Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Comportement de la gluthathion peroxydase au cours du vieillissement cellulaire et en conditions oxydantes

Pigeolet, Etienne

Award date:
1990

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 04. May. 2026

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur
Faculté des Sciences
Laboratoire de Biochimie Cellulaire
Professeur J. REMACLE

COMPORTEMENT DE LA GLUTATHION PEROXYDASE AU COURS DU VIEILLISSEMENT CELLULAIRE ET EN CONDITIONS OXYDANTES

Dissertation présentée pour
l'obtention du grade de
docteur en Sciences par

Etienne PIGEOLET

-1990-

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque
FT B3
1990/3

FT B 3| 1990/3

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur
Faculté des Sciences
Laboratoire de Biochimie Cellulaire
Professeur J. REMACLE

COMPORTEMENT DE LA GLUTATHION PEROXYDASE AU COURS DU VIEILLISSEMENT CELLULAIRE ET EN CONDITIONS OXYDANTES

Dissertation présentée pour
l'obtention du grade de
docteur en Sciences par

Etienne PIGEOLET

-1990-

LBS 3447282
210599

A Marie-Anne,
à mes parents,
à mes beaux-parents.

C'est avec un réel plaisir que je commencerai cet ouvrage en remerciant ceux qui de près ou de loin ont contribué à sa réalisation.

Par sa compétence scientifique et sa perspicacité, le professeur J. Remacle a guidé ce travail. Il m'a beaucoup appris tant au plan scientifique qu'au plan humain. Pour tout ceci, pour le sens des responsabilités qu'il attribue à ses élèves et la confiance qu'il m'a témoignée, qu'il soit le premier remercié à l'aboutissement de cette thèse.

C'est à Andrée Houbion que je dois ensuite exprimer ma gratitude : sa constante disponibilité, ses compétences techniques, son efficacité et son travail quotidien m'ont apporté une aide précieuse et un savoir-faire appréciable et apprécié.

De la même manière, je remercie Edouard Delaive pour ses conseils pratiques judicieux et son savoir-faire pour les techniques biochimiques dont il a la complète maîtrise.

J'ai pu expérimenter concrètement que la recherche n'est pas un travail en solitaire mais le fruit de la confrontation d'idées différentes. Outre le professeur Remacle, je tiens à remercier Carine Michiels, Olivier Toussaint et Martine Raes pour leurs critiques constructives.

Je remercie aussi Dominique Lambert pour tout le travail mathématique qu'il a réalisé à partir des données de la première partie de cette thèse. Par là, il a apporté à la discussion des résultats un éclairage particulier.

Je remercie également Thierry Coche pour l'élaboration du proramme "Mac Lab" qui m'a permis de calculer finement le Km de la Glutathion Peroxydase dans diverses conditions.

Merci à Marie Burgos pour son travail quotidien, discret, efficace et combien indispensable.

Que toutes les personnes qui m'ont entouré de leur amitié proche ou plus lointaine pendant la durée de ce travail soient remerciés. Ce foisonnement de

fortes personnalités a créé autour de moi un environnement relationnel très enrichissant que je n'oublierai jamais :

Anita Abraham, Thierry Arnould, Isabelle Alexandre, Anne et Omar Azouigh, Georges Baudoux, Carine et Vincent Bille, Marie Burgos, Claire et Philippe Corbisier, Marina et Edouard Delaive, Dominique Delforge, Marc Dieu, Manoëlle Doye, Véronique et Roland Englebert, Pierre Hayen, Isabelle Knott, Olivier Laloux, Bernadette et Thierry Leclipteux, Gérard Lenoir, Anne-Bénédicte et Etiennne Magonet, Philippe Morris, Evelyne et Eric Remy, Michel Roba et Martine Raes, Marc Roger, Françoise Rosier, Olivier Toussaint, Christine Vandesteene, Bénédicte et Vincent Weynants, Marie-Denise Zachary.

Mes remerciements aussi à Carine Michiels pour sa participation à la mise en page du manuscrit.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance aux membres du jury de cette thèse qui ont accepté de prendre connaissance du travail et d'y apporter leurs remarques constructives : le docteur M. Raes (FNDP), les professeurs J. Nève (ULB), A. Goffinet (FNDP), et C. De Schryver (FNDP).

Je remercie l'IRSIA, les Facultés Universitaires de Namur, l'ONEm et la CAPAC pour leur soutien financier.

Enfin, j'exprime mes remerciements à mes beaux-parents pour leurs encouragements constants, ma plus profonde reconnaissance à mes parents qui m'ont donné d'être et de me construire tel que je suis aujourd'hui, à Marie-Anne pour son Amour ...

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.

Introduction générale. 1

Chapitre I : Les radicaux, les antioxydants et les attaques radicalaires des protéines.
1.1 Les radicaux libres. 3
1.1.1 Définition. 3
1.1.2. Réactivité des radicaux libres. 3
1.1.3. Les radicaux libres dérivés de l'oxygène. 3
1.2. Production des radicaux libres dans les systèmes vivants . 5
1.2.1. Respiration mitochondriale. 5
1.2.2. Le système microsomal P450. 5
1.2.3. Autooxydation. 6
1.2.4. Les réactions enzymatiques. 6
1.2.5. L'inflammation. 7
1.2.6. La lésion de reperfusion. 8
1.2.7 Les médicaments. 9
1.3. Toxicité des radicaux libres. 9
1.3.1. Attaques radicalaires sur l'ADN. 9
1.3.2. Attaques radicalaires sur les lipides. 10
1.3.3. Attaques radicalaires sur les protéines. 11
1.4. Rôles bénéfiques des radicaux libres. 13
1.4.1. Fonctionnement de certaines enzymes. 13
1.4.2. Phagocytose. 14
1.4.3. Division cellulaire. 14
1.5. Les sytèmes de défenses cellulaires contre les radicaux libres. 14
1.5.1. Les défenses enzymatiques. 14
1.5.2. Défenses non enzymatiques. 17

Chapitre 2 : La glutathion Peroxydase. 21
2.1. Structure de la GPX. 21
2.1.1. Structure de la GPX EC 1.11.1.9. 21
2.1.2. Les autres GPX. 22
2.2. Le Sélénium. 24
2.2.1. Absorption du Sélénium. 24
2.2.2. Rôle essentiel et fonctions biologiques. 25
2.3. Génétique de la GPX. 27
2.4. Cinétique et dosage de la GPX. 28
2.5. Fonctions de la GPX. 31
2.5.1. Enzyme antioxydante. 31
2.5.2. GPX et cascade de l'acide arachidonique. 33
2.5.3. GPX et collagénase. 34
2.6. Activités GPX-like. 34
2.7. Induction de la GPX. 35
2.8. La GPX en pathologie et au cours du vieillissement. 36

Chapitre 3 : Le vieillissement et l'altération des protéines au cours du vieillissement. 38
3.1. Les théories du vieillissement. 38
3.1.1. Théories du vieillissement programmé. 39
3.1.2. Théories du vieillissement stochastique. 39
3.2. L'altération des protéines au cours du vieillissement. 42

Buts du travail. 47

II . MATERIELS ET METHODES. 49

1. Enzymes et produits. 49
2. Purification de la GPX d'érythrocytes bovins. 49
3. Mise au point du dosage de la GPX dans un homogénat de fibroblastes humains WI-38. 52
4. Dosage de la SOD. 57
5. Dosage de la catalase. 58
6. Incubation des enzymes antioxydantes avec les peroxydes et les radicaux libres. 58
6.1. Incubation des GPX, SOD et catalase avec H_2O_2, TBHP, CUOOH. 59
6.2. Incubation des GPX, SOD et catalase avec les radicaux hydroxyles. 59
6.3. Incubation des GPX, SOD et catalase avec les anions superoxydes. 59
6.4. Inhibition de la GPX par l'iodoacétate et le cyanure. 60
6.5.Préparation de la MDA et incubation de la GPX avec la MDA. 60
7. Modèle du vieillissement des fibroblastes humains en culture. 61
8. Préparation d'anticorps et immunotitration de la GPX. 61
8.1. Préparation d'antisérum par immunisation d'un lapin. 61
8.2. Chromatographie d'affinité et purification des anticorps anti-GPX. 62
9. Chromatographie sur tamis moléculaire. 63
10. Electrophorèses. 64
10.1. En conditions non dénaturantes. 64
10.2. En conditions dénaturantes. 66
11. Susceptibilisation à la protéolyse. 67
12. Dosage des protéines. 68

III. RESULTATS.

Chapitre 1 : Comportement du système antioxydant au cours d'un stress oxydatif. 69
1.1. Inactivation des enzymes antioxydantes par les radicaux libres dérivés de l'oxygène et les peroxydes. 69
1.1.1. Introduction. 69
1.1.2. Résultats expérimentaux. 69
1.1.2.1. Production des radicaux hydroxyles et anions superoxydes. 69
1.1.2.2. Effet sur la GPX. 70
1.1.2.3. Effet sur la SOD. 71
1.1.2.4. Effet sur la catalase. 72
1.1.3. Discussion des résultats. 72

1.1.4. Illustration du concept de seuil critique par construction mathématique.
77
1.1.5. Discussion. 82
1.2. Protéolyse de la GPX après son exposition aux radicaux libres et aux peroxydes. 83
1.2.1. Introduction. 83
1.2.2. Résultats expérimentaux. 84
1.2.3. Discussion. 87
1.2.4. Conclusions. 90

Chapitre 2 : La GPX au cours du vieillissement des fibroblastes WI-38. 91

2.1. Introduction. 91
2.2. Résultats expérimentaux et discussion. 92
2.2.1. Evolution de l'activité spécifique au cours du vieillissement. 92
2.2.2. Km de la GPX de cellules jeunes et vieilles. 95
2.2.3. Détection d'une altération de la GPX de cellules vieilles. 96
2.2.3.1. Par immunotitration. 96
2.2.3.2. Par thermolabilité. 97
Effet de la congélation. 99
Effet de la concentration en protéines et de la dilution. 99
Effet de l'activité enzymatique de départ. 100
Effet des générations. 101
Discussion des courbes de thermolabilité. 101
2.2.4. Approche visant à confirmer le modèle de l'altération de la GPX. 112
2.2.4.1. Problèmes techniques liés aux colonnes HPLC. 112
2.2.4.2. Activité enzymatique des dimères. 113
2.2.4.3. Tentative de mise en évidence directe des dimères. 115
2.2.4.4. Autres modifications possibles de l'enzyme. 117
Conditions oxydantes. 117
Effet du TBHP. 117
Effet des $OH^{\cdot}$. 117
Effet des $O_2^{\cdot -}$. 118
Protéolyse partielle. 118
Incubation à pH acide ou basique. 119
Influence de l'environnement. 119
2.2.4.5. Conclusions. 121

IV. CONCLUSIONS GENERALES. 123

Annexe 1 128
Annexe 2 134

V. BIBLIOGRAPHIE. 137

Liste des abréviations.

Ac : Anticorps
BDEMDA : Bisdiéthylmalonaldéhyde
CUOOH : Cumene hydroperoxyde
DAB : Diaminobenzidine
EDTA : Ethylène diamine tétraacétate
GPX : Glutathion Peroxydase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
G6PD : Glucose 6 phosphate déshydrogénase
HPLC : Chromatographie liquide à haute pression
HRP : Peroxydase de Raifort.
IgG : Immunoglobuline de type G
Leu : Leupeptine
MDA : Malonaldéhyde
NADH/NAD^+ : Nicotinamide dinucléotide réduit/oxydé
NADPH/$NADP^+$: Nicotinamide dinucléotide phosphate réduit/oxydé
NEM : N Ethylmaléimide
PBS : Phosphate Buffer Saline : Tampon phosphate 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.9%
Pepst : Pepstatine
PHGPX : Glutathion Peroxydase spécifique des phospholipides hydroperoxydés.
PM : Poids moléculaire
PMN : polymorphonucléaire
PMSF : α-toluène sulfonyl
RMN : Résonance magnétique nucléaire
$ROO^{\cdot}$: Radical peroxy lipidique
ROOH : Peroxyde lipidique
RPM : Tours par minute
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SOD : Superoxyde Dismutase
STI : Soya bean trypsin inhibitor
TBA : Acide thiobarbiturique
TBHP : ter-butyl hydroperoxyde
TEMED : NN N'N'-tétraméthyléthylène
Tris : Tris hydroxyméthyl aminométhane

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

Le paradoxe de l'oxygène.

Le maintien et la propagation de la vie nécessite la production et l'utilisation d'énergie. A l'exception d'un nombre restreint d'espèces peu évoluées, les animaux utilisent l'oxygène pour tirer des molécules substrats l'énergie nécessaire à leur survie. Les raisons qui ont conduit le monde animal à utiliser l'oxygène sont multiples : le rendement énergétique élevé des réactions d'oxydation avec l'oxygène, la disponibilité et la distribution de l'oxygène dues à son état gazeux et sa solubilité dans l'eau et la régénération de l'oxygène par le monde végétal qui assure un approvisionnement continu à très long terme.

Le paradoxe de l'oxygène est que, si il est nécessaire comme accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire, il peut aussi être une molécule toxique. Ainsi, l'homme placé dans une atmosphère d'oxygène pur souffre au bout de quelques heures d'une inflammation trachéale et au bout de quelques jours de lésions pulmonaires mortelles.

Parallèlement aux processus biochimiques utilisant l'oxygène, s'est développé un système biochimique visant à limiter la toxicité de celui-ci. La vie aérobie est donc caractérisée par un équilibre constant entre utilisation et détoxification de l'oxygène. Un manque d'oxygène entraîne la mort par manque de production d'énergie, un surplus d'oxygène entraîne la mort par toxicité de ses dérivés. L'organisme doit maintenir la concentration en oxygène entre ces deux seuils.

La toxicité de l'oxygène ne s'exprime pas par la molécule d'oxygène elle-même qui est peu réactive. C'est essentiellement lorsqu'elle est réduite au cours de réactions biochimiques utilisant l'oxygène que des intermédiaires dangereux apparaissent : en premier lieu le radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peuvent à leur tour donner naissance à des radicaux plus réactifs encore. Ces processus furent assez tardivement étudiés étant donné le caractère très éphémère des radicaux libres et donc la difficulté de les mettre en évidence. On prit conscience de l'existence d'un système antioxydant organisé lorsque Mc Cord et Fridovich en 1969 découvrirent la superoxyde dismutase (SOD) qui transforme les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène, ce qui confirmait l'existence significative de ce radical et sa toxicité chez les organismes vivants.

Radicaux libres et vieillissement.

Les systèmes de défense contre les radicaux libres et les peroxydes limitent grandement les dommages auxquels donnerait lieu la libération du radical superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et d'autres radicaux dérivés. Mais ceci ne signifie pas la suppression totale des radicaux, dont les agressions sont mineures mais continuelles. On peut ainsi se demander si à long terme, elles ne peuvent pas avoir des conséquences sur l'organisme. Certains auteurs pensent dès lors que la lente accumulation des dommages serait peut-être à l'origine des modifications que l'on impute à l'âge. Cette idée s'accorde avec certaines données expérimentales telle que l'accumulation intracellulaire au cours du vieillissement de produit de la peroxydation comme la lipofuscine (Gordon, 1974) ou la prolongation de la durée de vie moyenne des animaux par la restriction calorique couplée à une diminution de la production d'énergie et donc, on peut le supposer, de la production de radicaux libres (Masoro 1988). Cependant, les radicaux libres n'expliquent pas tous les faits ce qui incite Pryor (1984) à dire : "les radicaux n'affectent pas la durée de vie maximale génétiquement déterminée pour chaque espèce mais les réactions radicalaires contribuent de façon importante au développement des maladies déterminant la durée de vie moyenne de la population".

Les recherches continuent donc leur cours pour déterminer dans quelle mesure chaque critère incriminé dans le vieillissement (les radicaux libres étant un de ceux-ci) intervient et par quel type d'interrelation ils se combinent pour provoquer le phénomène global de vieillissement.

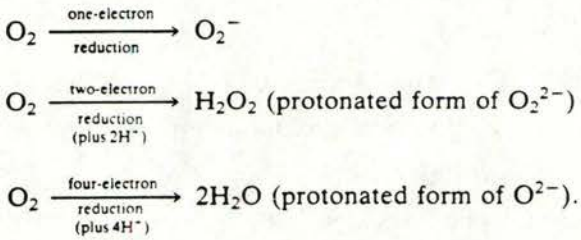


Figure I-1 : Production de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène par réduction univalente de l'oxygène (Halliwell et Gutteridge 1985).

CHAPITRE 1 : LES RADICAUX LIBRES, LES ANTIOXYDANTS ET LES ATTAQUES RADICALAIRES DES PROTEINES.

1.1 Les radicaux libres.

1.1.1 Définition

Les radicaux libres peuvent être définis comme toute espèce moléculaire ou atomique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés et capable d'une existence indépendante.

Les radicaux libres sont formés par exemple lorsqu'un lien covalent est rompu et que chaque atome ainsi séparé garde un électron de la liaison. Ce processus est connu sous le nom de fission homolytique.

1.1.2 Réactivité des radicaux libres.

Les radicaux libres ont une réactivité très variable même à 37°C. Le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) par exemple est très réactif. Il réagit presque aussi vite qu'il n'est formé et entre en collision avec les molécules proches. La plupart des radicaux ont une réactivité importante. Ceci entraîne que leur concentration est très faible. Certains radicaux libres cependant sont relativement stables : par exemple les nitroxydes ($R_2NO^{\cdot}$).

1.1.3 Les radicaux libres dérivés de l'oxygène.

En biologie, pour les organismes aérobies, on a constaté que l'utilisation de l'oxygène dans divers processus biochimiques conduisait à la formation de molécules toxiques radicalaires et non radicalaires. Ce sont ces molécules qui nous intéresseront dans ce travail et que nous allons décrire ici.

Au cours des réactions biochimiques impliquant l'oxygène, celui-ci peut être réduit par un électron, deux électrons ou quatre électrons (figure I-1). La réduction monovalente de l'oxygène produit le radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$. La réduction par deux électrons donne l'ion peroxyde qui est immédiatement protoné pour donner le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le produit de la réduction par quatre électrons est l'eau.

La réduction de l'oxygène par trois électrons est possible mais se réalise par l'intermédiaire d'un catalyseur métallique, souvent le fer ou le cuivre,

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-} \qquad \text{(Fenton reaction)}$$

Figure I-2 : Production du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

$$Fe^{3+} + O_2^{-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2 \qquad (O_2^{-} \text{ reducing the iron salt})$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-} \qquad \text{(Fenton reaction)}$$

$$\text{Net: } O_2^{-} + H_2O_2 \xrightarrow[\text{catalyst}]{\text{Fe-salt}} O_2 + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

(sometimes called an *iron-catalysed Haber–Weiss reaction*)

Figure I-3 : Production du radical hydroxyle par la réaction de Haber Weiss (Halliwell et Gutteridge 1985).

et est connue sous le nom de réaction de Fenton (figure I-2). Cette réaction produit le radical hydroxyle dont la réactivité est très importante.

Etant donné que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) se dismute spontanément avec une constante de vitesse de 0.35 M^{-1} sec^{-1} (Hamers et Roos 1985) pour donner le peroxyde d'hydrogène; étant donné d'autre part que l'anion superoxyde réagit spontanément avec le fer ferrique pour le réduire en fer ferreux, lorsque le fer et l'anion superoxyde sont présents et disponibles, les conditions sont réunies pour produire le radical hydroxyle. L'ensemble des réactions est connu sous le nom de réaction de Haber-Weiss (figure I-3).

La disponibilité du fer est très faible dans les tissus (Halliwell et Gutteridge 1984). Dans le sang, il est véhiculé par la transferrine et sa concentration libre est pratiquement nulle. Dans les cellules, le fer est stocké dans la ferritine qui est rarement saturée, indiquant que le fer libre dans les cellules doit être en concentration très faible. Le fer libre est celui qui transite entre la transferrine et la ferritine et qui sert dans la synthèse des protéines qui le requièrent. Ce fer libre est probablement chélaté par des constituants cellulaires tels que le citrate, l'ATP, le GTP. Ce tout petit stock de fer non lié aux protéines pourrait fournir le fer de la réaction de Fenton (Halliwell et Gutteridge 1984). Cependant certains auteurs suggèrent que le fer lié aux protéines pourrait être libéré lors de stress oxydants importants (Marklund 1988, Biémond *et al.* 1986, Aust *et al.* 1985) et pourrait ainsi participer à l'explosion de la production des radicaux.

Une autre espèce réactive dérivée de l'oxygène est l'oxygène singulet. Ce dernier possède le même nombre d'électrons que l'oxygène moléculaire; mais alors que l'oxygène moléculaire possède deux électrons non appariés de même spin sur la dernière couche électronique, l'oxygène singulet possède deux électrons de spins opposés sur cette dernière couche soit sur la même orbitale ($^1\Delta g$), soit sur deux orbitales différentes ($^1\Sigma g^+$). Il peut se former lorsque certains pigments (rétinol ou porphyrine par exemple) sont illuminés en présence d'oxygène moléculaire (Foote 1976).

Il existe enfin des radicaux organiques qui résultent essentiellement de l'attaque radicalaire des lipides de membrane et que l'on appelle du terme générique de radicaux alkoxy ($RO^{\cdot}$) ou radicaux peroxy ($ROO^{\cdot}$). Il existe également des peroxydes organiques (ROOH). Le R représente une chaîne carbonée de longueur variable issu des lipides de membranes lors du processus de la peroxydation lipidique dont nous reparlerons plus loin.

Figure 18-14
La chaîne respiratoire dans les mitochondries des mammifères et les points d'entrée des électrons à partir de divers substrats. Les sites d'inhibition du transport des électrons sont également indiqués, ainsi que les niveaux probables de conversion de l'énergie en ATP. *Le symbole* FP *désigne les flavoprotéines;* FP_1 *est la* NADH *déshydrogénase.* Fe.S *désigne les centres fer-soufre. Leurs positions dans la chaîne sont encore mal connues.* Q *est l'ubiquinone (coenzyme* Q).

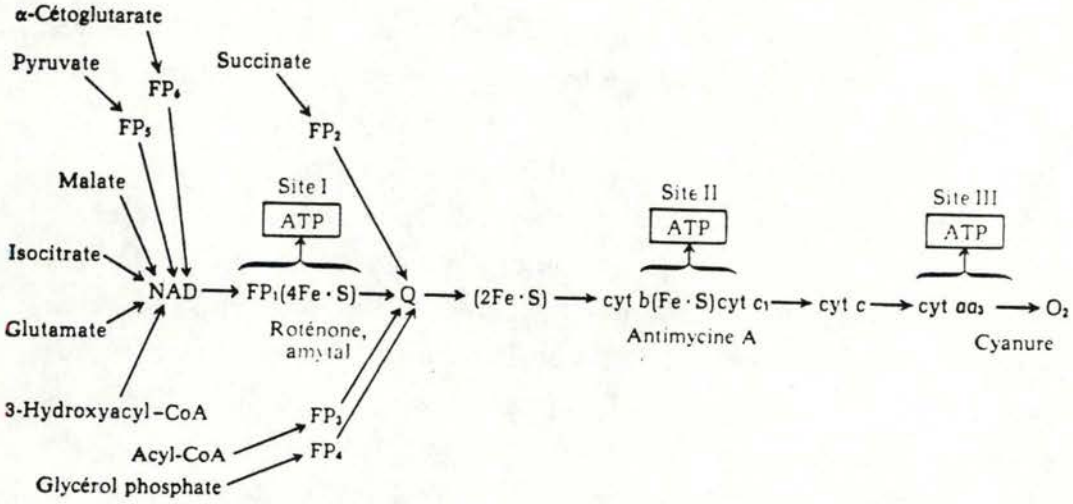


Figure I-4 : Chaîne des transporteurs d'électrons de la respiration mitochondriale (Lehninger 1977).

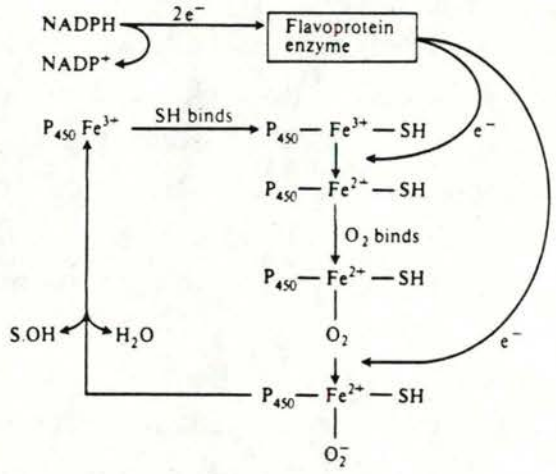


Fig. 3.17. Mechanism for substrate hydroxylation by cytochrome P_{450} in liver. SH represents the substrate molecule. The mechanism of P_{450} hydroxylation appears similar in other tissues or bacteria, but the source of reducing power used is different. The one shown is for liver endoplasmic reticulum. The mechanism by which the P_{450}—Fe(II)—O_2^- complex produces a hydroxylating species is not known. It is possible that there is a loss of water to give P_{450}—$[FeO]^{3+}$, in which the iron has a nominal valency of 5. It may be that the actual valency state of the iron is +4 (i.e. a ferryl species, FeO^{2+}) and the extra oxidizing capacity is located elsewhere on the molecule, as in compound I of horseradish peroxidase.

Figure I-5 : Mécanisme d'hydroxylation par le cytochrome P450 (Halliwell et Gutteridge 1985).

1.2 Production des radicaux libres dans les systèmes vivants.

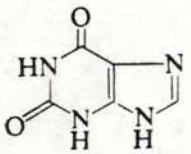
1.2.1 Respiration mitochondriale.

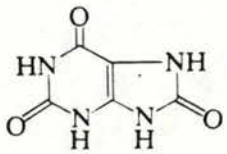
Le processus biochimique de la respiration est celui qui produit le plus de radicaux superoxydes dans une cellule normale (Chance *et al.* 1979). La respiration fonctionne comme une chaîne de transporteurs d'électrons capables de transférer des électrons de molécules substrats vers l'oxygène moléculaire par l'intermédiaire de molécules transporteuses qui passent alternativement de leur état oxydé à leur état réduit et vice versa (figure I-4). L'autooxydation de certains intermédiaires comme l'ubiquinone (coenzyme Q) pourrait être responsable de la production de radicaux superoxydes observée lors de la respiration mitochondriale (Nohl et Jordan 1986). Nohl et Hegner ont aussi montré qu'au cours du vieillissement, la production de $O_2^{\cdot -}$ par les mitochondries augmente (Nohl et Hegner 1978).

1.2.2 Le système microsomal P450.

Ce système participe à l'hydroxylation de certains substrats et notamment des substrats hydrophobes toxiques. Il agit ainsi comme un système important de détoxification des xénobiotiques. Ce système comprend notamment une flavoprotéine NADPH cytochrome P450 réductase et un cytochrome microsomal P450. les électrons sont transférés du NADPH à la flavoprotéine. Les électrons servent ensuite à réduire le Fe^{3+} du cytochrome P450 et l'oxygène moléculaire est fixé de telle sorte qu'un atome d'oxygène est réduit en eau et l'autre est introduit dans le substrat organique (figure I-5) (Halliwell et Gutteridge 1985).

Ce système microsomal du foie catalyse l'hydroxylation d'un grand nombre de substrats différents tels que les stéroïdes, les acides gras, le squalène, mais aussi des médicaments tels que le phénobarbital, la morphine, des hydrocarbures cancérogènes etc... . Pendant son cycle de fonctionnement, l'oxygène moléculaire qui a reçu un électron peut se libérer. Un radical superoxyde libre peut ainsi se retrouver dans les cellules (Chance *et al.* 1979, Halliwell et Gutteridge 1985).


xanthine


uric acid

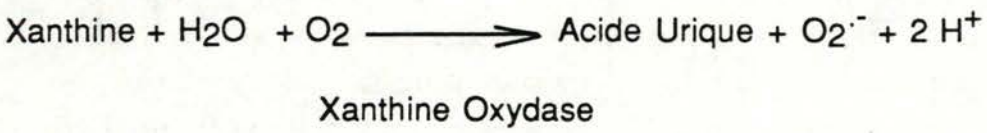


Figure I-6 : Production des anions superoxydes par la xanthine oxydase.

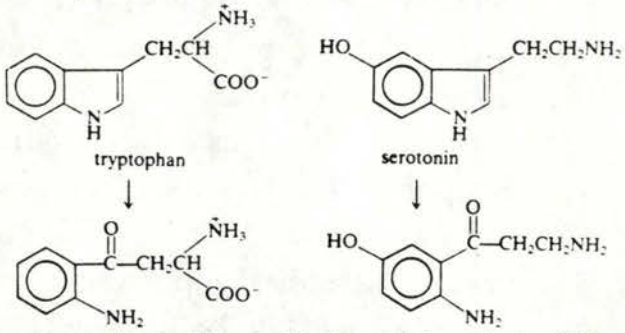
Indoleamine dioxygenase	Most animal tissues, especially small intestine, not liver. Activity of enzyme in lung increases during virus infection or after injection of bacterial endotoxin (30–100 fold) but is not increased by exposure to elevated oxygen concentrations.	Cleaves the indole ring of tryptophan and several related compounds such as serotonin  tryptophan serotonin O_2^- produced and involved in the catalytic mechanism. SOD inhibits the oxidation. Inhibition of the SOD in isolated rabbit intestine cells by diethyldithiocarbamate increased tryptophan degradation, as did addition of xanthine.
Tryptophan dioxygenase	Liver	Same reaction as above but specific for tryptophan.

Figure I-7 : Réaction de l'indoleamine dioxygénase et la tryptophane dioxygénase avec production concomitante des anions superoxydes (Halliwell et Gutteridge 1985).

1.2.3 Autooxydation.

Certaines molécules peuvent s'oxyder lentement en présence de l'oxygène moléculaire : c'est l'autooxydation. Cette réaction donne naissance au radical superoxyde. Parmi les molécules biologiques capables d'autooxydation, on trouve les thiols, les catécholamines (dopamine, adrénaline,...) et les flavines par exemple (Fridovich 1983).

1.2.4 Les réactions enzymatiques.

De nombreuses réactions enzymatiques génèrent des radicaux libres et principalement le radical superoxyde. En voici quelques exemples :

L'enzyme la plus connue à ce sujet est la xanthine oxydase, une enzyme qui provient de la protéolyse partielle de la xanthine déshydrogénase. La xanthine oxydase transforme la xanthine en acide urique en utilisant l'oxygène moléculaire et en libérant un radical superoxyde (figure I-6).

L'aldéhyde oxydase localisée dans le foie est une enzyme peu spécifique pour le substrat aldéhyde. Elle transforme divers aldéhydes en acide par l'oxygène moléculaire et libère également des anions superoxydes.

La tryptophane dioxygénase ou l'indoleamine dioxygénase clivent l'anneau indole et produit un radical superoxyde qui est impliqué dans le mécanisme catalytique. La SOD inhibe d'ailleurs cette oxydation du substrat (Halliwell et Gutteridge, 1985, Ozaki *et al.* 1987) (figure I-7).

Diverses peroxydases non spécifiques des plantes et des bactéries produisent aussi l'anion superoxyde au cours de leur réaction.

La monoamine oxydase localisée dans la membrane externe des mitochondries catalyse la déamidation des amines primaires et secondaires en aldéhydes et produit du peroxyde d'hydrogène (figure I-8). Il a été montré que lorsqu'elle réagit avec la 5,7-dihydroxytryptamine, une neurotoxine inhabituelle, des radicaux hydroxyles sont produits (Cohen 1985).

La cyclooxygénase, enzyme qui transforme l'acide arachidonique en prostaglandine (PGG2) et peut réduire cette PGG2, semble produire un radical oxygéné qui l'inactive. (Flohé 1982).

On ne peut oublier de mentionner la NAD(P)H oxydase des leucocytes dont le rôle est de produire des radicaux superoxydes qui participent à l'activité lytique des globules blancs contre les agents infectieux ou lors du processus de l'inflammation (figure I-9).

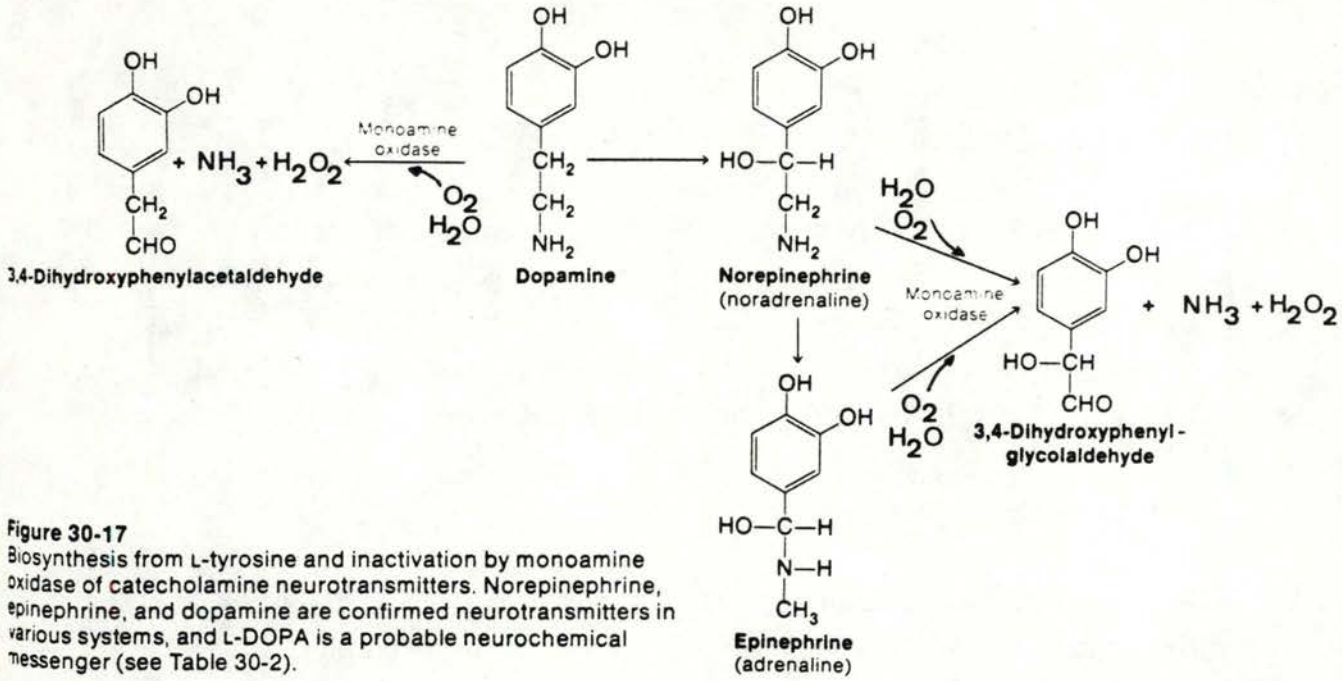


Figure 30-17
Biosynthesis from L-tyrosine and inactivation by monoamine oxidase of catecholamine neurotransmitters. Norepinephrine, epinephrine, and dopamine are confirmed neurotransmitters in various systems, and L-DOPA is a probable neurochemical messenger (see Table 30-2).

Figure I-8 : Substrats et produits de la monoamine oxydase dont la fonctionnement entraîne la production de peroxyde d'hydrogène (Zubay 1983).

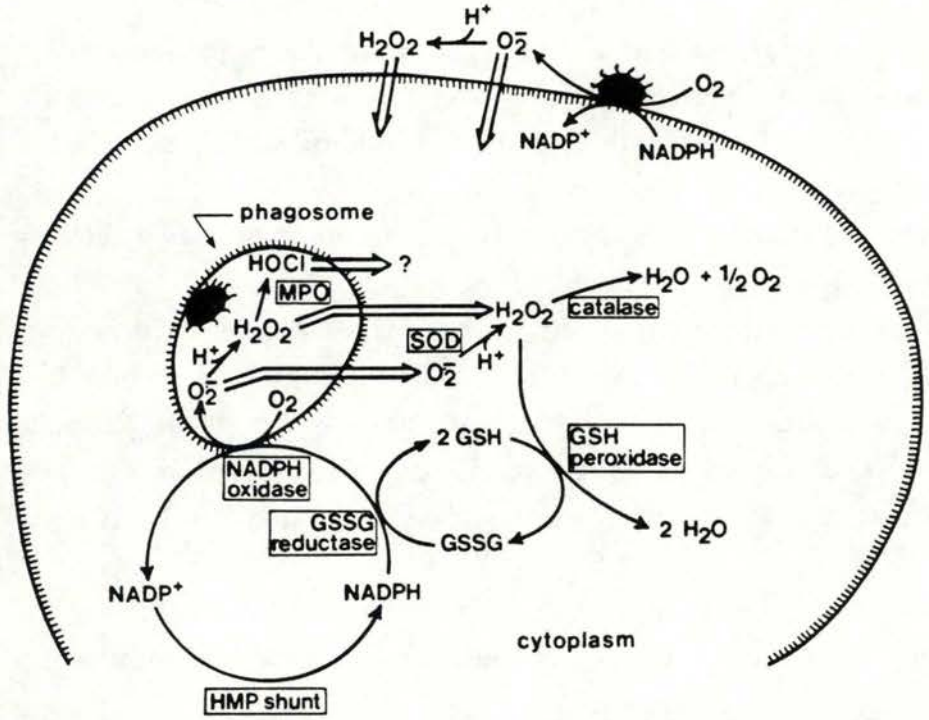


Fig. 1. Schematic representation of the generation of, and defence against, reactive oxygen species by neutrophils. Attachment of microorganisms activates an oxidase system in the plasma membrane of the neutrophils that converts oxygen into superoxide and—directly or indirectly—into hydrogen peroxide. When O_2^- or H_2O_2 leaks into the cytoplasm, SOD, catalase and the glutathione redox system protect the cells. When HOCl leaks into the cytoplasm, there is no known protecting system.

Figure I-9 : Production des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène par les leucocytes activés (Hamers, M et Roos, D. in Oxidative stress, Sies, H. Ed. Academic Press inc. London, 1985, p 353)

1.2.5 L'inflammation (Flohé *et al.* 1985).

Les radicaux libres sont impliqués de manière très diverse dans les processus inflammatoires. S'il est très difficile de détecter pour chaque tissu enflammé l'importance relative des divers radicaux directement impliqués dans les dommages tissulaires, par contre, de nombreux exemples montrent que la SOD, la catalase et la GPX, de même que des scavengers de radicaux libres apportent un effet protecteur, ce qui démontre sans ambiguité que des processus radicalaires sont impliqués.

Par exemple des cellules de divers types exposées à des PMN activés voient leur viabilité diminuer. Les dommages passent notamment par des attaques radicalaires des biomembranes. Les PMN activés dégradent également l'acide hyaluronique, un constituant du milieu intercellulaire, et le collagène.

Les radicaux libres jouent un rôle dans l'amplification des réponses inflammatoires, notamment dans le chémotactisme. Plusieurs auteurs, en effet, ont montré que du sérum incubé avec des $O_2^{\cdot -}$ ou même simplement de l'arachidonate incubé avec des $O_2^{\cdot -}$ produisaient un facteur chémotactique. D'autre part, les $O_2^{\cdot -}$ peuvent participer au phénomène de chémotactisme lui-même : des PMN incubés avec de la SOD ne répondent plus à l'effet chémotactique du LTB4, facteur connu pour induire la production de $O_2^{\cdot -}$ par les PMN humains.

Cependant, les radicaux libres dérivés de l'oxygène peuvent aussi agir à l'encontre de l'amplification de l'inflammation. Les leucotriènes C4, D4 et E4 qui ont une activité prononcée sur les muscles lisses des bronches et vaisseaux sanguins peuvent être inactivés par oxydation.

Ces observations, qui démontrent que les radicaux libres peuvent agir sur les mécanismes de l'inflammation, ne permettent cependant pas de connaître l'importance de ces radicaux dans diverses inflammations in vivo. La pharmacocinétique complique l'interprétation des résultats des expériences réalisées sur des organismes entiers avec des scavengers de radicaux. Le rôle des $O_2^{\cdot -}$ dans la formation de facteur(s) chémotactique(s) a cependant pu être montré.

Au niveau des expérimentations cliniques, l'effet anti-inflammatoire de la SOD a été montré pour des applications locales de l'enzyme au site d'inflammation, comme dans le cas de l'ostéoarthrite du genou.

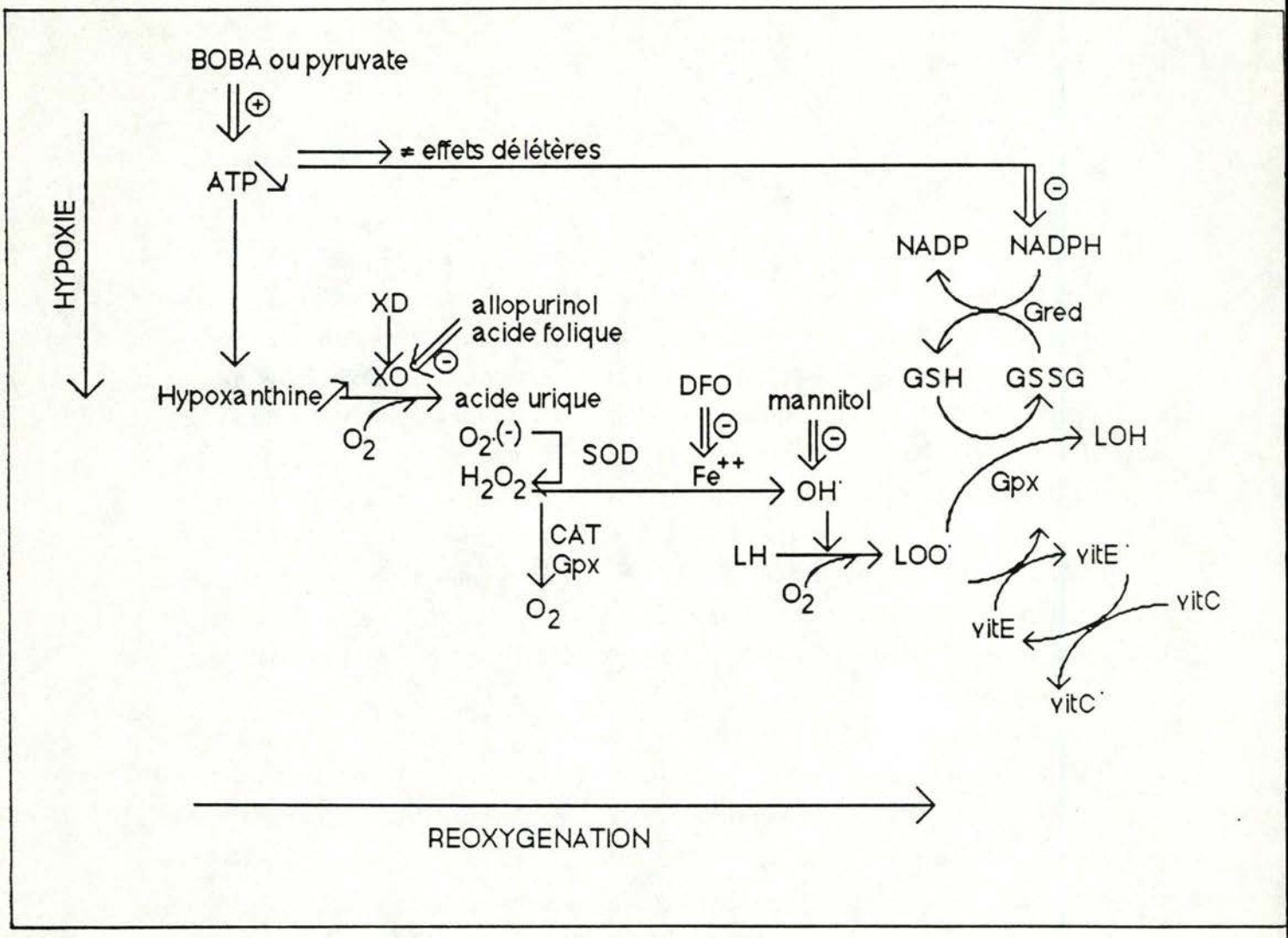


Figure I-10 : Proposition d'un mécanisme de production des radicaux libres et des peroxydes et altérations cellulaires lors d'une hypoxie/réoxygénation. XD = Xanthine déshydrogénas, XO = Xanthine oxydase, LH = acide gras insaturé, LOOH = peroxyde d'un acide gras insaturé, LOH = alcool correspondant (Michiels 1989).

