): 31- 34.
- 297.** Spence JD. (2006). Homocysteine : call off the funeral. *Stroke*. 37: 282-283.
- 298.** Bonna KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K. (2006). Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 354: 1578- 1588.
- 299.** The Heart Outcome Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. (2006). Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med*. 354, 1567 – 1577.
- 300.** Nappo F, De Rosa N, Marfella R, et al. (1999). Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA*. 281: 2113-8.
- 301.** Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. (1999) Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia. An effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation*. 99: 1156-60.
- 302.** Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY. (1999). Molecular mechanisms of neutrophil- endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ Res* 84: 516-24.
- 303.** Schäffler A, Menche N. (2004). *Anatomie Physiologie Biologie*. Ed. Maloine, Paris: 261-290.

- 304.** Hill R W, Wyse G A. (1989). *Animal physiology*. Second edition: Harper Colins Publishers Inc. New York. 344-345.
- 305.** Dadoune JP, Hadjisky P, Siffori JP, Vendrely E. 1990). *Histologie*. Flammarion Medecine Sciences. Paris. 193-197.
- 306.** Machado F. R., Ferriera A.G.K., Cumha A. A.da, Tagliari B., Mussilini B H. M, .Wofchuk S, Wyse A T. S, (2010). Homocysteine decreases glutamate uptake Na^+ , K^+ - ATPase activity and increases oxidative stress: prevention by vitamine C. *Journal of Neural Transmission*. 1-30.
- 307.** M. Coëffier, R. Gloro, N. Boukhetala, A. Moutaz, S. Lecleire, N. Vandaele, et al. (2010). Increased proteasome-mediated degradation of occluding in irritable bowel syndrome, *Am. J. Gastroenterol.* 105: 1181–1188.
- 308.** Lecleire S, Hassan A, Marion-Letellier R, Antonietti M, Sayove G, Bole- Feysot C, et al. (2008). Combined glutamine and arginine decrease proinflammatory cytokine production by biopsies from Crohn's patients in association with changes in nuclear factor-kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways, *J. Nutr.* 138:2481–2486.
- 309.** Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal.Biochem.* 72: 248–254.
- 310.** Uchiyama M, Mihara M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, *Anal. Biochem.* 86 271–278.
- 311.** Ellman, G L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem. Biophys.* 82: 70–77.
- 312.** Marklund SL. (1985). Pyrogallol autooxidation. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical* Greenwald, R.A. ed. Boca raton, Fla: CRC Press. 243-247.
- 313.** Clairborne A. (1985). Catalase activity. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Greenwald, R.A. ed Boca Raton, Fla: CRC Press. 283-284.
- 314.** Flohe L, Gunzler W.A, (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105: 114–121.
- 315.** Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P,Gołabek I, BartuśS, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biologicalmaterial by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta.* 274 (2):177 - 188.
- 316.** Martoja R, Martoja PM. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Paris : Edition Masson. 345.

- 317.** Rodriguez AP, Coux O, Manuel S. (2008). Basic technique to study the ubiquitin proteasome system: Araon ciechanover pratical course. In proteolyse. CIC bio GUNE, Bilbao. 1-38. (<http://www.in.proteolys>. 1-15 Septembre).
- 318.** Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirt KL, Krichna MC et al. (2008). Pharmacological doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenographts in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 11105- 11109.
- 319.** Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krichna MC, Shacter E et al. (2007). Ascorbate in pharmacologic concentrations selectivity generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellulaire fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 8749-8754.
- 320.** Zerizer S. (2006). Hyperhomocysteinemia, B vitamins and atherogenesis. Clinical and studies. Thèse en Physiologie animale. Univ. Constantine 1: 33-34.
- 321.** Benmebarek A, Zerizer S, Laggoune S, Kabouche Z. (2013). Immunostimulatory activity of *Stachys mialhesi* de Noé. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 9 (2): 1- 4.
- 322.** Perez FP, Ilie JI, Zhou X, Feinstein D, Jurivich DA. (2007). Pathomolecular effects of homocysteine on the aging process : A new theory of aging. *Medical hypotheses* 69 : 149-160.
- 323.** Zerizer S, Naimi D. (2004). Homocysteine: An independent risk factor in atherogenic process. *Egypt. Pharm. J*. 3 : 109-114.
- 324.** Saïle R, Taki H. (2007). Cholestérol, lipoprotéines et athérosclérose : de la biochimie à la physiopathologie. *Les Technologies de Laboratoire* 2 : 4-11.
- 325.** Morin D, Thiery H, Spedding M, Tillement J P. (2001). Mitochondria as target for antiischemic drugs. *J. Physiol. Pharmacol*. 13: 22-67.
- 326.** Majors A, Ehrhart T A, Pezacha E H. (1997). Homocysteine as a risk factor for vascular disease enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Artério. Thromb. Vasc. Biol*. 17: 2074-2081.
- 327.** Ding Q, Martin S, Dimayug A E, Bruce-Keller AJ, Keller J. (2006). Lmp 2 knock-out mice have reduced proteasome activities and increased levels of oxidatively damaged proteins, *Antioxid. Redox Signal*. 8: 130–135.
- 328.** Barber A J, Antonetti D A, Kern T S, Reiter C E, Soans RS, Krady J K, et al. (2005). The Ins 2 Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Invest.Ophthamol. Vis. Sci*. 46: 2210–2218.

- 329.** Gomes AV, Zong C, Edmondson RD, Li X, Stefani E, Zhang J, Jones R C, Thyparambil S, Wang GW, Qiao X, Bardag-Gorce F, Ping P. (2006). Mapping in murine cardiac 26S proteasome complexes. *Cir Rev.* 99(4):362-71.
- 330.** Ding Q, Keller JN. (2001). Protéasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications of heat shock proteins. *J Neurochem*, 77: 1010-1017.
- 331.** Katsiki M, Chondrogianni N, Chinou I, Rivett AJ, Gonos ES. (2007). The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res.* 10(2):157-72.
- 332.** Bulteau AL, Moreau M, Saunois A, C, Friguet B. (2006). Algae extract-mediated stimulation and protection of proteasome activity within human keratinocytes exposed to UVA and UVB irradiation. *Antioxid Redox Signal.* 8: 136-143.



Annexe

Publication internationale



Hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress differentially alters proteasome composition and activities in heart and aorta [☆]



Faouzia Derouiche ^{a,b}, Christine Bôle-Feysot ^{c,d}, Dalila Naïmi ^a, Moïse Coëffier ^{c,d,e,*}

^aLaboratory of Microbiological Engineering and Application (team of cellular physiology and molecular biology), Constantine University 1, Constantine, Algeria

^bKhenchela University, Khenchela, Algeria

^cINSERM Unit 1073, Rouen, France

^dInstitute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen University, Rouen, France

^eRouen University Hospital, Nutrition Unit, Rouen, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 August 2014

Available online 4 September 2014

Keywords:

Homocysteine
ROS
Oxidative stress
Aorta
Heart
Proteasome

ABSTRACT

Background and aims: Hyperhomocysteinemia (HHcy) is associated with cardiovascular diseases and is thought to induce endogenous oxidative stress and causes many cellular damages. Proteasome that degrades oxidized and ubiquitinated proteins can regulate the cellular response to oxidative stress. We aimed to investigate whether hyperhomocysteinemia induces oxidative stress and alters proteasome function and composition in heart and aorta tissues of rat.

Methods and results: To create hyperhomocysteinemia, male Wistar rats (Pasteur Institute-Algiers) were received daily intraperitoneal injections of DL-homocysteine (0.6–1.2 μM/g body weight) for 3 weeks. Biomarkers of oxidative stress (malondialdehyde (MDA), protein carbonyl (PC), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)) were first measured by biochemical methods and tissue damages by histological sections. Proteasome activities were quantitated using fluorogenic synthetic peptides; ubiquitinated proteins and proteasome subunits expression were then evaluated by SDS PAGE and Western blot analysis. We showed increased MDA and PC but decreased SOD and CAT levels both in plasma, heart and aorta accompanied by histological changes. A significant decrease of proteasome activities was observed in heart, whereas proteasome activity was not affected in aorta. However proteasome composition was altered in both tissues, as the accumulation of ubiquitinated proteins.

Conclusion: Data demonstrated an alteration of the ubiquitin–proteasome system in hyperhomocysteinemia as a result of accumulating oxidized and ubiquitinated proteins in response to oxidative stress. Further studies must be conducted to better understanding mechanisms responsible of proteasome alterations in hyperhomocysteinemia.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Hyperhomocysteinemia (HHcy), defined as an elevated plasma total homocysteine (Hcy) is a consequence of genetic defects of some enzymes, nutritional deficiencies, methionine rich diet, related of some diseases and some drugs [1,2]. Hcy is an amino acid derived from methionine and containing sulphur. Oxidative stress plays a key role in the pathophysiology of hyperhomocysteinemia

[☆] This work was supported in part by the Laboratory of Physiology-Cellular and Molecular Biology, Constantine University 1, Constantine, Algeria and by INSERM Unit 1073, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen University, Rouen, France.

* Corresponding author at: INSERM unit 1073, Rouen University, 22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex 1, France. Fax: +33 2 35 14 82 26.

E-mail address: moise.coeffier@chu-rouen.fr (M. Coëffier).

and its complications [3]. Previous studies showed that increased level of Hcy altered morphological tissue structure and reduced antioxidant defences in heart and aorta tissues of rats [3,4].

HHcy remains a major risk factor leading to endothelial cell dysfunction and induces apoptotic cell death through reactive oxygen species (ROS) production in endothelial and smooth muscle cells. HHcy also causes accumulation of damaged proteins resulting in modification and alterations of their function [2]. ROS are physiologically generated by metabolic processes or as consequences of injury [5,6]. It has been suggested that HHcy is associated with ROS formation, such as superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals which are normally eliminated by antioxidants enzymes [7]. It has been postulated that free radicals and lipid peroxidation products such as 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and malondialdehyde (MDA), a major end products of lipid peroxidation caused damage to proteins [8].

Numerous studies have demonstrated that the ubiquitin proteasome system (UPS) plays a pivotal role in the removal of oxidized proteins [9–11]. 26S proteasome is a large, multicatalytic protein complex, composed of a 20S core particle (CP) that carries the catalytic activity and by two 19S regulatory particle (RP). The 20S CP is a barrel-like structure composed of four rings, two identical outer α -rings and two identical inner β -rings. α and β rings are composed each of seven distinct subunits. The catalytic sites are localized to some of the β -subunits. The 19S (RP) is implicated in the recognition of polyubiquitinated substrates [12]. However, the regulation of UPS remains unknown during HHcy.

Thus, the present study aimed to evaluate the regulation of ubiquitin–proteasome system during hyperhomocysteinemia in rats.