1.2.6 La lésion de reperfusion.

L'ischémie d'organes tels que le coeur, le cerveau, le foie, ... est un évènement catastrophique pour le maintien des fonctions essentielles de ces organes. La reperfusion rapide s'avère nécessaire afin de préserver les tissus de la nécrose. Cependant, on a constaté que la reperfusion en elle-même d'un organe ischémié provoquait des lésions spécifiques (Flaherty et Weisfeldt 1988). Des études récentes ont démontré que les radicaux libres dérivés de l'oxygène jouent un rôle important dans la genèse des lésions de reperfusion dans le coeur : arythmies et nécrose (Manning *et al.* 1988, Nejima *et al.* 1989, Zweier 1988, Zweier *et al.* 1988, Baker *et al.* 1988) et aussi dans le cerveau (Armstead *et al.* 1988). Cette production radicalaire a été mise en évidence aussi bien par des mesures directes des radicaux (Baker *et al.* 1988, Armstead *et al.* 1988) que par l'observation d'effet protecteur des scavengers (Gharagozloo *et al.* 1988, Heuer *et al.* 1988, Weiss *et al.* 1988)(figure I-10).

Les mécanismes principaux responsables de la génération des radicaux libres lors de la reperfusion semblent être les suivants :

a) La xanthine oxydase : au cours de l'ischémie, la xanthine déshydrogénase est transformée en xanthine oxydase par protéolyse partielle (Chambers *et al.* 1985, Downey *et al.* 1988, Manning *et al.* 1988). Dans le même temps l'absence d'oxygène empêche la synthèse d'ATP et celui-ci se dégrade et provoque l'accumulation d'hypoxanthine (Jennings *et al.* 1981, Flaherty et Weisfeldt 1988). Lors de la reperfusion, la xanthine oxydase oxyde l'hypoxanthine et la xanthine provoquant une production massive de radicaux superoxydes.

b) La respiration mitochondriale pourrait être endommagée lors de l'ischémie et en période de réoxygénation, la production de superoxyde par la chaîne des transporteurs pourrait être exacerbée (Flaherty et Weisfeldt 1988)

c) Les globules blancs s'accumulent d'abord en bordure de la zone ischémiée puis dans cette zone ischémiée lors de la reperfusion (Flaherty et Weisfeldt 1988, Jolly et Lucchesi 1983).

d) un rôle important est à accorder au calcium qui est maintenu hors du cytosol par des systèmes de transports ioniques nécessitant de l'énergie. Pendant la période d'ischémie, la concentration en ATP diminue et le calcium pourrait être libéré dans le cytoplasme engendrant des effets tels que l'activation de protéases Ca^{++} dépendantes qui pourraient être responsables

entre autre de la transformation de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase (Flaherty et Weisfeldt 1988). D'autre part, les radicaux libres ont une action d'inactivation des ATPases Ca^{++} dépendantes. La reperfusion engendre une augmentation massive du Ca^{++} mitochondrial et tissulaire (Flaherty et Weisfeldt 1988). La perturbation de la régulation du calcium peut alors entraîner des effets physiologiques catastrophiques étant donné le nombre et l'importance des processus dans lequel cet ion est impliqué (Hearse et Tosaki 1988).

1.2.7 Les médicaments.

Certains médicaments produisent des radicaux libres lorsqu'ils sont à l'intérieur des cellules. Ainsi l'adriamycine, un antibiotique fréquemment utilisé dans le traitement du cancer possède une toxicité cardiaque non négligeable. Cette toxicité est due à la réduction de l'adriamycine par la NADH déshydrogénase mitochondriale avec transfert d'un électron à l'oxygène produisant un radical $O_2^{\cdot -}$. Dans les microsomes elle peut également subir un cycle rédox en présence de NADPH (Nakano *et al.* 1989, Halliwell et Gutteridge 1985, Jones 1985). D'autres médicaments antitumoraux présentent également la capacité de produire des radicaux libres par exemple la bléomycine, l'actinomycine D, la mitomycine C (Halliwell et Gutteridge 1985, Giloni *et al.* 1981). Des molécules portant un groupement nitrile comme la nitrofurantoïne (utilisée comme antiseptique urinaire) provoquent aussi la formation de radicaux superoxydes et sont toxiques pour les cellules (Michiels *et al.* 1989).

1.3 Toxicité des radicaux libres.

La toxicité des radicaux libres est due à leur capacité de réagir avec les molécules biologiques de tout type et de détruire ainsi leurs fonctions au sein des cellules et des tissus.

Nous allons examiner leurs effets sur les molécules biologiques les plus importantes : l' ADN, les lipides et les protéines.

1.3.1 Attaques radicalaires sur l' ADN.

C'est probablement le radical hydroxyle qui endommage le plus l'ADN. Il peut réagir aussi bien avec la partie sucre qu'avec les bases nucléiques,

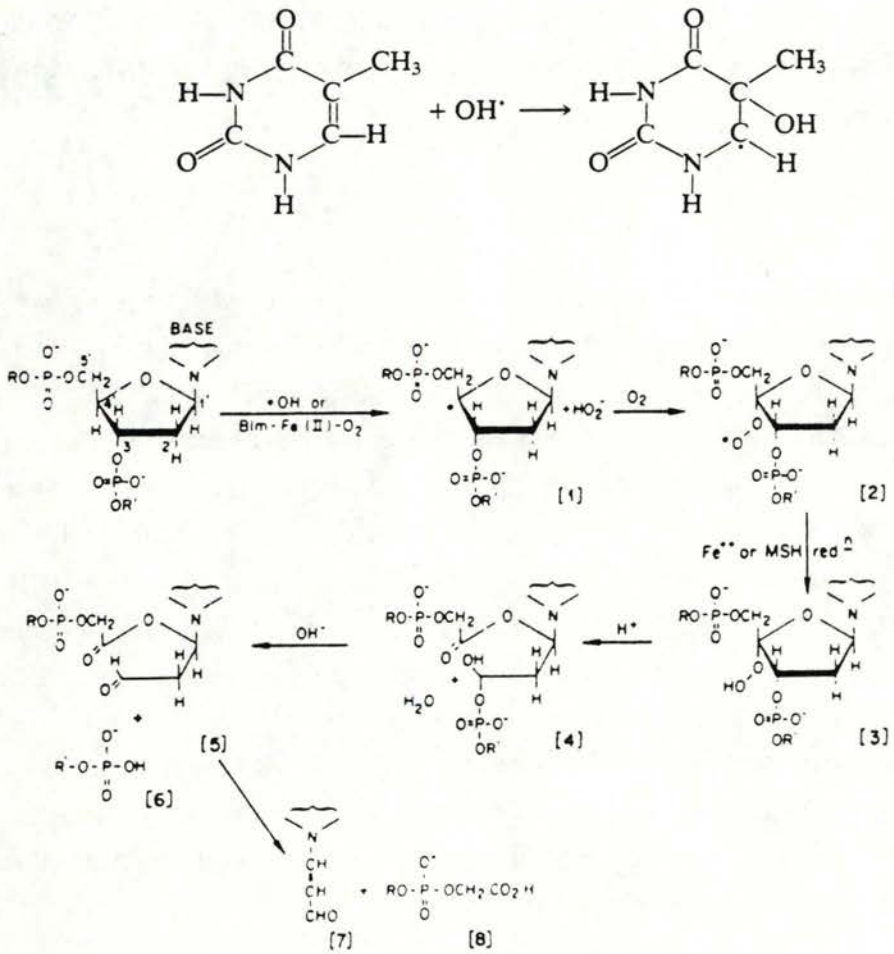


Figure I-11 : Réaction du radical hydroxyle sur la thymine et sur la partie sucre de l'ADN (Halliwell et Gutteridge 1985 et Giloni et al 1981).

purines ou pyrimidines. Sur les bases nucléiques, les radicaux hydroxyles peuvent s'additionner perturbant les liaisons hydrogènes entre les bases des brins opposés. Sur les sucres, ils peuvent également s'additionner, mais dans ce cas on observe une cassure de la liaison entre le sucre et le phosphate ce qui engendre une cassure de la chaîne d'ADN (Figure I-11) (Schulde-Frohlinde et Von Sonntag 1985).

Le radical superoxyde ne semble pas agir seul sur l'ADN; son action se réalise probablement via la production du radical hydroxyle. Il en va de même pour le peroxyde d'hydrogène.

L'oxygène singulet peut également réagir avec des doubles liaisons et former des endoperoxydes qui se dégradent ensuite en une variété de produits. L'ADN et les bases nucléiques en particulier peuvent donc subir les attaques de l'oxygène singulet (Halliwell et Gutteridge 1985).

Les produits de la peroxydation lipidique, les radicaux peroxy et les aldéhydes comme la malonaldéhyde et le 4-hydroxynonénal peuvent réagir avec les amines libres et donc avec les bases de l'ADN. Comme ils peuvent également réagir avec les protéines et qu'ils peuvent être bi ou multifonctionnels, des réactions de liaison entre les protéines et l'ADN sont possibles résultant en des complexes moléculaires très variés (Vaca *et al.* 1988).

1.3.2 Attaques radicalaires sur les lipides (Esterbauer 1982).

Les attaques radicalaires sur les lipides conduisent au phénomène de la peroxydation lipidique des membranes, phénomène très important et très étudié. En effet, la perte des propriétés membranaires (modification qualitative de la composition en lipides, perte de fluidité, largage de peroxydes et d'aldéhydes, ...) provoque de nombreuses perturbations dans la physiologie cellulaire.

Il est généralement accepté que la peroxydation des acides gras polyinsaturés s'effectue via une réaction en chaîne des radicaux libres. Le processus débute par une réaction d'initiation, la formation d'un radical initial capable d'attaquer des groupes α-méthylène (CH_2 adjacent à une ou plusieurs double liaison C-C). Ceci conduit à la formation d'un radical lipidique $L^{\cdot}$. Ce radical $L^{\cdot}$ réagit avec l'oxygène moléculaire et forme un radical peroxy $LOO^{\cdot}$. Ce dernier peut attaquer un autre groupe α-méthylène pour lui abstraire un hydrogène, ce qui produit un nouveau radical lipidique et un hydroperoxyde lipidique. Le radical lipidique peut de

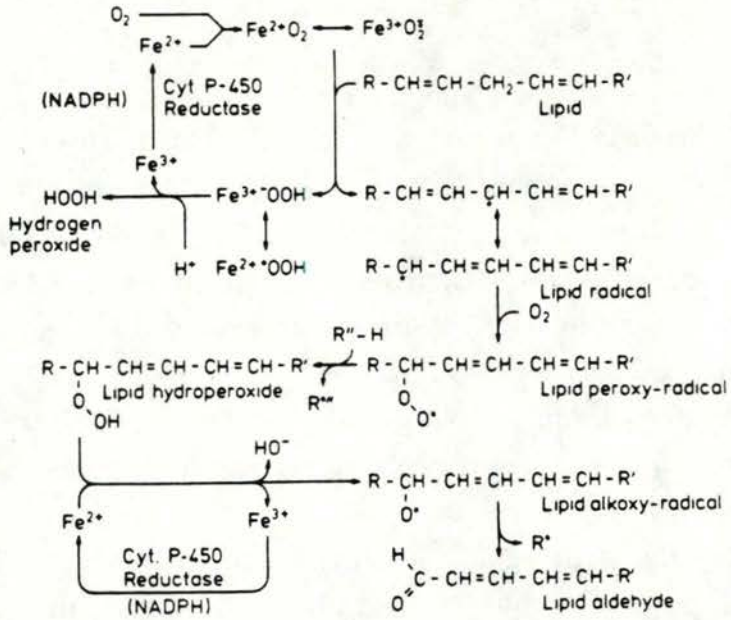


Fig. 1. Initiation and propagation of microsomal lipid peroxidation induced by iron ions (from Ref. 7).

Figure I-12 : Mécanisme de la peroxydation lipidique et implication du fer dans cette réaction (Kappus 1987).

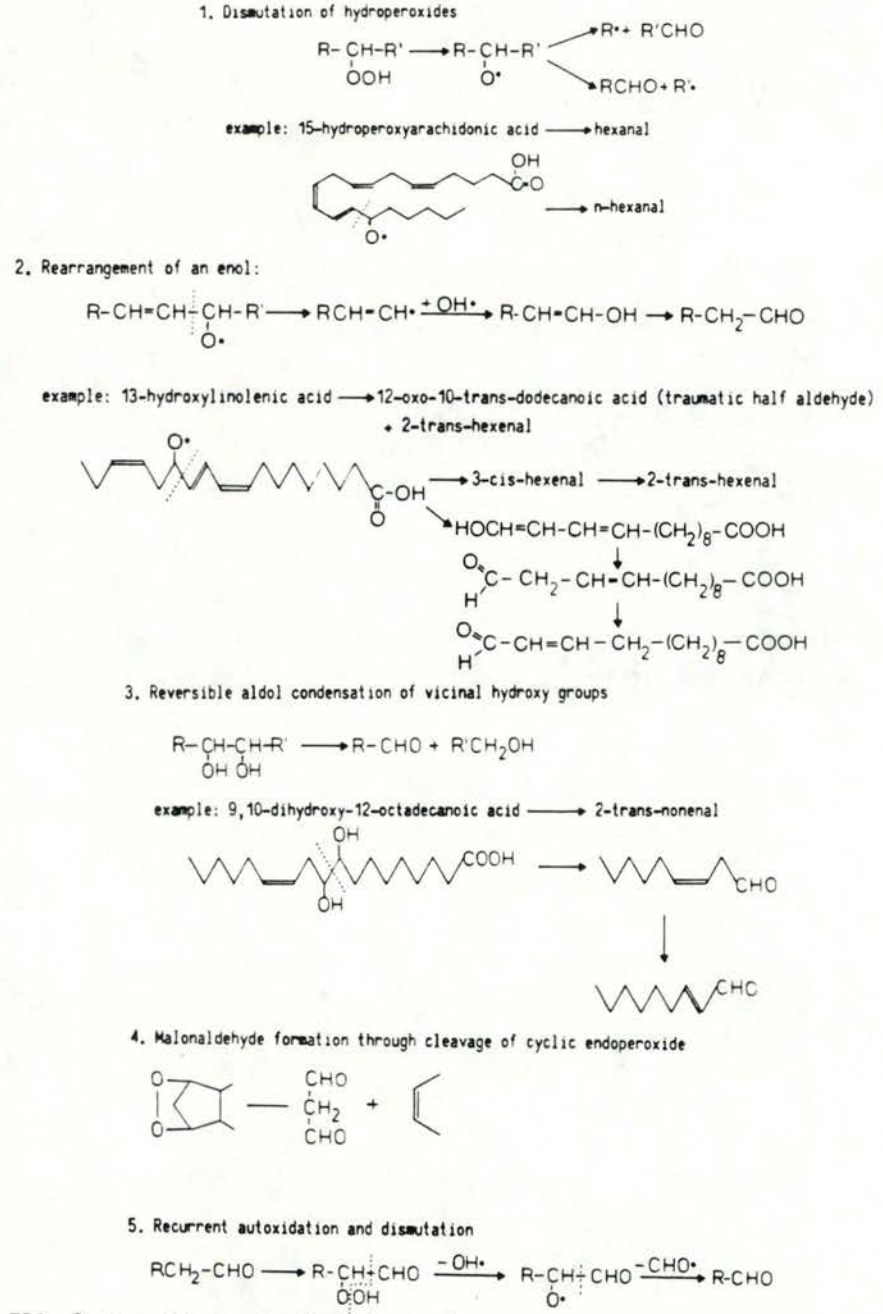
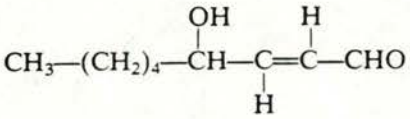


FIG. 2 Possible mechanisms for chain cleavage reactions leading to aldehydes.

Figure I-13 : Production des aldéhydes lors de la peroxydation lipidique (Esterbauer 1982).

4-hydroxy-2,3-*trans*-nonenal



Malonaldehyde (sometimes called malondialdehyde)

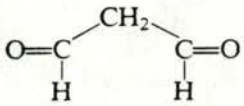


Figure I-14 : Structure des aldéhydes les plus réactionnels produits lors de la peroxydation lipidique : 4-hydroxynonénal et malonaldéhyde.

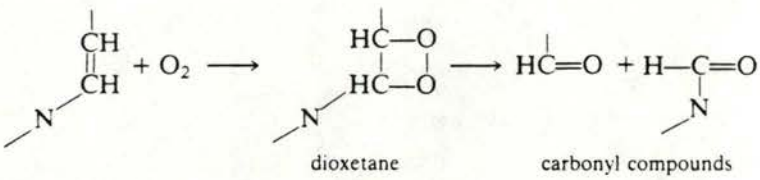


figure I-15 : Réaction de l'oxygène singulet sur une double liaison comme celle que l'on peut rencontrer dans un résidu tryptophane. L'histidine peut également réagir suivant cette réaction. (Halliwell et Gutteridge 1985).

nouveau réagir avec l'oxygène moléculaire : la réaction en chaîne se propage (figure I-12). Les peroxydes lipidiques se décomposent rapidement en d'autres produits car ils sont instables. Suivant le type de lipide attaqué, les hydroperoxydes lipidiques peuvent être convertis en une grande diversité de produits contenant des groupes fonctionnels oxygénés variés tels que aldéhydes, cétones, hydroxyles, époxydes, carboxyles et peroxydes (figure I-13). Parmi ces composés, les aldéhydes ont une grande importance étant donné leur réactivité élevée avec de nombreux types de molécules différents. Les aldéhydes à longues chaînes saturées ont une réactivité faible vis à vis des molécules biologiques. Les plus réactifs des aldéhydes sont le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, et les autres aldéhydes à chaînes courtes. Les alcénals et 4 hydroxyalcénals sont aussi hautement réactifs à pH neutre et à faible concentration (figure I-14).

Si l'on peut affirmer que le radical hydroxyle est capable d'initier la peroxydation lipidique,par abstraction d'un hydrogène à un groupe α-méthylène (Halliwell et Gutteridge 1985), il est cependant très difficile d'identifier le radical initial responsable de cette peroxydation lors de peroxydations lipidiques déclenchées dans des sytèmes biologiques particuliers dans des conditions particulières.

1.3.3 Attaques radicalaires sur les protéines.

Les acides aminés peuvent réagir avec différents types de radicaux. De très nombreux acides aminés réagissent très facilement avec le radical hydroxyle et particulièrement le tryptophane, l'histidine, la tyrosine, la phénylalanine et la cystéine.

L'oxygène singulet réagit aussi facilement avec l'histidine, le tryptophane, la méthionine et la cystéine (figure I-15).

Le radical superoxyde quant à lui est apparament peu réactif avec les acides aminés. Il peut oxyder des composés contenant des thiols, la cystéine par exemple, mais lentement.

Le peroxyde d'hydrogène est un agent faiblement oxydant et réagit aussi avec les thiols qu'il oxyde.

On peut donc voir que la réactivité des radicaux vis à vis des acides aminés se manifeste essentiellement par le radical hydroxyle.

L'étude de la réactivité des radicaux sur les protéines confirme ces réactions avec quelques nuances. Par exemple, bien que le tryptophane, la tyrosine, l'histidine et la cystéine soient les plus réactifs, la sélectivité de la

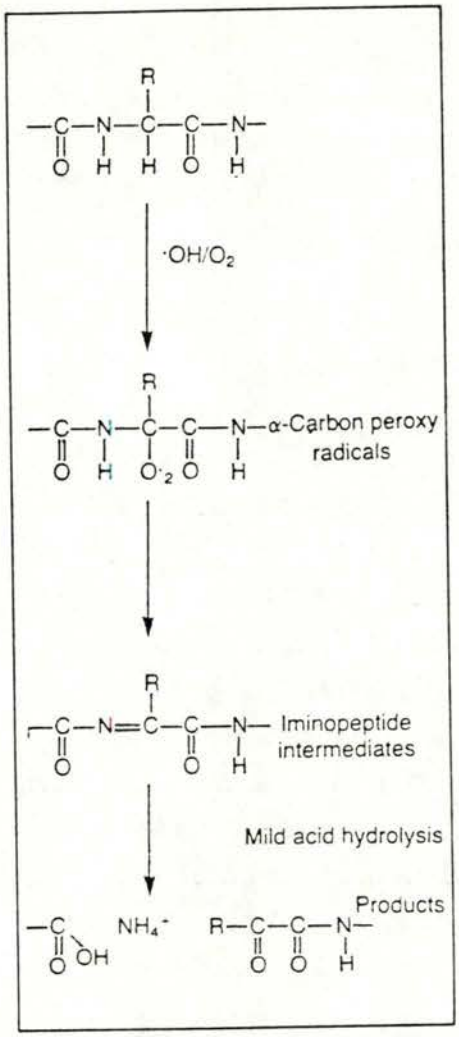


Fig. 1. Reaction scheme for model polypeptides proposed by Garrison. Hydroxyl radical-mediated scission of model polypeptides occurs via hydrogen abstraction at the α-carbon followed by peroxy radical formation. This radical decomposes (by hydroperoxy radical elimination) to form the iminopeptide. Under conditions of mild hydrolysis these decompose to yield acid, ammonia and dicarbonyl compounds.

Figure I-16 : Mécanisme de cassure d'un lien peptidique par le radical hydroxyle (Wolff et al 1986).

réaction vis à vis de ces acides aminés est moins importante que ce à quoi l'on s'attend au vu de la réactivité avec les acides aminés libres (Davies *et al.* 1987 b). La formation de bi-tyrosine est une caractéristique de la réaction des protéines avec les $OH^{\cdot}$ ce qui peut conduire à leur agrégation. Les radicaux hydroxyles peuvent également agir au niveau des liens peptidiques et les cliver (figure I-16). Dans ce cas les protéines peuvent être fragmentées.

Les radicaux superoxydes, s'ils ne sont pas très réactifs vis à vis des acides aminés, peuvent néanmoins contribuer à l'altération des protéines. Ainsi, ils peuvent réduire les cystines en cystéines ce qui peut causer dénaturation et perte de fonctionnalité. D'autre part, les protéines contenant du fer, du cuivre ou d'autres types de groupements prosthétiques peuvent être endommagées par les anions superoxydes (Davies *et al.* 1987 a).

Les modifications de la structure primaire des protéines peut conduire selon le type de protéine et l'intensité des dommages à des modifications de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines et donc de leur fonction. La modification de ces structures peut également augmenter la vitesse de dégradation de la protéine parce qu'elle pourrait être reconnue par des protéases intracellulaires (Davies et Del Signore 1987, Davies 1987, Davies *et al.* 1987 b).

Cette augmentation de la vitesse de dégradation des protéines préalablement soumises aux radicaux libres a été montrée pour différents modèles (lysat de globules rouges, lysat de E. coli, protéases purifiées) et pour différentes protéines (Dean 1987, Salo *et al.* 1988, Davies et Lin 1988 a, Pan Chen *et al.* 1987, Davies et goldberg 1987 a, Davies et Goldberg 1987 b, Levine *et al.* 1981, Dean et Pollak 1985). Davies et Lin (1988 b) ont montré que cette dégradation était réalisée chez E. coli par un système protéolytique indépendant de l'ATP et du calcium. Les protéases impliquées semblent être des métalloprotéases à sérine. Stadmann *et al.* (1988) ont étudié l'inactivation de plusieurs enzymes par divers systèmes biologiques oxydants et montrent l'importance du radical hydroxyle dans cette inactivation, l'accumulation de dérivés carbonyles sur les protéines et suggèrent que ces oxydations interviennent in vivo dans le renouvellement des protéines et au cours du vieillissement pour expliquer la présence de protéines altérées : la diminution de l'activité des protéases au cours du vieillissement expliquerait la diminution de la vitesse de dégradation des protéines oxydées et donc leur accumulation dans les cellules vieilles.

In vivo les processus d'oxydation semblent impliqués via l'altération de protéines dans diverses pathologies. L'oxydation catalysées par les métaux

(Fe, Cu) des protéines du cristallin intervient dans le développement de la cataracte (Garland *et al.* 1988). La modification liée à l'âge de la structure de protéoglycanes du cartilage qui peut être associée à la perte de fonction tissulaire et la prédisposition aux maladies arthritiques pourrait être attribuable à l'action des espèces réactives de l'oxygène sur ces molécules (Roberts *et al.* 1988). La dégradation des immunoglobulines par les radicaux libres passe par la perte de tryptophane, proline et ponts disulfures, importants dans le maintien de la structure des anticorps. Ces modifications sont identiques à celles que l'on rencontre chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde ou développant une inflammation au niveau du fluide synovial (Griffiths *et al.* 1988 a, Griffiths *et al.* 1988 b). La présence de radicaux in vivo est également responsable de la formation de disulfures mixtes (pont disulfure entre un thiol protéique et le GSH) qui peuvent être réduits par le GSH, et la thiorédoxine, induisant ainsi un stress au niveau du potentiel réducteur des cellules.

1.4 Rôles bénéfiques des radicaux libres.

Malgré le fait que la plupart des travaux ayant trait aux radicaux libres s'intéressent à étudier et à limiter leur toxicité, ils possèdent néanmoins des rôles actifs bénéfiques.

1.4.1 Fonctionnement de certaines enzymes.

Dans leur cycle catalytique, certaines enzymes utilisent des radicaux libres. L'indoleamine dioxygénase, dont nous avons déjà parlé, qui catalyse le clivage de l'anneau indole du tryptophane, de la tryptamine, de la sérotonine, ..., utilise l'anion superoxyde dans sa réaction. Elle est d'ailleurs inhibée par la SOD. De même, la synthèse de la prothrombine, du facteur VII et IX de la coagulation, nécessitent la vitamine K dont une des formes actives (semiquinone) peut réduire l'oxygène moléculaire en anion superoxyde. L'étape de synthèse dans les microsomes, dans laquelle intervient cette vitamine est partiellement inhibée par de grande quantité de SOD (Halliwell et Gutteridge 1985).

1.4.2 Phagocytose.

Le phénomène de l'activation de PMN qui conduit à la phagocytose des corps étrangers ou dégradés partiellement et la production dans le milieu extérieur de divers métabolites est connu pour produire des radicaux superoxydes dont le rôle est d'être cytotoxique pour les éléments attaqués (figure I-9). Il en va de même pour le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet qui sont aussi produits par ces cellules activées (Flohé *et al.* 1985).

1.4.3 Division cellulaire.

Un rôle encore hypothétique des anions superoxydes est celui de leur action dans la division cellulaire. Shibanuma *et al.* (1988) ont montré que des cellules stimulées à se diviser par l'action d'agents mitogènes voyaient leur cytoplasme s'alcaliniser légèrement et rapidement après la stimulation et montraient une production plus élevée que la normale de $O_2^{\cdot -}$. Les auteurs suggèrent que $O_2^{\cdot -}$ pourrait être un messager secondaire physiologique dans la transduction du signal mitogénique.

1.5 Les systèmes de défenses cellulaires contre les radicaux libres.

Etant donné que les radicaux libres sont produits de manière continue dans les cellules et que dans certaines conditions (métabolisme de médicaments ou de substances toxiques, hyperoxie, ...) cette production peut devenir importante, les cellules disposent d'une série de systèmes de défenses qui leur permettent de se protéger contre un emballement des processus de production en maintenant les concentrations en radicaux et en peroxydes à des niveaux très bas. Chance *et al.* (1979) estiment que la concentration moyenne stationnaire en superoxyde est de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-11} M et celle du peroxyde d'hydrogène de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-7} M.

Les sytèmes de défenses sont classiquement divisés en deux groupes : les défenses enzymatiques et les défenses non enzymatiques.

1.5.1 Les défenses enzymatiques.

Trois enzymes sont directement impliquées dans les réactions avec les peroxydes et les anions superoxydes : la GPX, la SOD et la catalase. D'autres enzymes ne sont pas directement impliquées mais leur rôle n'en est pas

$$2\,H_2O_2 \rightleftharpoons 2\,H_2O + O_2$$

$$R{-}O{-}O{-}H + AH_2 \longrightarrow A + R{-}O{-}H + H_2O$$

Figure I-17 : Réactions catalysées par la catalase.

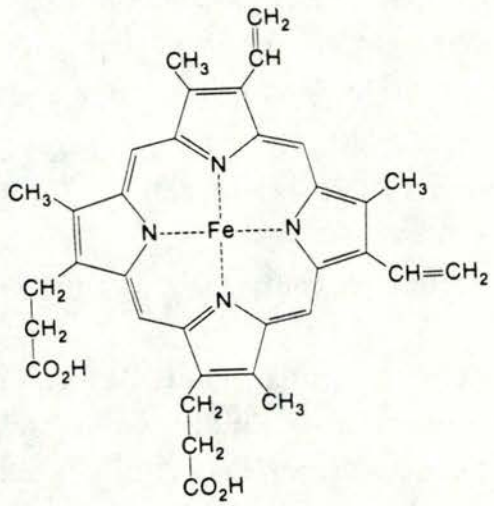


Figure I-18 : Structure de l'hème présente au niveau du site actif de la catalase.

moins important pour maintenir le potentiel réducteur de la cellule. Il s'agit essentiellement de la glutathion réductase et les enzymes qui interviennent dans la production du NADPH comme celles du shunt des hexoses monophosphates. On peut également citer les enzymes qui ne fournissent pas d'équivalents réducteurs mais qui contribuent à lutter indirectement contre l'oxydation des constituants cellulaires : les glutathion S transférases qui conjuguent le GSH aux xénobiotiques afin de les excréter et lutter contre leur toxicité, les enzymes responsables de l'excrétion hors de la cellule du GSSG excédentaire évitant par là l'oxydation des thiols protéiques intracellulaires, les enzymes de synthèse du GSH comme la glutathion synthétase et la γ glutamyl cystéine synthétase, les protéases qui dégradent les protéines oxydées empêchant leur accumulation et leur toxicité potentielle (Davies et Lin 1988 a et b).

Nous allons développer brièvement dans ce chapitre les principaux systèmes de défense mais étant donné que la GPX est l'objet principal de ce travail, le chapitre suivant lui sera entièrement consacré.

1.5.1.1 La catalase.

La catalase est une protéine de plus ou moins 230000 de PM. Elle est constituée de 4 sous-unités identiques. Elle catalyse la réaction de réduction de peroxyde d'hydrogène en eau principalement mais elle peut aussi avoir une activité peroxydasique (figure I-17). On la trouve dans de très nombreux tissus où elle est intracellulaire et associée aux peroxysomes sauf dans les globules rouges où elle se trouve à l'état soluble. Certains auteurs posent la question de savoir si la catalase n'est pas également présente dans les mitochondries (Nohl et Jordan 1980). Ceci est sujet à controverse et en tout cas, si elle est présente dans les mitochondries, elle l'est seulement à l'état de traces (Corbisier 1989).

L'enzyme possède 4 ferriprotoporphyrines (figure I-18) par tétramère qui constituent les sites actifs. Le site actif est situé au moins à 20 angströms sous la surface du monomère et est accessible par un canal bordé de résidus acides aminés hydrophobes (Reid *et al.* 1981). Pour cette raison, la catalase réduit des petits substrats pour lesquels l'encombrement stérique est faible.

Le mécanisme catalytique (figure I-19) est caractérisé par la formation d'un complexe enzyme-substrat (le composé I) dans lequel le fer de l'hème est oxydé de l'étage +3 à l'étage +4; un radical est formé sur l'hème qui garde un atome d'oxygène tandis qu'une molécule d'eau sort du site actif.

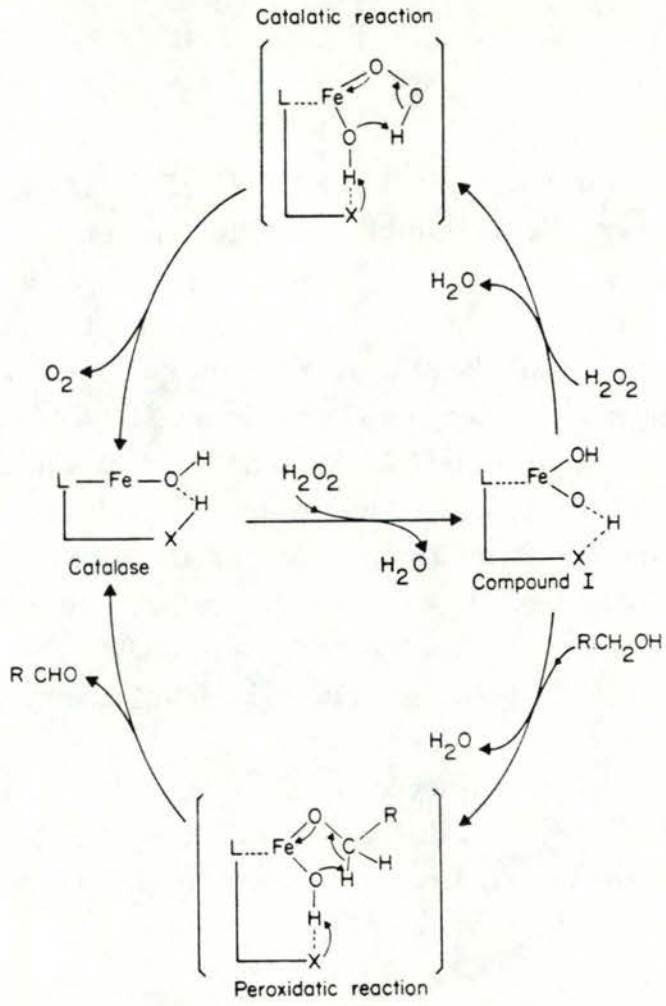


FIG. 3. Proposed mechanism of the reactions of catalase compound I. [Modified from Schonbaum and Chance (459).]

Figure I-19 : Mécanisme catalytique proposé par Chance et al (1979) pour la catalase.

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2\,H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Figure I-20 : Réaction catalysée par la superoxyde dismutase.

L'addition d'une seconde molécule de peroxyde d'hydrogène provoque une oxydation supplémentaire du fer qui passe à l'étage +6 pour former le composé III. Celui-ci subit un réarrangement moléculaire qui libère alors une molécule d'eau et une molécule d'oxygène. Une histidine et une asparagine semblent interagir avec les intermédiaires (Reid *et al.* 1981). Dans la réaction peroxydasique, le composé I réagit avec un donneur d'électron qui est le plus souvent un alcool de faible poids moléculaire (de 1 à 4 carbones). Un composé intermédiaire se forme (le composé II) avec le fer maintenu à l'étage +4. La catalase est inhibée par l'azide et le cyanure.

Vuillaume *et al.* (1988) ont décrit une nouvelle propriété de la catalase : elle pourrait synthétiser des nucléotides triphosphates à partir de nucléotides diphosphates lors de la décomposition du peroxyde d'hydrogène. Cette réaction serait dépendante du NADPH dont une molécule est attachée à chaque monomère (Kirman *et al.* 1987, Fita et Rossmann 1985).

1.5.1.2 Les superoxyde dismutases (Fridovich 1974).

Il existe plusieurs types de SOD; une SOD contient du Cu et du Zn, une autre contient du Mn et une troisième contient du Fe. La réaction catalysée par ces trois enzymes est identique. Il s'agit de la dismutation de l'anion superoxyde pour former du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène moléculaire (figure I-20).

La Cu/Zn SOD est la mieux connue. Elle se trouve essentiellement dans le cytosol des cellules animales mais aussi chez les levures et les cellules végétales. On ne la trouve généralement pas dans les bactéries et les algues bleues.

La Cu/Zn SOD est un dimère de 32000 de PM. Le Zn ne fonctionne pas dans le cycle catalytique mais semble stabiliser l'enzyme. Le Cu participe au cycle catalytique de l'enzyme. Le site actif consiste en un atome de Cu (+2) entouré de quatre histidines. Une de ces quatre histidines est impliquée dans un lien avec le Zn également. Ce dernier est en liaison non covalente avec deux autres histidines et un acide aspartique.

Lors de la réaction (figure I-21), le Cu est réduit par le premier superoxyde. L'histidine liée à la fois au Cu et au Zn pourrait à ce moment servir de donneur de proton pour la réaction de dismutation tandis qu'un second anion superoxyde est réduit et protoné par le site actif libérant un HO_2^- immédiatement transformé en H_2O_2 dans les conditions

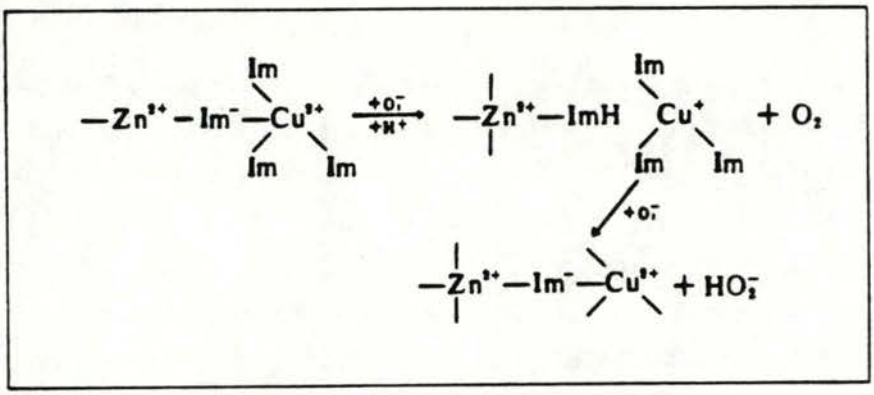
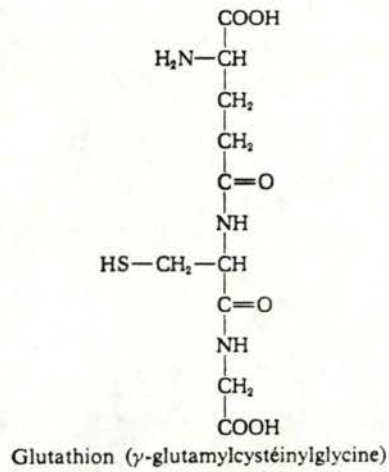


Figure I-21 : Mécanisme catalytique proposé par Fridovich (1986) pour la Cu/Zn SOD. (Im = imidazole)



Glutathion (γ-glutamylcystéinylglycine)

Figure I-22 : Structure du glutathion réduit.

physiologiques (Fee *et al.* 1981). La Cu/Zn SOD est inhibée par le cyanure et le diéthyldithiocarbamate.

Chez l'homme le gène de cette enzyme est localisé sur le chromosome 21. Dans les travaux du premier chapitre des résultats, c'est cette SOD qui sera étudiée.

La Mn SOD possède des caractéristiques très différentes de la Cu/Zn SOD. Chez les animaux, on la retrouve dans la matrice mitochondriale. Elle est la SOD bactérienne la plus courante. Elle n'est pas inhibée par le cyanure et le diéthyldithiocarbamate mais est beaucoup moins stable que la Cu/Zn SOD. Son poids moléculaire est de 40000. Dans les organismes évolués, elle est sous forme de tétramère alors que dans les bactéries elle est le plus souvent sous forme de dimères.

La Fe SOD est très similaire à la Mn SOD sur le plan de la séquence en acides aminés et la structure. La Fe SOD se trouve principalement chez les bactéries mais on l'a trouvée également chez certaines plantes et algues. Elle est constituée le plus souvent en dimère, parfois en tétramère avec un atome de Fe par monomère dans le site actif.

1.5.2 Défenses non enzymatiques.

1.5.2.1 Le glutathion.

Le GSH (figure I-22) est un tripeptide présent dans toutes les cellules sous forme réduite essentiellement. Sa concentration varie suivant les types de cellules de 0.5 à 10 mM (Meister 1982) alors que la concentration en GSSG intracellulaire est beaucoup plus faible : moins de 1% du GSH (Sies *et al.* 1983). On l'estime entre 5 et 500 µM (Kosower et Kosower 1978).

Ce tripeptide possède une activité antioxydante par l'intermédiaire de différents mécanismes. Nous avons déjà mentionné son activité dans le fonctionnement de la GPX, enzyme impliquée directement dans la réduction des peroxydes et par conséquent dans la lutte contre l'oxydation des constituants cellulaires. Nous avons également évoqué le rôle du GSH dans la détoxification des xénobiotiques via la glutathion S transférase. Cette activité peut être considérée en partie comme antioxydante dans la mesure où certains xénobiotiques expriment leur toxicité par la production de radicaux libres.

Le GSH intervient aussi comme antioxydant sans nécessairement faire appel à une activité enzymatique (Kosower et Kosower 1983). Le glutahion

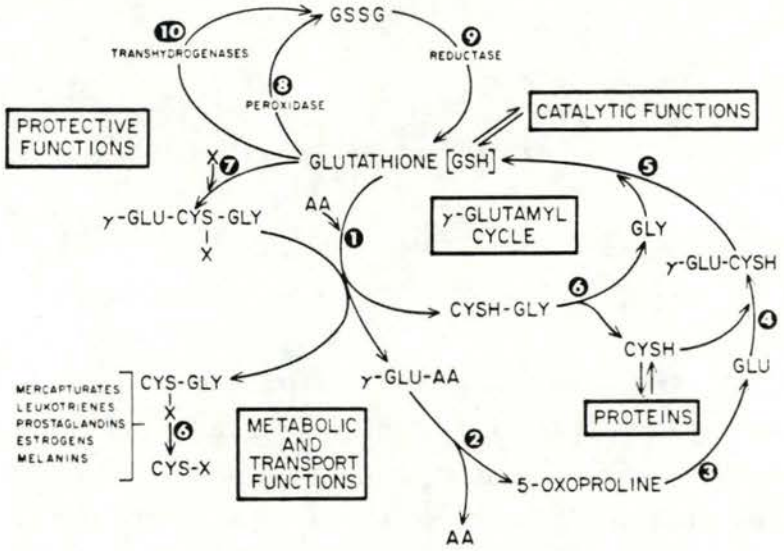
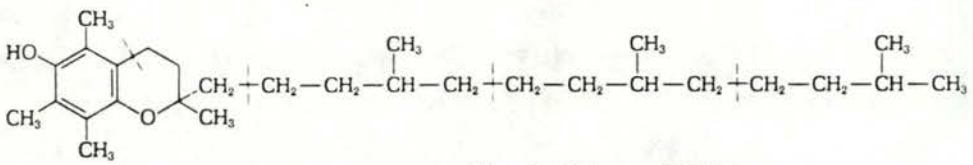


FIG. 1. An outline of the metabolism and function of glutathione. Enzymes: (*1*) γ-glutamyltranspeptidase; (*2*) γ-glutamylcyclotransferase; (*3*) 5-oxoprolinase; (*4*) γ-glutamylcysteine synthetase; (*5*) glutathione synthetase; (*6*) dipeptidase; (*7*) glutathione *S*-transferase; (*8*) glutathione peroxidase; (*9*) glutathione reductase; (*10*) transhydrogenases. AA = amino acids; X = compounds that react with glutathione to yield conjugates, such as those that lead to the formation of mercapturic acids, leukotrienes, and compounds which are involved in other phases of metabolism.

Figure I-23 : Vue globale du métabolisme du glutathion (Meister 1983).



Vitamine E (α-tocophérol)

Figure I-24 : Structure de la vitamine E (α-tocophérol).

peut réduire certains ponts disulfures dans les membranes et dans le cytosol et il peut être le substrat de la thiol disulfure oxydoréductase qui peut réduire les disulfures mixtes partout dans la cellule. Ceci permet de maintenir les thiols protéiques nécessaires à l'activité de certaines protéines. En cas de stress oxydant, le GSSG ne s'accumule pas dans les cellules mais est excrété, ce qui évite l'oxydation des thiols protéiques qui dans ce cas pourraient réagir avec le GSSG en grande concentration.

Orrenius *et al.* (1983) ont montré que le GSH était impliqué dans le maintien de la compartimentalisation intracellulaire du calcium. Or, on a déjà montré que le calcium intervient dans le phénomène du stress oxydant par exemple en activant des protéases responsables notamment de la transformation de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase. Lötscher *et al.* (1980) ont montré que l'addition de ter-butyl hydroperoxyde à des mitochondries de foie de rat isolées, conduisait à un largage de calcium par ces mitochondries. Ce largage semble être contrôlé par le rapport $NADPH/NADP^+$ et dans ce cas la diminution du NADPH s'effectuait par l'intermédiaire de l'oxydation du GSH par le ter-butyl hydroperoxyde via la GPX.

Le système responsable du stockage du calcium dans le réticulum endoplasmique est également sensible à l'oxydation par le ter-butyl hydroperoxyde (Orrenius *et al.* 1983). La présence de GSH en concentration physiologique contrecarre l'effet inhibiteur du peroxyde sur le système de séquestration microsomal du calcium. Dans ce cas, il semble que l'enzyme responsable de la translocation du calcium soit inactivée par l'oxydation due au peroxyde et protégée en présence de GSH.