2. Material and methods

2.1. Animal model of hyperhomocysteinemia

Male Wistar rats (3 months, 240 ± 10 g), obtained from Pasteur Institute in Algiers, were maintained under controlled conditions. Treated animals were injected intraperitoneally, once a day with DL-homocysteine (Sigma Aldrich) for 3 weeks as previously described [13].

2.2. Plasma and tissue homogenates

Blood was collected 24 h after the last DL-homocysteine injection from the sinus venipuncture of control and treated rats with EDTA treated tubes and centrifuged at 3000 rpm for 20 min at 4 °C. Plasma was immediately aspirated for malondialdehyde (MDA) assay and stored at -80 °C for homocysteine and protein carbonyl groups (PC) analyses. Heart and aorta were homogenized in ice-cold PBS pH 7.4. Homogenates were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. Supernatants were taken for total protein determination by the method of Bradford using bovine serum albumin (BSA) as standard [14]. Supernatants were rapidly frozen and stored at -80 °C for antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and PC content measurement, and directly used for MDA assay.

For proteasome assays, tissues were homogenized for 2 min with homogenizer (Janke – Kunkel, Inka-Labortechnik) in ice-cold lysis buffer containing 30 mM Tris, pH 7.2, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1% Triton X and then centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. Supernatants were immediately frozen at -80 °C after total protein determination by Bradford's method for later proteasome activities assays and supplemented with both 1% protease inhibitor cocktail and phosphatases inhibitors for western blot analysis as previously described [15,16].

2.3. Homocysteine assay

Plasma total homocysteine concentration was assayed by Axis® Homocysteine EIA Kit (IBL International, Germany), an enzyme immunoassay detection, by following manufacturer's instructions.

2.4. MDA assay

The level of malondialdehyde MDA was determined by a previously spectrophotometric described method [17]. MDA levels were expressed as nmol/mg protein.

2.5. Protein carbonyl (PC) assay

PC content was measured using an OxiSelect™ Protein Carbonyl Spectrophotometric Assay Kit (Cell Biolabs, Inc). Results were expressed as nmol PC/mg protein.

2.6. SOD assay

SOD activity was carried out as previously described [18] by using the inhibition of autoxidation of pyrogallol by SOD enzyme. SOD activity was expressed as units per milligram of protein (U/mg protein).

2.7. Catalase assay

CAT activity was measured as previously reported [19] and expressed as units of CAT by mg of protein of enzymatic preparation (U/mg protein).

2.8. Histological analysis

Specimens of abdominal aorta and heart were fixed in 10% formalin solution, dehydrated through a graded series of ethanol solutions and embedded in paraffin. Paraffin longitudinal sections of 5 μ m thick were then stained with hematoxylin–eosine (H–E) for histological examination under light microscope.

2.9. Proteasome activities assays

Peptidase activities of the proteasome were assayed using fluorogenic peptides, Suc-LLVY-MAC (Calbiochem) for chymotrypsin-like activity, Boc-LSTR-AMC (Sigma Aldrich) for trypsin-like activity and Z-LLE-MCA (Sigma Aldrich) for caspase-like activity and Z-LLL-MCA (Sigma) for peptidases activity as previously described [15]. Proteasome activities were monitored in a microtiter plate fluorometer Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wilbad, Germany) in absence or in presence of 10 μ M of proteasome inhibitor MG132 (Sigma Aldrich), the difference between the two values was attributed to proteasome activity expressed in relative fluorescent units (RFU)/60 min/mg protein.

2.10. Western blot analysis of proteasome subunits expression and ubiquitinated proteins

As previously described [16], 25 μ g of proteins were added to lauryl dodecyl sulfate buffer (Nu-PAGE LDS 4 \times) plus 500 mM DTT, boiled at 100 °C for 5 min and then separated on 4–12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). After separation, they were transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Orsay, France) for 1 h at 100 V. The membrane was blocked for 1 h at room temperature with 5% (w:v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS, 10 mM Tris, pH 8; 150 mM NaCl) plus 0.1% Tween 20 followed by overnight incubation at 4 °C with specific primary antibodies, mouse anti 20S subunit β 1, anti 20S subunit β 2 (1:1000, Biomol) or anti β -actin (1:1000, Sigma Aldrich); rabbit anti 20S α 1, anti β 5, anti 20S core (1:1000, Biomol) or anti ubiquitin (1:1000, Calbiochem). After three washes in TBS/0.1% Tween 20, a 1 h incubation with secondary antibodies, horseradish peroxidase-conjugated goat anti rabbit or anti mouse IgG (1:5000, Santa Cruz Biotechnology) was performed, followed by three additional washes, immunoreactive proteins were revealed by using enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (GE Healthcare). Protein bands were quantified by densitometry using Image scanner III and Image Quant TL software (GE Healthcare).

2.11. Statistical analysis

All results were expressed as mean \pm SD. Results were compared by student *t*-test, Mann–Whitney test or two way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison

Table 1
Oxidative stress biomarkers.

Parameters	Controls	Treated
Plasma MDA (nmol/ml)	1.56 ± 0.18	2.96 ± 0.51*
Heart MDA (nmol/mg protein)	5.25 ± 1.36	18.09 ± 0.90*
Aortic MDA (nmol/mg protein)	0.53 ± 0.26	1.71 ± 0.03*
Plasma PC (nmol/ml)	1.32 ± 0.14	2.69 ± 0.13*
Heart PC (nmol/mg protein)	1.56 ± 0.21	9.50 ± 1.24*
Aorta PC (nmol/mg protein)	0.45 ± 1.10	1.87 ± 0.09*
Heart SOD (U/mg protein)	18.81 ± 2.3	9.22 ± 0.08*
Aorta SOD (U/mg protein)	13.26 ± 1.71	6.78 ± 0.54*
Heart CAT (U/mg protein)	12.64 ± 0.81	5.34 ± 0.38*
Aorta CAT (U/mg protein)	19.88 ± 0.76	12.79 ± 1.36*

Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PC) levels were measured in plasma, heart and aorta tissues of rats treated or not with DL-homocysteine during 3 weeks. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were measured in heart and aorta. Values are means mean ± SE (*n* = 5 in each group).

* *p* < 0.05 vs. controls.

test, as appropriate. *p* < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Total homocysteine levels

Plasma homocysteine levels were significantly higher (7.53 fold change) after DL-homocysteine administration as compared to controls (42.2 ± 3.4 vs. 5.6 ± 1.8 μM, *p* < 0.05).

3.2. Oxidative stress biomarkers levels

Biomarkers of oxidative stress, MDA, PC, SOD, CAT in plasma, heart and aorta tissues of control and treated rats are displayed in Table 1. Levels of plasma, cardiac and aortic MDA were

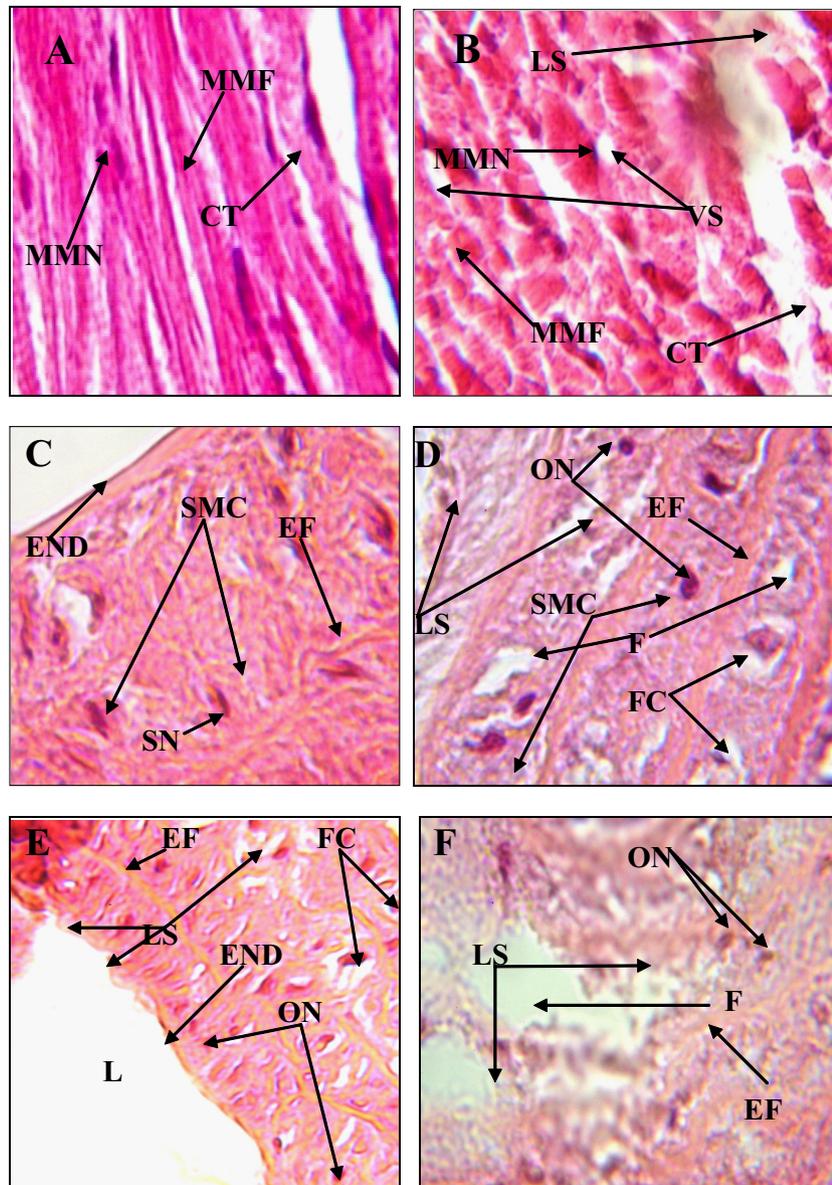


Fig. 1. (A) Longitudinal section of heart control rat, H-E (×400). (B) Longitudinal section of heart rat 3 weeks DL-homocysteine application, H-E (×400). (C) Longitudinal section of abdominal aorta control rat, H-E (×1000). (D), (E), (F) Longitudinal sections of abdominal aorta rat 3 weeks DL-homocysteine application, H-E (×1000), H-E (×400), H-E (×1000) respectively. MMF: muscular myocardial fiber, MMN: muscular myocardial nuclei, LS: lysis, VS: Vacuoles, CT: connective tissue, END: endothelium, SMC: smooth muscle cells, EF: elastic fiber, SN: spindle nuclei, ON: oval nuclei, F: fenestration, FC: foam cell, L: lumen.

significantly increased (1.89, 3.43 and 3.22 fold change, respectively) in DL-homocysteine treated rats as compared to controls. PC content in plasma, heart and aorta in treated rats were significantly higher than in controls (2.03, 6.08 and 4.15 fold change, respectively). In contrast, SOD and CAT activities were significantly reduced both in heart (2.04 and 1.95 fold change, respectively) and aorta (1.86 and 1.55 fold change, respectively) in DL-homocysteine-treated rats.