1.5.2.2 La vitamine E

L'α-tocophérol qui est le composé le plus actif et le plus abondant ayant une activité vitamine E, est une molécule liposoluble dont la structure est présentée à la figure I-24. Elle se trouve à l'intérieur des membranes du fait de sa liposolubilité.

Le rôle le plus important de la vitamine E est celui de la protection des membranes contre la peroxydation lipidique. Comme il est montré à la figure I-25, la vitamine E réagit avec les radicaux peroxy lipidique pour former le radical α-tocophéryl relativement stable du fait de la délocalisation possible de l'électron non apparié. Elle constitue donc une

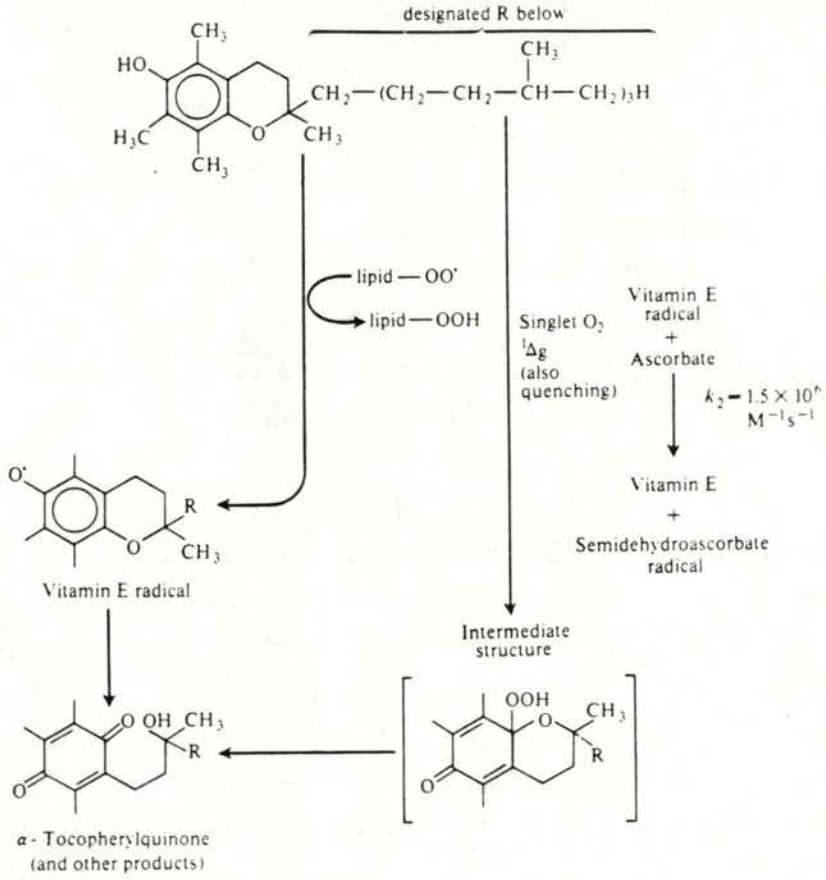


Figure I-25 : Mécanisme de protection contre la peroxydation lipidique par la vitamine E (Halliwell et Gutteridge 1985).

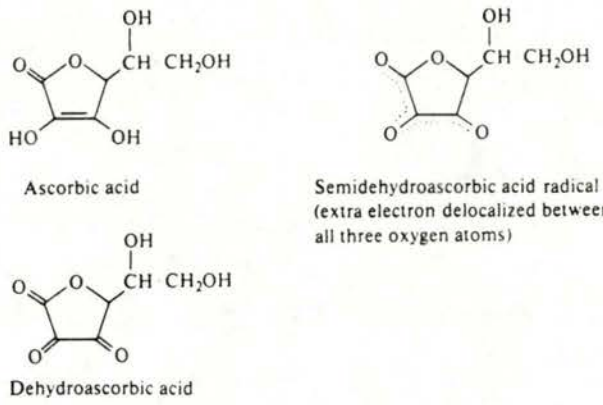


Figure I-26 : Structure de la vitamine C (Halliwell et Gutteridge 1985).

molécule de terminaison de la réaction de propagation de la peroxydation lipidique.

Le radical α-tocophéryl peut être transformé en vitamine E par l'intermédiaire de la vitamine C qui agit à partir du cytosol, ainsi que par le glutathion. De nombreux résultats ont démontré l'efficacité de la vitamine E dans la protection contre la peroxydation lipidique (Romero et Cadenas 1987, Ichinose et Sagaï 1982, Dean et Cheeseman 1987). La vitamine E peut également réagir avec l'oxygène singulet et l'anion superoxyde, quoique assez lentement, et limiter la toxicité de ces molécules vis à vis des membranes.

Il est possible que la vitamine E interviennent aussi dans le métabolisme de l'acide arachidonique. Lors de la transformation de la PGG2 en PGH2, un radical très réactif est formé. Si ce radical n'est pas détruit, il peut inactiver la cyclooxygénase. La vitamine E pourrait stimuler dans une certaine mesure la synthèse des prostaglandines en limitant l'inactivation de la cyclooxygénase (Halliwell et Gutteridge 1985).

1.5.2.3.La vitamine C

La vitamine C (aussi acide ascorbique) (figure I-26) possède une activité antioxydante par sa capacité de réagir avec $O_2^{\cdot -}$, $HO_2^{\cdot}$ et $OH^{\cdot}$ pour donner le semidéhydroascorbate. Elle réagit aussi avec l'oxygène singulet. Elle joue un rôle important, par exemple dans le cristallin où elle est en concentration importante et protège de l'oxydation connue pour provoquer la cataracte (Babizhaev *et al.* 1987).

Cependant la vitamine C semble être une arme à double tranchant dans le cadre de la défense antioxydante. En effet, l'acide ascorbique peut réduire le fer ferrique en fer ferreux ce qui est d'ailleurs son rôle dans l'intestin afin de permettre l'absorption du fer. Nous avons déjà indiqué que le fer réduit en présence de peroxyde d'hydrogène génère des radicaux hydroxyles par la réction de Fenton. Le système ascorbate/fer est donc une association dangereuse puisque générant des radicaux hydroxyles et il est d'ailleurs utilisé in vitro pour provoquer un stress oxydant. L'effet de l'acide ascorbique est donc variable suivant sa concentration et l'environnement moléculaire dans lequel il se trouve.

Il faut également noter que le rôle de la vitamine C ne se limite pas à son action antioxydante. Elle est utilisée comme cofacteur pour différentes enzymes : proline hydroxylase et lysine hydroxylase impliquées dans la

synthèse du collagène. La vitamine C est aussi utilisée par la dopamine β hydroxylase qui converti la dopamine en noradrénaline.

TABLE III Preparations and Molecular Characteristics of GSH Peroxidases from Different Sources

Source of enzyme	Criteria of purity	Molecular weight (Method)	Selenium content (gram atoms/mol) (Method)	Reference
Bovine erythrocytes	Rechromatography (ion exchange and gel filtration), ultracentrifugation; microzone electrophoresis, disc electrophoresis; crystallization	85,000 (Gel filtration); 80,000 (Disc electrophoresis); 83,000 (Ultracentrifugation); 21,000/subunit (SDS electrophoresis)	4.04 (Neutron activation analysis)	*24,25* *26*
Ovine erythrocytes	Rechromatography (gel filtration); disc electrophoresis	22,000/subunit (SDS electrophoresis)	3.8 (Fluorimetric analysis)	*27*
Rat liver	Rechromatography (ion exchange and gel filtration); ultracentrifugation	75,000–76,000 (Thin layer gel filtration); 76,000 (Ultracentrifugation); 19,000/subunit (SDS electrophoresis); 17,000/subunit (Amino acid composition)	4.24 (Fluorimetric analysis)	*28*
Human erythrocytes	Disc electrophoresis	95,000 (Ultracentrifugation); 23,000/subunit (SDS electrophoresis)	3.5 (Fluorimetric analysis)	*29*
Human placenta	Disc electrophoresis	85,500 (Gel filtration); 22,000 (SDS electrophoresis)	4.0 (Fluorimetric analysis)	*30*

Table I-1 : Caractéristiques de la GPX de différentes origines (Flohé 1982).

CHAPITRE 2 : LA GLUTATHION PEROXYDASE (GPX).

La GPX (E.C 1.11.1.9) fut découverte par G.C Mills en 1957 dans des érythrocytes bovins. Elle fut presque oubliée au cours des années soixante. Mais depuis le milieu des années septante, elle fut étudiée avec beaucoup d'intérêt par de nombreux chercheurs de tous les horizons et l'on peut dire actuellement qu'elle est une enzyme bien connue.

2.1 Structure de la GPX

L'étude de la GPX s'est effectuée principalement par la voie de son activité enzymatique. Ceci a conduit à découvrir que l'activité Glutathion Peroxydase et l'enzyme Glutathion Peroxydase (E.C. 1.11.1.9) n'étaient pas des synonymes. En effet, l'activité GPX est réalisée par des structures protéiques différentes que l'on classe généralement en deux catégories. Les GPX sélénium dépendantes et les GPX sélénium indépendantes. Chacune de ces deux catégories comprend des structures protéiques différentes. La GPX (EC. 1.11.1.9) est l'enzyme sélénium dépendante que l'on trouve notamment dans le cytoplasme des cellules. C'est celle-ci qui fait l'objet de ce travail et c'est elle que nous allons décrire en détail avant de mentionner les différences qui existent avec les autres structures protéiques à activité GPX.

2.1.1 Structure de la GPX E.C. 1.11.1.9.

La GPX a été isolée à partir de différentes sources chez les mammifères (Table I- 1). L'enzyme isolée des érythrocytes bovins est la mieux connue actuellement. La GPX est une protéine tétramérique soluble d'un poids moléculaire d'environ 85.000 (Flohé *et al.* 1972). Les quatre sous-unités sont identiques et c'est en 1973 (Flohé *et al.*) que l'on a montré l'existence de sélénium dans l'enzyme, en le soupçonnant de faire partie du site actif. Stults *et al.* (1977) confirment la présence de Se dans l'enzyme et Forstrom *et al.* (1978) et Zakowsky *et al.* (1978) indiquent que le Se est attaché de manière covalente à la protéine par l'intermédiaire d'une sélénocystéine incorporée à la structure primaire de l'enzyme. Ladenstein *et al.* (1979) et Epp *et al.* (1983) entreprennent des analyses structurelles de la GPX. Ceux-ci confirment les découvertes précédentes et révèlent des détails structurels

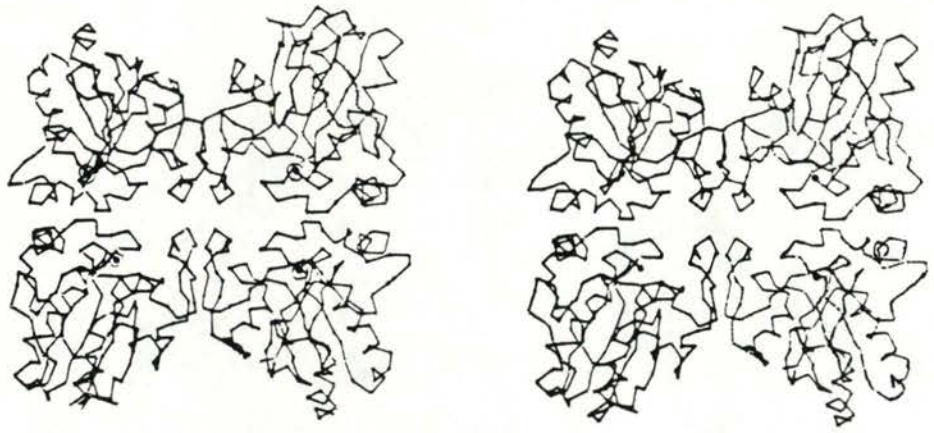


FIG. 10. Stereo diagram of the C^{α} backbone of a GSH peroxidase tetramer; (○) positions of C^{α} atoms; (●) positions of selenium atoms.

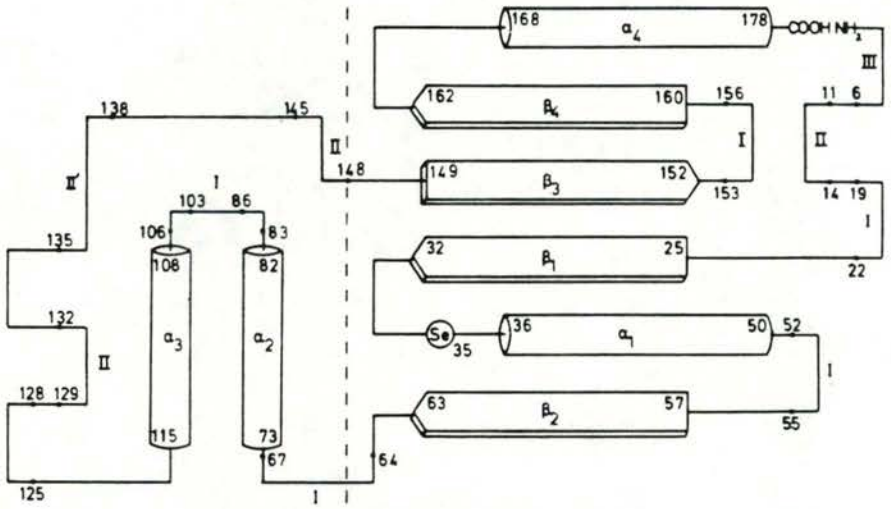


Fig. 3. Schematic drawing of a GSH peroxidase subunit showing β-sheets (arrows), α-helices (cylinders), position of the selenocysteine (circle), β-turns (roman numbers), and subunit contact region (left side of broken line). [From Ladenstein *et al.* [*34*] with permission from *J. Mol. Biol.* **134**, 199 (1979). Copyright by Academic Press, Inc. (London) Ltd.]

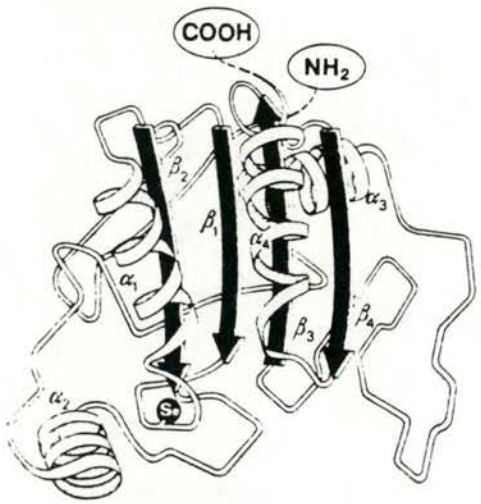


Fig. 2. *Schematic drawing of the folding pattern of a GSH peroxidase subunit.* α and β, indicate α-helices and β-strands, respectively; Se shows the position of the selenocysteine residue (SeCys-35)

Figure I-27 : Différentes représentations de la structure du monomère de la GPX (Flohé 1982, Ladenstein et al.1979, Epp et al.1983).

permettant d'aborder le mécanisme catalytique de l'enzyme. D'après eux, la sélénocystéine est en position 35 sur chaque monomère. L'enzyme tétramérique est formée de quatre chaînes peptidiques identiques en acides aminés et arrangées presqu'en un plan (figure I-27). Chaque sous-unité de 178 acides aminés, contient un atome de Se. Les distances entre ces atomes sont trop importantes pour former des ponts intramoléculaires entre Se. Les sites catalytiques forment des dépressions plates sur la surface de la molécule. Chaque site consiste en quatre boucles peptidiques. Le site actif est formé par l'adjonction de deux sous-unités. La sélénocystéine est entourée par des acides aminés hydrophobes aromatiques (Trp 147, Tyr 148, Phe 150). Le tryptophane pourrait être impliqué dans une liaison hydrogène avec la sélénocystéine (35). Cette importante hydrophobicité du site actif, pourrait contribuer à l'affinité de la GPX pour des hydroperoxydes organiques.

D'autres auteurs ont étudié la GPX provenant d'autres sources que les érythrocytes bovins : GPX de foie de rat (Nakamura *et al.* 1974, Stults *et al.* 1977), érythrocytes humains (Awasthi *et al.* 1975, Forward *et al.* 1985), poumon de rat (Chiu *et al.* 1976), placenta humain (Awasthi *et al.* 1979), foie de hamster (Chaudière et Tappel 1983). Les enzymes de ces différentes sources gardent des propriétés globalement identiques.

Le point isoélectrique de la GPX se situe autour de 4.9 pour la GPX humaine et celle de hamster (Awasthi *et al.* 1979, Awasthi *et al.* 1975, et Chaudière et Tappel 1983).

2.1.2 Les autres GPX.

Très proche de la GPX dont nous venons de parler, la GPX mitochondriale est un isomère de charge de l'enzyme cytoplasmique, l'enzyme mitochondriale étant chargée plus négativement que l'enzyme cytoplasmique (Zakowski *et al.* 1978). Suivant les auteurs (Zakowski *et al.* 1978, Wendel 1981, Green et O'Brien 1970) la répartition de la GPX entre le cytoplasme et les mitochondries serait de l'ordre de 60 à 75 % dans le cytoplasme et 25 à 40 % dans les mitochondries.

En 1986, Cohen et Takahashi et Takahashi et Cohen isolent du plasma humain une GPX dont les caractéristiques semblent quelque peu différentes de la GPX cellulaire. Ainsi si l'enzyme contient aussi 4 atomes de Se par tétramère et si le poids moléculaire est proche de celui de la GPX cellulaire (Takahashi *et al.* 1987, Maddipati et Marnett 1987) les propriétés

TABLE 1. *Molecular properties and nomenclature of cytosolic rat liver glutathione S-transferases with basic isoelectric points*

Enzyme (New nomenclature)	Peak no. in chromatofocusing	Subunit structure[a]	Precipitin reaction with antitransferase antibodies[b]		Previous nomenclature[c]
			BL	AC	
Glutathione *S*-transferase L_2	I	Y_aY_a	+	−	—
Glutathione *S*-transferase BL	II	Y_aY_c	+	−	B
Glutathione *S*-transferase B_2	III	Y_cY_c	+	−	AA
Glutathione *S*-transferase A_2	IV	Y_bY_b	−	+	A
Glutathione *S*-transferase AC	V	Y_bY_b'	−	+	C
Glutathione *S*-transferase C_2	VI	$Y_b'Y_b'$	−	+	—

[a]The subunits are named according to size as suggested by Bass et al. (5). $Y_a = 22,000$; $Y_b = 23,500$; and $Y_c = 25,000$ dalton. Y_b' can be distinguished from Y_b primarily on the basis of differences in catalytic properties.
[b]Antibodies against glutathione *S*-transferases BL and AC were raised in rabbits.
[c]In the previous nomenclature (17) transferases L_2 and C_2 were not recognized.

Table I-2 : Nomenclature des différentes isoenzymes de la glutathion S transférase et leurs sous-unités constitutives (Mannervik et al 1983).

antigéniques se révèlent tout à fait différentes. D'autre part, le Km apparent de l'enzyme plasmatique semble être 10 fois inférieur à celui de l'enzyme cellulaire. Ceci répond peut-être à une quantité de GSH dans le plasma beaucoup plus faible que dans les cellules (Maddipati et Marnett 1987). L'enzyme plasmatique se révèle être une glycoprotéine (Takahashi *et al.* 1987) comme la grande majorité des protéines plasmatiques sécrétées, et tout récemment Avissar *et al.* (1989) viennent apporter des arguments expérimentaux suggérant que l'enzyme plasmatique est synthétisée et sécrétée par les hépatocytes.

En 1985, Ursini *et al.* (1985) décrouvrent également l'existence d'une gluthation peroxydase différente également de la GPX classique dans des cellules de coeur, de poumon, de rein, de foie et de cerveau de porc et de rat. Cette enzyme possède la plupart des caractéristiques de la GPX classique. Elle s'en distingue par le fait qu'elle est monomérique avec un poids moléculaire de 23.000, soit le poids moléculaire du monomère. De plus, cette enzyme se révèle active sur des hydroperoxydes de phospholipides et beaucoup moins sur des peroxydes organiques alors que la GPX classique n'est pas active du tout sur ces hydroperoxydes de phospholipides. L'enzyme est aussi activée par la présence de Triton (Maiorino *et al.* 1986) ce qui n'est pas le cas de la GPX classique et suggère que la phospholipide hydroperoxyde GPX (PHGPX), nouvellement nommée, catalyse sa réaction de préférence à l'interface lipide-eau. Ursini *et al.* (1986) préciseront les caractéristiques cinétiques de cette enzyme. Duan *et al.* (1988) quant à eux détectent une enzyme similaire dans le foie de rat qui révélerait quelques différences avec la PHGPX de Ursini.

Les enzymes qui viennent d'être décrites ici sont sélénium-dépendantes. Il existe cependant à côté de ces protéines, d'autres enzymes ne contenant pas de sélénium et exerçant une activité GPX. C'est le cas principalement de la glutathion S transferase. Ce terme décrit une famille de protéines solubles multifonctionnelles dans les tissus de mammifères (Maruyama *et al.* 1983). Ces protéines existent dans des formes multiples et partagent un certain nombre de propriétés communes. Toutes les formes sont des dimères de poids moléculaire entre 45.000 et 50.000 et consistent en deux sous-unités identiques ou différentes (Table I-2). Elles ont une activité glutathion S transférase, catalysent les réactions de conjugaison du GSH et d'une variété de molécules organiques contenant des centres électrophiles et ont une large spécificité dans la liaison de substances lipophiles. Quatre types de sous-unités peuvent être identifiées chez les GSH S transférases. Ils ont été

désignés par les symboles Ya, Yb, Yb' et Yc. Chez le foetus, une forme Yf a également été découverte (Scott *et al.* 1987). La quantité relative de chaque sous-unité dépend du tissu d'origine et de l'état métabolique de ce tissu (Mannervik *et al.* 1983, Lawrence et Burk 1978). Par exemple, Ya est la forme majeure habituelle dans le foie de rat alors que Yc est abondant dans les testicules. La régulation de l'expression de ces sous-unités est également différente, chacune étant induite par la présence de molécules à détoxifier bien particulières.

L'activité Glutathion Peroxydase n'est pas l'apanage de toutes les isoenzymes de la GSH S transférase. Les dimères possédant cette activité GPX sont les suivant : YaYa, YcYc et YaYc (Mannervik *et al.* 1983). De plus, Scott *et al.* (1987) montrent que le dimère YcYf possède l'activité GPX la plus forte. Ces dimères à activité GPX sont les formes les plus cationiques de l'enzyme (Di Ilio *et al.* 1986).

L'activité GPX de la GSH S transférase ne se manifeste pas toujours pour tous les substrats peroxydes. Elle se manifeste clairement pour des substrats hydrophobes tels que le cumène hydroperoxyde (CUOOH) et par contre, ne se manifeste pas pour le H_2O_2 (Mannervik, 1985, Prohaska et Ganther, 1977, Cikryt *et al.* 1982, Carmagnol *et al.* 1983). Cependant, pour le ter-butyl hydrpoperoxyde (TBHP), les avis sont partagés : pour certains (Carmagnol *et al.* 1983), la GSH S transférase ne pourrait avoir d'activité GPX avec ce substrat. Pour Prohaska et Ganther (1977) et Mannervik (1985), elle pourrait avoir cette activité quoique avec une efficacité beaucoup moindre que pour le CUOOH. Notons aussi que Carmagnol *et al.* (1983) ne détectent pas d'activité GPX Se-indépendante dans les fibroblastes humains ni dans les poumons humains.

Enfin, la γ glutamyl transpeptidase, enzyme membranaire responsable du transport des acides aminés vers l'intérieur de la cellule, possède une activité glutathion oxydase (Griffith et Suresh 1980).

2.2 Le Sélénium

2.2.1 Absorption du sélénium.

La biodisponibilité du sélénium élémentaire est nulle (Korpela, 1988). Le sélénium incorporé dans les molécules biologiques se trouve sous forme de sélénate (SeO_4^{--}) ou de sélénite (SeO_3^{--}). Pour les animaux, l'apport

essentiel en sélénium est constitué d'acides aminés séléniés notamment la séléno-méthionine et la séléno-cystéine (Nève *et al.* 1987). Il semble que la séléno-méthionine soit transportée activement dans les cellules par le même transporteur que la méthionine mais que par contre, la séléno-cystéine ne soit pas transportée activement. La séléno-cystéine présente dans les cellules serait le résultat du métabolisme de la séléno-méthionine (Nève *et al.* 1987, Esaki *et al.* 1982). La séléno-cystéine peut être dégradée par la séléno-cystéine lyase (Esaki *et al.* 1982) en alanine et séléniure d'hydrogène. C'est ce dernier qui est l'élément clé de l'excrétion du sélénium. Le sélénium est toxique et détoxifié par des méthyltransférases. Les dérivés méthylés sont alors éliminés par voies urinaire et fécale principalement et par la sueur et les poumons secondairement.

2.2.2 Rôle essentiel et fonctions biologiques.

Les implications biologiques du sélénium connues actuellement sont multiples. Il interviendrait dans la constitution d'enzymes. La GPX est la plus connue mais chez les bactéries, il est présent dans plusieurs autres enzymes et notamment la formate déshydrogénase, la glycine réductase (Nève *et al.* 1983) et différentes hydrogénases (Axley *et al.* 1989). La déplétion en sélénium provoque la maladie de Keshan. Il s'agit d'une cardiomyopathie caractérisée par de l'insuffisance cardiaque, l'élargissement du coeur, de l'arythmie et des modifications électrocardiographiques. Une anémie hémolytique peut également s'observer.

Le sélénium intervient aussi dans la spermatogenèse. En cas de déficience, la mobilité des spermatozoïdes est faible. On sait qu'il est incorporé dans des protéines de poids moléculaire de 15.000 à 20.000 qui se forment lors de la maturation de la cellule et qui ont un rôle dans l'intégrité du flagelle (Behne *et al.* 1982).

Lors d'une déficience en sélénium, le catabolisme de l'hème est accru. Ceci le rend moins disponible pour la synthèse d'hémoprotéines (Nève *et al.* 1987).

Trois études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation entre une déficience en sélénium sérique et un risque accru de cancer (Willet *et al.* 1983, Salonen *et al.* 1984, Salonen *et al.* 1985). Yu *et al.* (1988) montrent que le sélénium peut être un modulateur pour la différenciation et la prolifération des cellules tumorales. Il semble capable de modifier le phénotype biochimique de certaines cellules cancéreuses et le rendre

normal. D'autres auteurs montrent que le sélénium peut inhiber la croissance cellulaire et la synthèse de DNA dans diverses lignées cellulaires in vitro mais aussi in vivo (Medina et Oborn 1984, Medina *et al.* 1985, Watrach *et al.* 1984, Fico *et al.* 1986). Les mécanismes de ces effets inhibiteurs du sélénium ne sont pas connus.

Si l'implication du sélénium dans les diverses pathologies décrites ci-dessus semble évidente, son rôle ne semble par toujours lié à celui de la GPX. En effet, le sélénium s'incorpore dans d'autres protéines que la GPX.

Bansal *et al.* (1989) ont mis en évidence dans le foie de souris deux protéines contenant du sélénium, sans activité GPX et immunologiquement différentes de 56.000 et 14.000 daltons dont les fonctions ne sont pas connues. Yang *et al.* (1987) ont mis en évidence l'existence dans le plasma du rat une protéine de 57.000 daltons contenant du Se et différente de la GPX alors que dans des lignées cellulaires humaines, Golczewski *et al.* (1989) détectent des protéines séléniées de 60, 23, 21, 19 et 16 Kdaltons dont les fonctions sont totalement inconnues.

Nève *et al.* (1989) ont mesuré la quantité de sélénium dans le plasma, les globules rouges et l'urine dans un échantillon de la population belge. Les moyennes se situent à 1,06 ± 0,15 µmole Se/l dans le plasma, 5,0 ± 1,1 nmole Se/g Hb dans les globules rouges et de 0,05 à 0,65 µmole Se/g de créatinine dans les urines. Une réponse significative de l'activité GPX plaquettaire mais pas erythrocytaire a été obtenue au cours d'un apport supplémentaire en sélénium. Ceci est interprété par les auteurs comme un indice d'une très légère déficience de l'apport alimentaire usuel en sélénium en Belgique.

En ce qui concerne la GPX, la déplétion en sélénium sur l'activité de l'enzyme, Hafeman *et al.* (1974), Chow et Tappel (1974), Lawrence et Burk (1976), Reiter et Wendel (1984), Kazuhiko *et al.* (1986), Hill *et al.* (1987) et Simmons *et al.* (1987) montrent pour différents organes du rat, de la souris et de la mouche, une diminution jusqu'à quelques pourcents de l'activité de la GPX lorsque les animaux sont nourris avec des régimes sans sélénium. El Sayed *et al.* (1983) et Jenkinson *et al.* (1987) montrent qu'une déficience en sélénium réduit la capacité de rats et de souris à résister à un stress oxydatif. Housset *et al.* (1983) et Junod *et al.* (1987) montrent un effet protecteur de la séléno-méthionine ajoutée au milieu de culture de cellules endothéliales contre la toxicité de l'oxygène.

Korpela (1988) et Deagen *et al.* (1987) montrent quant à eux que l'apport du sélénium après une déficience provoque une augmentation rapide et importante de l'activité GPX dans différents tissus du rat. Cette

augmentation s'effectue de la même façon quelque soit la forme du sélénium donné (sélénite, sélénate, séléno-cystéine ou séléno-méthionine).

Deagen *et al.* (1987) font cependant remarquer que la proportion de sélénium associé à la GPX par rapport au sélénium total varie d'un tissu à l'autre. Elle est la plus élevée pour les globules rouges et le foie (± 70 %) et la plus faible pour le muscle, les testicules et le cerveau (± 3 %) alors qu'elle est de 4 % environ pour le plasma. D'autres auteurs détectent des relations entre le sélénium et d'autres antioxydants tels que la vitamine E et la vitamine C. Hoekstra (1975) montre que la supplémentation de Se peut prévenir les dommages dus à un manque de vitamine E alors que Scott *et al.* (1977) indiquent qu'en présence de faibles concentrations en Se, l'apport de vitamine E augmente l'activité de la GPX chez le rat. Cupp *et al.* (1989) pour leur part, montrent que après une déficience en sélénium, l'apport de vitamine C simultanément à celui de sélénite permet une récupération plus rapide de l'activité GPX que lors de l'apport de sélénite seul.

La vitamine E et la vitamine C agissent probablement via leurs propriétés antioxydantes en synergie avec le sélénium de la GPX. Cependant, les mécanismes biochimiques par lesquels ces coopérations s'opèrent ne sont pas connus.

2.3 Génétique de la GPX

Le gène de la GPX humaine est localisé sur le chromosome 3 (Ceballos *et al.* 1988). Une des questions les plus intéressantes au sujet de la GPX, lorsqu'il fut découvert que le site actif était constitué d'une séléno-cystéine était de savoir comment cette séléno-cystéine était incorporée à la séquence primaire de la protéine. Etait-elle incorporée en tant que séléno-cystéine lors de la synthèse donc co-traductionnellement, ou le sélénium était-il intégré après la synthèse ou post-traductionnellement ? Lorsque, en 1982, Hawkes *et al.* identifièrent un aminoacyl tRNA dans le foie du rat spécifique pour la séléno-cystéine, on s'orienta rapidement vers la solution de l'incorporation co-traductionnelle. En 1983, Hawkes *et al.* montrent que le foie du rat est capable de synthétiser de la séléno-cystéine à partir de sélénite et que la séléno-cystéine peut être incorporée dans la GPX via un aminoacyl tRNA spécifique.

En 1986, Chambers *et al.* étudient le mRNA de la GPX de différents tissus chez la souris. La caractéristique la plus importante de leurs résultats est que la séléno-cystéine est codée par un codon UGA qui est habituellement un

Figure I-28 : Séquence nucléotidique du c-DNA de la GPX de bovin, de souris et de l'homme. L'étoile représente les identités en nucléotides entre les différents c-DNA (Mullenbach et al 1988).

codon de terminaison. La même année, Zinoni *et al.* (1986) déterminent la séquence du gène de la formate déshydrogénase de E. coli. Leurs résultats suggèrent fortement que la séléno-cystéine soit codée par le codon UGA présent dans le mRNA. En 1987, Sunde et Eveson montrent que la séléno-cystéine de la GPX n'est pas formée à partir de cystéine mais bien à partir de la sérine et rappellent certains travaux qui montrent la lecture de codon "stop" chez des animaux supérieurs par des séryl tRNA. Mullenbach *et al.* (1988) repèrent le codon UGA dans la séquence du cDNA de la GPX de bovin, de souris et de l'homme. En 1989, Lee *et al.* identifient dans les cellules de mammifères un tRNA à sérine qui reconnaît le codon UGA et qui engendre un séléno-cystéinyl tRNA, alors que Leinfelden *et al.* (1989) montrent les mêmes résultats pour E. coli et l'intégration du sélénium à la formate déshydrogénase.

Le mécanisme par lequel le codon UGA n'est pas traduit en terminaison n'est pas encore bien connu. Les bases voisines du codon, des structures secondaires du messager ou des interactions stériques entre tRNAs pourraient être impliquées (Mullenbach *et al.* 1988). Les séquences nucléotidiques des cDNA de lapin, de rat, de l'homme de la souris et du bovin sont connues (Akasaka *et al.* 1989, Ho *et al.* 1988, Sukenaga *et al.* 1987, Mullenbach *et al.* 1987) ainsi que la séquence du gène humain (Ishida *et al.* 1987) (figure I-28).

L'expression du gène de la GPX pourrait être contrôlée par la présence de sélénium dans le milieu mais ceci est encore l'objet de controverse. Saedi *et al.* (1988) et Yoshimura *et al.* (1988) montrent qu'en cas de déficience en sélénium dans le milieu, la synthèse du mRNA de la GPX est très fortement diminuée. Par contre, Reddy *et al.* (1988) montrent quant à eux, que si l'activité GPX est absente dans ces conditions, la synthèse du mRNA n'est que faiblement diminuée. Pour Chada *et al.* (1988) et Toyoda *et al.* (1989), le contrôle de l'expression de la GPX humaine par le sélénium est réel et médié au niveau post-transcriptionnel.

2.4 Cinétique et dosage de la GPX

La Glutathion Peroxydase est une enzyme qui catalyse la réduction des hydroperoxydes hydrophobes et du H_2O_2 par l'intermédiaire du GSH (γ glutamylcystéinyl glycine). Deux molécules de GSH sont utilisées pour une molécule d'hydroperoxyde et le glutathion est oxydé en disulfure (GSSG). Les études cinétiques ont été particulièrement difficiles pour cette enzyme et

nous en retraçons les étapes principales qui ont amené à proposer un schéma de réaction (figure I-29). Les études de Flohé (Flohé *et al.* 1972) indiquent que l'on ne peut trouver de Vmax et de Km. En effet, la vitesse de la réaction augmente sans cesse lorsque l'on augmente la concentration du GSH et la concentration en peroxyde (pour une concentration en enzyme donnée). En représentant les courbes de cinétiques par l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration en un des deux substrats, Flohé *et al.* (1972) obtiennent des droites parallèles pour des concentrations différentes de l'autre substrat. Cela indique clairement qu'aucun complexe ternaire ne se forme. Si un complexe ternaire se formait, un plateau de vitesse serait atteint lorsque l'enzyme serait saturée par ses substrats lorsqu'ils sont mis en excès. Par conséquent, la GPX réalise une réaction à double déplacement en ping-pong. Comme il y a en fait trois molécules de substrats dont les deux dernières sont identiques, la cinétique de l'enzyme est appelée ter uni ping-pong.

D'autre part, la GPX peut être inhibée par différentes molécules suivant son état rédox. En état réduit, elle est inhibée par l'iodoacétate (Kraus *et al.* 1980). En état oxydé, elle est inhibée par le cyanure (Kraus *et al.* 1980, Prohaska *et al.* 1977). On peut donc penser que la GPX passe par ces deux stades lors de son cycle catalytique. Comme l'iodoacétate est reconnu réagir avec les sulfhydryles et que le sélénium a des propriétés chimiques très voisines du souffre, il semble que le sélénium sous forme de sélénol (SeH) soit une forme chimique de l'enzyme active.

Les études de Kraus *et al.* (1980) montrent également que le glutathion réduit forme un complexe avec l'enzyme oxydée et que la dissociation n'est pas possible sans addition de réducteurs. Ils concluent que la forme E-Se-SG est également une forme catalytique de l'enzyme. Lorsque les deux substrats sont ajoutés simultanément à l'enzyme, la réaction démarre mais la plupart du temps, on constate une activation de l'enzyme au cours du premier temps de la réaction. Cette activation dépend de la concentration en enzyme et de la concentration en GSH mais pas en peroxydes (Splittgerber *et al.* 1979). La réduction de l'enzyme semble donc l'activer. Les résultats de Forstrom et Tappel (1979) suggèrent que la spécificité de la GPX pour le glutathion ne soit vraie que pour la première molécule thiol.

Chaudière *et al.* (1984) étudiant l'inhibition de la GPX par divers mercaptans ont pu déduire certaines propriétés du site catalytique de la GPX; ainsi, ils suggèrent que l'acide sélénénique n'est probablement pas un intermédiaire durable mais qu'une cystéine ou une molécule de glutathion

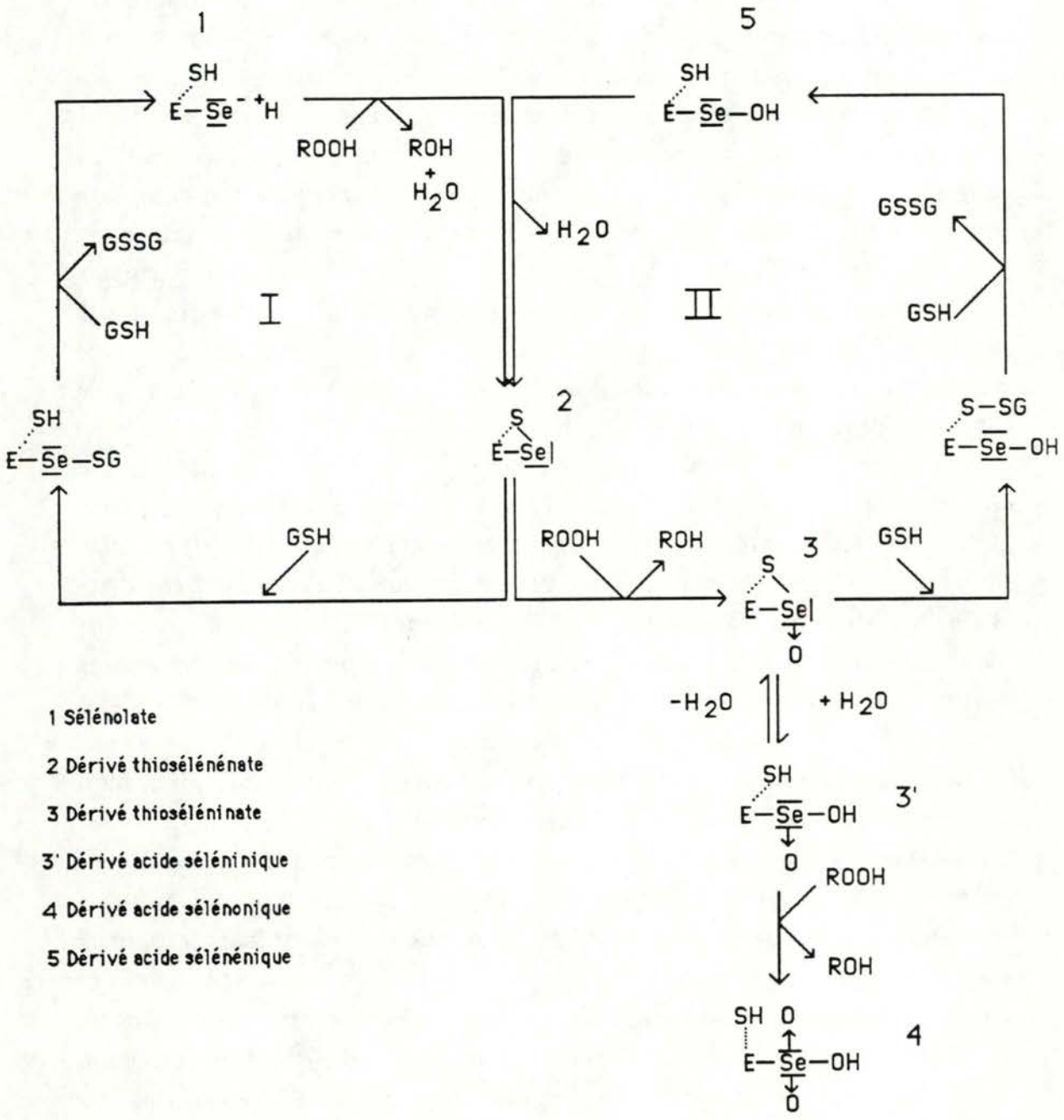


Figure I-29 : Mécanisme catalytique de la GPX élaboré à partir des données de la littérature et particulièrement celles de Chaudière et al (1983).

présente dans le site actif génère après oxydation par le peroxyde un dérivé thiosélénénate. Leur étude montre également que le mercaptosuccinate est un inhibiteur spécifique et puissant de la GPX.

Sur base de toutes ces données, un mécanisme catalytique peut être envisagé (Figure I-29) (Chaudière *et al.* 1984, Blum et Fridovich, 1985). La forme de départ, la plus réduite contient le sélénium dans la forme d'une séléno-cystéine sélénolate aux concentrations physiologiques en GSH. Une molécule d'hydroperoxyde oxyde ce sélénolate en acide sélénénique directement transformé en thiosélénénate tandis que l'alcool correspondant au peroxyde est relâché du site actif avec une molécule d'eau. Une première molécule de glutathion libère alors le sulfhydryle impliqué dans la liaison thiosélénénate en réagissant avec le sélénium. Une seconde molécule de glutathion régénère alors le sélénolate tandis que le glutathion oxydé quitte le site actif. L'activation de l'enzyme par le glutathion peut être expliquée par la possibilité pour l'enzyme oxydée (thiosélénénate) de réagir encore avec un peroxyde donnant un dérivé de l'acide séléninique. L'enzyme dans cet état devra d'abord revenir au stade du thiosélénénate en réagissant avec deux molécules de GSH avant de pouvoir soit être réoxydée soit retourner au stade sélénolate et accepter un nouveau peroxyde. Il est probable que le cyle catalytique I soit plus rapide que le cycle II. En excès de GSH le cycle I sera favorisé mais il faudra attendre un temps de latence pour que les formes enzymatiques du cycle II soient réduites dans les formes du cycle I. Pendant ce temps de latence, la proportion d'enzyme dans le cycle I augmentera et la vitesse de la réaction augmentera jusqu'à ce qu'il n'y ait plus que le cycle I qui fonctionne.

L'oxydation du dérivé de l'acide séléninique (SeO_2H) est cependant encore possible (Blum et Fridovich, 1985) Dans ce cas, on obtient un dérivé de l'acide sélénonique (SeO_3H) qui ne peut plus être réduit par un thiol; l'enzyme est inactivée.

Le pH optimum de l'enzyme est de 8 (Chaudière et Tappel, 1984), 8,5 (Flohé et Günzler, 1984, Awasthi et al., 1975, Flohé 1972) ou 8,8 à 9,1 (Chiu *et al.* 1976) suivant les auteurs. La GPX s'est montrée efficace pour réduire de nombreux peroxydes différents : cumène hydroperoxyde, ter butyl hydroperoxyde, diisopropylbenzène hydroperoxyde, peroxyde de l'acide linoléique, ethyl hydroperoxyde, peroxyde d'hydrogène, etc... (Chaudière et Tappel 1983). Pour les peroxydes de taille importante, plus l'hydrophobicité est marquée et plus la réaction est rapide.

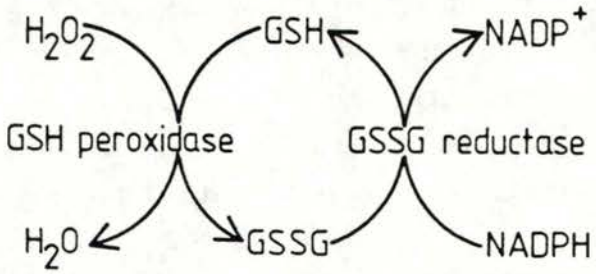


Fig. 5. – The role of glutathione as an antioxidant, depending upon the enzyme GSH peroxidase, cycling with GSSG reductase, to regenerate the reduced form of GSH.

Figure I-3O : Représentation schématique du principe de dosage de la GPX par spectrophotométrie.