3.3. Histological investigations

Light microscopy of the heart in control rats showed normal tissue structure (Fig. 1A). In contrast, intracytoplasmic vacuolizations of muscular fiber were observed in the heart of DL-homocysteine treated rats (Fig. 1B). The aorta of control rats had intact endothelium and spindle shape mediocyte nuclei (Fig. 1C). In contrast, formation of foam cells and thick elastic fiber were observed in the aorta of DL-homocysteine treated rats. In addition, smooth muscle cell nuclei changed from spindle to oval nuclei (Fig. 1D–F) and desquamation processes of endothelium was observed (Fig. 1E) as well as elastolysis (Fig. 1F).

3.4. Proteasome activities

Chymotrypsin-like, trypsin-like and caspase-like activities in heart were significantly decreased in treated rats compared with controls (Fig. 2A, D, E). Chymotrypsin-like activity was significantly decreased from 35 min to 90 min incubation with substrate (Fig. 2B). Peptidase activity in heart was unaltered (Fig. 2C). All proteasome activities in aorta were unchanged (not shown).

3.5. Proteasome subunits and total ubiquitinated protein expression

Western blot analysis of subunits proteasome composition demonstrated significant decreases of the expression of 20S α 1 subunit, 20S β 1 subunit, 20S β 2 and slightly 20S β 5 subunit, whereas 20S β 5 subunit remained unchanged in heart of

DL-homocysteine treated rats as compared to controls (Fig. 3). Aortic 20S proteasome subunits 20S α 1, 20S β 2, 20S β 5 were unchanged (Fig. 4) between both controls. In contrast, 20S core was significantly reduced in DL homocysteine-treated rats compared with controls (Fig. 4). Ubiquitinated protein expression was significantly increased both in heart and aorta (Figs. 3 and 4) of DL-homocysteine treated rats.

4. Discussion

In the present work, we showed that the plasma level of homocysteine was elevated after DL-homocysteine treatment to $42 \pm 3 \mu\text{M}$. This value was in the range of pathophysiological concentrations [20–60 μM] found in humans [1] and also in some experimental models [3,13,20]. We thus created a rat model of intermediate hyperhomocysteinemia (HHcy).

Increased MDA and PC levels and decreased SOD and CAT activities observed in Hcy-treated treated rats were in accordance with a previous study [4], even if another study reported increased SOD and CAT levels [13]. Hcy induced oxidative damages both in heart and aorta by increasing lipid peroxidation and oxidized proteins since MDA, a biomarker of lipid peroxidation and PC, a parameter of protein damage were higher. This condition could be related to increasing ROS generated in part by Hcy autoxidation and also may be mainly related to mitochondria that generated more ROS in response to oxidative stress as previously reported [7]. SOD and CAT compose the first antioxidant enzymes responsible for removal of ROS by O_2^- dismutation and H_2O_2 conversion respectively. Thus, inhibition of SOD and CAT activities altered ROS elimination [21]. We supposed that SOD and CAT were targeted for oxidation by free radicals that reduced their activities in hyperhomocysteinemia rats. Excessive production of ROS may induce protein damages resulting in a significant accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins observed both in heart and aorta tissues. DL-homocysteine administration leads to cardiac and aortic injury as alteration of the histological structure in these tissues of treated rats were observed, in accordance with previous results [3].

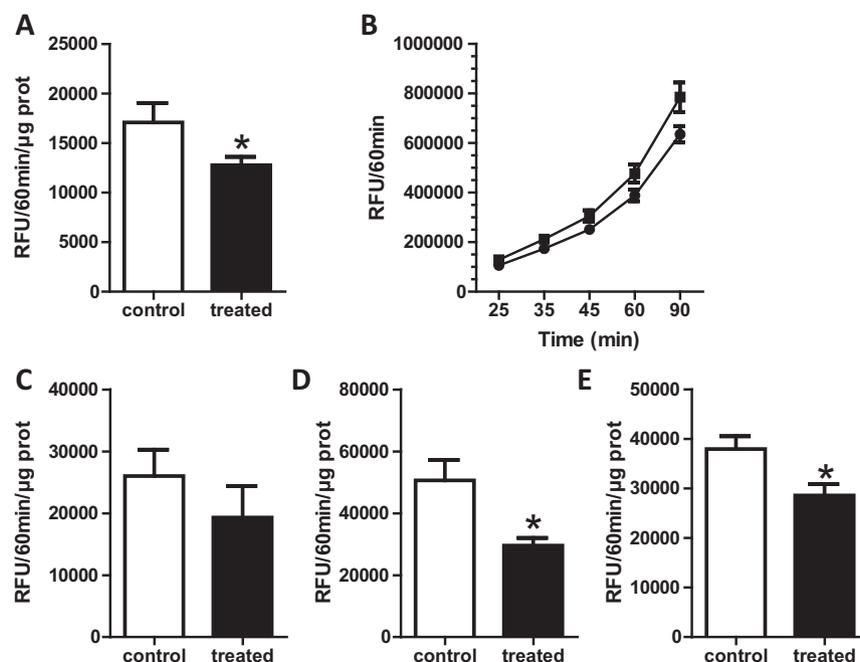


Fig. 2. Effect of DL-homocysteine on proteasome activities in rat heart. Chymotrypsin-like activity (A and B), peptidase (C), trypsin-like (D) and caspase-like (E) activities were evaluated in heart of DL-homocysteine-treated and controls rats (n = 8/group). Values are means \pm SE. *, $p < 0.05$ vs. controls.

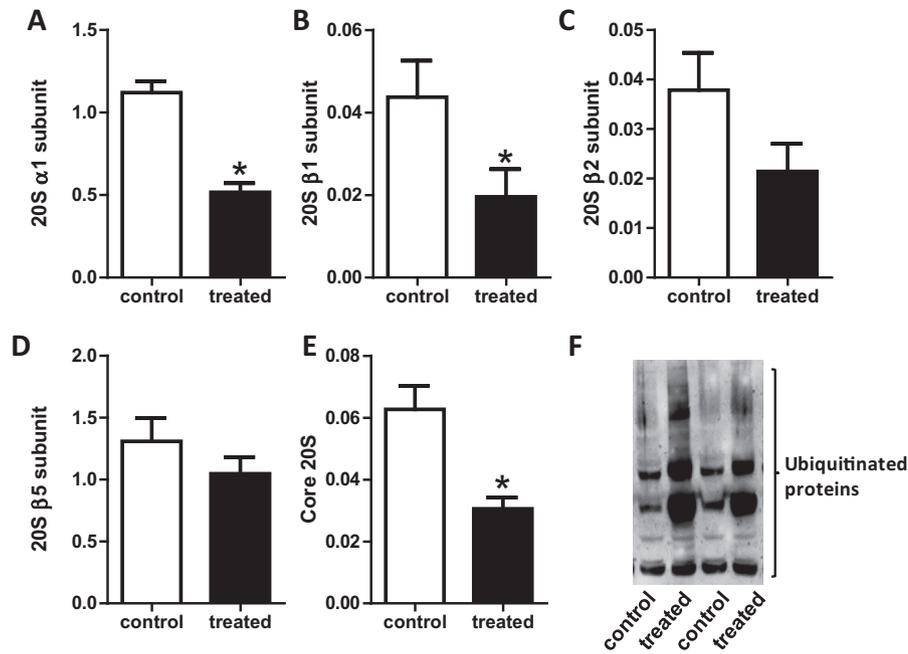


Fig. 3. Effect of DL-homocysteine on proteasome subunit expression in heart. Proteasome subunits, 20S α 1 (A), 20S β 1 (B), 20S β 2 (C), 20S β 5 (D) and 20S core (E) and ubiquitinated proteins (F) were evaluated in heart of DL-homocysteine-treated and controls rats ($n = 8/\text{group}$). Values are means \pm SE. *, $p < 0.05$ vs. controls.

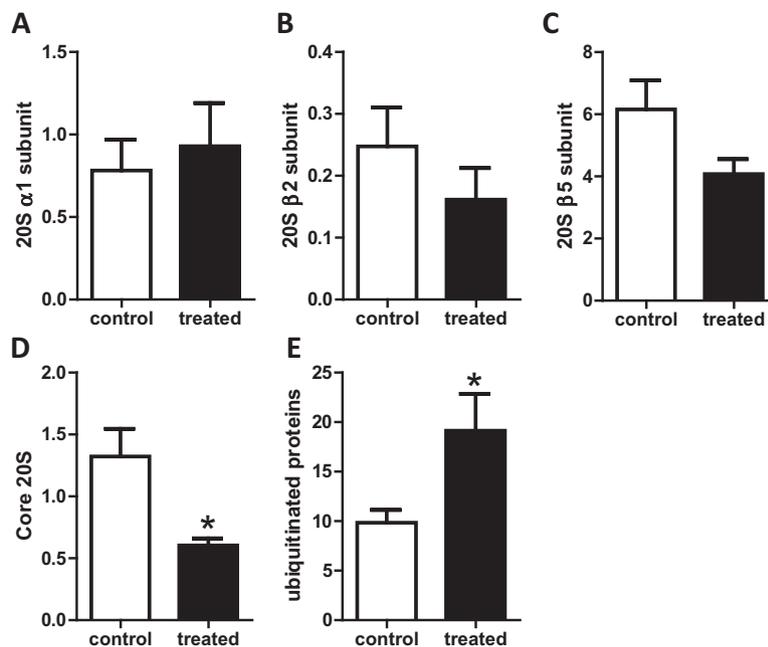


Fig. 4. Effect of DL-homocysteine on proteasome subunit expression in aorta. Proteasome subunits, 20S α 1 (A), 20S β 2 (B), 20S β 5 (C) and 20S core (D) and ubiquitinated proteins (E) were evaluated in aorta of DL-homocysteine-treated and controls rats ($n = 8/\text{group}$). Values are means \pm SE. *, $p < 0.05$ vs. controls.