La GPX est inhibée par les métaux lourds et divers cations divalents (Bem *et al.* 1985). La cisplatine, agent antitumoral utilisé en chimiothérapie du cancer, s'est révélée également inhibitrice de l'enzyme (Milano *et al.* 1988). Les sels d'or, utilisés notamment dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde sont des inhibiteurs bien connus de la GPX (Chaudière *et al.* 1984, Baker et Tappel, 1984, Dillard *et al.* 1987). Le sélénium est en effet un ligand de haute affinité pour l'or. Cette inhibition est cependant réversible in vivo. L'aurothioglucose provoque une diminution de l'activité de la GPX dans divers tissus et augmente de manière concomittante le GSH.

Le dosage de la Glutathion Peroxydase peut être effectué par différentes méthodes. La mesure de GSH non consommé peut être réalisée par polarographie après l'arrêt de la réaction (Flohé et Gunzler 1984, Wendel 1981). La mesure de H_2O_2 peut être réalisée également après l'arrêt de la réaction (Flohé et Günzler 1984). Enfin, une méthode indirecte utilisant la glutahion réductase et le NADPH pour régénérer le GSSG oxydé peut être utilisée. Dans ce cas, on peut suivre au spectrophotomètre la consommation de NADPH par le système (figure I-30). Cette méthode a été mise au point en 1967 par Paglia et Valentine et est recommandée par tous les auteurs pour les mesures dans les liquides biologiques. Du fait de la cinétique de la GPX, de très nombreuses variantes du dosage existent. Comme nous avons fait une mise au point du dosage dans les conditions où nous travaillions, ce problème sera examiné en détail dans le chapitre des matériels et méthodes.

2.5 Fonctions de la GPX

2.5.1 Enzyme antioxydante.

Le rôle principal de la Glutathion Peroxydase vu son activité de réduction du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes organiques est de défendre l'organisme contre les effets néfastes des dérivés actifs de l'oxygène, dans des conditions physiologiques aussi bien que dans des conditions de stress oxydant et ceci en coopération avec la superoxyde dismutase et la catalase. La GPX est active sur le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes organiques. Certains auteurs (Jones *et al.* 1981, Simmons et Jamall 1988) insistent sur la plus grande efficacité de la GPX par rapport à la catalase pour détoxifier le H_2O_2. Et, il est vrai que pour des érythrocytes exposés à H_2O_2, la protection par la GPX est plus efficace que par la catalase (Cohen et Hochstein 1963). Ceci est confirmé par Simmons et Jamall (1989) pour ce qui

est de la peroxydation dans des coeurs de rat déficients en l'une ou l'autre activité. Cependant, les explications de ce phénomène sur base des propriétés cinétiques des deux enzymes sont très controversées (Flohé 1982, Gaetani *et al.* 1989, Jones *et al.* 1981). D'autre part, dans le cristallin, la catalase apparaît plus importante que la GPX (Halliwell et Gutteridge 1985). En terme de protection globale, il semble que la quantité relative des enzymes soit parmi les facteurs les plus importants de même que leur répartition subcellulaire. En effet, si dans les globules rouges, les deux enzymes sont libres, dans le foie, par exemple, la GPX est présente dans le cytosol et les mitochondries alors que la catalase se trouve dans les peroxysomes. Suivant les voies de production de H_2O_2, l'une des deux enzymes sera plus importante. Ainsi, un foie perfusé avec une concentration élevée en oxygène sera mieux protégé de la nécrose par la GPX alors que la perfusion avec une substance comme le glycolate, du fait de la présence de glycolate oxydase dans les peroxysomes, pourra se révéler dommageable par l'intermédiaire de H_2O_2 si l'activité de la catalase et non celle de la GPX est diminuée (Halliwell et Gutteridge 1988). Pour les cellules endothéliales soumises à une production exogène de H_2O_2, la GPX semble également plus efficace que la catalase (Harlan *et al.* 1984, Suttorp *et al.* 1986, Michiels *et al.* soumis pour publication).

Mais la GPX ne détoxifie pas seulement le H_2O_2. Les peroxydes hydrophobes sont également de bons substrats de cette enzyme. Dans ce cas, il est bien difficile de faire la distinction entre la PHGPX et la GPX. Elles semblent toutes les deux impliquées dans la protection contre la peroxydation lipidique des membranes. La GPX agit dans la phase soluble et n'est impliquée que dans la réduction des peroxydes qui sont libérés de la membrane par la phospholipase A2 dont l'affinité est de 2 à 4 fois plus élevée pour les peroxydes lipidiques que pour les lipides non peroxydés (Van Kuijk *et al.* 1987). La PHGPX quant à elle agit à l'interface eau/lipide et agit principalement sur les phospholipides peroxydés. La protection apportée varie ici aussi suivant le mécanisme qui engendre la peroxydation. Ainsi, si la peroxydation est initiée par les radicaux hydroxyles issus de la réaction de Fenton via H_2O_2 et Fe^{++}, la GPX apportera une protection par réduction du peroxyde d'hydrogène. Par contre, la peroxydation initiée par un complexe de fer tel que Fe-ADP ou ATP dans les microsomes est due à la génération d'ions perferryles ($Fe_3{}^{+}O_2{}^{-}$) qui peuvent abstraire un hydrogène directement sur les lipides insaturés. Dans ce cas, la GPX ne peut apporter qu'une faible protection (Ursini et Bindoli 1987, Beloqui *et al.* 1986). La

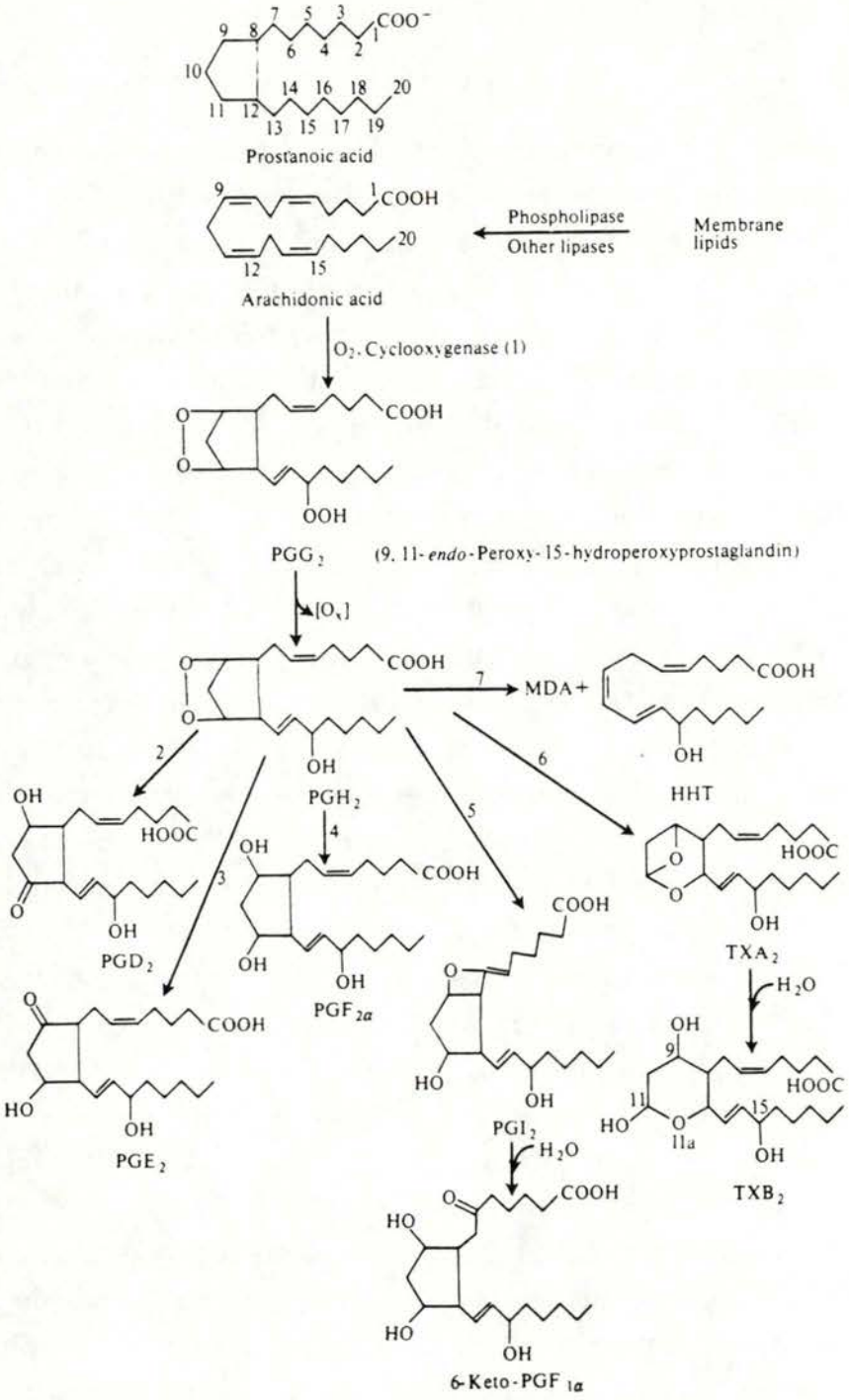


Figure I-31 : Structures des molécules issues du métabolisme de l'acide arachidonique (Halliwell et Gutteridge 1985).

PHGPX agit en synergie avec la vitamine E et pourrait être plus efficace pour enrayer la réaction de propagation de la peroxydation lipidique que la GPX.

La GPX dans cette fonction de détoxification consomme du glutathion qui, dans la cellule, est régénéré par la glutathion réductase et le NADPH, lui-même réduit par le fonctionnement du cycle des pentoses phosphate directement lié à la glycolyse et principal fournisseur pour la cellule de molécules réduites. Dans un monde aérobie, les cellules doivent lutter contre l'oxydation de leurs constituants. C'est par cette voie du glutathion essentiellement que passe l'énergie destinée à cette tâche.

Les stress oxydants occasionnels sont aussi gérés en grande partie par cette voie. Etant donné que le glutathion a de multiples rôles au sein de la cellule (détoxification des xénobiotiques, transport des acides aminés à l'intérieur des cellules et toutes fonctions pour lesquelles l'état réduit des constituants est crucial), les stress oxydants qui diminuent subitement la quantité de GSH mettent en danger toute la structure biochimique de la cellule. L'activité de la GPX est donc un paramètre important par lequel les conditions d'environnement peuvent influencer l'équilibre dynamique à l'intérieur des cellules et des tissus.

2.5.2 GPX et cascade de l'acide arachidonique

Lors des processus inflammatoires, un ensemble de molécules sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique libéré des phospholipides des membranes des cellules. L'acide arachidonique est hydrolysé par la phospholipase A2 et métabolisé par la cyclooxygénase ou la lipoxygénase. Les premiers produits formés par ces enzymes sont des hydroperoxydes (figure I-31).

In vitro, le premier produit de la cyclooxygénase, la PGG2 est réduit facilement par la GPX. In vivo, cependant, l'importance de cette réaction n'est pas connue étant donné que la cyclooxygénase possède elle-même une activité hydroperoxydase qui résulte toutefois en une inactivation de l'enzyme (Flohé 1982). Le premier produit de la lipoxygénase des plaquettes, le 12 HPETE, peut être également réduit par le GPX en 12 HETE, un facteur chémotactique puissant. Bryant et Bailey (1980) ont montré qu'une déficience en sélénium provoquait une perturbation dans la production du HETE. Dans ce cas, il semble donc que la GPX soit impliquée.

La synthèse des leucotriènes passe également par un acide 5-hydroperoxyde qui peut être réduit par la GPX. Les peroxydes d'acide gras

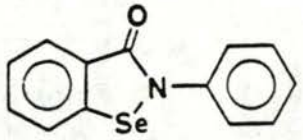


Figure I-32 : Structure de l'Ebselen.

activent la 5-lipoxygénase et la 15-lipoxygénase. Hatzelman *et al.* (1989) ont montré que la présence de GPX en quantité importante dans les PMN humains bloquait l'activation de la 5-lipoxygénase. La GPX semble donc impliquée au moins en partie dans la régulation du déclenchement de la voie 5 et 15-lipoxygénasique en limitant le niveau des peroxydes d'acides gras.

Enfin, la prostacycline synthétase est sujette à l'inactivation par les hydroperoxydes d'acide gras, surtout le 15 HPETE, qui peuvent être réduits par la GPX. Une production importante du peroxyde peut donc entraver la synthèse de prostacycline et favoriser une agrégation plaquettaire (Hong *et al.* 1980). Bult *et al.* (1980) ont montré que la formation de prostacycline est diminuée dans l'aorte de rats nourris sans sélénium.

Il est donc clair que la GPX intervient dans le métabolisme des dérivés de l'acide arachidonique. Son importance relative et son impact sur la physiologie sont cependant encore mal connus.

2.5.3 GPX et collagénase

Chaudière (1986) émet l'hypothèse que la GPX soit impliquée dans la régulation de l'activité collagénase. Son hypothèse est basée sur le fait que dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, des composés inhibant assez spécifiquement la GPX sont utilisés. Or, on sait que le GSSG est un activateur de la collagénase. Il se pourrait donc que le fonctionnement important de la GPX, comme c'est le cas en conditions inflammatoires où des radicaux libres dérivés de l'oxygène sont produits abondamment, provoque une accumulation de glutathion oxydé favorable à une activation permanente ou fréquente de la collagénase.

2.6 Activité GPX-like

Il existe plusieurs molécules chimiques qui possèdent une activité Glutathion Peroxydase. La plus connue est l'ebselen (2-phényl-1,2-benzisosélénazol-3(2H)-one) synthétisé dans les laboratoires Natterman par Dereu et Graf (1984) et dont la formule se trouve à la Figure I-32 . Muller *et al.* (1984) ont montré que cette substance avait une activité GPX-like mais elle ne sert pas de donneur de selenium pour la GPX. Cette molécule est testée comme anti-inflammatoire. Mercurio *et al.* (1986) ont montré que, injecté à des poulets déficients en sélénium et présentant une diathèse

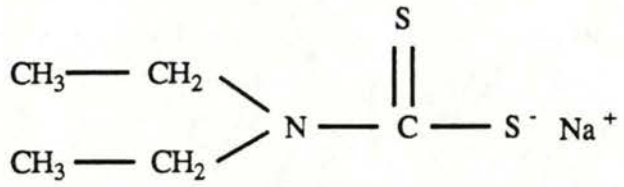


Figure I-33 : Structure du diéthyldithiocarbamate.

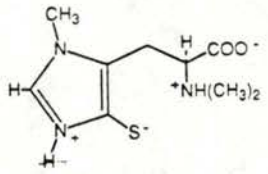


Figure I-34 : Structure de l'ovothiol C.

exsudative, il améliorait l'état des animaux avec une intensité liée à la dose injectée. Il protège les animaux également contre la toxicité due au paraquat et à la nitrofurantoïne, tous deux prooxydants. Il est inhibé comme la GPX par l'aurothioglucose. L'étude de sa cinétique (Miaorino *et al.* 1988) montre qu'elle fonctionne sur le modèle ter uni ping-pong comme l'enzyme. Sa spécificité est toutefois beaucoup plus faible que celle de l'enzyme. D'autre part, il peut réduire les hydroperoxydes de phospholipides comme la PHGPX. Leurs *et al.* (1989) ont montré que l'ebselen inhibait la production des anions superoxydes chez des macrophages de cochons d'Inde et que cela n'était pas dû à son activité GPX-like. Cotgreave *et al.* (1989) ont obtenu aussi une inhibtion de l'hyperactivité oxydative de granulocytes stimulés au PMA. Dans ce cas, une action via la protéine kinase C est possible.

La N-acétylcystéine peut réduire H_2O_2 en H_2O en formant un pont disulfure entre deux molécules. Cette réaction est plus rapide en présence d'ebselen (Cotgreave et Moldeus 1987). L'ebselen semble donc pouvoir utiliser la N-acétylcystéine comme substrat, ce qui n'est pas le cas de la GPX.

Le diéthyldithiocarbamate (Figure I-33) oxydé peut être réduit par le GSH réduit et il peut être réoxydé par divers peroxydes (Kumar, 1986). Outre cette activité GPX-like, il peut également être oxydé par le cytochrome c.

Dans les oeufs d'oursin, Turner *et al.* (1988) ont montré qu'une molécule remplace l'activité de la GPX : l'ovothiol (Figure I-34) qui réagit avec H_2O_2 et est réduite ensuite par le glutathion.

2.7 Induction de la GPX

Bien que toutes les indications n'aillent pas en ce sens (Antonenkov 1987, Barja *et al.* 1989), une large majorité de résultats décrivent une induction de la GPX dans des conditions de stress oxydatifs divers (Chaudière *et al.* 1987). Pinto *et al.* (1969) font remarquer qu'il existe une différence d'activité de la GPX entre sexes chez le rat et que les hormones femelles sont responsables d'une stimulation de l'enzyme dont l'activité varie d'ailleurs au cours du cycle. L'exposition de rat à l'ozone (Chow *et al.* 1974), l'irradiation de cochon d'Inde (Erden *et al.* 1984), le passage de levures de conditions anaérobies à des conditions aérobies (Galliazo *et al.* 1987), la production de H_2O_2 in vivo par intoxication à l'éthylmorphine (Chaudière *et al.* 1987), la production exacerbée de $O_2^{\cdot -}$ par des macrophages péritonéaux de souris activés (Rokutan 1988)... sont autant de conditions qui provoquent une augmentation de l'activité de la GPX. Chez Neurospora crassa (Kapoor

et Lewis 1987), un choc thermique qui est associé à un stress oxydatif modéré a été reconnu comme inducteur de la GPX. Il en va de même chez des cellules d'embryon de souris soumises à une hyperthermie modérée (Omar *et al.* 1987) et dans le foie, le sérum et la peau de souris adultes dans les conditions d'hyperthermie locale sévère (Kawai *et al.* 1988).

A côté de cette littérature, un ensemble de travaux centrés sur l'étude de la trisomie 21 indiquent que certaines caractéristiques pathologiques de cette maladie pourraient être le résultat de dommages oxydatifs accrus dans les cellules. Parallèlement, une augmentation de l'activité de la GPX dans divers types cellulaires de sujets atteints de cette maladie a été mise en évidence (Sinet *et al.* 1975, Nève *et al.* 1983, Nève *et al.* 1984, Gromadzinska *et al.* 1988, Crosti *et al.* 1989). Etant donné que le gène de la GPX humaine est situé sur le chromosome 3, il n'est pas modifié directement par la présence d'un troisième chromosome 21 comme c'est le cas pour la SOD dont le gène est situé sur ce dernier. L'explication de cette induction serait donc que, du fait de la plus grande quantité de SOD et de la présence probable d'un stress oxydatif chez ces personnes, la quantité de H_2O_2 est plus élevée et induirait l'expression de la GPX. D'un autre côté,Ceballos *et al.* (1988) montrent que la transfection du gène humain de la Cu/Zn SOD dans des cellules de souris induit une augmentation de l'activité de la GPX.

2.8 La GPX en pathologie et au cours du vieillissement

A l'heure actuelle, de nombreuses recherches sont en cours dans le domaine de la cancérologie pour étudier le rôle de la GPX dans cette maladie. Si le sélénium semble impliqué dans la réduction de l'incidence de certains cancers (Nève *et al.* 1987, Ip 1981), il ne semble pas que son action passe par l'activité de la Glutathion Peroxydase (Ip 1981). D'autre part, les molécules oxydantes telles que les peroxydes et les radicaux libres sont soupçonnées d'être des promoteurs du cancer. On s'interroge donc sur le rôle possible de la GPX comme enzyme antioxydante dans la protection contre le développement de certains cancers.

La GPX pourrait aussi être impliquée dans les effets secondaires de la chimiothérapie de certains cancers. Ainsi, la cisplatine, un agent chimiothérapeutique, est un inhibiteur de la GPX (Milano *et al.* 1988). Ceci est probablement dû au fait que le sélénium fixe facilement les métaux lourds en l'occurence le platine. On constate par ailleurs, que la cisplatine induit une diminution de l'activité de la GPX et du contenu en sélénium

dans le sang (Vernie *et al.* 1988) et qu'elle engendre une néphrotoxicité importante. Cette néphrotoxicité est due principalement à un dysfonctionnement des mitochondries. L'addition de sélénium en même temps que la cisplatine réduit cette toxicité qui pourrait donc s'exercer par l'inhibition de la GPX entraînant une augmentation des radicaux libres et oxydants empêchant le bon fonctionnement des mitochondries (Sugiyama *et al.* 1989).

L'adriamycine est aussi un antibiotique utilisé comme antitumoral et dont le mode d'action est probablement dû aux radicaux libres qu'il engendre (Nakano *et al.* 1989). La GPX protège le coeur de la toxicité de ce médicament sans doute en diminuant, au moins en partie, le stress oxydatif généré qui endommage la respiration mitochondriale (Nakano *et al.* 1989).

Le développement de la cataracte est sans doute dû à des conséquences de stress oxydatif. Toutes les composantes antioxydantes dont la GPX sont impliquées dans la lutte contre l'évolution de cette affection (Babizahev *et al.* 1987, Rao 1988).

Les maladies de type syndrome d'Alzheimer et syndrome de Down sont caractérisées par un vieillissement prématuré et montrent une accumulation de lipofuscine, "pigment de l'âge" résultant d'une peroxydation lipidique et de réactions de divers constituants biologiques avec les produits de cette peroxydation. Ces phénomènes sont un important argument de la théorie des radicaux libres qui postule qu'ils sont impliqués dans les processus du vieillissement. L'évolution de l'activité de la GPX et son importance dans le processus du vieillissement ont donc intéressé de nombreux auteurs. De manière générale, on peut dire qu'il n'y a pas d'évolution déterminée de l'activité de la GPX au cours du vieillissement. Celle-ci diminue dans de nombreux tissus différents mais elle reste inchangée ou augmente dans d'autres et ceci pour diverses espèces étudiées (Détails et références dans la discussion des résultats).

CHAPITRE 3 : LE VIEILLISSEMENT ET L'ALTERATION DES PROTEINES AU COURS DU VIEILLISSEMENT

Le vieillissement des organismes vivants est défini comme une dégradation progressive au cours du temps de la structure et du fonctionnement de ces organismes aboutissant à la mort.

Afin de comprendre les mécanismes du vieillissement, divers modèles d'études ont été développés, permettant de suivre ce processus en contrôlant au mieux les influences de l'environnement. Les essais ont abouti notamment à la mise au point de modèles de vieillissement cellulaire in vitro comme celui que nous utiliserons : des fibroblastes de poumon foetal humain (WI-38).

En 1961, Hayflick et Moorhead montrèrent que des fibroblastes humains, maintenus en culture, possédaient un potentiel de divisions limité et distinguaient une phase de vieillissement essentiellement caractérisée par une diminution de la vitesse de croissance des cellules, l'arrêt des divisions et la mort des cellules. Divers travaux ont montré qu'il existait bien une relation entre le vieillissement observé in vitro et celui observé in vivo. Ainsi, des cellules humaines provenant d'individus âgés réalisaient un nombre de passage en culture inférieur à celles provenant d'un individu jeune (Hayflick 1965). Martin *et al.* (1970) ont confirmé ces résultats et établi qu'il existait une corrélation inverse entre l'âge des donneurs et le nombre de passages en culture de leurs cellules. Ils ont aussi observé que des cellules provenant d'individus atteints du syndrome de Werner, maladie génétique caractérisée par un vieillissement prématuré, réalisaient un nombre de passages en culture inférieur à des cellules provenant d'un individu sain. Hayflick (1974) a aussi observé une corrélation entre le nombre de passages en culture de cellules provenant de différentes espèces animales et la durée de vie maximale de ces espèces mais ces observations sont contestées par d'autres auteurs (Stanley *et al.* 1975).

3.1 Les théories du vieillissement.

Il existe un nombre important de théories pour expliquer les mécanismes du vieillissement. On peut diviser ces théories en deux grands groupes : les théories du vieillissement programmé et les théories stochastiques.

3.1.1 Théories du vieillissement programmé.

Parmi ces théories, on peut encore distinguer deux options différentes : celle qui consiste à penser que le vieillissement est la phase terminale d'un processus de différenciation et celle qui consiste à penser que le vieillissement est un glissement des cellules hors de l'état différencié qui leur est propre. Les théories de la différenciation (théorie du codon restriction : Strehler 1967, théorie de la régulation des gènes : Kanungo 1980) supposent que, pendant la vie des cellules, un certain nombre de gènes sont exprimés puis réprimés définissant le phénotype de la cellule à un moment donné. Après le développement et le stade "adulte", des nouvelles modifications dans l'expression des gènes apparaîtraient qui caractériseraient le phénotype vieux jusqu'à empêcher la cellule de survivre dans des conditions normales.

Des mutations qui interféreraient avec le programme de développement et de vieillissement pourraient conduire les cellules soit vers l'immortalité (cellules transformées), soit vers un racourcissement de leur durée de vie (syndrome de Werner et progérie).

Une vision différente a été proposée par Cutler (1984). Il suppose que les cellules glissent graduellement hors de leur état de différenciation, ce qui résulte en une accumulation de petits changements dans l'appareillage génétique des cellules. Ces modification seraient suffisantes pour altérer les caractéristiques différenciées des cellules et leurs systèmes stabilisateurs de l'homéostasie mais ne modifieraient pas les fonctions vitales. Le vieillissement apparaîtrait donc comme une déstabilisation de l'expression des gènes.

3.1.2 Théories stochastiques

Les théories stochastiques interprètent le vieillissement comme le résultat de l'action d'éléments extérieurs qui provoquent des dommages dans les processus qui maintiennent l'équilibre dynamique des cellules et leurs fonctions. Les théories les plus connues dans ce cadre sont celles de l'erreur catastrophique, des mutations somatiques et des radicaux libres. Orgel en 1963 a proposé la théorie de l'erreur catastrophique. Cette théorie suppose qui le vieillissement apparaît parce que des erreurs surgissent au niveau des mécanismes de la synthèse protéique. On sait que la

transmission de l'information du DNA vers les protéines n'est pas infaillible. Par conséquent, des erreurs peuvent se glisser dans le processus de transcription ou de traduction aboutissant à la synthèse de protéines erronées qui ne remplissent plus ou remplissent mal leur fonction. Si l'erreur apparaît au niveau d'une protéine impliquée elle-même dans la machinerie de synthèse, son fonctionnement peut entraîner un taux d'erreurs dans la transcription et la traduction plus grand encore jusqu'à empêcher le fonctionnement normal de la cellule : c'est l'erreur catastrophique. En 1973, Orgel généralisa sa théorie. Il maintient l'idée de la propagation en chaîne d'une erreur, mais ne se prononce pas sur son origine. Dès lors, de nombreuses autres théories comme celle des radicaux libres peuvent entrer dans le schéma de l'erreur catastrophique.

La théorie des mutations somatiques interprète le vieillissement comme le résultat de dommages génétiques aléatoires qui s'accumuleraient au cours de la vie des cellules. C'est l'accumulation des modifications qui empêcherait les cellules de fonctionner correctement. Cette théorie est en perte de vitesse actuellement car il existe un certain nombre d'observations qui ne s'accordent pas avec la théorie, comme le fait que l'irradiation de certaines cellules en division provoque des aberrations génétiques mais sans affecter leur durée de vie (Hayflick 1985).

La théorie des radicaux libres (Gordon 1974) explique le vieillissement par l'accumulation de dommages dans la cellule dus aux réactions radicalaires. Une diminution des défenses antioxydantes accroît encore les altérations cellulaires et tissulaires. Un certain nombre d'arguments mettent en évidence l'importance des radicaux libres (Hayflick 1985, Halliwell et Gutteridge 1985). Les antioxydants alimentaires augmentent la durée de vie chez les rats, les drosophiles, les nématodes,... La réduction de la consommation d'oxygène, par exemple en élevant des drosophiles à température de 10°C plutôt qu'à 30°C, augmente leur durée de vie du fait de la réduction de leur métabolisme. L'accumulation durant la vie des cellules de lipofuscine, complexe moléculaire résultant de la peroxydation des acides gras et de la réaction des protéines et des acides nucléiques avec les produits de dégradation des lipides est un argument important en faveur de cette théorie qui montre que l'effet des radicaux libres provoque une accumulation de déchets non dégradables dans la cellule pouvant empêcher son fonctionnement. Les exemples montrant directement ou indirectement l'effet des radicaux libres sur la durée de vie sont très nombreux dans la littérature. Cependant, l'action des antioxydants se manifeste sur la durée de

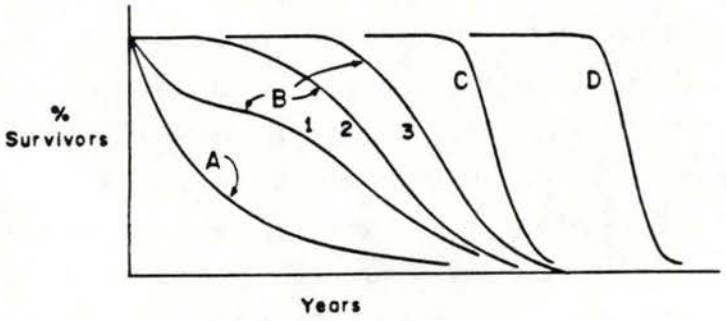


FIGURE 2. Survivorship curves. From W.A. Pryor "Vitamin E" (B. Lubin and L.J. Machlin, editors) New York Academy of Sciences, Volume 393 pp 1-23, 1982. Redrawn from a figure in A. Comfort, "The Biology of Senescence." Holt, Rinehart, and Winston, Inc., New York, 1956.

Figure I-35 : Courbes théoriques de survie de populations humaines. A : la mort est causée par des phénomènes aléatoires, comme dans les populations animales sauvages. B : Courbes d'une population à durée de vie moyenne croissante, typique des sociétés humaines actuelles. C : courbe d'une population dont tous les individus vivent jusque la durée de vie maximale de l'espèce. D : courbe qui ne pourrait être atteinte que par une augmentation de la durée de vie maximale de l'espèce.

vie moyenne d'une espèce mais pas sur sa durée de vie maximale. D'autre part, il n'est pas prouvé que l'accumulation de produits de dégradation comme la lipofuscine entrave à ce point la cellule qu'elle dégénère.

Les observations qui sont en faveur de l'une ou l'autre théorie sont innombrables dans la littérature. Cependant, aucune de ces théories qui vient d'être décrite ne peut expliquer par elle-même tout le processus du vieillissement. Le défaut majeur des théories stochastiques est qu'elles expliquent difficilement pourquoi il y a tant de différences de durée de vie entre des espèces qui sont évolutivement proches les unes des autres et vivent dans un milieu semblable. Elles n'expliquent pas non plus aisément l'immortalité des cellules transformées qui sont pourtant aussi soumises à l'apparition d'erreurs ou à des processus continus d'endommagement des cellules. Les handicaps principaux des théories du vieillissement programmé sont de ne pas pouvoir apporter d'explications moléculaires valables et de ne pas expliquer pourquoi, à l'intérieur d'une même espèce et même pour des cellules dont le patrimoine génétique est identique, il y a tant de variabilité dans les moments où apparaissent les processus dégénératifs associés au vieillissement, que ce soit en comparant des individus entre eux ou des populations cellulaires entre elles.

C'est ainsi que les revues actualisées au sujet du processus de vieillissement des cellules ou des organismes (Holliday 1988, Stanulis-Preager 1987) essaient d'intègrer les théories du vieillissement programmé et les théories stochastiques. Il ne fait plus de doute que la durée de vie est sous contrôle génétique et qu'elle peut être modifiée par des processus stochastiques. Le vieillissement des organismes est le résultat d'une défaillance des mécanismes de maintenance. Bien que tous ces mécanismes de la maintenance peuvent se dégrader, il est probable qu'un certain nombre de défaillances sont une conséquence secondaire d'autres modifications moléculaires d'importance primordiale qu'il reste à identifier (Holliday 1988). On peut expliquer le contrôle génétique par le fait que ces mécanismes de maintenance sont assurés par des protéines régulées par l'expression génétique.

Ainsi, si l'on observe la courbe de survie d'individus d'une population (Figure I-35)(Pryor 1984), on constate que lorsque les soins et les moyens de lutte contre les maladies augmentent, la durée de vie moyenne de la population augmente et se rapproche de la durée de vie maximum de l'espèce. Les soins maximums produiraient la courbe c pour laquelle la population vivrait jusqu'au maximum de la durée de vie et tous les

individus mourraient dans une étroite tranche d'âge. La courbe d pourrait être obtenue seulement en augmentant la durée de vie maximale de l'espèce. Cette durée de vie maximale est fixée génétiquement tandis que la durée de vie moyenne est principalement le résultat de phénomènes stochastiques.

Ce raisonnement peut être transposé aux cultures de cellules pour le vieillissement cellulaire. Dans ce cas, les sytèmes de maintenance seraient les voies métaboliques produisant de l'énergie, les systèmes de défense contre les radicaux libres, les systèmes de détection et de réparation des erreurs lors de la transcription/traduction et lors de la réplication de l'ADN...

3.2 L'altération des protéines au cours du vieillissement.

L'altération du fonctionnement des tissus au cours du vieillissement résulte de modifications au niveau du fonctionnement cellulaire. La mise en évidence de ces mécanismes d'altération nécessite donc une étude détaillée des cellules et des modifications moléculaires qui les accompagnent.

Les altérations moléculaires peuvent être quantitatives ou qualitatives. Par exemple, on sait que certaines enzymes voient leur activité diminuer ou augmenter au cours du vieillissement (Hayflick et Finch 1977). Cela peut entraîner des modifications fonctionnelles dans les cellules. Des altérations qualitatives peuvent également apparaître dans le DNA, les phospholipides de membranes et les enzymes (Hayflick et Finch 1977, Gordon 1974, Cohen et Zubenko 1985). Ces altérations structurelles peuvent aussi influencer la physiologie cellulaire et contribuer au mauvais fonctionnement des tissus.

Les modifications les plus connues de l' ADN lors du vieillissement sont les cassures sur un brin et les réactions qui engendrent des liaisons covalentes entre les protéines et l'ADN. Mais ces modifications, que l'on peut observer lors d'une production radicalaire sur l'ADN, ne se produisent pas nécessairement au cours du vieillissement et il n'est pas prouvé que ces changements affectent le comportement des cellules vieilles (Rothstein 1982).

Les modifications quantitatives des lipides sont très variables d'un type cellulaire à l'autre et d'une espèce à l'autre. Elles consistent essentiellement en une augmentation du rapport cholestérol/phospholipides totaux au cours du vieillissement et des modifications dans la composition

membranaire en différents phospholipides mais sans concordance des résultats dans les différents modèles étudiés toutefois (Rothstein 1982).

Types d'altérations et méthodes de mise en évidence

Les altérations des protéines peuvent être de plusieurs types. Les premières études ont été principalement axées sur la diminution de l'activité des enzymes au cours du vieillissement (pour une revue, voir Finch 1972). Cependant, on s'est aperçu que les modifications des protéines au cours du vieillissement étaient très hétérogènes : certaines enzymes voient leur activité diminuer, d'autres augmenter et d'autres ne se modifient pas (Hayflick et Finch 1977).

Une autre technique pour mesurer l'altération des protéines au cours du vieillissement est de mesurer leur sensibilité à la température. Ici aussi, on a vu que si de nombreuses protéines devenaient plus thermolabiles au cours du vieillissement (Houben *et al.* 1984 a et b, Somville 1985, Gupta et Rothstein 1976, Orhloff *et al.* 1979, Takahashi *et al.* 1987, Veley *et al.* 1985, Reiss et Rothstein 1974, Harding 1973), d'autres par contre voyaient leur résistance thermique augmenter (Capasso et Zimmerman 1980, Fleshman *et al.* 1985, Reznick et Gherson 1977).

La troisième technique largement utilisée pour détecter des altérations enzymatiques est l'immunotitration qui permet de montrer l'existence de matériel à réaction croisée. On a constaté que, pour certaines enzymes, une même activité enzymatique d'enzyme "vieille" nécessitait une quantité plus élevée d'antisérum pour précipiter 50 % de cette activité que pour précipiter 50 % de la même activité d'enzyme "jeune". On explique ces résultats par le fait que certaines enzymes "vieilles" maintiennent leur structure tertiaire et donc leurs épitopes alors qu'ils perdent en tout ou en partie leur activité catalytique (Hirsch 1983) : c'est ce que l'on appelle le matériel à réaction croisée. Plusieurs auteurs ont mis en évidence ce phénomène sur plusieurs enzymes différentes et dans des modèles in vivo et in vitro (Reznick et Gherson 1977, Sharma et Rothstein 1978, Zeelon *et al.* 1973, Gherson et Gherson 1973, Somville 1982, Reiss et Gherson 1976) .

L'électrofocalisation s'est aussi révélé être une technique intéressante pour mettre en évidence des modifications dans le point isoélectrique des protéines. Diverses protéines sont affectées par cette modification (Sleyster et Knook 1981, Dreyfus *et al.* 1978, Van Klee *et al.* 1975, Williams et Johns 1979, Tunakoshi et Deutsch 1981). La raison de cette modification pour les

protéines étudiées par ces auteurs a été attribuée à la déamidation des résidus aspartyl et glutamyl plus acides. Ce type de réaction a pu être simulé in vitro en exposant des protéines purifiées à des conditions alcalines. Ces changements de charge furent accompagnés de façon variable par des changements dans l'activité catalytique, la stabilité thermique, l'affinité pour les substrats, etc... (Stadmann 1988). La plus belle étude mettant en évidence le rôle de la déamidation dans l'apparition de l'altération des protéines au cours du vieillissement fut celle de Yuan *et al.* (1981) sur la triose phosphate isomérase de globules rouges et de cristallin humains. Ces auteurs montrent que les asparagines 71 et 15 de l'enzyme sont déamidées au cours du vieillissement. Comme ces acides aminés sont situés dans la région de contact des deux sous-unités de l'enzyme, la déamidation provoque l'apparition de quatre charges négatives supplémentaires qui rendent l'enzyme instable car plus rapidement dissociée en sous-unités du fait de la répulsion des charges négatives.

Ces changements de comportement visibles par ces différentes techniques ont pour cause des modifications moléculaires de types différents également. Nous avons délà parlé de la déamidation mais de nombreux autres processus ont été mis en évidence. En effet, les altérations dues à l'âge ont aussi été attribuées à des modifications covalentes d'acides aminés par oxydation (Oliver *et al.* 1987, Dulic *et al.* 1987, Gafni 1983, Gordillo *et al.* 1988, Noy *et al.* 1985), à la glycosylation de groupes lysines (Cerami *et al.* 1987), à la racémisation des résidus aspartiques et asparagines (Lowenson et Clarkes 1988, Van den Oetelaar *et al.* 1989), à des changements spontanés dans la conformation des protéines (Rothstein 1984, Sharma et Rothstein 1980), à une protéolyse partielle (McFall *et al.* 1986, Takemoto *et al.* 1987 a et b) et à une carboxyméthylation (Sellinger *et al.* 1988).

De toutes ces modifications, celles dues à l'oxydation semblent les plus importantes. En tout cas, elles sont les mieux étudiées. Elles apportent à la théorie des radicaux libres une quantité importante d'arguments. Divers systèmes biologiques sont capables de produire des espèces oxydantes en présence d'oxygène : l'autooxydation des flavoprotéines, le systèmes NAD(P)H cytochrome P450 réductase, la xanthine oxydase, etc (voir chapitre I). Ces systèmes se sont avérés capables d'inactiver in vitro certaines enzymes par l'intermédiaire du Fe^{++}. Ainsi, l'histidine peut être oxydée par des réactions radicalaires et donner de l'asparagine, de l'acide aspartique et un certain nombre de dérivés oxygénés (Levine 1983a). L'inactivation par oxydation d'une seule histidine du site actif de la glutamine synthétase est

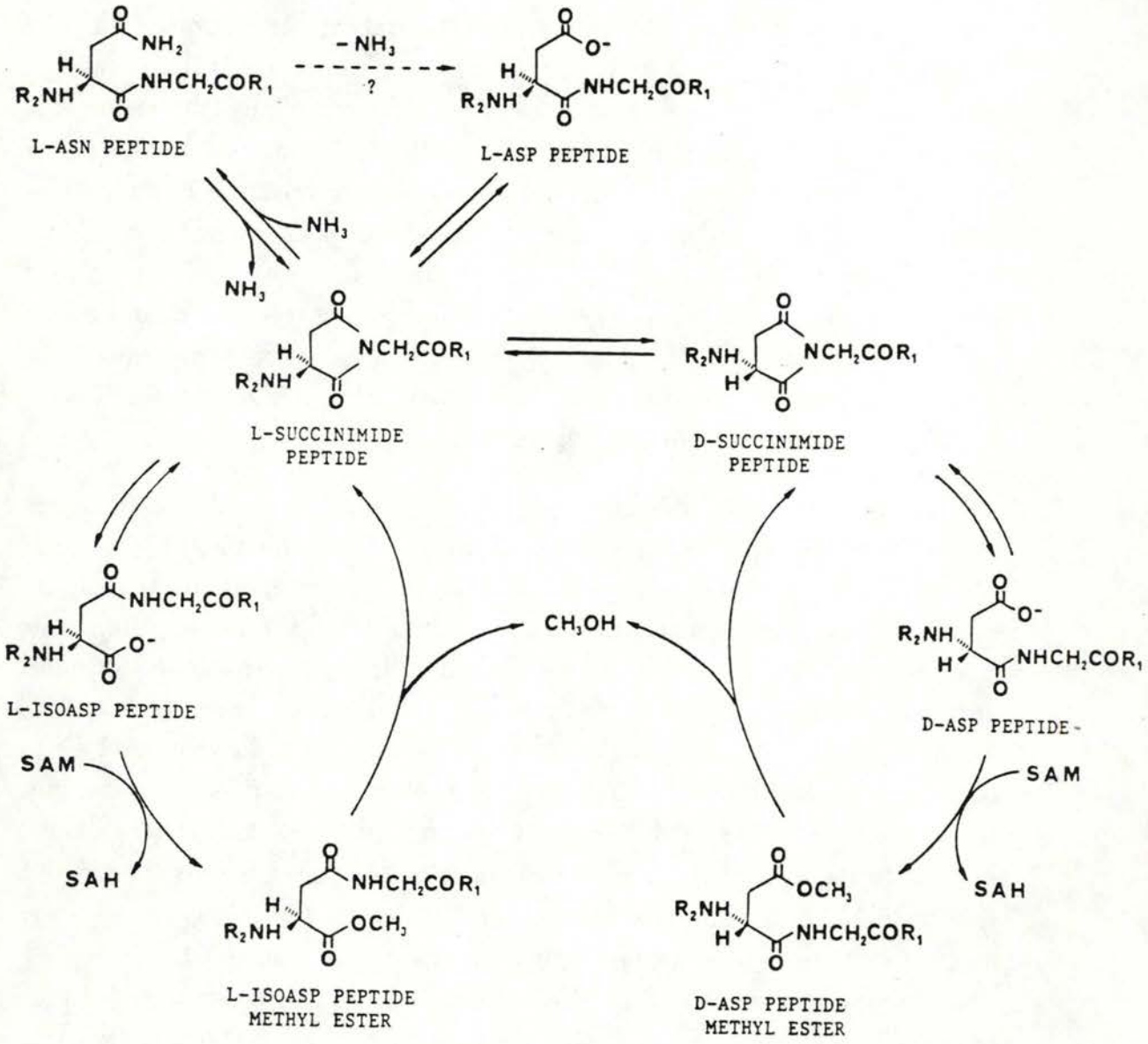


Figure 5. Role of succinimide peptide intermediate and carboxymethylation reactions in the deamidation, racemization and isomerization of asparaginyl and aspartyl-containing peptides. Abbreviations: SAM, S-adenosylmethionine; SAH, S-adenosylhomocysteine.

Figure I-36 : Déamidation, racémisation et isomérisation de la L-asparagine via l'intermédiaire du L-succinimide au sein d'une protéine (Stadtman 1988).

ainsi expliquée (Levine 1983 a, b et c). Oliver *et al.* (1987) ont montré, par l'analyse des groupes carbonyles sur les protéines, que la concentration en protéines oxydées augmente dans les érythrocytes humains lorsque ceux-ci vieillissent. Dans les cultures de fibroblastes, cette augmentation a aussi été observée en fonction de l'âge des donneurs (Oliver *et al.* 1987). Il a aussi été montré que, chez le rat, lors du vieillissement, il y a apparition de matériel à réaction croisée pour la glutamine synthétase et que parallélement les groupes carbonyles de l'enzyme augmentent. De tels résultats permettent de soupçonner que l'oxydation contribue à l'accumulation d'enzyme altérée pendant le vieillissement.

La racémisation et l'isomérisation des résidus aspartyls au cours du vieillissement de certains tissus ont aussi été observées (Masters *et al.* 1977, 1978, Brunauer et Clarke 1986, Van den Oetelaar *et al.* 1986). La racémisation et l'isomérisation des résidus L-aspartyls s'effectuent via un intermédiaire, l'aspartylsuccinimide, qui intervient aussi probablement lors de la déamidation de l'asparagine (Figure I-36) (Geiger et Clarke 1987).

Les altérations observées lors du vieillissement ne semblent pas toujours être accompagnées de changements majeurs détectables. Ceci a conduit à l'hypothèse que les altérations observées sont dues à des modifications subtiles dans la conformation des protéines (Rothstein 1984). Ainsi, par exemple, Sharma et Rothstein (1980) entreprenant des études sur l'énolase purifiée de vieux et de jeunes nématodes (Turbatrix aceti) ont montré que les deux enzymes différaient par leur stabilité thermique, les propriétés spectrales, les paramètres cinétiques et les caractéristiques immunochimiques. Mais, lorsque l'on dénaturait les deux enzymes avec des concentrations élevées en guanidine-HCl puis qu'on les renaturait dans des milieux à faible concentration en guanidine-HCl, les deux enzymes donnaient des formes enzymatiques que l'on ne pouvait plus distinguer sur base des critères cités plus haut.

Il est généralement supposé que l'accumulation des formes altérées au cours du vieillissement reflète aussi une perte parallèle de la capacité protéolytique des cellules (Goldstein *et al.* 1976). Ainsi la durée de vie des molécules dans les cellules augmenterait, ce qui leur donnerait plus de temps pour subir des changements spontanés de conformation. Cependant, dans certains cas (Houben *et al.* 1984 a et b, Somville *et al.* 1985, Mbemba *et al.* 1985a), la nature du milieu environnant a été impliquée dans l'altération des protéines. Dans ces cas, l'altération est alors réversible et disparaît lorsque les cellules sont cultivées avec certaines molécules comme par

exemple la vincamine. Celle-ci fait disparaître l'altération de la SOD chez des fibroblastes vieux (Somville *et al.* 1985). Par contre certaines molécules utilisées chez l'homme par certains thérapeutes pour combattre les effets du vieillissement n'ont pas d'effets sur l'altération des enzymes chez les cellules vieilles. C'est le cas de la procaïne (Pigeolet *et al.* 1988).

Remarquons enfin qu'il est parfois très difficile de détecter des changements subtils même dans la structure primaire. Ainsi, pour la glutamine synthétase, l'oxydation d'une simple histidine inactivait l'enzyme. Des techniques très sensibles furent nécessaires pour détecter quelle était la modification responsable de cette inactivation. Dans l'état actuel des analyses, il est difficile de mettre en évidence des modifications de la structure primaire pour des enzymes de cellules vieilles dans le cas où le nombre de modifications est faible ou unique et dans la cas ou seul une petite fraction des molécules enzymatiques sont modifiées.

Les nombreuses expériences qui ont tenté de mettre en évidence des modifications de la structure primaire des enzymes chez les cellules vieilles ont obtenu une réponse négative, ce qui est souvent utilisé comme argument contre la théorie de Orgel, du moins dans sa première version.

BUTS DU TRAVAIL.

La littérature abonde de résultats démontrant la toxicité des radicaux libres vis à vis des systèmes vivants. Cependant, il est clair que ces radicaux libres dérivés de l'oxygène peuvent aussi avoir des rôles positifs à jouer dans le fonctionnement des cellules et des organismes et quoiqu'il en soit, leur présence est un corollaire de la vie aérobie. La concentration en radicaux libres et en peroxydes n'est jamais nulle dans les cellules mais elle est faible. Par conséquent, il faut bien admettre qu'au-delà d'un seuil de concentration, l'homéostasie cellulaire est détruite alors qu'en deçà la cellule continue à vivre. Le seuil est atteint lorsque l'ensemble du système participant à la destruction des radicaux et des peroxydes est dépassé. Au-delà de ce seuil, la production radicalaire s'emballe. Nous avons voulu comprendre comment ce phénomène d'emballement s'explique et pour ce faire, nous avons étudié la résistance vis à vis des espèces oxydantes elles-mêmes des trois enzymes directement impliquées dans la protection contre l'oxydation (catalase, SOD et GPX).

Nous nous sommes ensuite centrés plus spécifiquement sur la GPX. Le choix de cette enzyme est conforté par des résultats récents qui attribuent à la GPX une importance primordiale dans la défense des cellules contre les stress oxydants (Michiels et Remacle, 1988 a et b, Michiels *et al.* 1988).

Dans le même souci de tester la résistance de l'enzyme vis à vis des radicaux, nous avons voulu savoir si l'exposition de la GPX aux radicaux et aux peroxydes la susceptibilisait à la protéolyse comme cela a été montré pour d'autres protéines ou si , du fait de son rôle antioxydant qui l'oblige à agir là où se trouve les espèces oxydantes, elle ne possédait pas une résistance particulière à cet égard. Nous avons alors soumis l'enzyme à des attaques par des radicaux et des peroxydes puis nous avons étudié sa vitesse de dégradation par diverses protéases en comparaison avec la GPX native.

Enfin, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, les radicaux libres ne sont pas étrangers au phénomène de vieillissement cellulaire, même si les relations causales et les mécanismes restent hypothétiques et mal expliqués. De manière à mieux cerner les relations entre vieillissement et radicaux, nous avons décidé d'investiguer le rôle que la GPX pourrait jouer. Dans le modèle de vieillissement cellulaire in vitro (fibroblastes de poumon humain WI-38), nous avons étudié la fonctionnalité de la GPX au cours du vieillissement afin de voir si les cellules vieilles était moins bien protégées du stress oxydant du fait d'une diminution éventuelle de son

activité. Nous avons également étudié en détail l'altération de l'enzyme au cours du vieillissement afin de recueillir des informations qui pourraient appuyer certaines hypothèses du vieillissement.

MATERIELS ET METHODES

II MATERIELS ET METHODES

1. Enzymes et produits.

Les enzymes utilisés dans ce travail, Cu/Zn superoxyde dismutase (SOD) (érythrocytes bovins), catalase (foie bovin), Mn SOD (E. coli), xanthine oxydase (grade I et grade II de lait), glutathion réductase (type IV de levure), les protéases sauf protéases lysosomales et la Glutathion Peroxydase (GPX) pour certaines expériences furent obtenues chez Sigma chemicals (St Louis M.O., U.S.A). Le GSH, NADPH, épinéphrine, xanthine, l'acide 2-thiobarbiturique viennent également de chez Sigma chemicals.

Les autres produits chimiques, sauf spécifié dans le texte, de pureté analytique, furent obtenus chez Merck A.G. (Darmstadt, FRG).

2. Purification de la GPX d'érythrocytes bovins.

La plupart des expériences ont été réalisées avec la GPX que nous avons purifiée nous-mêmes à partir d'érythrocytes bovins. Cependant en ce qui concerne les expériences de susceptibilisation à la protéolyse par les radicaux, de la GPX commerciale d'érythrocytes bovins a également été utilisée. Le mannitol a été obtenus chez UCB S.A. (Bruxelles, Belgique).

La méthode de purification utilisée est celle décrite par Adelbert Grossmann et Albrecht Wendel (1985) (adaptée à notre matériel de laboratoire).

Matériels:

Anticoagulant : 0,28 M EDTA
0,008 M citrate
à diluer 2,8 fois avant l'utilisation et utiliser 42 ml pour 1 L de sang

Solution de lavage : 0,1 M glucose
2,8 M NaCl
0,2 M KH_2PO_4 pH 7,0
0,02 M EDTA
0,02 M NaN_3
à diluer 20 fois lors de l'utilisation.

Solvant organique : 570 ml chloroforme
950 ml Ethanol

Tampons Phosphate :

PB0 : EDTA 1mM
NaN_3 1mM pH 8,0
Mannitol 50 mM

PBI : KH2PO4 0,6 M
EDTA 1 mM pH 6,7
Mannitol 50 mM

PBII : K_2HPO_4 3,85 M pH 7,0

PBIII : KH_2PO_4 0,7 M
EDTA 1 mM pH 8,0
NaN_3 1 mM
Mannitol 50 mM

PBIV : diluer 1,4 fois PBIII avec PBO

PBV : KH_2PO_4 20 mM
EDTA 1 mM pH 8,0
NaN_3 1 mM
Mannitol 50 mM

Mode opératoire :

La purification a été réalisée à partir de 3 litres de sang auxquels a été ajoutée la quantité nécessaire d'anticoagulant.

Préparation des globules rouges :

Le sang est centrifugé 20 minutes à 3.500 RPM dans des bouteilles de 250 ml, dans un rotor JA 14 et centrifugeuse J 21 B (Beckman Instruments Inc., Spinco division, Palo Alto, CA).

Le plasma et la couche leucocytaire sont décantés.

Les globules rouges sont lavés trois fois et centrifugés trois fois avec la solution de lavage.

Le volume de globules rouges est porté à 2,5 L avec de l'eau distillée et laissé 4 heures à 4° C pour hémolyse.

1,85 L de PBI est ajouté pour la nuit.

Précipitation organique :

1,26 L de solution de solvants organiques est ajouté goutte à goutte à 4° C et sous agitation vigoureuse aux 4,35 L d'hémolysat.

Agitation encore pendant 20 minutes après l'addition de solvant organique

Centrifugation 20 minutes à 3.500 RPM (mêmes conditions que celles décrites ci-dessus).

Le surnageant est décanté, filtré et concentré 6 fois sur membrane Amicon PM30.

Le concentrat (400 ml) est dialysé contre 3 fois 3 L de solution composée de 1 volume PBI et 2 volume PBII, 0,3 mM de dithiotréitol et sous pression d'azote.

Précipitation au phosphate :

400 ml de PBII sont ajoutés au dialysat.

Centrifugation en tube de 50 ml à 15.000 RPM pendant 10 minutes après une nuit à 4° C.

Le culot est resuspendu dans 15 ml de PBIII.

Chromatographie hydrophobe :

17 ml de gel phénylsépharose ® CL-4B (25 mm X 80 mm) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) sont ajoutés sous agitation aux 15 ml de solution contenant la Glutathion Peroxydase.

Le gel est placé dans une colonne lavée au PBIV

L'élution est réalisée par le PB0

Du dithiotréitol (concentration finale 1 mM) est ajouté à l'éluat qui est placé sous atmosphère d'azote.

Chromatographie échangeuse d'ions DEAE :

La solution contenant la Glutathion Peroxydase est passée sur 3 colonnes de 5 ml (14 mm X 40 mm) placées en série et équilibrées avec du PBV. A une concentration de 20 mM en phosphate la Glutathion Peroxydase ne se fixe pas à la colonne mais bien les protéines contaminantes.

La solution recueillie est concentrée sur membrane Amicon PM 10.

Elle est ensuite dialysée contre un tampon KH_2PO_4 1 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM.

Le dialysat est enfin lyophilisé en présence de 0.5 mg/ml de sucrose et de mannitol et conservé à -70° C.

Le sang de départ contenait 355.545 U.E. et nous en avons récolté 6.604 après la purification soit un rendement de 1,86%. L'activité spécifique dans le sang était de 0,64 U.E/mg de protéines et dans la solution purifiée finale de 2.679 U.E./mg de protéines soit un indice de purification de 4.186 fois.

Les électrophorèses en conditions dénaturantes (figure III-17 A, piste 2) montrent deux autres bandes de protéines contaminant notre préparation purifiée. Leur poids moléculaire est de 63.000 et 25.400. Ces protéines ne sont pas présentes dans la GPX de chez Sigma Chemicals (figure III- 22, piste 2).

3. Mise au point du dosage de la GPX dans un homogénat de fibroblastes humains WI-38.

Selon Flohé et Günzler (1984), le dosage de la GPX par le test du couplage à la glutathion réductase est la méthode de choix pour déterminer son activité dans le matériel biologique. Le principe du dosage est le suivant (figure I-30) : le peroxyde est réduit par le GSH par l'intermédiaire de la GPX.

Le GSSG formé est ensuite réduit par le NADPH par l'intermédiaire de la glutathion réductase. Il s'agit alors de suivre la diminution d'absorbance du NADPH.

La GPX se révèle être en quantité faible dans les fibroblastes.

Flohé et Günzler (1984) suggère de réoptimaliser certaines caractéristiques du dosage lorsque l'on passe d'un tissu à l'autre voire d'une espèce à l'autre. Nous avons donc revu certaines caractéristiques du dosage afin de les adapter à notre problème, sur base de plusieurs dosages proposés dans la littérature (Flohé et Günzler 1984, Wendel 1981, Orhloff *et al.* 1980, Mbemba *et al.* 1985 b). Nous nous sommes basés au départ sur une méthode décrite pour les fibroblastes (Mbemba *et al.* 1985 b) en y ajoutant certaines améliorations jugées intéressantes par d'autres auteurs.

Il est important de remarquer que le choix de certaines conditions est relativement arbitraire. Ainsi, la vitesse de réaction augmente avec l'augmentation de la concentration du GSH et du peroxyde et il n'est pas possible d'atteindre une concentration maximale pour les deux substrats à la fois donnant lieu à un plateau pour la vitesse de réaction. Ceci est dû à la cinétique "ping-pong" de l'enzyme (cfr Introduction 2.4). Cependant, il n'est pas question non plus d'augmenter ces concentrations à outrance car cela provoque une augmentation de la vitesse de réaction spontanée entre le GSH et le peroxyde, et donc une augmentation des valeurs des blancs. De plus, ces réactions spontanées augmentent rapidement avec le pH. Enfin, il n'y a dans la littérature aucun consensus apparent quant à une méthode unique que la communauté scientifique utiliserait de préférence de manière à permettre les comparaisons entre auteurs pour l'activité de la GPX. Même la définition de l'unité d'activité de la GPX n'est pas unique. De ces données, il résulte qu'il n'existe pas de conditions optimales pour le dosage de la GPX, ce qui est illustré par le nombre important de conditons différentes que l'on retrouve dans la littérature. Une diminution du pH de dosage par exemple permettra d'augmenter la concentration des substrats sans modifier la valeur des blancs et par conséquent engendrer des erreurs relatives du même ordre de grandeur. C'est ainsi que sur les quatre références données (Flohé et Günzler 1984, Wendel 1981, Orhloff *et al.* 1980, Mbemba *et al.* 1985 b) trois pH différents sont proposés : 7,0; 7,6 et 8,5. Les uns se réfèrant à une courbe de pH observent un maximum d'activité à pH 8,5 tandis que les autres invoquent le fait que les réactions spontanées entre le glutathion et le peroxyde augmentent avec le pH pour justifier le rejet du pH optimum comme conditions de travail. De manière à établir un

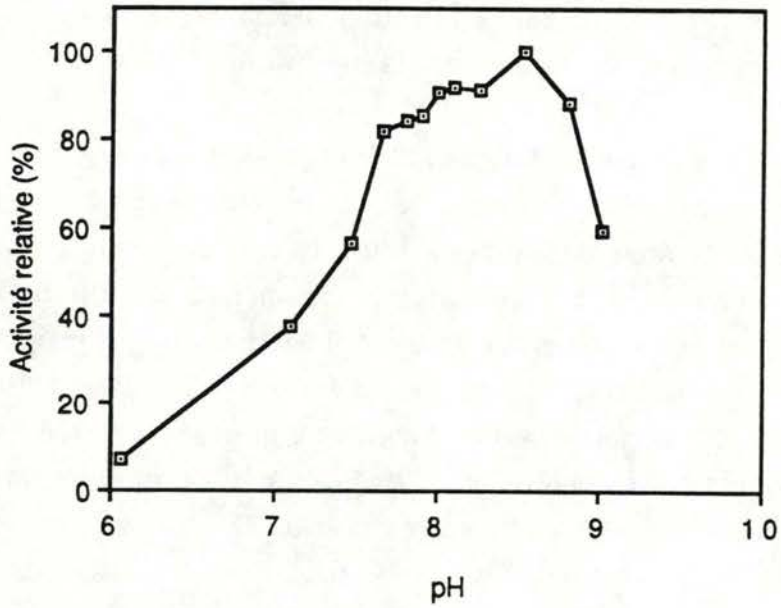


Figure II-1 : Activité de la GPX en fonction du pH de dosage. Des solutions de dosage sont préparées et ajustées à différents pH à l'aide d'un tampon phosphate 60 mM (pH 6 à 8.5) ou d'un tampon pyrophosphate 60 mM (pH 8 à 9). L'activité d'un homogénat de cellules jeunes est mesurée avec ces différentes solution de dosage. Dans toutes les expériences de dosage de la GPX des "matériels et méthodes", chaque point représente la moyenne de trois dosages d'un même échantillon. Chaque expérience a été réalisée une seule fois.

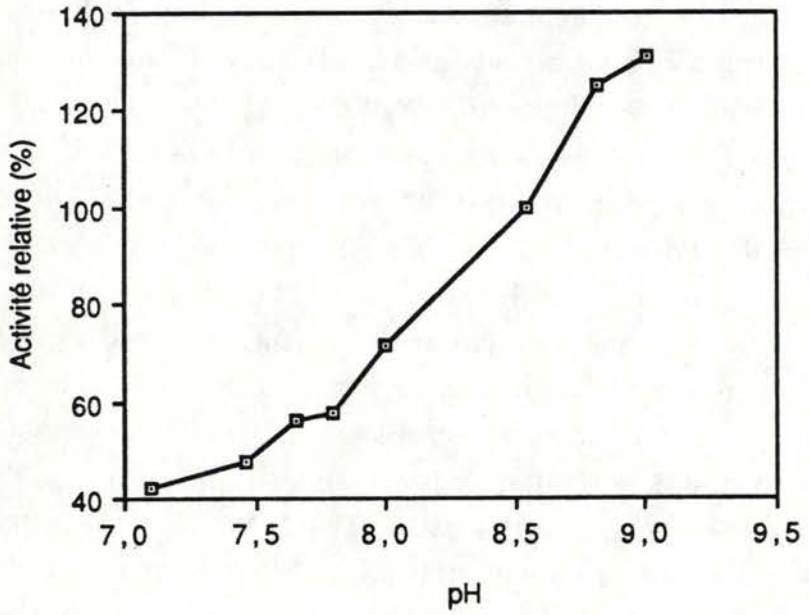


Figure II-2 : Evolution de l'activité relative des blancs en fonction du pH de dosage. Les solutions de dosage de la figure II-1 sont utilisées. A 0.4 ml de solution de dosage est ajouté 0.1 ml de tampon au même pH et 0.1 ml de ter-butylhydroperoxyde. La diminution de l'absorbance est mesurée en l'absence de l'enzyme. Les résultats sont présentés arbitrairement par rapport à la valeur obtenue à pH 8.5.

compromis entre ces deux données qui soit le plus avantageux possible dans nos conditions de dosage, nous avons réalisé une courbe de pH de l'activité de l'enzyme (figure II-1) et une courbe de pH des réactions spontanées des substrats (figure II-2) en mesurant la variation d'absorbance obtenue sans ajouter la GPX à l'ensemble des substrats. A la lumière de ces deux courbes, nous avons choisi de travailler à pH 7,9. En effet, à ce pH , on constate que l'activité enzymatique est proche du maximum (environ 85 % de l'activité maximale) alors que les réactions spontanées ne représentent que 5 % environ d'une activité enzymatique telle qu'on peut l'obtenir dans les expériences qui suivront. On voit clairement que au-delà de pH 7,9, l'activité enzymatique n'augmente plus que lentement alors que les réactions spontanées augmentent fortement. Par contre, en-deçà de ce pH, l'activité enzymatique diminue proportionellement plus vite que les réactions spontanées.

Dans la littérature, trois substrats sont proposés (Flohé et Günzler 1984, Wendel 1981, Orhloff *et al.* 1980, Carmagnol *et al.* 1983, Awasthi 1975, Beutler *et al.* 1974, Cikryt *et al.* 1982, Flohé 1972, Lawrence et Burk 1976, Prohaska et Ganther 1977): H_2O_2, le cumène hydroperoxyde (CUOOH) et le ter-butylhydroperoxyde (TBHP). Cependant, la catalase se trouve en quantité importante dans la fraction cytosolique avec une ASR supérieure à 1 (Remacle *et al.* 1980), et d'autre part, Beutler *et al.* (1974) montre des valeurs de blancs élevés avec H_2O_2. Il semble que le cumène hydroperoxyde réagisse avec la Glutathion Peroxydase Se dépendante et Se indépendante. Quant au ter-butylhydroperoxyde (TBHP), certains auteurs pensent qu'il réagit moins bien avec la glutathion peroxidase Se indépendante que le cumène hydroperoxyde (Prohaska et Ganther 1977, Cikryt *et al.* 1982). De plus Carmagnol *et al.* (1983) suggère que la Glutathion Peroxydase Se indépendante n' existe pas dans les fibroblastes. Nous avons dès lors choisi de mettre au point le dosage avec le TBHP avant de vérifier la suggestion de Carmagnol *et al.* (1983).

La littérature propose également, pour la Glutathion Peroxydase qui n'aurait pas été conservée avec du glutathion d'incuber l'enzyme à 37° C pendant 10 minutes en présence de glutathion avant de déclencher la réaction en ajoutant du TBHP. Ceci permettrait une certaine réactivation de l'enzyme partiellement inactivée. Cependant, nous avons observé dans certains cas, une inactivation importante de l'enzyme après ce traitement. Pour cette raison et pour des raisons pratiques, nous avons ramené cette

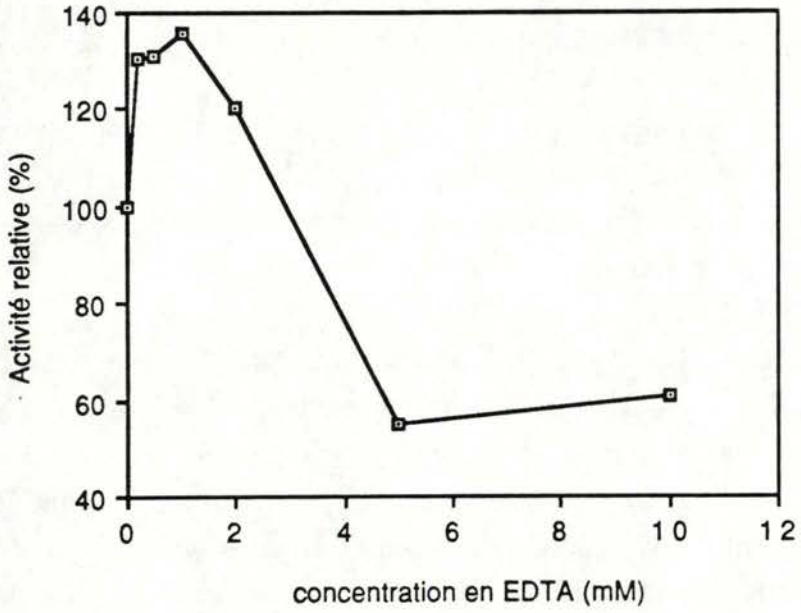


Figure II-3 : Effet de la concentration en EDTA sur l'activité de la GPX. Un homogénat de cellules jeunes a été divisé en aliquots contenant différentes concentrations en EDTA. Les aliquots furent incubés une heure à 4° C avant d'être dosés. La solution de dosage contenait des concentrations en EDTA identiques aux aliquots correpondants.

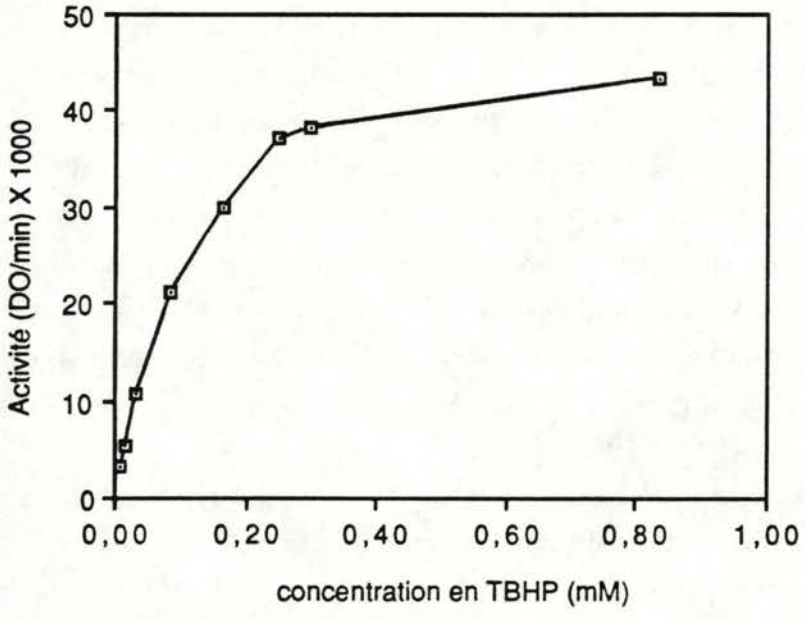


Figure II-4 : Courbe cinétique de la GPX purifiée en fonction de la concentration en TBHP. La concentration en glutathion est maintenue à 0,87 mM.

incubation à température ambiante pendant 5 minutes. Sans ce traitement, l'enregistrement des dosages montrait une légère incurvation.

Certains auteurs suggèrent une inhibition de la GPX par des cations tels que Hg^{++}, Cd^{++}, Cu^{++}, Ni^{++}, Co^{++}, Zn^{++}, Mg^{++} (Awasthi *et al.* 1975, Chaudière et Tappel 1984). Ils proposent donc l'usage de l'EDTA afin de protéger l'enzyme. Nous avons réalisé une courbe de concentration en EDTA (figure II-3). Nous constatons effectivement que notre enzyme purifiée gagne un peu plus de 30 % d'activité en présence de 1 mM d'EDTA. Ceci nous a décidés à utiliser cette molécule dans tous nos dosages ultérieurs.

En maintenant notre concentration en glutathion au niveau de celle proposée dans l'article de Mbemba *et al.* (1985b), nous avons effectué une cinétique en fonction de la concentration en peroxyde. La figure II-4 montre les résultats. Les points expérimentaux ont été utilisés pour un ajustement sur l'équation de Michaelis-Mentem (programme Mac Lab, Unité de Biologie quantitative, FNDP Namur, Belgique). Le Km apparent calculé par cette opération est de 0,112 mM en TBHP. Nous avons choisi pour nos dosages une concentration en TBHP de 0,4 mM. D'après le calcul à cette concentration , nous atteignons 90 % de l'activité maximale. Nous n'avons pas choisi une concentration plus élevée pour limiter l'effet des réactions spontanées entre GSH et peroxydes. La variation d'absorbance dans nos conditions et avec cette concentration en TBHP restait tout à fait linéaire pendant au moins trois minutes.

Par conséquent, les conditions de dosage de la GPX seront les suivantes :

Solutions à préparer

KH_2PO_4 60 mM pH 7,9
NADPH 1,1 mM dans KH_2PO_4
GSH 13 mM dans KH_2PO_4
ter-butylhydroperoxyde 2,4 mM dans une solution éthanol/ eau (1/3)
Glutathion réductase 500 U/2.3 ml

La solution du dosage est préparée de la manière suivante:

8 ml KH_2PO_4 60 mM pH 7,9
1 ml NADPH 1,1 mM

1 ml GSH 13 mM
50 µl de glutathion réductase 500 U/2.3 ml

Dosage proprement dit:

0,4 ml de solution de dosage
0,1 ml d'enzyme à doser
incubation 5 minutes à température ambiante
0,1 ml de TBHP
lecture au spectrophotomètre Perkin-Elmer 557 DW (Hitachi Ltd, Tokyo Japon) à 366nm.

L'unité enzymatique correspond à l'oxydation d'une µmole de NADPH par minute à 25° C et dans les conditions définies ci-dessus.

Détermination de l'activité Glutathion Peroxydase dans le sang :

200 µl de sang sont additionnés à 2 ml d'eau distillée pour hémolyse.
la quantité d'hémoglobine est déterminée par la méthode de Drabkin (Wendel, A. 1981).
Le sang est dilué à 3 mg d'hémoglobine par ml.
L'hémolysat est centrifugé 2 min. à 12.000 RPM (centrifugeuse Beckman J 21 B, Beckman Instruments, Inc., Spinco division, Palo Alto, CA)

Pour mesurer la Glutathion Peroxydase dans le sang, il faut inhiber l'activité pseudoperoxidative de l'hémoglobine en la transformant en cyanométhémoglobine par l'intermédiaire d'une solution de transformation (Wendel, A. 1981) : KCN 4.5 mM
$K_3(Fe(CN)_6)$ 0.45 mM
ajuster à pH 7.0 avec KH_2P0_4 0.25 M
Additionner 500 µl de solution de transformation à 1 ml d'hémolysat et doser après 5 minutes.

Il était important après cette mise au point de s'assurer que l'activité mesurée était bien celle de la GPX Se-dépendante (EC 1.11.1.9.) et non la somme d'une telle activité et de celle d'une GPX Se-indépendante présente dans les fibroblastes. Puisque la GPX Se-dépendante utilise aussi bien H_2O_2 que les peroxydes organiques, alors que, au contraire, la GPX Se-indépendante n'utilise pas H_2O_2 et éventuellement n'utilise pas le TBHP,

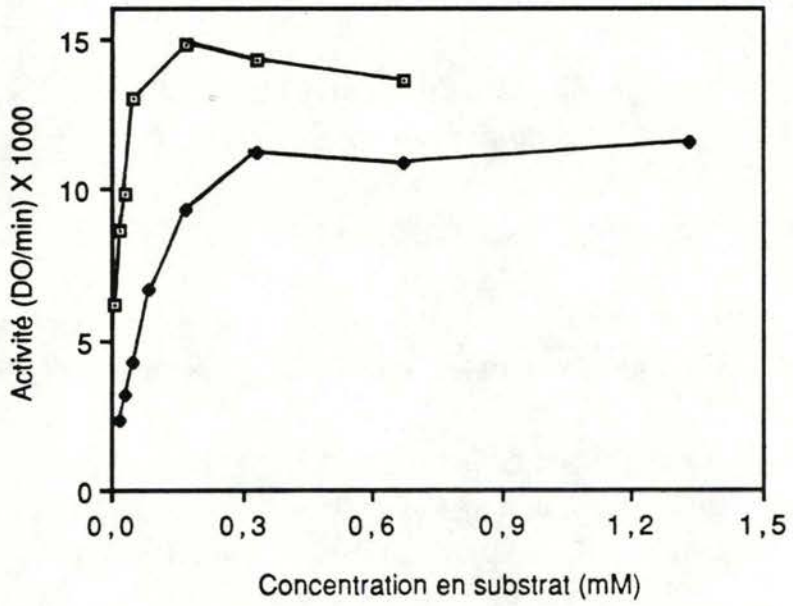


Figure II-5 : Courbe de cinétique de la GPX de fraction soluble de fibroblastes WI-38 en fonction de la concentration en TBHP (◆) ou en H_2O_2 (□). La concentration en glutathion est maintenue à 0,87 mM.

nous avons décidé de mesurer l'activité maximale de la fraction soluble des fibroblastes avec H_2O_2 et TBHP en maintenant les autres conditions constantes. Nous avons mesuré pour la GPX purifiée (Se dépendante) que l'activité maximale avec TBHP et H_2O_2 était identique. Par conséquent, pour un même volume de fraction soluble, si deux enzymes métabolisent le TBHP alors que une seule métabolise H_2O_2 via le glutathion, l'activité maximale que nous devons observer avec le TBHP doit être plus élevée que celle que nous observons avec H_2O_2. La fraction soluble de fibroblastes est obtenue en centrifugeant l'homogénat obtenu à 39.000 rpm pendant 30 minutes sur centrifugeuse Beckman L5.65 (Beckman Instruments Inc, Spinco Division, Palo Alto, CA, USA, rotor type 40). Nous avons inhibé la catalase de cette fraction soluble par l'azide 0,1 mM (Aebi 1974) et nous avons réalisé deux courbes cinétiques avec cette fraction. La première avec H_2O_2 comme substrat de l'enzyme, la seconde avec TBHP. Comme on le voit à la figure II-5, la vitesse maximale de la réaction est légèrement plus élevée avec H_2O_2 qu'avec TBHP. Si Vmax avec TBHP est considéré comme 100 %, V max avec H_2O_2 est de 123 %. Ces résultats nous indiquent clairement que nous pouvons utiliser le TBHP comme substrat pour mesurer l'activité de la GPX EC 1.11.1.9. dans la fraction soluble des fibroblastes. En effet, soit le TBHP ne réagit pas avec la GPX Se-indépendante et il n'y a pas de contre-indication à l'utiliser pour mesurer l'activité Se-dépendante, soit il réagit avec la GPX Se-indépendante mais nos résultats montrent que cette enzyme n'est pas présente dans les fibroblastes WI-38 puisque l'activité maximale n'est pas supérieure à celle que l'on observe avec H_2O_2.

On peut aussi observer à la figure II-5 une affinité beaucoup plus importante de la GPX pour H_2O_2 que pour TBHP puisque le Km apparent calculé pour H_2O_2 est de 0,012 mM. Ces résultats nous permettent donc de continuer nos expériences avec TBHP comme substrat pour les fractions solubles de surnageant.

4. Dosage de la SOD (érythrocytes bovins).

L'activité de la SOD est mesurée par sa capacité d'inhiber l'oxydation de l'épinéphrine par les anions superoxydes. A 1 ml de tampon TRAP (hydrochlorure de triéthanolamine), 20 mM pH 9 contenant du sucrose 0,25 M, EDTA 2 mM sont ajoutés successivement 10 µl d'épinéphrine 0,1 M, 20 µl de xanthine 0,1 M et 2 µl de xanthine oxydase grade I (25 USigma/0,6 ml).

La formation d'adrénochrome est mesurée par la différence d'absorbance à 480 nm et 575 nm dans le spectrophotomètre Perkin Elmer 557DW (Hitachi LTD, Tokyo, Japon). 100 µl de solution contenant la SOD sont ajoutés et la diminution de la formation d'adrénochrome est observée. L'activité de la SOD est exprimée en pourcentage d'inhibition de la formation d'adrénochrome.

5. Dosage de la catalase.

L'activité de la catalase est mesurée par la vitesse de disparition de H_2O_2 détectée à 240 nm au spectrophotomètre Zeiss PM6 (FRG) suivant la méthode de Aebi (1974). 1,98 ml de tampon KH_2PO_4 50 mM pH 7 est placé dans une cuvette; on y ajoute 20 µl d'une solution de catalase et 1 ml d'une solution de H_2O_2 30 mM dans le tampon phosphate. L'unité de la catalase est définie comme la quantité d'enzyme qui décompose 1 µmole de H2O2 par minute à pH 7 et 23°C à partir d'une solution de 30 mM de H2O2. Cependant, nous utiliserons toujours des activités relatives de la catalase vis à vis d'un contrôle.

6. Incubation des enzymes antioxydantes avec les peroxydes et les radicaux libres.

Avant utilisation, la catalase commerciale fut traitée de manière à enlever le thymol (scavenger des $O_2^{\cdot -}$) qui est présent dans les préparations commerciales. Pour ce faire, 25 µl de catalase fut diluée dans 150 µl de phosphate KH_2PO_4 50 mM pH 7,4 contenant 0,1 mM d'EDTA. La solution fut déposée sur une colonne de chromatographie d'exclusion Séphadex G25 ® (25 cm X 0,6 cm) équilibrée dans le même tampon. La fraction protéique du volume mort fut utilisée.

L'acétaldéhyde a été obtenu chez Fluka Chemie (Buchs, Suisse), le desféral chez Ciba Geigy (Grand Bigard, Belgique), le mannitol chez UCB (Bruxelles, Belgique), l'acide trichloroacétique chez Farmitalia, Carlo Erba (Milan, Italie). Sauf pour l'incubation avec les $OH^{\cdot}$, la GPX fut celle que nous avons purifiée à partir d'érythrocytes bovins suivant la méthode de Grossman et Wendel (1985).

6.1 Incubation des GPX, catalase et SOD avec H_2O_2, TBHP et CUOOH.

Les enzymes purifiées furent diluées dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM en présence ou en absence de ces molécules à 10^{-3} M. Cette solution fut incubée à 37°C et l'activité résiduelle mesurée en fonction du temps d'incubation. Lorsque une inactivation se manifestait, différentes concentrations de peroxydes furent testées pour un temps d'incubation déterminé. Les solutions incubées avec les peroxydes et les contrôles furent diluées de manière importante au moment du dosage de façon à éviter les interférences avec les peroxydes incubés.

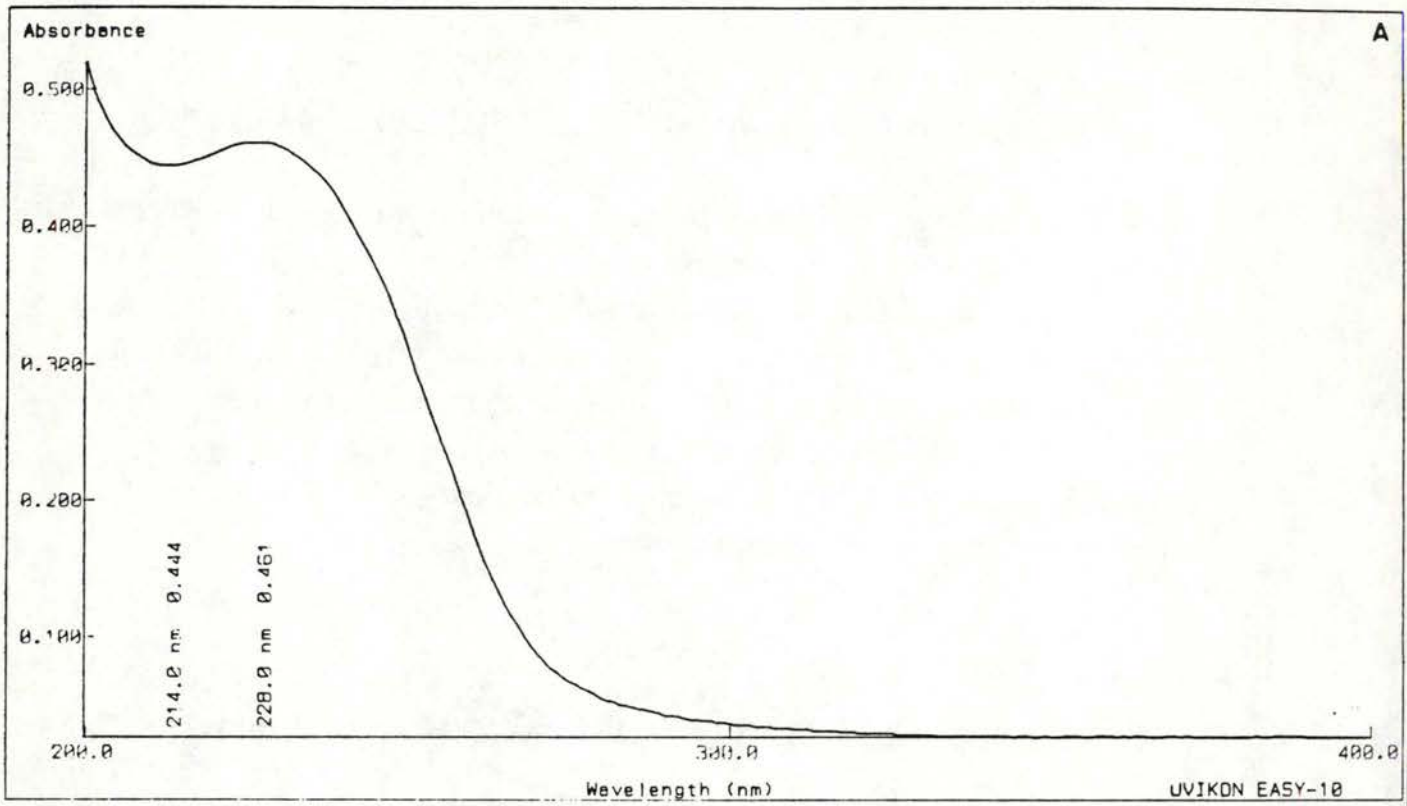
6.2 Incubation de la GPX, SOD et catalase avec les radicaux hydroxyles.

Le système utilisé pour produire les radicaux hydroxyles fut le système ascorbate /Fe^{++}. L'ascorbate (10^{-2} M) et le Fe (5.10^{-5} M) furent dissous dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM. Nous avons mesuré la production de radicaux hydroxyles par la méthode de l'oxydation du déoxyribose décrite par Halliwell et Gutteridge (1981). Les radicaux hydroxyles réagissent avec le déoxyribose (1 mM) pour former des groupements carbonyles sur ce dernier, qui peuvent réagir à leur tour avec l'acide thiobarbiturique et former un chromogène qui absorbe à 532 nm.

Comme pour l'incubation avec les hydroperoxydes, les enzymes furent incubés dans un faible volume à 37°C avec l'ascorbate et le fer puis ensuite dilué dans le tampon phosphate 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM avant le dosage.

6.3 Incubation de la GPX, SOD et catalase avec les anions superoxydes.

Les anions superoxydes furent produits par la xanthine oxydase et l'acétaldéhyde comme substrat. L'acétaldéhyde fut distillé fraîchement lors de l'utilisation. Nous avons contrôlé la production des anions superoxydes en suivant l'oxydation de l'épinéphrine à 480 nm : dans 1 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, nous ajoutons 2 µl de xanthine oxydase (grade III, 25 U/0,7 ml), 20 µl d'acétaldéhyde 100 mM ou 250 mM (concentration finale 2 mM ou 5 mM) pour une production



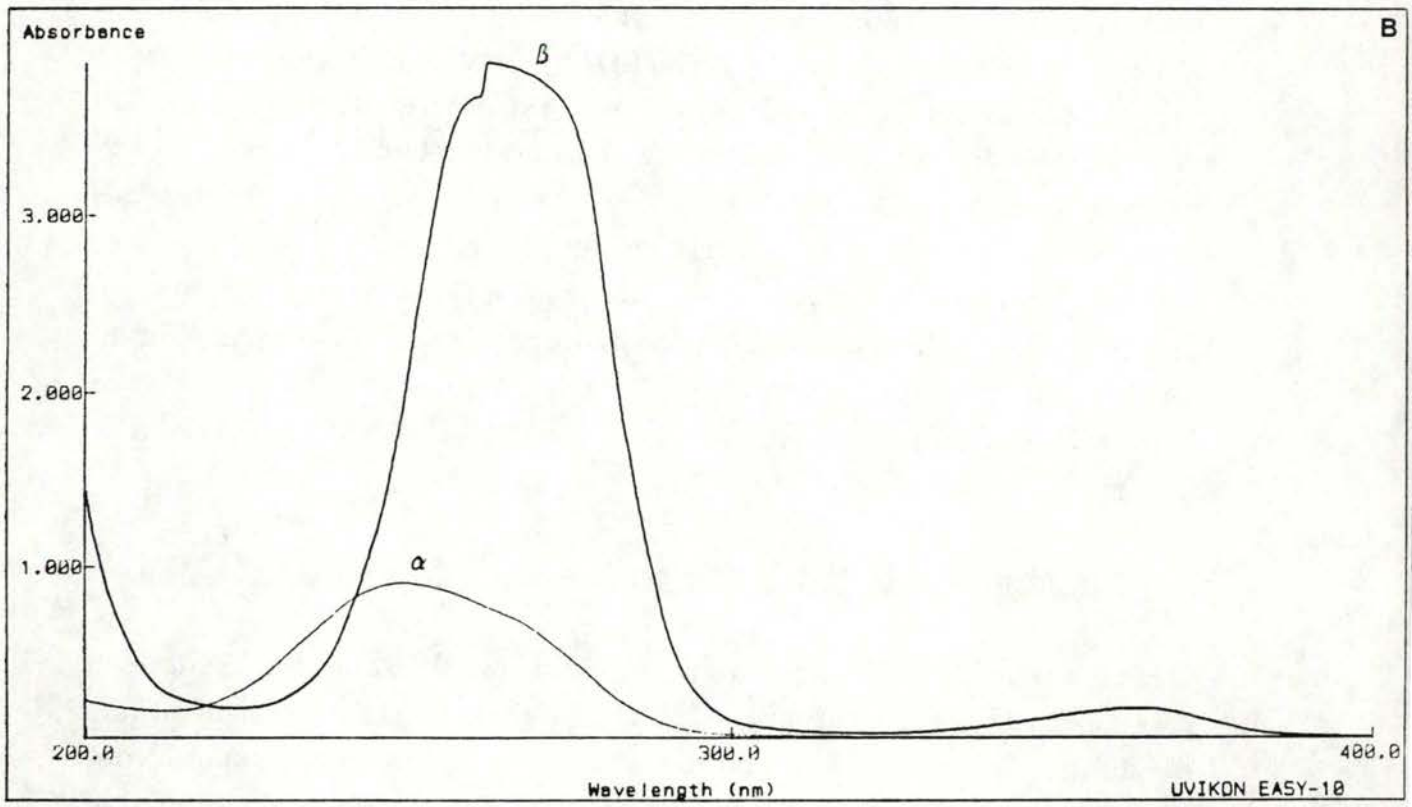


Figure II-6 : Spectre d'absorbance de la bisdiéthylmalonaldéhyde à 0.03 mM (A) et de la malonaldéhyde à 15 µM (B) : la courbe α est mesurée à pH = 2 et la courbe β à pH = 8.

quantitativement différente de radicaux superoxydes et 10 µl d'épinéphrine 0,1 M.