Proteasome normally mediated degradation of oxidized and ubiquitinated proteins to prevent their toxicity [9,10,12]. The regulation of proteasome during HHcy has been poorly documented [20] and to our knowledge has not yet been studied in heart and aorta. In the present study, we observed reduction of chymotrypsin-like, trypsin-like and caspase-like proteasome activities in heart of Hcy treated rats. Interestingly, these modifications were associated with decrease of 20S α 1, 20S β 1, 20S β 2 and 20S core subunits expression, while 20S β 5 expression remained unchanged. Decreased β 1 and β 2 catalytic subunits may explain

respectively the decrease of caspase-like and trypsin-like activities. In addition decreased of all three activities could also be related to decrease of the regulatory 20S α 1 and 20S core subunits expression. It has been reported that reduction of proteasome activity may occur in the appearance of oxidized and ubiquitinated proteins in the cytosol [22]. Thus, inhibition of proteasome could be due to the accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins. In contrast, in aorta, we found no significant changes in proteasome activities. In previous paper [20] that reported no activation of proteasome in liver of cystathionine beta synthase deficient

mice developing HHcy. In addition, in aorta of hyperglycemic mice, chymotrypsin-like activity was reduced, whereas the trypsin-like and caspase-like activities remained unchanged [23]. In the present study, 20S core expression was decreased while 20S β 5, 20S β 2 and 20S α 1 subunits expressions were not changed.

Proteasome inhibition in cardiac cells may contribute to accumulation of damaged proteins and in turn would lead to cellular consequences [24]. Further investigations should be conducted to identify oxidized and ubiquitinated substrates of proteasome. In addition, oxidative inactivation of the proteasome has been reported in many cell types and tissues [25,26], but the mechanisms remain poorly documented and should be elucidate.

In conclusion, we reported alteration of 26S proteasome during hyperhomocysteinemia in heart and aorta resulting to an increase of oxidized and ubiquitinated proteins. In these pathophysiological conditions, the role of proteasome inhibition on cardiovascular disorders remains to be elucidated.

Conflict of interest

None to declare.

References

- [1] O. Nygard, J.E. Nordrehaug, H. Refsum, P.M. Ueland, M. Farstad, S.E. Vollsted, Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 337 (1997) 230–236.
- [2] C. Zhang, Y. Cai, M.T. Adachi, S. Oshiro, T. Aso, R.J. Kaufman, et al., Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response, *Biol. Chem.* 276 (2001) 35867–35874.
- [3] A. Miller, V. Mujumdar, E. Shek, J. Guillot, M. Angelo, L. Palmer, et al., Hyperhomocysteinemia induced multiorgan damage, *Health Vessels* 15 (2000) 135–143.
- [4] Z. Vahabzed, A. Abolfathi, M.K. Ansari, A. Safaiyan, Effect of dietary Taurine on lipid profile and oxidative stress in tissues of homocysteine-treated rats, *Res. J. Biol. Sci.* 3 (11) (2008) 1271–1275.
- [5] C.D. Shajisehvin, A. Kottai, K. Suresh, Evaluation of in vitro antioxidant and lipid peroxidation effect of various extracts of the whole plant of *Borreria Hispida* (LINN) on rat fed with high fat diet, *Int. J. Pharmaceut. Sci. Rev. Res.* 3 (2010) 66–69.
- [6] B.P. Yu, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol. Rev.* 74 (1994) 139–162.
- [7] F.M. Faraci, S.R. Lentz, Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction, *Stroke* 35 (2004) 345–347.
- [8] W. Jessup, L. Kritharides, R. Strocker, Lipid oxidation in atherogenesis: an overview, *Biochem. Soc. Transact.* 32 (2004) 134–138.
- [9] K.J. Davies, Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome, *Biochimie* 83 (2001) 301–310.
- [10] A. Ciechanover, Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44 (37) (2005) 5944–5967.
- [11] S. Murata, H. Yashiroda, K. Tanaka, Molecular mechanism of proteasome assembly, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10 (2009) 104–115.
- [12] M. Schmidt, J. Hanna, S. Elsasser, D. Finly, Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine, *Biol. Chem.* 386 (2005) 725–737.
- [13] C. Matté, V. Mackdanz, F.M. Stefanelo, Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA Damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid, *Neurochem. Int.* 54 (2009) 7–13.
- [14] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [15] M. Coëffier, R. Goro, N. Boukhetala, A. Moutaz, S. Leclaire, N. Vandaele, et al., Increased proteasome-mediated degradation of occluding in irritable bowel syndrome, *Am. J. Gastroenterol.* 105 (2010) 1181–1188.
- [16] S. Leclaire, A. Hassan, R. Marion-Letellier, M. Antonietti, G. Sayove, C. Bole-Feysot, et al., Combined glutamine and arginine decrease proinflammatory cytokine production by biopsies from Crohn's patients in association with changes in nuclear factor-kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways, *J. Nutr.* 138 (2008) 2481–2486.
- [17] M. Uchiyama, M. Mihara, Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, *Anal. Biochem.* 86 (1978) 271–278.
- [18] S.L. Marklund, Pyrogallol autoxidation, in: R.A. Greenwald (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1985, pp. 243–247.
- [19] A. Clairborne, Catalase activity, in: R.A. Greenwald (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1985, pp. 283–284.
- [20] J. Hamelet, C. Noll, C. Ripoll, J.-L. Paul, N. Janel, J.-M. Delabar, Effect of hyperhomocysteinemia on the protein kinase DYRK1A in liver of mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378 (2009) 673–677.
- [21] F. Stern, Y.N. Berner, Z. Polyak, M. Kormanitsky, B.A. Sela, M. Hopp, et al., Homocysteine effect on protein degradation rates, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 1002–1009.
- [22] Q. Ding, S. Martin, A.E. Dimayug, A.J. Bruce-Keller, J. Keller, Lmp 2 knock-out mice have reduced proteasome activities and increased levels of oxidatively damaged proteins, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 130–135.
- [23] A.J. Barber, D.A. Antonetti, T.S. Kern, C.E. Reiter, R.S. Soans, J.K. Krady, et al., The Ins 2 Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46 (2005) 2210–2218.
- [24] P. Maher, Proteasome inhibitors prevent oxidative stress-induced nerve cell death by a novel mechanism, *Biochem. Pharmacol.* 75 (10) (2008) 1994–2006.
- [25] N.F. Bence, R.M. Sampa, R.R. Kopito, Impairment of ubiquitin-proteasome system by protein aggregation, *Science* 292 (2001) 1552–1555.
- [26] T. Reinheckel, N. Sitte, O. Ullrich, U. Kuckelkorn, K.J. Davies, T. Grune, Comparative resistance of the 20s and 26s proteasome to oxidative stress, *Biochem. J.* 335 (Pt3) (1998) 637–642.