Les solutions enzymatiques furent incubées à 37°C (SOD, GPX) ou à 23°C (catalase) dans de faibles volumes (de manière à diluer avant le dosage) avec les mêmes concentrations finales en xanthine oxydase et en acétaldéhyde.

6.4 Inhibition de la GPX par l'iodoacétate et le cyanure .

De manière à tester l'état rédox de la GPX, nous avons incubé l'enzyme avec l'iodoacétate 1 mM pendant 20 minutes ou avec du cyanure de potassium 10 mM pendant 120 minutes suivant la méthode de Kraus *et al.* (1980). On sait que l'enzyme réduite est habituellement inhibée par l'iodoacétate tandis que l'enzyme oxydée est inhibée par le cyanure (Prohaska *et al.* 1977, Kraus *et al.* 1980).

6.5 Préparation de la malonaldéhyde (MDA) et incubation de la GPX avec la MDA.

La MDA est obtenue par hydrolyse acide de la bisdiéthylmalonaldéhyde (BDEMDA) selon la méthode de Kwon et Watts (1963). Une solution aqueuse de 200 ml de ce produit à 10^{-2} M est incubée à 50°C avec 1 ml de HCl 1M. Après 2 heures la réaction est arrêtée en refroidissant la solution à 0°C. La concentration finale en MDA est calculée selon les coéfficients d'extinction à pH < 3 (245 nm $\varepsilon = 1{,}34.10^4$ M^{-1} cm^{-1}) et à pH > 7 (267 nm $\varepsilon = 3{,}18.10^4$ M^{-1} cm^{-1}) (Kwon et Watts 1963). Un spectre du produit final a été effectué à ces deux pH donnant comme il est décrit par ces deux auteurs un pic d'absorbance à 262 nm à pH 8 et un pic à 249 nm à pH 2 (figure II-6B). Le produit de départ ne présente pas ces profils (figure II-6A).

La GPX fut incubée en présence de 10^{-3} M de MDA. Comme lors de la préparation de la MDA, il reste un maximum de 30% de BDEMDA, nous avons incubé le contrôle avec 3.10^{-4} M de BDEMDA de manière à pouvoir discerner un effet éventuel de cette molécule de celui de la MDA. Nous avons vérifié au préalable que ni la MDA, ni la BDEMDA n'interféraient avec le dosage de l'enzyme.

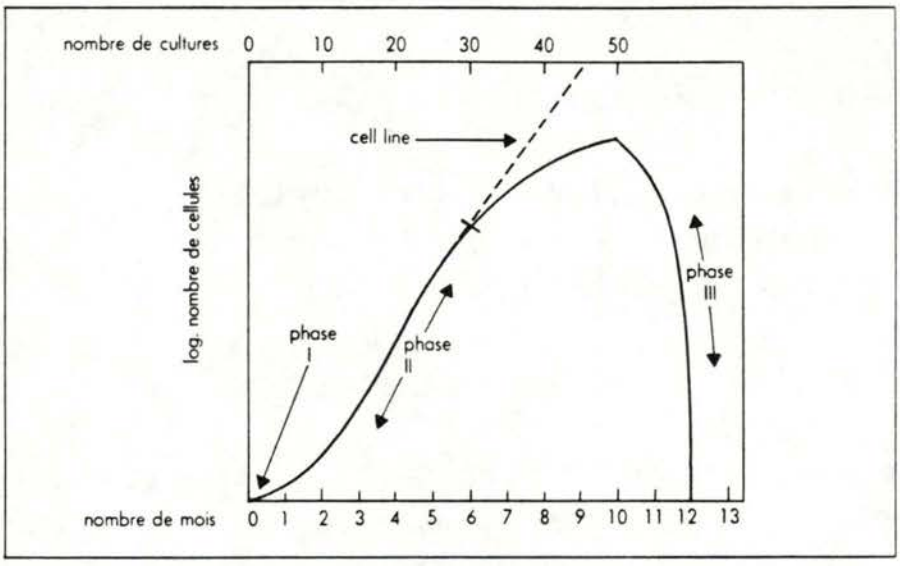


Fig. 2 – Evolution de la culture de fibroblastes d'embryons humains depuis sa mise en culture (phase I), sa croissance exponentielle (phase II) et enfin sa période de déclin (phase III) qui précède la mort des cellules (d'après Hayflick, 1966).

Figure II-7 : Evolution de la culture de fibroblastes de poumon foetal humain depuis sa mise en culture (phase I), sa croissance exponentielle (phase II) et enfin sa période de déclin (phase III), qui précède la mort des cellules (d'après Haylick, 1966).

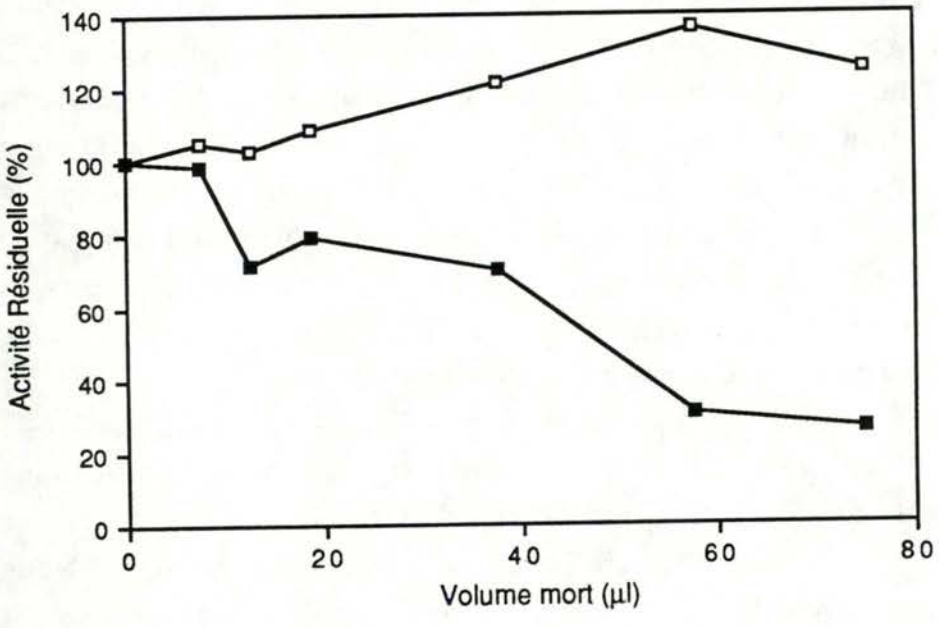


Figure II-8 : Immunotitration d'une fraction soluble de fibroblastes WI-38 (G 47) par un antisérum anti-GPX traité par chromatographie d'exclusion (■). Des aliquots de 0.4 ml de fractions solubles sont additionnés de quantités croissantes du volume mort. Après une nuit à 4°C, les échantillons sont centrifugés et l'activité de la GPX de la fraction soluble est mesurée. Le contrôle représente 0.4 ml de fraction soluble additionné de quantités croissantes de volume mort d'un sérum normal (□). On constate une contamination des anticorps par de la GPX.

7. Modèle du vieillissement des fibroblastes humains WI-38 en culture.

Le modèle de vieillissement suivi est celui de Hayflick (1965). Il s'agit de fibroblastes provenant d'un poumon d'embryon humain, mis en culture (fibroblastes WI-38). Les cellules sont maintenues dans le milieu essentiel minimum de Eagle (13 acides aminés et 8 vitamines) et des sels de Earle. On y ajoute 50 mg/ml d'auréomycine, 2.2 gr/l de $NaHCO_3$ et on ajuste le milieu à pH 7,4. Ce milieu, stérilisé, contient également 10 % de sérum de veau foetal stérile apportant à la culture les facteurs de croissance nécessaires. Les cellules sont cultivées dans des boîtes en plastique de 75 cm^2 (Falcon plastics Ca, U.S.A.) et quand elles arrivent à confluence, elles sont repiquées dans de nouvelles boîtes de 75 cm^2 jusqu'à l'arrêt des divisions et la mort des cellules. Hayflick distingue trois phases dans l'évolution de la culture (fig. II-7). La phase I correspond à la mise en culture des cellules à partir du tissu d'origine, la phase II est celle de la croissance exponentielle pendant laquelle les cellules sont transplantées régulièrement lors de la confluence dans 2 ou 4 autres boîtes de culture, et la phase III caractérise le vieillissement; on y observe une diminution de la vitesse de croissance des cellules jusqu'à l'arrêt des divisions. Le prélèvement des cellules se fait en les raclant dans un tampon PBS (phosphate buffer saline : KH_2PO_4/K_2HPO_4 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M) en présence de 1 mM d'EDTA après avoir été rincées avec du PBS. L'homogénat est obtenu en passant ces cellules raclées dans un homogénéiseur de Dounce serré (30 coups)

8. Préparation d'anticorps, purification et immunotitration de la GPX.

8.1. préparation d'antisérum par immunisation d'un lapin (Vaitukaitis 1981)

La solution d'immunogène est préparée comme suit :

100 µg de protéine antigénique diluée dans 1 ml de PBS sont ajoutées à 1 ml d'adjuvant de Freund complet. Cette solution est agitée.

Un lapin est rasé sur le dos et la solution d'immunogène est injectée en intradermique sur 40 sites d'injection à raison de 50 µl par injection .

Après 6 semaines un rappel est effectué en une injection intramusculaire avec 100 µg de protéine antigénique diluée dans l'adjuvant de Freund incomplet.

Dix jours après le rappel, un prélèvement de sang s'effectue par l'oreille.

Tous les mois un rappel est exécuté et un prélèvement de sang dix jours plus tard.

Le sérum récolté est soumis à une chromatographie sur tamis moléculaire et les fractions correspondant au volume mort sont conservées (Ultrogel ACA 44, 22 mm X 500 mm, LKB). En effet, le sérum contient une quantité importante de GPX que nous voulions ainsi éliminer. La précipitation au sulfate d'ammonium n'est pas intéressante car elle co-purifie la GPX avec les anticorps (Awasthi *et al.* 1979). Un sérum sans anticorps anti-GPX est soumis au même traitement pour le contrôle.

La figure II-8 montre les résultats de l'imunotitration réalisée avec cette préparation sur un surnageant de cellules vieilles. L'activité demeurant dans le surnageant additionné du sérum contrôle est supérieure à l'activité de départ du surnageant cellulaire et il est donc difficile d'évaluer quantitativement l'inhibition même si celle-ci est bien visible Pour éviter ces problème, nous avons décidé de purifier les anticorps par chromatographie d'affinité.

8.2. Chromatographie d'affinité et purification des anticorps anti-GPX

8.2.1. Construction de la colonne :

Le couplage de la Glutathion Peroxydase sur un gel de sépharose 6B® (Pharmacia, Uppsala, Sweden) se fait par le bromure de cyanogène (BrCN).

Le gel de sépharose est lavé à l'eau froide.

15 ml de gel sont suspendus dans 75 ml de $NaHCO_3$ 50 mM pH 11,0.

Sous agitation, 0,75 gr de bromure de cyanogène sont ajoutés et le pH est maintenu à 11,0 par addition de NaOH 1 M.

Après 10 minutes d'agitation, le gel est filtré sur Büchner et lavé avec une grande quantité de $NaHCO_3$ 0,1 M pH 9,0.

3 ml de gel activé sont placés en contact de 1.5 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M, pH 9,0 contenant 1 mg de Glutathion Peroxydase purifiée.

La solution est agitée à froid pendant la nuit.

Le gel est placé dans une colonne (12 mm X 80 mm) et lavé avec du phosphate 0,01 M, pH 7,5 puis avec de la lysine 0,2 M, pH 9,0 et enfin équilibré dans du PBS.

8.2.2. Purification des anticorps :

Un grand volume de sérum est passé sur la colonne qui est ensuite lavée avec du PBS jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit très faible et constante.

A la vitesse maximum de la pompe (Gilson, Minipuls 2), de l'acide formique 0,5 % est passé sur la colonne qui provoque le décrochage des anticorps récupérés dans un faible volume de Tris-HCl 1 M, pH 8,0.

Lorsque le pic d'absorbance des anticorps à 280 nm est passé, la colonne est lavée avec du Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 puis rééquilibrée avec du PBS.

Les anticorps sont dialysés contre du PBS puis centrifugés 10 minutes à 12.000 RPM et congelés.

La solution d'anticorps purifiés par chromatographie d'affinité contient 2,58 mg/ml de protéines. Des volumes croissants de cette solution sont additionnés à du PBS pour donner des volumes de 0,1 ml. Ceux-ci sont ajoutés aux 0,4 ml de surnageants décrit précédemment pour l'immunotitration. Le contrôle est réalisé de la même manière mais à partir d'une solution d'anticorps de lapin anti-IgG de souris purifiés également par la même technique et dont la concentration en protéine a été amenée au même niveau que celle des anticorps anti-GPX.

9. Chromatographie sur tamis moléculaire.

La chromatographie sur tamis moléculaire de la GPX purifiée et des surnageants cellulaires est réalisée sur un appareillage Kontron HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) System 600, détection par spectrophotomètre Kontron Uvikon 720 LC, saisie et traitement des données par le système Kontron Anacomp 220.

Des volumes de 100 µl de GPX purifiée diluée et des surnageants cellulaires sont injectés sur une colonne LKB Ultropac column, TSK G 3.000 SW (7,5 mm X 300 mm) équilibrée dans un tampon KH_2P0_4, 0,1 M, pH 7,0. La révélation des pics de Glutathion Peroxydase s'effectue par la mesure de l'activité enzymatique mesurée dans des aliquots de 300 µl récupérés à la sortie de la colonne. La colonne est étalonnée à chaque expérience avec la thyroglobuline (PM : 300.000), la sérum albumine bovine (PM : 66.200), l'ovalbumine (PM : 45.000) et le cytochrome c (PM : 12.500).

Des volumes allant jusque 200 µl de GPX purifiée et des surnageants cellulaires ont également été injectés par le même système sur une colonne Superose 12 (10 mm X 300 mm) (Pharmacia, Uppsala, Suède) équilibrée dans un tampon KH_2PO_4 0,1 M pH 7.4 ou spécifié dans le texte. L'étalonnage de la colonne s'effectue avec la thyroglobuline, l'albumine bovine sérique, l'ovalbumine et le cytochrome c.

10. Electrophorèses.

10.1. En conditions non dénaturantes (gel de 180 X 200 X 3 mm).

Le gel de séparation est préparé à partir d'acrylamide 7% (BDH Chemicals LTD England) et de NN'-méthylène-bisacrylamide 0,25% (BDH Chemicals LTD England) dans un tampon Tris-HCl 0,25 M, pH 8,8. la polymérisation est initiée par l'addition de NNN'N'-tétraméthyl-éthylène diamine (TEMED) 0,04% (Merck Darmstadt, FRG) et de peroxydisulfate d'ammonium 0,07% (Merck Darmstadt, FRG).

Le gel est coulé entre deux plaques de verre et laissé à polymériser pendant 2 heures sous une couche d'eau.

Après ce temps un gel d'empilement est coulé sur le gel de séparation : acrylamide 5,7%, NN'-méthylène-bisacrylamide 0,13% dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8. La polymérisation est initiée de la même façon que pour le gel de séparation.

Le lendemain, l'échantillon est déposé dans les puits du gel d'empilement, dilué 2 fois dans une solution de sucrose à 50%.

La migration est réalisée à 40 mA pendant les temps indiqués, à l'aide d'un générateur Consort E 532. Le tampon de migration est constitué de Tris-HCl 0,05 M, glycine 0,5 M, pH 8,5.

La révélation de la Glutathion Peroxydase s'effectue par la mise en évidence des protéines, la réaction enzymatique de l'enzyme ou par immunoblotting.

Révélation des protéines :

Solution de coloration :
45,4% méthanol
45,15% H_20
9,2% acide acétique glacial

0,25% de bleu de Coomassie

Le gel est plongé dans la solution de coloration pendant 2 heures ensuite il est décoloré par la solution suivante :

Ethanol 30%

Acide acétique 10%

H_20 60%

Révélation par immunoblotting :

Le gel est décollé des plaques de verre et le gel d'empilement est écarté.

Il est déposé dans une solution de migration pour blotting:

Tris-HCL 25 mM

Glycine 192 mM pH 8,3

Méthanol 20%

Il s'équilibre avec cette solution pendant 45 minutes.

Sur le gel est déposée une feuille de nitrocellulose côté anode.

La migration s'effectue la nuit sous une tension de 20 volts et ensuite pendant 30 minutes sous une tension de 60 volts à l'aide d'un générateur LKB 2005 Transphor.

La feuille de nitrocellulose est alors lavée dans du PBS, NP40 3%, puis au PBS seul.

Elle est saturée par des protéines 1 heure à 37°C (afin d'éviter la fixation non spécifique des anticorps) par :

Tris-HCl 10 mM, pH 7,4

NaCl 0,9%

Ovalbumine 3%

Elle est lavée par trois bains de 10 minutes avec agitation de :

Tris-HCl 10 mM pH 7.4

tween 20, 1%

NaCl 0,9%

La feuille est recouverte de sérum ou d'une solution contenant les anticorps appropriés pendant 1 heure à température ambiante et lavée ensuite par 3 bains de 10 minutes sous agitation de la solution précédente.

Les anticorps secondaires, anti-anticorps de lapin, greffés à la peroxydase de raifort (HRP) sont déposés sur la feuille pendant 30 minutes à température ambiante

La feuille est enfin lavée 3 fois avec du PBS seul

La peroxidase est révélée à la diaminobenzidine (DAB) :

0,5 mg/ml DAB dans Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, additionnée de 1 µl/ml de H_2O_2.

10.2 En conditions dénaturantes (gel de 60 X 70 X 1 mm)

Le système d'électrophorèse utilisé est celui de Biorad (Richmond Californie USA). Le gel de séparation est préparé à partir d'acrylamide 12% (BDH Chemicals LTD, England) et de NN'-méthylène bisacrylamide 0,32% (BDH Chemicals LTD, England) dans un tampon Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, SDS 0,1% (Janssen Chimica, Beerse, Belgium). La polymérisation est initiée par addition de NNN'N'-tétraméthyl-éthylène-diamine (TEMED) 0,1% et de peroxydisulfate d'ammonium 0,05%. Le gel est coulé entre deux plaques de verre et laissé à polymériser pendant 45 minutes sous une couche d'alcool N-butylique (Carlo Erba, Milan, Italie).

Un gel d'empilement est ensuite coulé sur le gel de séparation : acrylamide 3%, NN'-méthylène-bisacrylamide 0,08% dans un tampon Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 0,1%. La polymérisation se déroule comme pour le gel de séparation pendant 30 minutes.

Les échantillons sont dilués 2 fois dans une solution de glycérol 17,4%, bleu de bromophénol 0,6 mg/ml, SDS 20 mg/ml, Tris-HCl 0,25 M pH 6,8. Un volume d'un dizième de celui de l'échantillon contenant du mercaptoéthanol à 12% est ajouté et l'ensemble est incubé à 100°C pendant 2 minutes avant d'être déposé dans les puits du gel d'empilement.

La migration s'effectue à 40 mA pendant 40 minutes environ grâce à un générateur Consort E532. Le tampon de migration est constitué de Tris-HCl 25 mM, Glycine 0,192 M, SDS 0,1%. Un étalon Bio-rad contenant le lysosyme (PM 14.000), le soya bean trypsin inhibitor (PM 21.500), l'anhydrase carbonique (PM 31.000), l'ovalbumine (PM 45.000), l'albumine bovine sérique (PM 66.200) et la phosphorylase B (PM 92.500) est utilisé.

La révélation s'effectue par mise en évidence des protéines au bleu de Coomassie ou par coloration à l'argent selon la méthode de Merril et Goldman (1984).

Révélation des protéines par le bleu de Coomassie :

Solution de coloration :

45,4% méthanol

45,15% H_20

9,2% acide acétique glacial

0,25% de bleu de Coomassie

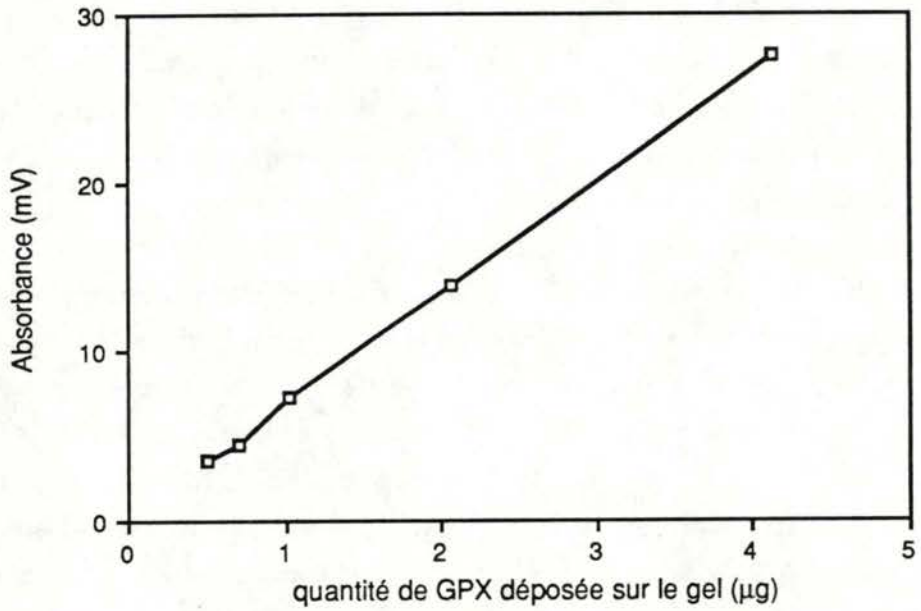


Figure II-9 : Droite d'étalonnage de l'absorbance des bandes d'électrophorèse en fonction de la quantité de GPX exprimée en quantité de protéine déposée dans les puits du gel. Chaque point représente une seule mesure.

Le gel est plongé dans la solution de coloration pendant 2 heures ensuite il est décoloré par la solution suivante :

Ethanol 30%

Acide acétique 10%

H_2O 60%

Les gels ainsi révélés peuvent être analysés par un densitomètre GS-300 (Hoefer Scientific Instruments; San Francisco, USA) en vue de mesurer l'intensité de coloration des bandes.

11. Susceptibilisation à la protéolyse.

La protéolyse est visualisée par la diminution de l'intensité de la bande de GPX en électrophorèse dénaturante. La figure II-9 montre qu'il y a une très bonne corrélation linéaire entre l'intensité de la bande de GPX mesurée sur le gel (valeur maximum du pic) et la quantité de GPX déposée sur ce gel.

Pour la protéolyse seule, les expériences sont réalisées comme suit : Un volume total de 15 µl est obtenu par addition d'une solution de GPX et de protéases. L'incubation pendant les temps indiqués est réalisée puis l' échantillon est dilué 2 fois dans la solution de bleu de bromophénol indiquée plus haut additionné de mercaptoéthanol et porté à 100°C pendant 2 minutes avant d'être entièrement déposé sur le gel. Pour le lysat de la fraction lysosomale et la pepsine qui doivent travailler respectivement à pH 5 et pH 2, le pH est ajusté en ajoutant à 10 µl de solution, 5 µl de tampon acétate 0,5 M pH 5 ou 5 µl de tampon phosphate (acide phosphorique)0,5 M pH 2.

1,7 µg de GPX est incubée avec 3 µg de trypsine, 2,5 µg de papaïne, 2,5 µg de chymotrypsine, 3 µg de pepsine, 3 µg de pronase ou 20 µg de protéines de lysat de globules rouges de bovin obtenu par choc hypotonique dans l'eau distillée et centrifugé à la centrifugeuse de table (Janetzki TH 12, 9800 g). 1 ou 2 µg de GPX sont incubés avec 13,5 µg de protéines de lysat de fraction lysosomale de foie de rat obtenue par centrifugation différentielle. La fraction lysosomale a été congelée et décongelée 3 fois puis une nouvelle centrifugation à 39.000 rpm pendant 30 minutes (centrifugeuse Beckmann L5-65, rotor type 40) a été réalisée et le surnageant utilisé pour les expériences de protéolyse.

La même méthode est appliquée pour mesurer la protéolyse exercée par les peroxydes et les radicaux libres avec les concentrations indiquées dans le texte.

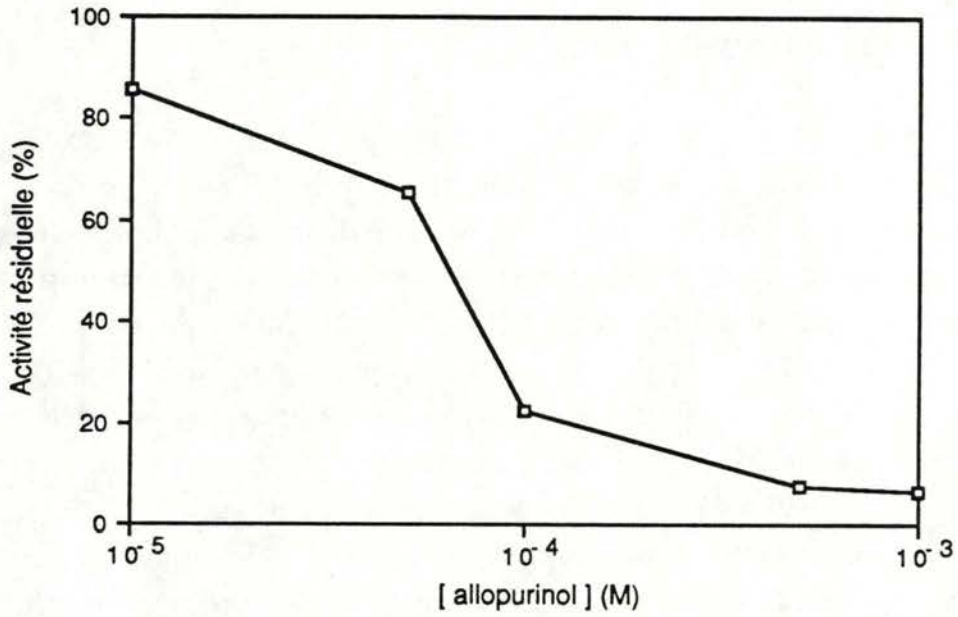


Figure II-10 : Inhibition de la xanthine oxydase par l'allopurinol. 0,28 U de xanthine oxydase sont placés dans 1 ml de PO_4 50 mM pH 7.4 EDTA 1 mM contenant 2 mM d'acétaldéhyde. La production d'$O_2^{\cdot -}$ est mesurée par l'oxydation de l'épinéphrine. L'effet inhibiteur de concentrations croissantes d'allopurinol est mesuré par la diminution de l'oxydation de l'épinéphrine par rapport à l'échantillon sans allopurinol. Chaque point représente la moyenne de deux dosage d'un même échantillon.

Pour la susceptibilisation à la protéolyse, l'enzyme est incubée avec les peroxydes ou les radicaux libres en concentrations indiquées dans le texte dans un volume de 5 µl et pendant 120 minutes à 37°C. Les protéases sont ensuite ajoutées et le pH ajusté dans un volume final de 15 µl. L'incubation est réalisée pour la protéolyse. Pour les radicaux hydroxyles, lors de l'addition des protéases, la desférioxamine 10^{-3} M et le mannitol 100 mM sont ajoutés à tous les tubes, ceci afin d'arrêter la production de radicaux qui existeraient encore au cours de cette période. Pour les anions superoxydes, l'allopurinol, inhibiteur de la xanthine oxydase est ajouté à une concentration finale de 10^{-3} M. La figure II-10 montre l'effet de cette molécule sur l'activité de la xanthine oxydase. L'échantillon est ensuite préparé pour l'électrophorèse comme décrit précédemment.

12. Dosage des Protéines.

Les dosages de protéines sont réalisés selon la méthode de Lowry *et al.* (1951).

RESULTATS

CHAPITRE 1 : COMPORTEMENT DU SYSTEME ANTIOXYDANT AU COURS D'UN STRESS OXYDATIF.

1.1 Inactivation des enzymes antioxydantes par les radicaux libres dérivés de l'oxygène et les peroxydes.

1.1.1 Introduction

Les cellules vivantes sont dans un état d'équilibre dynamique maintenu par des processus régulateurs essentiellement contrôlés par les enzymes. Cependant, lorsqu'elles sont soumises à des stress excessifs, les cellules dégénèrent et meurent. Dans le cas particulier de la production de radicaux libres, la littérature en révèle de nombreux exemples (Raes *et al.* 1987; Mc Cord, 1988; Orrenius, 1987; Zweier, 1988). Un des objectifs de ce travail était de caractériser la résistance du système enzymatique cellulaire antioxydant vis à vis d'un stress oxydant. En effet, il a été proposé (Remacle *et al.* soumis pour publication) que durant une production excessive de radicaux libres, le système de défense de la cellule pourrait être surpassé. Il existerait un seuil de production radicalaire au-dessus duquel un processus irréversible de dégradation aurait lieu. Ce seuil pourrait être modifié en agissant sur l'activité des enzymes antioxydantes.

Dans ce chapitre, nous détaillerons l'investigation systématique réalisée sur l'effet de trois espèces réactives dérivées de l'oxygène : l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et divers hydroperoxydes. Nous aurons ainsi des valeurs comparatives de leur potentiel d'inactivation des trois enzymes antioxydantes. De cette manière, une vue générale des relations entre ces trois enzymes et leurs métabolites pourra être développée. Cette construction conduira à l'idée qu'un seuil de production radicalaire peut être effectivement atteint, au-dessus duquel les enzymes antioxydantes deviennent moins actives et donc la production radicalaire peut augmenter irréversiblement.

1.1.2 Résultats expérimentaux (Pigeolet *et al.* 1990)

1.1.2.1 Production des radicaux hydroxyles et anions superoxydes.

Halliwell et Gutteridge ont décrit un dosage colorimétrique simple des radicaux hydroxyles. Ceux-ci réagissent avec le déoxyribose pour former

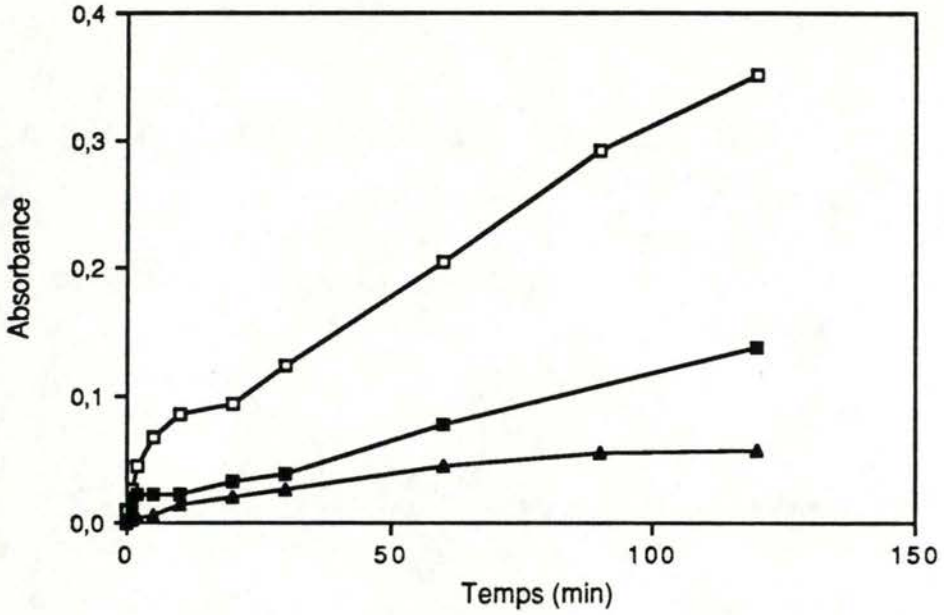


Figure III-1 : Production des radicaux hydroxyles. Le déoxyribose (1 mM) est incubé pendant des temps croissants avec 5 10^{-5} M de Fe^{++} et 10^{-2} M d'ascorbate. Les radicaux hydroxyles produits réagissent avec le déoxyribose qui dès lors peut réagir à son tour avec l'acide 2-thiobarbiturique formant un chromogène mesuré à 532 nm. Ascorbate + Fe^{++} (□), ascorbate + Fe^{++} + desferrioxamine 10^{-3} M (▲), ascorbate + Fe^{++} + mannitol 0.1 M (■). Chaque point représente la moyenne de deux dosages d'un même échantillon (n = 2)

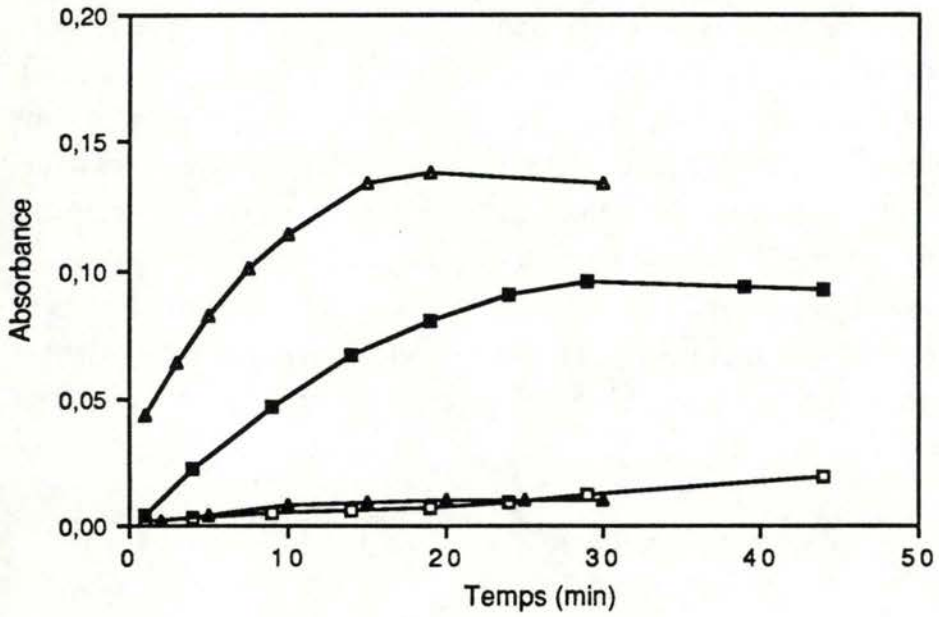


Figure III-2 : Production des anions superoxydes. La réaction xanthine oxydase/ acétaldéhyde produit des anions superoxydes qui oxydent l'épinéphrine, formant un adrénochrome absorbant à 480 nm. Xanthine oxydase + acétaldéhyde 2 mM (■), xanthine oxydase (0.07 U) + acétaldéhyde 5 mM (Δ), acétaldéhyde 5 mM sans xanthine oxydase (□), acétaldéhyde 5 mM + xanthine oxydase (0.07 U) + MnSOD (25 U) (▲). n = 2.

une substance réactive avec l'acide thiobarbiturique. Cette méthode a été utilisée pour contrôler la production des radicaux hydroxyles dans le système ascorbate/Fe^{++}. Une accumulation de chromogène formé par réaction entre l'acide thiobarbiturique et les produits de dégradation du déoxyribose dans ce système est observée au cours du temps (fig. III-1). La production est à peu près constante au moins pendant 90 minutes. La preuve de l'implication du radical hydroxyle est donnée par la diminution de cette accumulation par le desféral et le mannitol. Le desféral est un puissant chélateur du fer qui empêche la participation de cet ion métallique dans la réaction de Haber-Weiss. Le second est un capteur de référence des radicaux hydroxyles.

L'oxydation de l'épinéphrine au cours du temps par les anions superoxydes produit par l'oxydation de l'acétaldéhyde via la xanthine oxydase se voit à la figure III-2. L'acétaldéhyde a été utilisée comme substrat à cause de sa lente utilisation par la xanthine oxydase par rapport au substrat classique, la xanthine. Ceci permet une plus lente mais plus longue production de radical superoxide. L'addition de 25 U de Mn SOD empêche la formation d'adrénochrome alors que la SOD inactive n'a aucun effet. Ceci confirme l'implication des anions superoxydes dans la réaction.

1.1.2.2. Effet sur la glutathion peroxydase.

La GPX fut incubée pendant 30 minutes en présence de concentrations croissantes en H_2O_2. L'activité résiduelle de l'enzyme fut mesurée. L'activité résiduelle du contrôle (incubée sans H_2O_2 et équivalent à 56 ± 5,8 % de l'activité initiale) fut considérée comme 100 %. L'activité résiduelle des tests fut calculée par rapport au contrôle (fig. III-4). Par extrapolation de la courbe, la concentration en H_2O_2 conduisant à une inactivation de l'enzyme de 50 % fut estimée à 10^{-1} M environ dans ces conditions.

L'inactivation de l'enzyme avec le TBHP ou le CUOOH à 10^{-3} M fut beaucoup plus rapide qu'avec H_2O_2. Nous avons donc utilisé un temps plus court d'incubation avec ces deux molécules. Les résultats montrent un inactivation de 50 % de l'enzyme avec le TBHP à 5.10^{-4} M et avec le CUOOH à 3.10^{-4} M. les activités résiduelles des contrôles étaient de 67,3 ± 8,7 % de l'activité initiale pour l'expérience réalisée avec le TBHP et de 72,1 ± 1,1 % de l'activité initiale pour l'expérience réalisée avec le CUOOH.

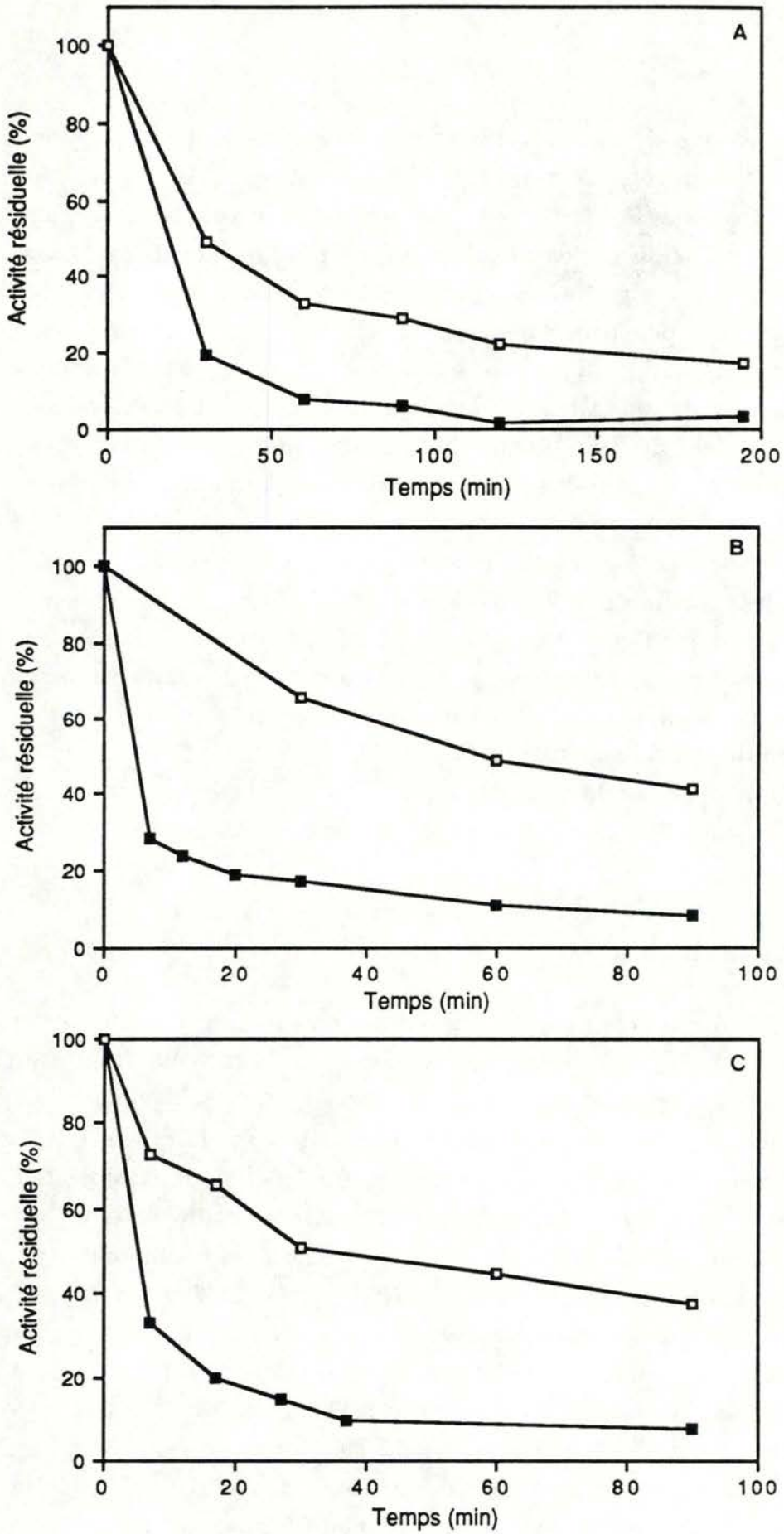


Figure III-3 : Evolution de l'activité de la GPX au cours du temps d'incubation à 37°c avec les hydroperoxydes à 10^{-3} M. Contrôles sans hydroperoxydes (□), GPX incubée en présence des hydroperoxydes (■). A : H_2O_2, B : TBHP, C : CUOOH. n = 3.

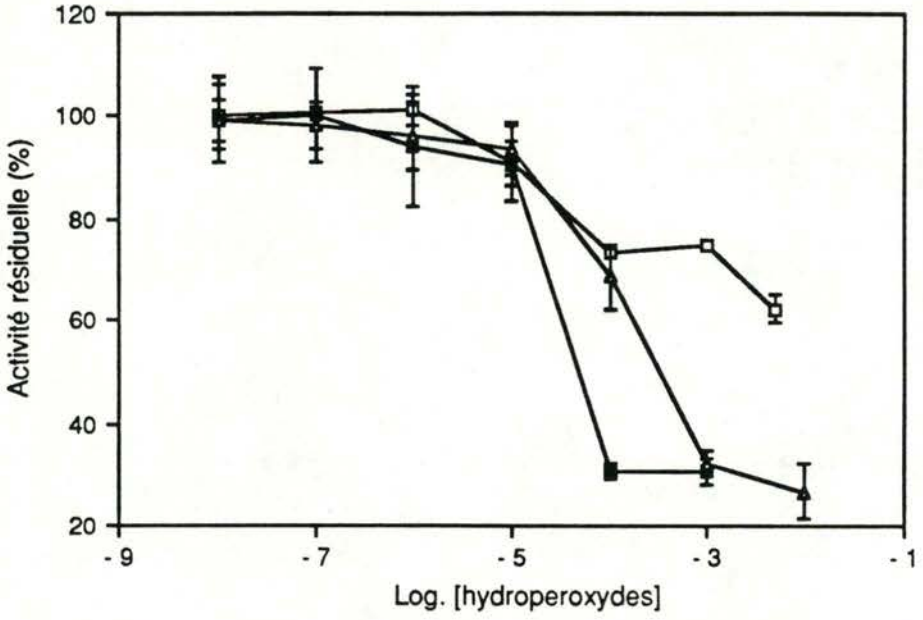


Figure III-4 : Effet des peroxydes sur l'activité de la GPX. La GPX fut incubée à 37°c avec des concentrations croissantes de H_2O_2 (□), de CuOOH (Δ), de TBHP (■). Après la période d'incubation respectivement de 30 min, 15 min et 11 min pour H_2O_2, CUOOH et TBHP, l'activité résiduelle de la GPX fut mesurée. Les résullats sont exprimés en % de l'activité GPX incubée pendant les mêmes temps sans peroxydes. Pour ce graphique et les suivants, chaque point représente la moyenne et ± 1 écart-type de trois expériences différentes. Pour chaque expérience réalisée les points pris en compte représentent eux-mêmes la moyenne de trois dosages d'un même échantillon.

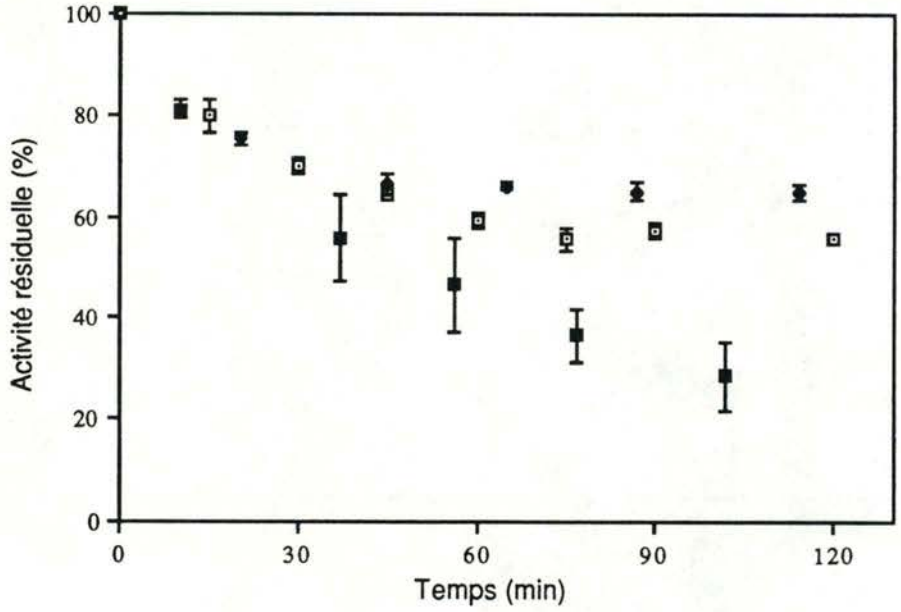


Figure III-5 : Evolution de l'activité résiduelle de la GPX en fonction du temps d'incubation à 37°c en présence de Fe^{++} 5 10^{-5} M seul (◆), en présence de Fe^{++} 5 10^{-5} M et ascorbate 10^{-2} M (■), en présence de Fe^{++} 5 10^{-5} M, ascorbate 10^{-2} M et mannitol 100 mM (□).

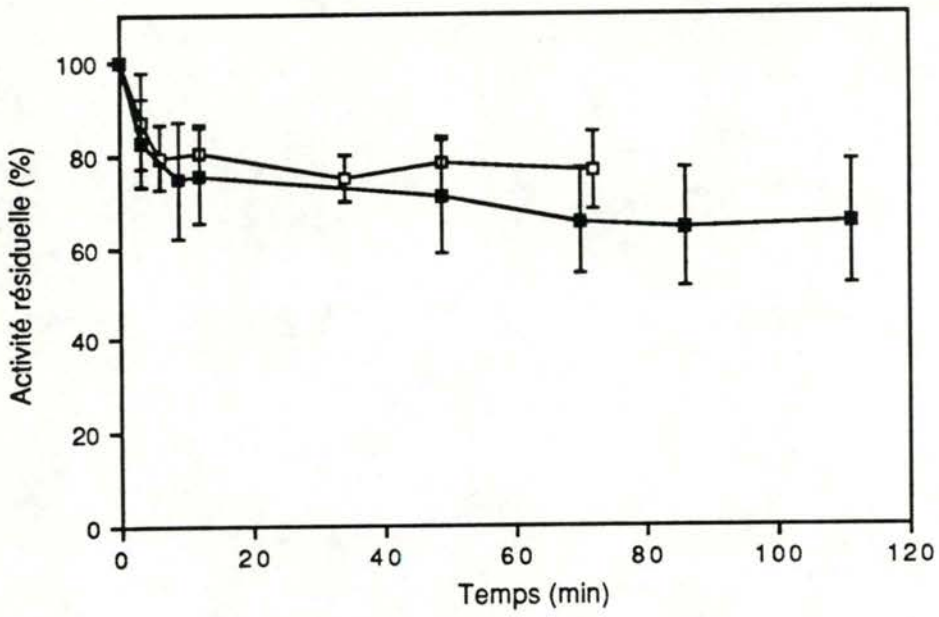


Figure III-6 : Effet des anions superoxydes sur l'activité GPX. La GPX fut incubée avec l'acétaldéhyde 5 mM et de la xanthine oxydase (0.07 U) à 37°c pendant des temps croissants. L'activité résiduelle dut alors mesurée. Xanthine oxydase seule (□), xanthine oxydase et acétaldéhyde 5 mM (■).

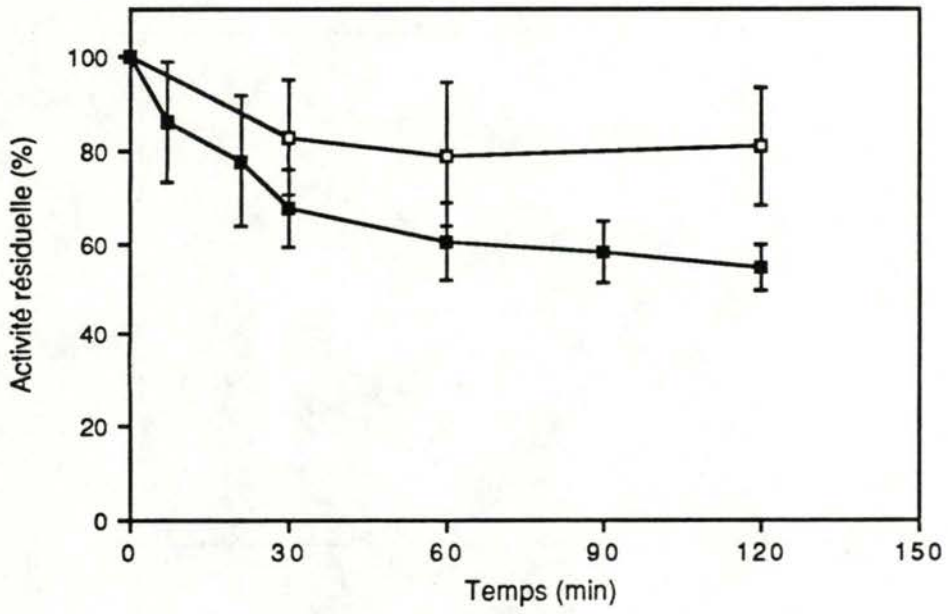


Figure III-7 : Evolution de l'activité résiduelle de la GPX en fonction du temps d'incubation à 37°c en présence de MDA 10^{-3} M (■). Le contrôle (□) représente l'activité de la GPX incubée en présence de 3 10^{-4} M de BDEMDA, produit de départ de notre synthèse de MDA.

La figure III-5 présente l'inactivation de la GPX en fonction du temps en présence du système ascorbate/Fe^{++} ou en présence de Fe^{++} seul (contrôle). L'inactivation par les radicaux hydroxyles est nette : cet effet est nettement diminué en présence de 0,1 M de mannitol. La légère différence subsistant avec la courbe contrôle s'explique par le fait que même en présence de 0,1 M de mannitol, certains radicaux hydroxyles échappent à la capture (fig. III-1).

La GPX fut également exposée à la réaction xanthine oxydase/acétaldéhyde de manière à investiguer l'effet des anions superoxydes. Nous avons mesuré l'inactivation de l'enzyme en fonction du temps. La figure III-6 montre que l'incubation avec la xanthine oxydase et 5.10^{-3} M d'acétaldéhyde n'inactive pas l'enzyme comparativement au contrôle. De la même manière en utilisant 2.10^{-3} M ou 10^{-2} M d'acétaldéhyde avec la xanthine oxydase, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet inactivateur de l'anion superoxyde (non montré).

La GPX fut enfin incubée en présence de malondialdéhyde (MDA) 10^{-3} M. la MDA est un des produits de dégradation des peroxydes lipidiques apparaissant dans les cellules lors de la peroxydation des membranes suite à une production radicalaire importante. L'inactivation de la GPX en fonction du temps fut également mesurée. La figure III-7 montre que cette molécule peut effectivement provoquer une inactivation significative de l'enzyme.

1.1.2.3. Effet sur la superoxyde dismutase.

La SOD (Cu/Zn SOD) fut incubée à 37°C pendant 20 minutes avec des quantités croissantes de H_2O_2. Les résultats sont présentés à la figure III-8. Dans ces conditions, on observe 50 % d'inactivation pour une concentration de 4.10^{-4} M en H_2O_2. Les peroxydes organiques comme le TBHP et le CUOOH n'affectent pas l'enzyme.: même à 10^{-3} M, dans les mêmes conditions nous n'observons pas d'inactivation. Des incubations plus longues allant jusque 2 heures n'ont pas donné non plus d'inactivation (non montré).

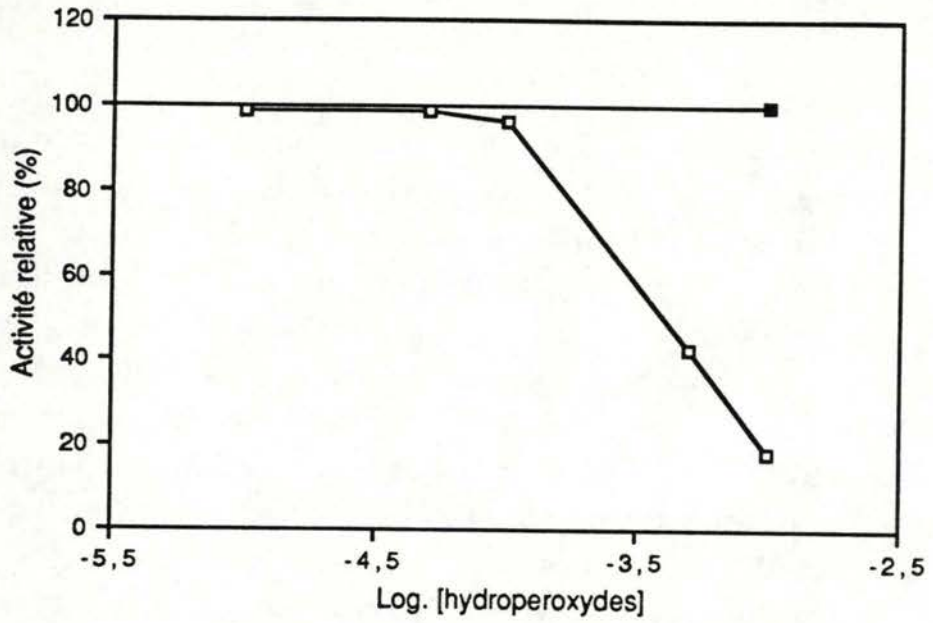


Figure III-8 : Activité résiduelle de la SOD incubée à 37°c pendant 20 min avec des concentrations croissantes de H_2O_2 (□). L'enzyme incubée sans H_2O_2 pendant le même temps est considérée comme ayant un activité résiduelle de 100 %. Les deux autres hydroperoxydes, TBHP et CuOOH (■) ont également été testés à 10^{-3} M. n = 3.

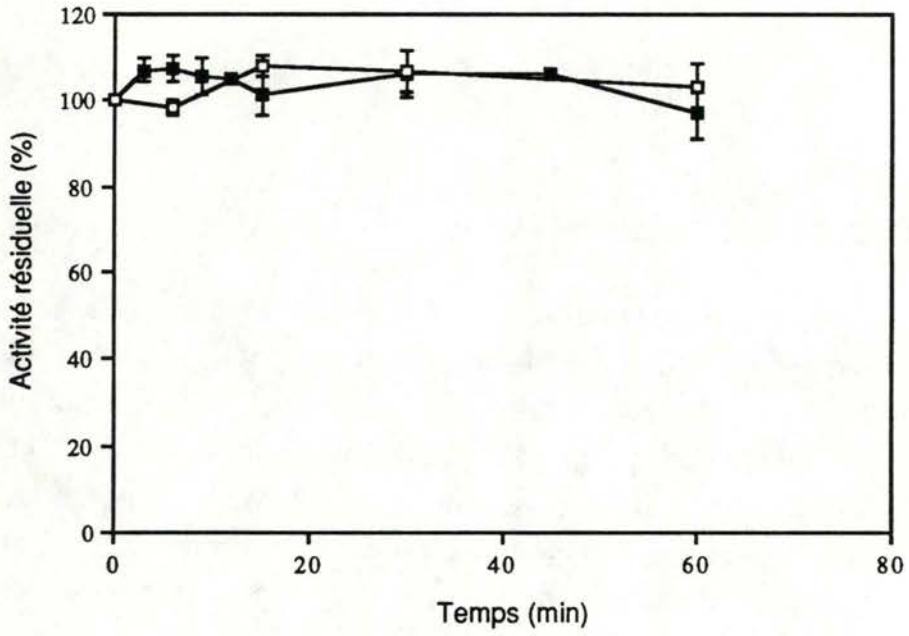


Figure III-9 : Evolution de l'activité de la SOD incubée à 37°c avec du Fe^{++} 5 10^{-5} M seul (□) ou avec du Fe^{++} 5 10^{-5} M et de l'ascorbate 10^{-2} M (■).

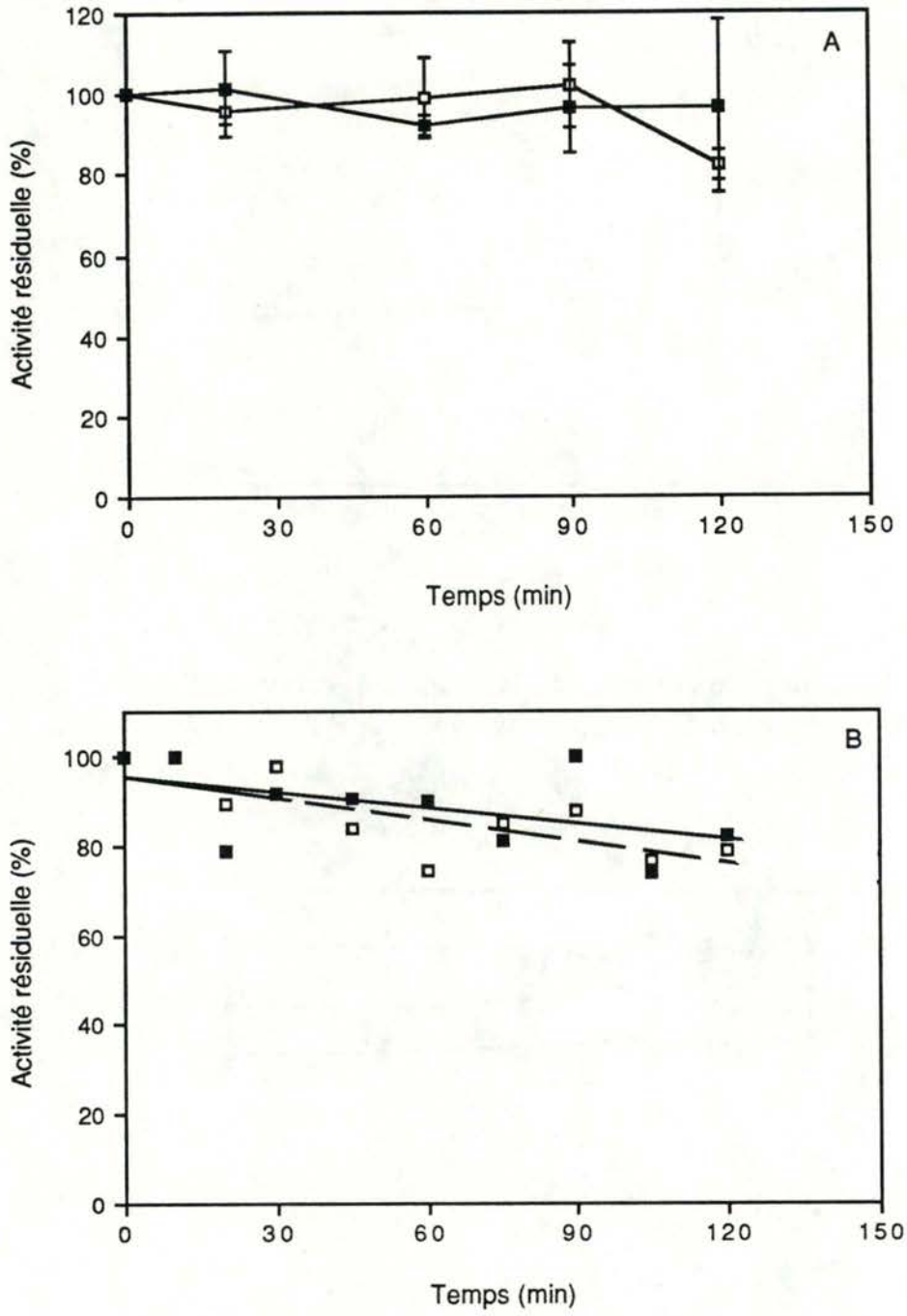


Figure III-10 : A : Evolution de l'activité de la catalase incubée à 37°c seule (□) ou avec TBHP 10^{-3} M (■)
B : Evolution de l'activité de la catalase incubée à 37°c seule (□) ou avec CUOOH 10^{-3} M (■). n = 2.

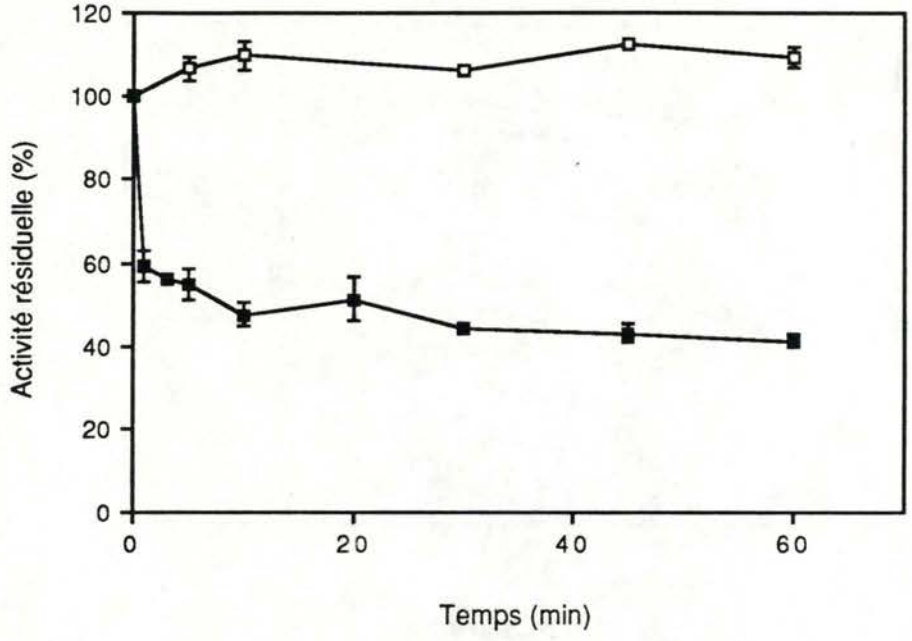


Figure III-11 : Evolution de l'activité de la catalase incubée à 37°c avec du Fe^{++} 5 10^{-5} M seul (□) ou avec du Fe^{++} 5 10^{-5} M et de l'ascorbate 10^{-2} M (■).

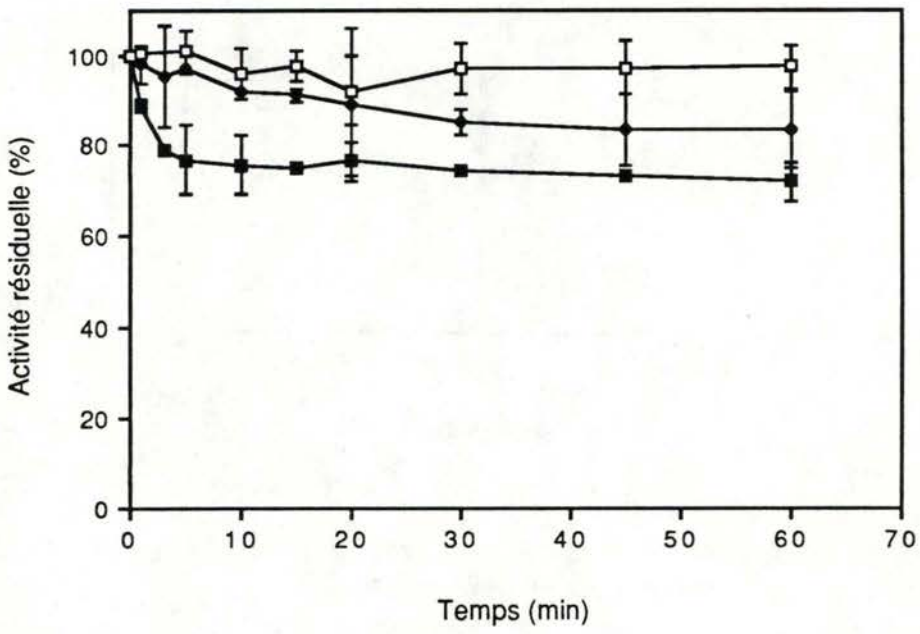


Figure III-12 : Effet des anions superoxydes sur l'activité de la catalase. La catalase fut incubée avec de l'acétaldéhyde 5 mM et la xanthine oxydase (0.07 U) à 23°c pendant des temps croissants. L'activité résiduelle fut alors mesurée. La catalase en présence de l'acétaldéhyde 5 mM seul (□), en présence d'acétaldéhyde 5 mM, xanthine oxydase (0.07 U) et MnSOD inactive (■), en présence d'acétaldéhyde 5 mM, xanthine oxydase et MnSOD active (25 U) (◆).

De la même manière, le système ascorbate/Fe^{++} produisant des radicaux hydroxyles n'a pas inactivé l'enzyme (fig. III-9). Les anions superoxydes sont le substrat de l'enzyme; ils n'ont donc pas été testés.

1.1.2.4 Effet sur la catalase.

La catalase fut exposée aux peroxydes organiques : les figures III-10A et III-10B montrent qu'ils n'ont pas d'effet inactivateur sur la catalase.

Cependant lorsque la catalase est incubée avec l'ascorbate/Fe++ (fig. III-11) une inactivation rapide a lieu, avec une perte de 50 % de l'activité initiale. Il faut noter cependant que le mannitol à 0,1 M n'a pas d'effet protecteur (non montré).

L'incubation de la catalase avec xanthine oxydase/acétaldéhyde 2.10^{-3} M est présentée à la figure III-12. Une inactivation rapide mais de faible intensité s'observe. Cette inactivation est induite par les anions superoxydes puisque l'addition de Mn SOD (25 U Sigma) empêche l'inactivation de l'enzyme. La courbe obtenue avec la Mn SOD inactivée par la chaleur à 95°C pendant 60 minutes est la même que celle obtenue sans la Mn SOD. Curieusement, il est à noter que la Cu/Zn SOD ne protége pas la catalase et donne une courbe identique au test.

Tous ces résultats sont résumés de manière schématique dans le tableau III-1. Ce résumé des effets comparatifs des divers dérivés oxygénés sur les enzymes antioxydantes permet d'obtenir une vue générale des interrelations existant entre ces enzymes et leurs subtrats. C'est ce que nous analyserons ci-dessous.

1.1.3 Discussion des résultats.

Nous avons donc investigué la susceptibilité des enzymes cellulaires antioxydantes principales, GPX, SOD, catalase vis à vis de leurs substrats oxydants.

L'inactivation de la GPX en présence d'hydroperoxydes révèle la sensibilité de cette enzyme vis à vis de ses propres substrats. En effet, nous pouvons constater que les peroxydes organiques sont des inactivateurs très puissants puisque 11 minutes à 5.10^{-5} M en TBHP et 15 minutes à 3.10^{-4} M

	TBHP	CUOOH	hydrogen peroxide	superoxide anion	hydroxyl radical
GPX	11 min. 5.10^{-5} M	15 min. 3.10^{-4} M	30 min. 10^{-1} M	—	+
SOD	—	—	20 min. 4.10^{-4} M	\	—
CAT	—	—	\	+	+

Table III-1 : Résumé des résultats de l'inactivation des enzymes antioxydantes par les trois peroxydes, les anions superoxydes et les radicaux hydroxyles. Les chiffres représentent les concentrations en oxydants et les temps d'incubation à 37°c qui résultent en 50 % d'inactivation des enzymes par rapport aux contrôles. + : inactivation sans quantification précise, - : pas d'inactivation, \ : non testé.

en CUOOH sont des conditions suffisantes pour inactiver 50 % de l'enzyme. Le TBHP est la molécule la plus efficace suivie par le CUOOH puis H_2O_2. Il n'y a pas de corrélation stricte entre la capacité d'inactivation et la taille de la molécule puisque H_2O_2 est plus petit que TBHP, lui-même plus petit que le CUOOH. De même, il n'y a pas de corrélation entre la capacité d'inactivation et l'hydrophobicité puisque dans ce cas aussi H_2O_2 est moins hydrophobe que TBHP lui-même moins hydrophobe que CUOOH. On pourrait alors proposer que la combinaison de ces deux caractéristiques (taille et hydrophobicité) pourrait être en relation avec la capacité d'inactivation. Plus hydrophobe et plus petite est la molécule, et plus son pouvoir d'inactivation serait important. Condell et Tappel (1983) ont également rapporté un effet inactivateur de H_2O_2 bien que légèrement plus faible, de même qu'un effet similaire de l'hydroperoxyde linoléique. Blum et Fridovich (1985) ont aussi rapporté que l'inactivation de la GPX par le TBHP est un phénomène irréversible. La possibilité que l'effet inactivateur des peroxydes se réalisent par le biais de la production d'espèces radicalaires ne peut être écartée de manière définitive. En effet, même à très faible concentration, des traces de fer sont présents dans les tampons phosphate utilisés pour les préparations. Cependant, deux raisons permettent de penser que cet effet doit être très faible : d'une part, à pH neutre, la réaction des peroxydes avec les métaux est très lente (Aust *et al.* 1985); d'autre part, la différence d'effet entre les peroxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène est telle qu'elle pourrait difficilement s'expliquer si on admettait que leur action s'effectue via un intermédiaire commun, le radical hydroxyle par exemple. L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'inactivation de la GPX par les peroxydes fait référence à la figure I-29 de l'introduction. Les peroxydes réagissent avec le sélénium du site actif de l'enzyme pour former des dérivés thiosélénénate et séléninique (Chaudière et Tappel 1984). Ces deux dernières formes peuvent être réduites par le glutathion et assurer le fonctionnement catalytique de l'enzyme. Cependant, en absence de glutathion, le dérivé séléninique pourrait encore être oxydé lentement par un peroxyde pour former un dérivé sélénonique (Blum et fridovich 1985). Ce groupement ne peut plus alors être réduit par le glutathion. Le site catalytique de l'enzyme serait donc irréversiblement bloqué.

On pourrait penser à première vue que l'incubation de la GPX avec les hydroperoxydes est éloignée des conditions rencontrées in vivo où l'enzyme est entourée de glutathion et par conséquent détruit ces peroxydes. Cependant, dans des conditions de stress oxydant, lorsque la concentration

de molécules antioxydantes telles que le glutathion est diminuée, l'effet inactivateur de ces peroxydes pourrait devenir crucial et expliquer les dommages irréversibles causés par les radicaux libres et leurs dérivés.

Il est bien connu que les radicaux hydroxyles sont très réactifs vis à vis de tous les types de molécules biologiques. Epp *et al.* (1983) ont montré que la GPX possède un tryptophane dans son site actif. Cet acide aminé est probablement impliqué dans la liaison des peroxydes hydrophobes et est un résidu particulièrement sensible aux radicaux hydroxyles. Cependant, vu la réactivité importante de ce radical avec d'autres acides aminés, d'autres mécanismes d'inactivation de la GPX sont possibles.

Dans nos conditions de production des anions superoxydes, nos résultats ne montrent pas d'inactivation de la GPX. Ces résultats s'accordent avec ceux de Searle *et al.* (1980) mais sont en contradiction avec ceux de Michelson et Maral (1983) et ceux de Blum et Fridovich (1985). Dans leur travail, ces derniers montrent que l'enzyme est susceptible aux anions superoxydes lorsqu'il se trouve dans un état réduit (sélénium sous forme de sélénol). Par contre il est insensible à ce même radical si le site actif est oxydé. Par conséquent, nous avons voulu déterminer l'état rédox de l'enzyme dans nos conditions de travail. Cette discrimination entre forme réduite et oxydée est habituellement réalisée par l'inhibition au cyanure ou à l'iodoacétate (Prohaska *et al.* 1977; Kraus *et al.* 1980). Classiquement, l'enzyme réduite est inhibée par l'iodoacétate alors que l'enzyme oxydée l'est par le cyanure. Dans nos conditions, nous n'obtenons malheureusement pas de différence entre les résultats de l'inhibition par le cyanure ou par l'iodoacétate. Une telle situation est décrite par Kraus *et al.* (1980) et concerne une forme oxydée spéciale de la GPX congelée depuis une période assez longue. C'était le cas dans notre expérience et nous pouvons supposer que nous avons à faire ici à cette forme oxydée de la GPX qui n'est pas susceptible aux anions superoxydes. L'inactivation de la GPX par la MDA est une observation intéressante qui n'a encore jamais été montrée. La MDA n'est pas le seul produit de la dégradation des peroxydes lipidiques mais elle en est un bon représentant puisque les produits de cette dégradation sont essentiellement des aldéhydes. Ceux-ci sont connus pour réagir avec les groupements aminés des protéines mais aussi des autres molécules biologiques. C'est probablement par cette réactivité qu'elle peut avoir une influence sur l'activité des enzymes.

Les résultats obtenus pour la SOD sont en accord avec d'autres travaux (Bray *et al.* 1974; Hodgson et fridovich, 1975; Blech et Borders, 1983; Fielden

et al., 1973; Beauchamp et Fridovich 1973) : H_2O_2 inactive la SOD. Blech et Borders ont investigué le mécanisme de l'inactivation de la Cu/Zn SOD par H_2O_2 et ont proposé que l'espèce réactive soit en fait le radical $OOH^{\cdot}$ provoquant l'oxydation d'une histidine dans le site actif. Jewett *et al.* (1989) sont d'accord avec cette hypothèse et indiquent qu'une faible quantité de H_2O_2 est capable d'influencer l'activité de la SOD et qu'il faut une plus forte concentration en H_2O_2 pour l'inactiver totalement et provoquer le départ du cuivre. Bertini *et al.* (1989) quant à eux, étudiant l'inactivation par H_2O_2 via la RMN, concluent que la modification par H_2O_2 n'est pas dirigée vers un acide aminé spécifique mais est le résultat de plus d'un type de modification qui change la conformation de la protéine et implique les résidus liés par coordination avec le cuivre.

La SOD est cependant insensible aux peroxydes organiques et au radical hydroxyle. On suspectait la SOD d'être susceptible à ce dernier radical car elle contient du cuivre qui peut remplacer le fer dans la réaction de Fenton (Halliwell et Gutteridge, 1985). Ces auteurs rapportent également l'implication du cuivre dans l'oxydation de l'ascorbate produisant du peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyles. Une solution contenant de l'ascorbate et du cuivre inactive de nombreuses protéines probablement par formation de radicaux hydroxyles. Il est possible que la SOD puisse être légèrement endommagée par le système ascorbate/Fe^{++} sans perte d'activité. En effet la SOD soumise aux radicaux hydroxyles est plus susceptible à la protéolyse que la SOD native (Davies, 1987 a).

Le site actif de la catalase n'est pas facilement accessible au solvant. Il est localisé à l'extrémité d'un étroit canal et bien que ce canal soit limité par des acides aminés hydrophobes, l'étroitesse ne permet probablement pas aux peroxydes organiques d'atteindre le site actif (Reid *et al.* 1981; Keilin et Hartree, 1955). Dès lors, il n'est pas surprenant de n'observer aucun effet de ces peroxydes sur l'enzyme.

L'inactivation de la catalase par l'ascorbate seul ou en présence d'un métal comme le cuivre a déjà été rapportée par quelques chercheurs (Orr, 1967 a; Orr, 1967 b; Orr, 1966; Keilin et Hartree, 1951; Chance, 1950). Davison et al.(1986) ont étudié le mécanisme de cette inhibition. Ils ont conclu que le semidéhydroascorbate est l'inhibiteur irréversible agissant probablement sur un résidu histidine. Ils n'excluent pas cependant la possibilité d'une production localisée du radical hydroxyle avec un rôle possible pour le semidéhydroascorbate comme donneur d'électron (Fenton). Mais ils ne considèrent pas la possibilité de la formation du radical hydroxyle résultant

de la réaction de Haber-Weiss avec le fer présent dans le site actif. Cette possibilité est cependant plausible suite aux observations de Kono et Fridovich (1982) qui montrent que le centre ferrique du site catalytique peut être réduit en un composé ferrooxy par le radical superoxyde. Dans cette situation, l'absence de protection par le mannitol s'expliquerait du fait que l'effet délétère du radical s'exercerait immédiatement au lieu de sa production dans le site actif, bien isolé du milieu environnant la protéine. Le même mécanisme expliquerait aussi l'inactivation obtenue avec l'anion superoxyde. Cette dernière, déjà mentionnée par d'autres chercheurs (Kono et Frodivich, 1982, Whiteside et Hassan, 1988) est plus faible que la précédente dû au fait probablement de la faible accessibilité du site actif et la moindre réactivité de l'anion superoxyde. Le fait que la Mn SOD seule puisse efficacement empêcher cette inactivation, par opposition à la Cu/Zn SOD fut une observation surprenante qui s'explique peut-être par le mécanisme particulier de l'inactivation du site actif. Kono et Fridovich (1982) ont rapporté la même observation.

Les résultats résumés à la table 1 montrent clairement que les trois plus importantes enzymes du système de défense antioxydante sont inactivées par au moins une des espèces réactives de l'oxygène. Ces trois enzymes se protègent l'une l'autre de l'inactivation soit directement, soit indirectement. En effet, la SOD en détruisant l'anion superoxyde diminue la possibilité de réduction du fer oxydé et donc réduit la possibilité de formation du radical hydroxyle, important déclencheur de la peroxydation lipidique. Les produits de cette peroxydation lipidique, la MDA par exemple est un inactivateur de la GPX. Ces conclusions soulignent également l'importance du fer dans les dommages oxydatifs. La disponibilité du fer est très faible en conditions normales mais elle peut être augmentée très fortement à partir de son lieu de stockage comme la ferritine ou la transferrine pendant un stress oxydatif (Davies, 1987 a, b, c, d; Biémond *et al.* 1986).

La SOD est elle-même protégée par la GPX et la catalase contre H_2O_2. La catalase sensible aux radicaux hydroxyles et superoxydes est également protégée par la SOD.

La pertinence de ces données pour des conditions physiologique est difficile à assurer à cause des différences dans la composition du milieu dans lequel les enzymes sont localisées, la source de la production des molécules oxydantes et la distance par rapport au site actif des enzymes. Cependant il est clair que ces inhibitions n'ont pas lieu dans des conditions normales

puisque la quantité de ces molécules réactives est très faible. On rapporte des concentrations en H_2O_2 et $O_2^{\cdot -}$ dans les cellules de l'ordre de 10^{-9} M et 10^{-11} à 10^{-12} M respectivement (Chance *et al.* 1979), ce qui est donc bien en-dessous des concentrations utilisées dans les expériences décrites ici. Dans nos conditions, la production de superoxyde atteindrait 2.10^{-5} M avec 2 mM en acétaldéhyde et après 30 minutes et environ $3.2\ 10^{-5}$ M avec 5 mM d'acétaldéhyde. Cependant dans des conditions pathologiques comme par exemple dans des foyers inflammatoires, en présence de molécules produisant des radicaux libres ou en cas de reperfusion après une ischémie, la quantité de ces molécules pourrait augmenter fortement. Ce que nous postulons ici est que dans des conditions particulières, la production excessive de radicaux pourrait atteindre un niveau critique auquel ils inactiveraient les enzymes antioxydantes conduisant à un processus en feed back positif irréversible et les taux de production de ces molécules oxydantes augmenterait alors exponentiellement.

1.1.4 Illustration du concept de seuil critique par construction mathématique .

Les résultats que nous avons obtenus concernant l'inactivation des enzymes par les radicaux libres et les peroxydes permet donc de postuler l'existence d'un seuil critique que l'on pourrait décrire qualitativement comme suit : Dans des conditions normales, la production de radicaux est faible; les enzymes antioxydantes métabolisent très bien ces radicaux et peroxydes : la production de molécules oxydantes ne peut s'emballer. Imaginons une situation dans laquelle la production de radicaux est soudainement beaucoup plus élevée. C'est le cas par exemple suivant le schéma de Mc Cord (1985) lors d'une reperfusion après ischémie ou en présence d'une molécule comme la nitrofurantoïne dont le métabolisme produit des radicaux superoxydes. Cette production massive induit une production secondaire importante de H_2O_2 via la SOD et par dismutation spontanée. La destruction de H_2O_2 par la GPX entraîne une consommation importante de GSH. Si cette consommation est supérieure à sa régénération, la concentration cellulaire en GSH diminue, ce qui diminue la vitesse de fonctionnement de la GPX et donc la vitesse de destruction du H_2O_2 : sa concentration augmente encore. Par voie de conséquence, la SOD sensible à H_2O_2 pourrait fonctionner moins bien et engendrer une

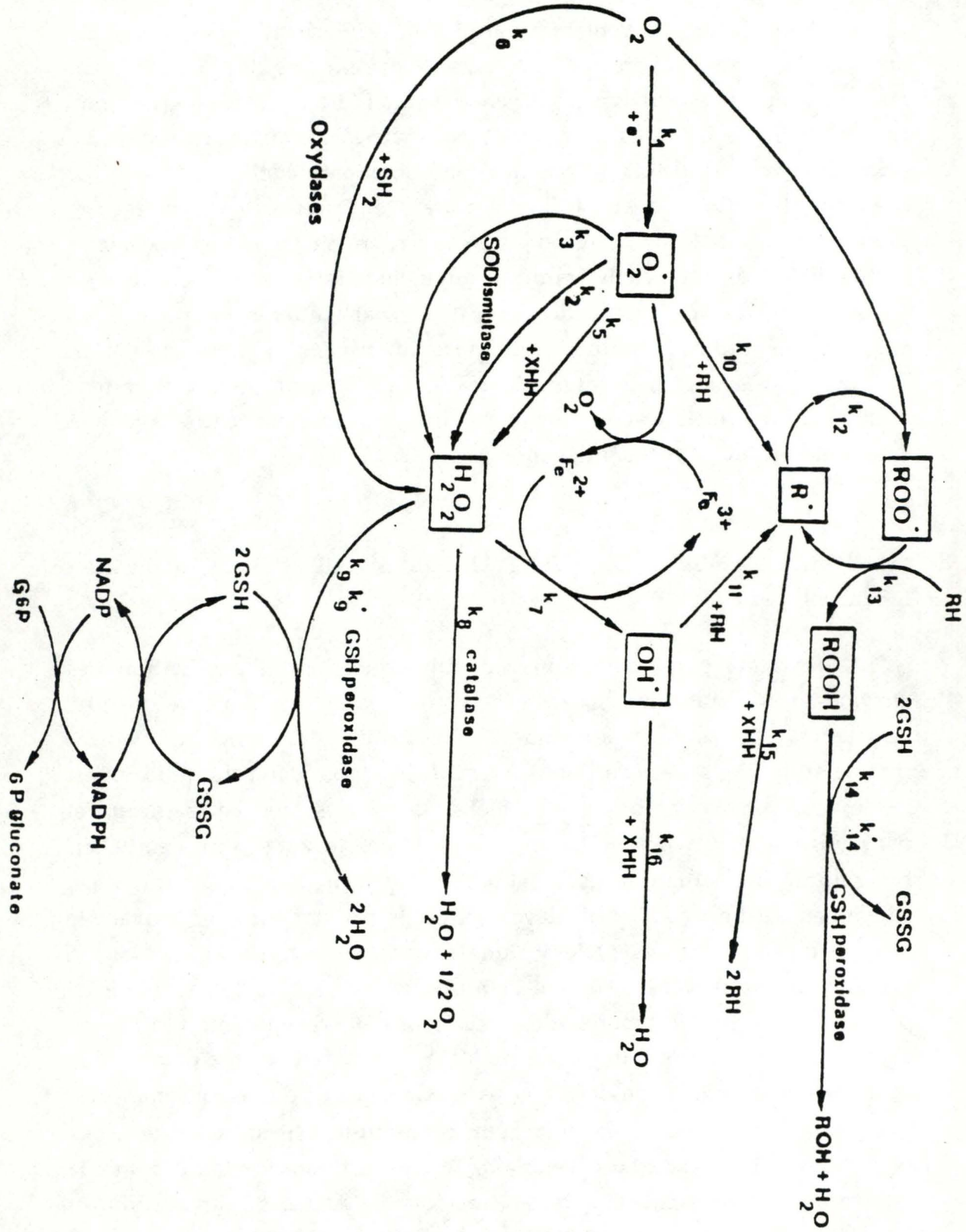


Figure III-13 : Représentation schématique des voies principales de production et de destruction des radicaux libres dans une cellule.

augmentation supplémentaire de la concentration en superoxyde. Une concentration élevée en superoxyde est susceptible de mobiliser le fer de la ferritine (Biémond *et al.* 1986) et par conséquent de réunir tous les éléments pour produire des radicaux hydroxyles (Haber-Weiss) qui sont aussi susceptibles d'inactiver la catalase et la GPX. Ceci engendrerait une nouvelle fois une augmentation de la concentration en H_2O_2. Cette augmentation des trois dérivés de l'oxygène engendrerait parallèlement une peroxydation lipidique et la production excessive d'hydroperoxydes capables d'inactiver la GPX.

On peut donc trouver une situation en-deçà de laquelle les enzymes dominent la formation des espèces oxydantes et au-delà de laquelle le phénomène qui vient d'être décrit a lieu : cette situation est le seuil critique de production des espèces oxydantes.

Nous avons voulu illustrer cette notion de seuil critique en construisant un système d'équations mathématiques rendant compte au mieux de la production et de l'élimination intracellulaire des dérivés de l'oxygène selon les réactions biochimiques décrites à la figure III-13. Celle-ci schématise les chemins de production et destruction des radicaux libres et des peroxydes dans une cellule. A chaque réaction est associée une constante de vitesse. Dans un tel schéma, la concentration de chaque intermédiaire comme par exemple $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, $OH^{\cdot}$, ... est la résultante de sa vitesse de production moins sa vitesse d'élimination. On peut donc écrire l'équation représentant la variation de sa concentration en fonction du temps comme la somme des vitesses de sa formation moins la somme des vitesses de son élimination.

Nous noterons [A] la concentration en une substance A dans le modèle suivant. Introduisons alors les notations suivantes.

1) Substances toxiques pour la cellule ("variables").

(a) radicaux libres:

$[O_2^{\cdot(-)}]=X$ (ions superoxydes)

$[OH^{\cdot}]=Z$ (radicaux hydroxyles)

$[R^{\cdot}]=W$ (chaînes carbonées radicalaires)

$[ROO^{\cdot}]=U$ (radicaux peroxyles)

(b) peroxydes :

$[H_2O_2]=Y$ (peroxyde d'hydrogène)

$[ROOH]=R$ (peroxydes lipidiques)

$$[\dot{X}] = K_1 \zeta \varepsilon - K_2 X^2 - [K_3 S (1-\alpha Y) + K_4 F + K_5 V + K_{10} \pi] X \quad (1)$$

$$[\dot{Y}] = [K_5 V + K_3 S (1 - \alpha Y)]X + K_6 \sigma D - (K_7 f + K_8 C) Y - (K_9 K_{9'} G) (K_9 Y + K_{9'} G)^{-1} (1 - \beta R) P Y \quad (2)$$

$$[\dot{Z}] = K_7 f Y - (K_{11} \pi + K_{16} V) Z \quad (3)$$

$$[\dot{W}] = K_{10} \pi X + K_{11} \pi Z + K_{13} \pi U - (K_{12} \zeta + K_{15} V) W \quad (4)$$

$$[\dot{R}] = K_{13} \pi U - (K_{14} K_{14'} G) (K_{14} R + K_{14'} G)^{-1}. (1 - \beta R).P R \quad (5)$$

$$[\dot{U}] = K_{12} \zeta W - K_{13} \pi U \quad (6)$$

Figure III-14 : Sur base de la figure III-13, les équations cinétiques de production et destruction des radicaux libres et des peroxydes peuvent être élaborées.

2) Enzymes ("paramètres").

[superoxyde dismutase]=S

[oxydases]=D

[catalase]=C

[glutathion réduit]=G

[glutathion peroxydase]=P

3) Divers.