Doctorat en Sciences 2015-2016
Option : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Nom : Derouiche
Prénom : Faouzia

Thème : *Évaluation du stress oxydatif induit par l'hyperhomocystéinémie dans le cœur et l'aorte chez le rat Wistar albinos : implication du système ubiquitine protéasome.*

Résumé

Le système ubiquitine protéasome (UPS) est un complexe multi-enzymatique responsable de la dégradation de la majorité des protéines intracellulaires. De ce fait, il est impliqué dans la régulation de la plupart des processus biologiques, telle que l'élimination des protéines oxydées accumulées lors du stress oxydatif dans certaines maladies. Cependant sa régulation durant l'hyperhomocystéinémie (HHcy) reste à démontrer.

L'objectif de mon travail de thèse est d'évaluer la fonction et la composition de ce système au niveau du cœur et de l'aorte durant le stress oxydatif induit dans un modèle de rat Wistar albino par l'administration intrapéritonéale d'une dose unique de la DL- homocystéine (Hcy) (0.6 -1.2 μ M/g : poids corporel) pendant 03 semaines. Dans ce contexte, ma thèse s'est développée autour de 02 axes principaux.

Dans le premier axe, l'induction du stress oxydatif dans ce modèle d'HHcy a été confirmée dans les deux organes (cœur et aorte) par l'augmentation significative du malondialdéhyde (MDA) et des protéines carbonylées (PC), respectivement, marqueurs de la peroxydation lipidique et de l'oxydation protéique et aussi par la diminution significative du glutathion (GSH) et des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). En outre, le stress oxydatif vérifié dans ce même modèle supplémenté d'une dose unique intrapéritonéale d'acide folique (F) (0,011 μ M/g poids corporel) ou de vitamine C (vit C) (100 mg/kg poids corporel) durant la deuxième et la troisième semaines du traitement n'a pas été réduit. Des coupes histologiques ont été aussi réalisées pour confirmer ce stress oxydatif. L'analyse des facteurs impliqués dans le stress oxydatif et le protéasome : le monoxyde d'azote (NO) et la Caspase 3 a également été conduite dans ce modèle d'étude. Une augmentation en Caspase 3 avec une diminution en NO ont été observées dans le cœur et l'aorte.

Le deuxième axe est consacré à l'étude du protéasome. Les trois activités protéasomales cardiaques et aortiques : chymotrypsin-like, trypsin-like et caspase- like et aussi l'activité de peptidases ont été quantifiées à 355/ 460 nm excitation / émission par Microplate Fluoromètre Reader en utilisant respectivement les peptides fluorogéniques synthétiques spécifiques Suc- LLVY-AMC, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Z-Leu-Leu-Glu-AMC, Z-Leu-Leu-Leu-AMC en présence et en absence d'inhibiteur spécifique du protéasome : le MG 132 (Z-Leu-Leu-Leu-al). L'expression de 05 sous- unités du protéasome, 20S β 1, 20S β 2, 20S β 5, 20S α 1, 20S Core et des protéines ubiquitylées a été analysée par SDS PAGE et western blot (WB). Une inhibition des 03 activités peptidases du protéasome cardiaque a été observée, en revanche, ces activités n'ont pas été changées au niveau de l'aorte. Cependant l'expression des sous-unités a significativement été réduite dans le cœur (dans l'aorte uniquement le 20S Core) et celle des protéines ubiquitylées a significativement été augmentée dans les deux organes. De plus, pour mieux expliquer les résultats au niveau du cœur, l'analyse du rapport 26S/20S protéasomal a montré l'association du complexe, ainsi que l'accumulation du produit final de la peroxydation lipidique, le 4-hydroxy-2-nonéal (HNE).

En conclusion, le système ubiquitine protéasome est altéré durant Le stress oxydatif induit par le taux élevé d'homocystéine, due aux protéines oxydées et ubiquitylées accumulées.

Mots clés : Protéasome , Homocystéine, Stress oxydatif, Aorte, Cœur, Rat.

Structures de recherche : Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Université des Frères Mentouri- Constantine , Algérie. INSERM unit 1073, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Université de Rouen, France.

Jury :

Présidente :	Pr. Satta Dalila	Université des Frères Mentouri – Constantine.
Directrice de thèse :	Pr. Naimi Dalila	Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie – Constantine 3.
Examinatrice :	Pr. Tebibel Soraya	Université des Frères Mentouri – Constantine.
Examineur :	Pr. Lahouel Mesbah	Université de Jijel.
Examineur :	Pr. Houcher Bakhouche	Université Ferhat Abbas – Sétif I.
Examineur :	Pr. Yahia Mouloud	Université Hadj Lakhdar – Batna.