$[Fe^{3+}]=F$ (paramètre)

$[Fe^{2+}]=f$ (paramètre)

$[O_2]=\zeta$ (paramètre) (oxygène moléculaire)

[XHH]=V (constante) (équivalents réducteurs, ex: vitamine C)

$[RH]=\pi$ (constante) (chaînes carbonées)

$[e^-]=\epsilon$ (constante) (électrons)

$[SH]=\sigma$ (constante) (groupements thiols)

La figure III-13 nous permet d'écrire les équations décrivant la cinétique des diverses réactions qui y sont représentées. Notons [•A] la vitesse à laquelle évolue la concentration [A] (d[A]/dt). Nous obtenons alors les équations de la figure III-14.

Les constantes α et β décrivent respectivement l'inhibition de la superoxyde dismutase (SOD) par l'H_2O_2 et l'inhibition de la glutathion peroxydase (GPX) par les peroxydes lipidiques. Ces constantes empiriques sont telles que:

$$0 < \alpha \leq (\text{Max } [H_2O_2])^{-1} \text{ et } 0 < \beta \leq (\text{Max } [ROOH])^{-1}$$

Les termes fractionnaires qui interviennent dans les équations (2) et (5) décrivent la cinétique propre de la GPX.

Traitement des équations stationnaires.- Recherche d'instabilité dans le système.

Certains détails du traitement mathématique de ce système d'équations est donné en annexe 1. Nous allons cependant en donner ici les principaux résultats.

1) Superoxyde dismutase (SOD).

a) Absence du terme d'inhibition de la SOD ou de la GPX ($\alpha = \beta = 0$).

Si nous ne tenons pas compte des inhibitions enzymatiques, le système de production et d'élimination des radicaux libres reste stable, au sein de la cellule, par rapport à un changement arbitraire des paramètres.

Ce fait n'est pas confirmé par les expériences. En effet, Remacle *et al.* (1984) et Michiels et Remacle (1988) ont montré que le système cellulaire devenait très instable si l'on réduit de 30 % la concentration cellulaire en glutathion ou de 21% l'activité en glutathion peroxydase.

b) Terme d'inhibition de la SOD incorporé dans le modèle ($\alpha \neq 0, \beta = 0$).

Le système (1),..., (6) n'admet alors qu'un et un seul état stationnaire. L'utilisation de critères de stabilité (critères de Routh-Hurwitz (Meirovitch, 1970)) nous montre que ce système est toujours stable. Dès lors, l'introduction d'un terme inhibiteur de la SOD par le peroxyde d'hydrogène n'induit aucune instabilité dans le système. Ceci n'est pas étonnant: en effet, les termes qui s'ajoutent au système (1),..., (6) lorsque $\alpha = 0$ ne sont "pas assez" non linéaires que pour modifier la stabilité du système. Le seul effet d'une inhibition de la SOD n'est alors que de limiter la production de peroxyde d'hydrogène.

c) Terme d'inhibition de la GPX incorporé dans le modèle ($\alpha = 0, \beta \neq 0$).

L'introduction d'un terme inhibiteur de la GPX change totalement la situation. En effet, les solutions des équations stationnaires conduisent pour $\alpha = 0$ et $\beta \neq 0$ à l'existence d'un point critique dont les coordonées sont $P_c = [K_{13}\, \pi\, Uo\, (1 + n\, ro)] \,.\, [K_{14}\, ro\, (1 - \beta\, ro)]^{-1}$ (sur l'axe de la concentration en GPX) et $ro = [(\beta^2 + \beta)^{1/2} - \beta] \,.\, [\beta\, \pi]^{-1}$ (sur l'axe da la concentration en peroxyde lipidique) où $n = K_{14}/ K_{14'}\, G$

Le comportement du système va donc dépendre en particulier de la concentration en GPX par rapport à ce point critique. Après traitement des équations et si nous utilisons les critères de Routh-Hurwitz, nous voyons que l'état stationnaire (Xo, ..., Uo) est stable si et seulement si $0 \leq Ro \leq ro$ (Ro=[ROOH]). Nous obtenons donc les trois situations suivantes.

Si $[GPX] < P_c$, il n'y a aucun état stationnaire possible.

Si $[GPX] = P_c$, il y a un et un seul état stationnaire.

Si $[GPX] > P_c$, il y a deux états stationnaires dont un est stable et l'autre instable.

Il est aussi à noter que l'introduction des deux termes d'inhibition $\alpha \neq 0$, $\beta \neq 0$ à la fois entraîne un comportement similaire du système dynamique (topologiquement) équivalent à celui que nous venons de décrire ci-dessus.

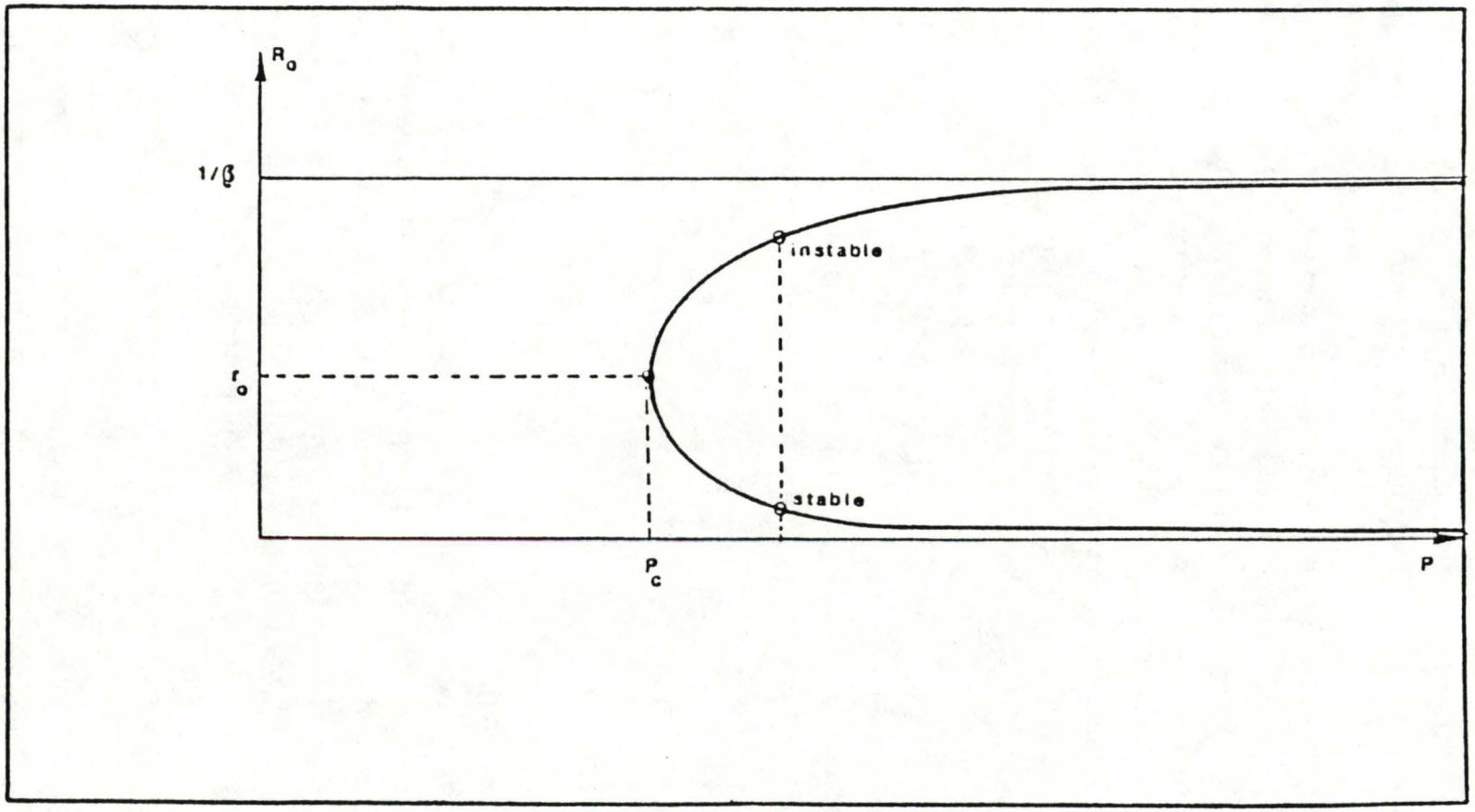


Figure III-15 : Ce graphique représente pour différentes concentrations de P (GPX), la valeur de R0 (concentration en ROOH) pour les deux états stationnaires.

Graphiquement, ces résultats mathématiques peuvent être visualisés de deux manières. La première se présente sous la forme de la bifurcation présentée à la figure III-15. Lorsque P>Pc, le système dynamique présente un "bassin d'attraction", déterminé par l'état stationnaire stable (la branche inférieure de la bifurcation représente la concentration minimale en peroxyde lipidique qui existe dans le système), et par l'état stationnaire instable (la branche supérieure de la bifurcation représente la concentration maximale en peroxyde lipidique que la cellule peut supporter). La distance entre les deux états tend vers 0 lorsque P tend vers P_c. Biologiquement, cela signifie que si la concentration en GPX (P) diminue trop, tout en restant supérieure à la valeur critique pour permettre l'existence du système, une petite fluctuation de concentration en peroxyde lipidique autour de l'état stable ne sera plus amortie. Au contraire, elle pourra être amplifiée entraînant ainsi la cellule vers une mort probable. De même, si la concentration en GPX devient trop faible (<Pc) alors le système devient instable. C'est ce qui est observé lorsque la GPX est inhibée par des anticorps ou des inhibiteurs chimiques spécifiques (Michiels et Remacle, 1988; Michiels *et al.*, 1988)

La deuxième manière de présenter graphiquement ces résultats est donnée sur la figure III-16 qui présente le "portrait de phase" (ROOH, ROO·). Ce portrait de phase donne l'évolution de la concentration en radicaux peroxyles ROO· en fonction de la concentration en peroxydes lipidiques ROOH. On y remarquera plusieurs points importants. Tout d'abord, ce portrait de phase prend en considération l'existence d'une faible concentration en ROOH et ROO· même lorsque le système ne subit pas de fluctuations en radicaux libres (ce qui correspond à la branche inférieure de la bifurcation). Ensuite, si le système subit des fluctuations radicalaires, il va s'éloigner de son état stationnaire. Cet éloignement ne sera temporaire pour autant que cette fluctuation reste en-deçà d'une concentration critique (ce qui correspond à la branche supérieure de la bifurcation). Au delà de cette concentration critique, le système sera incapable de revenir à l'état stationnaire et va donc en dévier de plus en plus, entraînant la cellule vers une mort très probable.

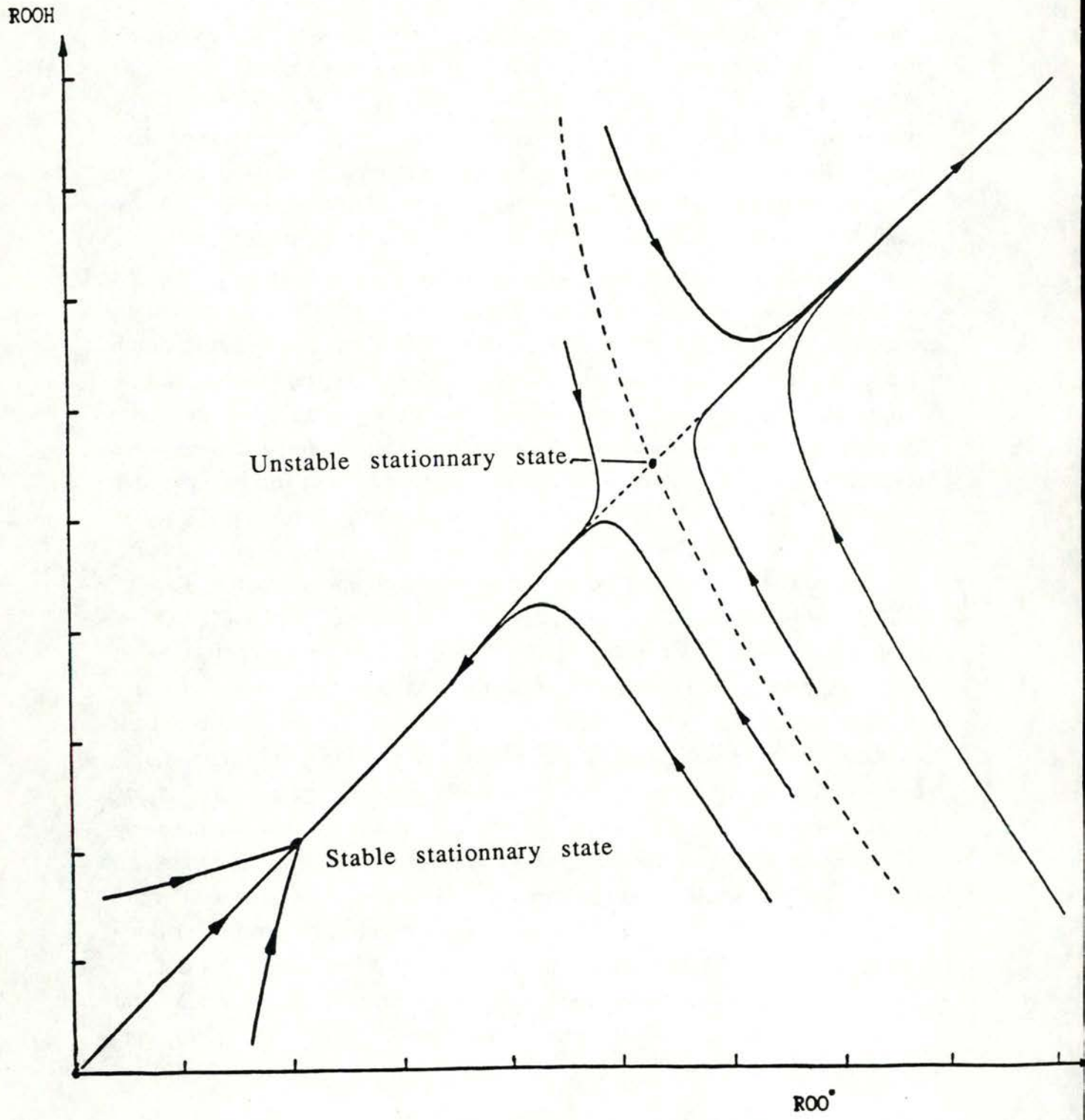


Figure III-16 : Diagramme représentant l'évolution des coordonnées (R.V) (concentration en ROOH, concentration en ROO·) pour une valeur de P (GPX) supérieure à Pc et admettant donc deux états stationnaires.

La courbe pointillée décroissante illustre le seuil critique : toutes les valeurs de coordonnées inférieures à ce seuil seront ramenées à l'état stationnaire stable, toutes les valeurs supérieures à ce seuil seront amenées vers + ∞.

1.1.5 Discussion.

L'interprétation biologique d'un tel graphique (III-16) peut se faire de la manière suivante : la ligne pointillée de la figure III-16 représente un seuil critique de valeurs ROOH et ROO$^{\cdot}$. En dessous de cette limite, les concentrations sont ramenées à un niveau basal. La perturbation qui a engendré l'augmentation de ces valeurs n'a pas de conséquences fatales sur le système biologique impliqué. Au-dessus de cette limite, la régulation de ces concentrations ne se fait plus et celles-ci augmentent jusqu'à détruire le système biologique dans lequel elles se trouvent.

Remarquons que l'état stationnaire instable n'a pas de signification biologique. En effet, les systèmes biologiques ne sont jamais statiques et les valeurs de leurs paramètres se modifient sans cesse. Les systèmes régulateurs tendent à ramener ces valeurs à une valeur basale. Par conséquent comme on peut le voir sur la figure III-16, la moindre variation de la valeur d'un des deux paramètres à l'état stationnaire instable provoque une évolution du système soit vers l'état stationnaire stable soit vers la déstabilisation définitive.

Enfin, nous pouvons constater par la figure III-16 que lorsque la concentration en GPX diminue (tout en restant supérieure à la concentration critique), la différence entre les valeurs de ROOH à l'état stationnaire stable et instable diminue. Cela signifie qu'une fluctuation de moindre importance en ROOH entraînera le système au-dessus du seuil critique conduisant irréversiblement à la mort de la cellule. Ceci est vérifié expérimentalement. Raes *et al.* (1987) et Michiels *et al.* (1988) ont effectivement montré qu'en inhibant en partie la GPX par des inhibiteurs chimiques ou des anticorps, les cellules résistaient moins bien à un stress oxydant.

1.2 Protéolyse de la GPXaprès son exposition aux radicaux libres et aux peroxydes.

1.2.1 Introduction.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la GPX est sensible aux peroxydes et aux radicaux hydroxyles. Il est donc possible que la GPX soit partiellement inactivée lors de stress oxydatifs aigus et qu'elle perde sa fonctionnalité. Dans la littérature (cfr introduction), on sait que de nombreuses protéines réagissent avec les radicaux libres. Cette réactivité provoque perte de fonctionnalité, susceptibilisation à la protéolyse et parfois dégradation directe par cassure des liens peptidiques. Certains auteurs voient ces phénomènes comme un rôle physiologique des radicaux libres dans des organismes aérobies. Ils contribueraient ainsi au turn over normal des protéines cellulaires.

Ce phénomène n'étant décrit que pour quelques protéines, nous nous sommes penchés sur le comportement du système antioxydant et plus particulièrement de la GPX dans des conditions de production des radicaux libres. Cette enzyme antioxydante est-elle aussi sensible à cette action des radicaux libres ? Etant donné son rôle cellulaire, ne possède-t-elle pas une protection particulière ? Puisque elle est très vite inactivée par les peroxydes , nous avons également testé à côté des radicaux libres, l'effet d'un peroxyde organique (TBHP) et du peroxyde d'hydrogène.

Nous avons d'abord cherché quelles protéases dégradaient la GPX; nous avons ensuite observé l'effet des radicaux libres et des peroxydes (H_2O_2 et TBHP) seuls sur la dégradation de la GPX. Nous avons enfin essayé de voir si l'exposition de la GPX aux radicaux libres et aux peroxydes utilisés ne susceptibilisait pas l'enzyme à la protéolyse.

La technique que nous avons mise en oeuvre pour observer de tels effets est la suivante : la GPX est incubée en solution soit à pH 7,4 avec les systèmes produisant les radicaux libres ou avec les peroxydes, soit avec les protéases au pH optimum de leur fonctionnement, soit avec les uns puis les autres. La solution est alors traitée pour l'électrophorèse en conditions dénaturantes. Après électrophorèse, nous mettons en évidence les monomères de la GPX par coloration des protéines. Nous avons montré (voir matériels et méthodes) que l'intensité de la coloration de la bande de GPX était linéairement correlée à la quantité de GPX présente. Par conséquent lorsque l'enzyme est dégradée, une certaine quantité de protéine

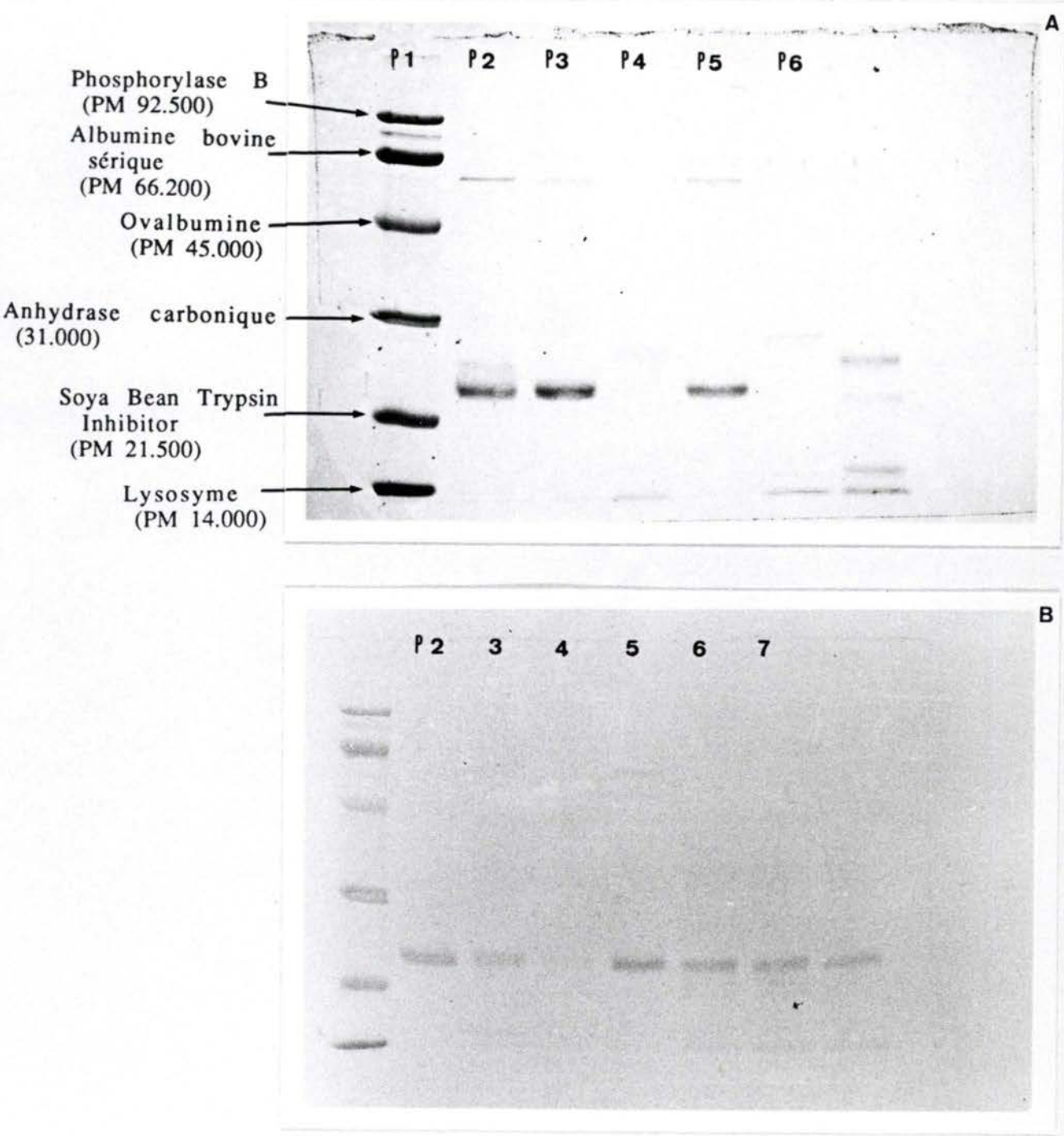


Figure III-17 : Electrophorèse en conditions dénaturantes de la GPX purifiée incubée au préalable avec différentes protéases.

A : Piste 1 (P1) : étalon Biorad, P2 : GPX seule (1,7 µg), P3 : GPX (1,7 µg) + trypsine (3 µg), P4 : trypsine seule, P5 : GPX + chymotrypsine (2,5 µg), P6 : chymotrypsine seule.

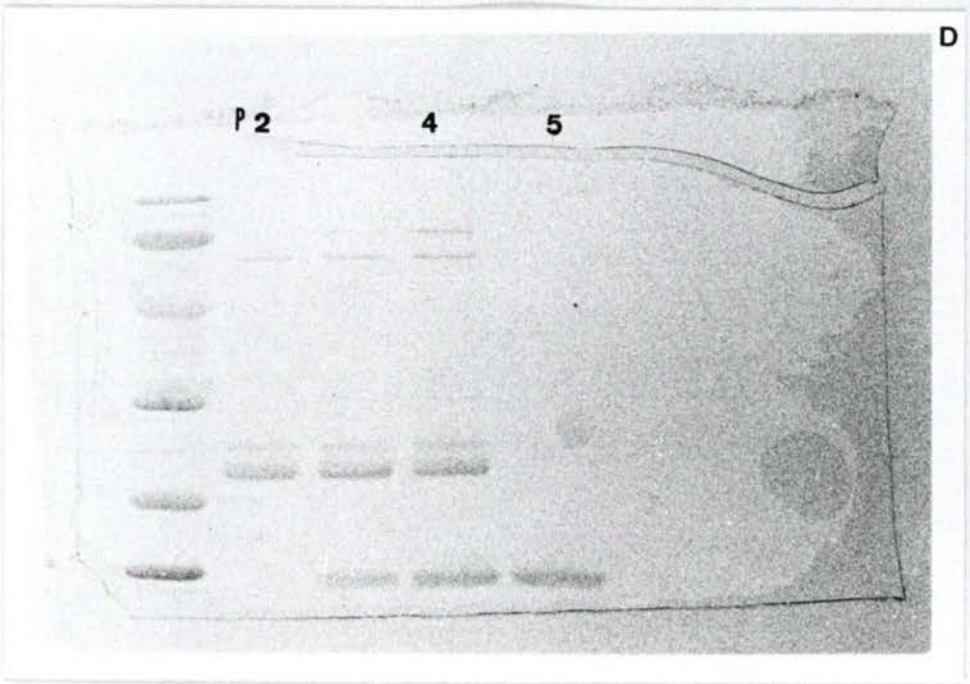
B : P2 : GPX (1,7 µg) + pepsine (3µg) 12 min à 37°c, P3 : GPX + pepsine 20 min à 37°c, P4 : GPX + pepsine 45 min à 37°c, P5 : GPX seule, P6 : GPX (1,7 µg) + pronase (3 µg) 12 min à 37°c, P7 : GPX + pronase 20 min à 37°c, P8 : GPX + pronase 45 min à 37°c.

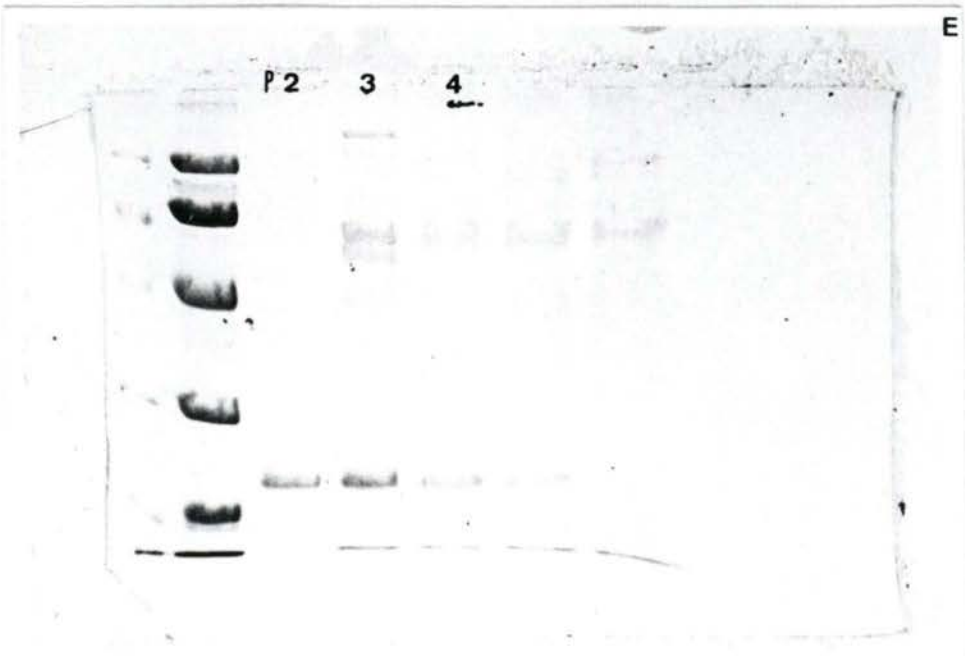
C : P2 GPX (1,7 µg) + papaîne (2,5 µg) 4 min à 37°c, P3 : 10 min à 37°c, P6 : 60 min à 37°c, P7 : papaîne seule, P8 : GPX seule.

D : P2 : GPX (1,7 µg) seule, P4 : GPX + lysat de globules rouges (20 µg) 90 min à 37°c, P5 : lysat de globules rouges.

E : P2 : GPX (1 µg) seule, P3 : GPX + lysat de lysosomes (13,5 µg) sans incubation, P4 : GPX + lysat de lysosomes 120 min à 37°c.

C
P 2
3
6
7
8


D
P 2
4
5


E
P 2
3
4

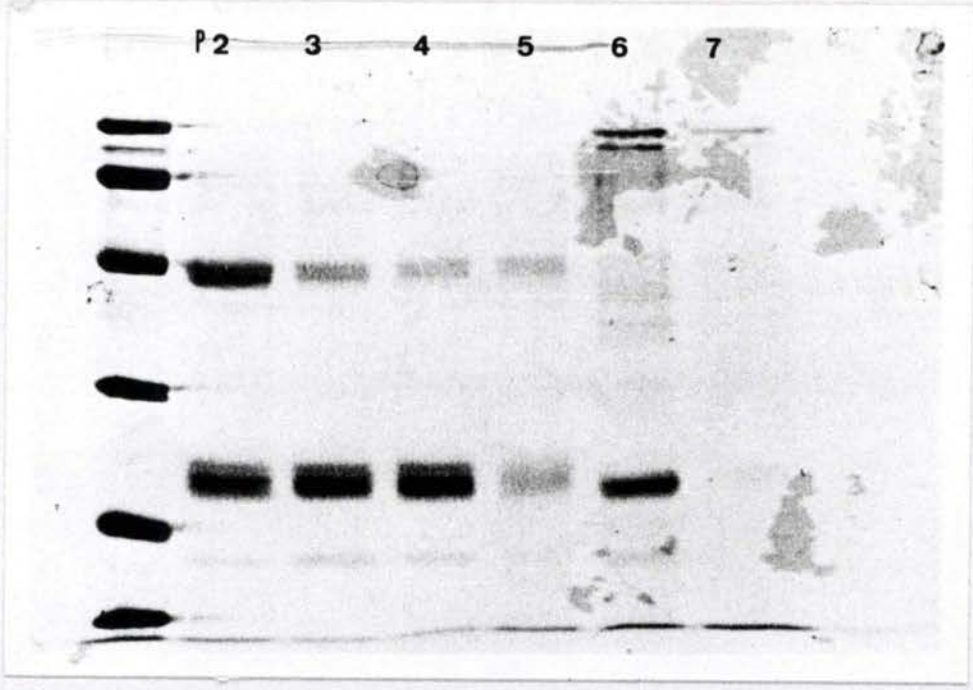


Figure III-18 : Electrophorèse dénaturante de la GPX exposée aux peroxydes et aux radicaux libres sans protéolyse ultérieure.
P2 : GPX seule (1 µg) 120 min. 37°C, P3 : GPX + H_2O_2 10^{-3} M 120 min à 37°c, P4 : GPX + TBHP 10^{-3} M 120 min à 37°c, P5 : GPX + ascorbate/Fe^{++} 60 min à 37°c, P6 : GPX + xanthine oxydase 120 min à 37°c, P7 : GPX + xanthine oxydase + acétaldéhyde 20 mM 120 min à 37°c.

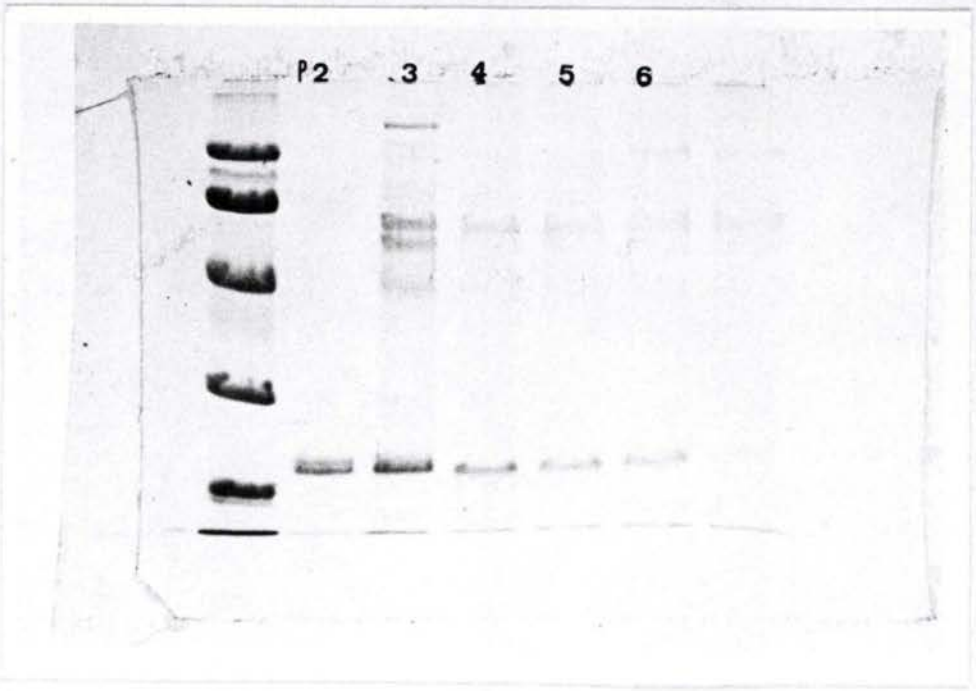


Figure III-19 : Electrophorèse dénaturante de la GPX exposée aux peroxydes ou non puis ayant subi une protéolyse par les protéases lysosomales.
P2 : GPX seule (1 µg), P3 : GPX + protéases lysosomales (13,5 µg) sans incubation, P4 : GPX + protéases lysosomales 120 min à 37°c, P5 : GPX + H_2O_2 10^{-3} M 120 min à 37°c + protéases lysosomales 120 min à 37°c, P6 : GPX + TBHP 10^{-3} M 120 min à 37°c + protéases lysosomales 120 min à 37°c.

disparaît et l'intensité de la bande colorée de GPX diminue. C'est en analysant quantitativement l'intensité des bandes par rapport à des contrôles que nous déterminons l'importance de la dégradation protéolytique.

1.2.2 Résultats expérimentaux.

En premier lieu, nous avons testé différentes protéases afin de reconnaître celles qui possédaient une activité protéolytique pour la GPX. La figure III-17 nous montre le résultat de l'électrophorèse pratiquée en conditions dénaturantes sur des échantillons où la GPX a été mise en présence de trypsine, chymotrypsine, papaïne, pepsine, pronase, d'un lysat de globules rouges de bovin et d'un lysat de fraction lysosomale de foie de rat. La trypsine et la chymotrypsine n'ont pas d'activité protéolytique sur la GPX après 120 minutes d'incubation car on n'observe pas de diminution de l'intensité de la bande de GPX. Le lysat de globule rouge n'a pas d'activité non plus. Par contre on observe une nette activité protéolytique pour la papaïne (après 4 minutes d'incubation) pour la pepsine (20 minutes) pour la pronase (12 minutes) et les protéases lysosomales. Comme l'incubation avec ces dernières protéases est la condition la plus proche de ce que l'on rencontre in vivo, c'est celle-ci que nous utiliserons essentiellement pour les expériences ultérieures. L'incubation est fixée à 120 minutes à 37°C et pH 5.

Nous avons ensuite observé l'effet des deux peroxydes utilisés (H_2O_2 et TBHP) et des radicaux hydroxyles et superoxydes sur la GPX sans exposition aux protéases. L'enzyme a donc été incubée 120 minutes à 37°C avec le TBHP 10^{-3} M, H_2O_2 10^{-3} M, les systèmes produisant les radicaux hydroxyles (ascorbate 10^{-2} M et Fe^{++} 5.10^{-5} M) et les anions superoxydes (xanthine oxydase 1.4 mU et acétaldéhyde 20 mM) à pH 7,4 (tampon phosphate). Elle fut incubée ensuite 120 minutes à 37°C et pH 5 mais sans les protéases lysosomales. La figure III-18 montre les résultats obtenus sur l'électrophorèse. Pour la GPX pure, on constate l'existence de deux bandes : une à un PM de 22.000 environ et l'autre à 45.000 environ. Cette seconde bande n'apparaissait pas dans les autres expériences. On constate par ailleurs que le TBHP et H2O2 ne dégradent pas l'enzyme; par contre les radicaux hydroxyles seuls et les anions superoxydes seuls dégradent fortement la GPX puisque la bande de protéine disparait lorsque l'enzyme est incubée avec ces radicaux libres. Remarquons que cette dégradation a été

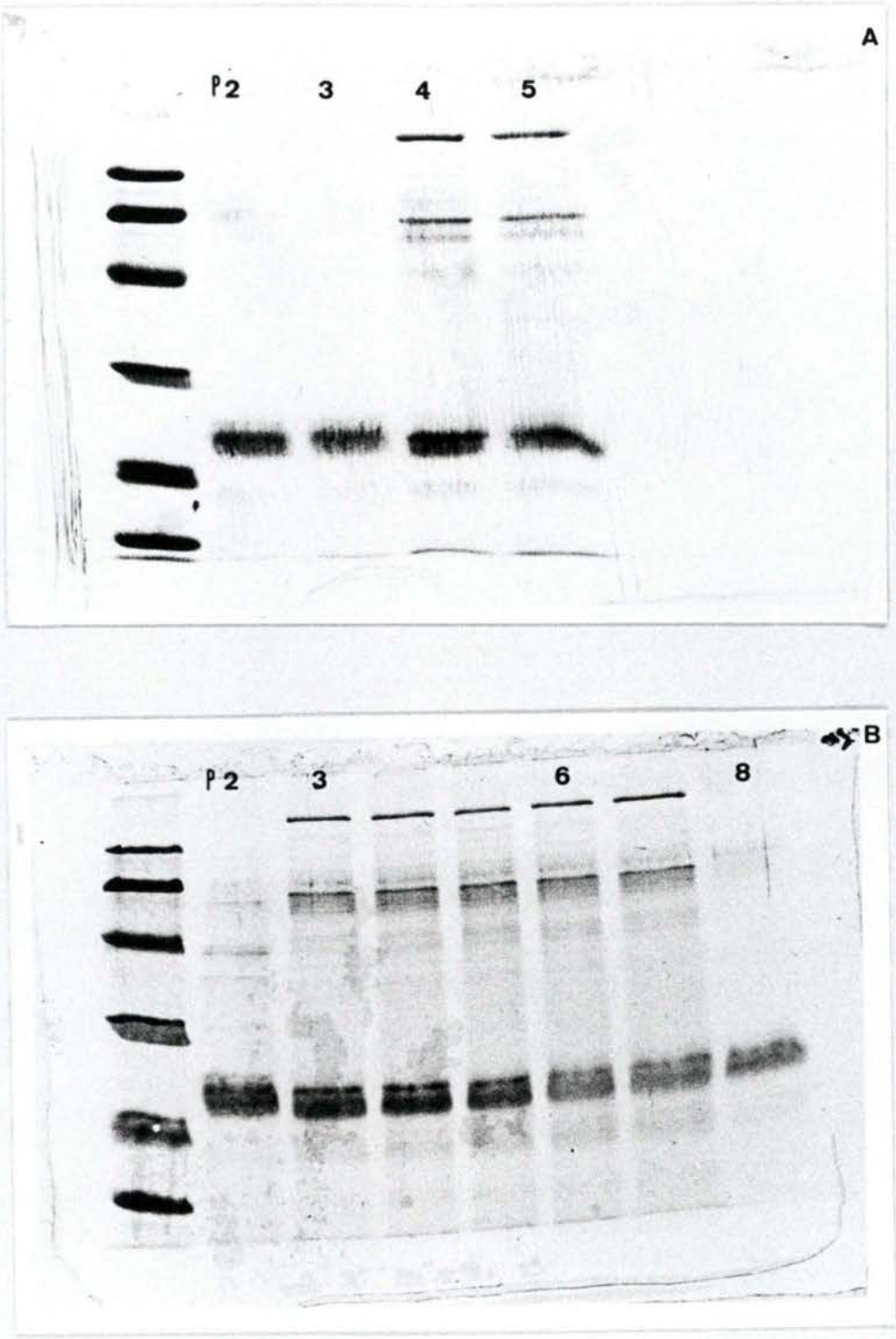


Figure III-20 : Electrophorèse dénaturante de la GPX exposée au système ascorbate/Fe^{++} puis aux protéases lysosomales.

A : P2 : GPX (2 µg) + Fe^{++}, P3 : GPX + ascorbate/Fe^{++} 60 min à 37°c + incubation 120 min à 37°c pH 5, P4 : GPX + Fe^{++} 60 min à 37°c + protéases lysosomales (13,5 µg) 120 min à 37°c, P5 : GPX + ascorbate/Fe^{++} 60 min à 37°c + protéases lysosomales 120 min à 37°c.

B : P2 : GPX (2 µg) + Fe^{++}, P3 : GPX + mannitol 0,1 M + desferriosamine 10^{-3} M + ascorbate/Fe^{++} 60 min à 37°C + protéases lysosomales 120 min à 37°c, P6 : GPX + ascorbate/Fe^{++} 60 min à 37°c + protéases lysosomales 120 min à 37°c, P8 : GPX + ascorbate/Fe^{++} 60 min à 37°c + incubation 120 min à 37°c pH 5.

observée aussi en absence de l'incubation à 37°C pendant 120 minutes à pH 5, ce qui confirme l'effet des radicaux libres à pH neutre. On peut voir enfin sur cette figure que que la présence de xanthine oxydase seule dégrade légèrement la GPX (piste 6). Ceci est dû à la présence de protéases contaminant la xanthine oxydase commerciale, phénomène bien connu (catalogue Sigma Chemicals) et que nous observerons encore plus loin.

Afin de répondre à la question de savoir si l'exposition de la GPX aux peroxydes susceptibilisait l'enzyme à la protéolyse, nous avons incubé la GPX (1 µg) avec ces molécules dans les conditions utilisées ci-dessus avant de la soumettre aux protéases. La figure III-19 montre que l'intensité de la bande de GPX lorsque celle-ci a été incubée avec H_2O_2 ou TBHP puis incubée pendant 120 minutes avec les protéases lysosomales est légèrement plus faible que celle de l'enzyme incubée en présence des protéases sans avoir été soumise aux peroxydes. Ce résultat indique que l'inactivation de la GPX par les peroxydes peut favoriser sa dégradation par les protéases.

Nous avons également réalisé deux expériences similaires à la précédente pour les radicaux hydroxyles et les anions superoxydes. La GPX (2 µg) est incubée pendant 60 minutes avec ou sans le système produisant les radicaux hydroxyles. La desferioxamine 10^{-3} M et le mannitol 100 mM sont ajoutés par la suite alors que le pH est amené à 5 pour permettre aux protéases lysosomales de fonctionner. La figure III-20 montre les résultats de cette expérience réalisée en double. L'intensité de coloration des bandes a été mesurée pour les différentes pistes et la table III-2 en donne les valeurs. Nous constatons que la bande de GPX ne diminue pas lorsqu'elle est soumise aux protéases lysosomales seules. Elle migre légèrement plus bas ce qui voudrait dire que la GPX a été partiellement coupée et que son poids moléculaire a diminué un peu. Ce phénomène quoique moins apparent est déjà observable aux figures III-17 et III-19. Si l'intensité de la bande ne diminue pas, cela est dû au fait que la quantité de GPX de cette expérience était plus élevée que pour les expériences précédentes par rapport à la quantité d'enzymes lysosomales. En effet comme nous savions que dans ce cas, et les radicaux hydroxyles et les protéases dégraderaient l'enzyme, nous avons augmenté la quantité de GPX au départ afin de bien examiner l'effet. Nous constatons que l'effet des radicaux hydroxyles est toujours présent puisqu'il y a une diminution de 27 % et de 17 % de la bande de GPX. Cependant, lorsque les radicaux et les protéases lysosomales sont présents consécutivement, l'effet de dégradation est supérieur puisqu'il y a diminution de 37 % et 28 % de la bande. La différence est faible mais elle se

PISTES	A (mV)	PISTES	B (mV)
P2 (R-, L-)	30	P2 (R-, L-)	20,4
P3 (R+, L-)	22	P8 (R+, L-)	17
P4 (R-, L+)	30	P3 (R-, L+)	21
P5 (R+, L+)	19	P6 (R+, L+)	14,8

Table III-2 : A/B : Mesure de l'intensité des bandes de la figure III-20 A/B. R+/- : présence ou absence des radicaux libres ($OH^{\cdot}$). L+/- : présence ou absence des protéases lysosomiales.

Figure III-21 : Electrophorèse dénaturante de la GPX exposée au système xanthine oxydase/acétaldéhyde puis aux protéases lysosomales.
P2 : GPX (1 µg) + xanthine oxydase 30 min à 37°c + incubation pH 5 120 min à 37°c, P3 : GPX + acétaldéhyde (10 mM) 30 min à 37°c + incubation pH 5 120 min à 37°c, P4 : GPX + xanthine oxydase + acétaldéhyde (10 mM) 30 min à 37°c + incubation pH 5 120 min à 37°c, P5 : GPX + acétaldéhyde (10 mM) 30 min à 37°c + protéases lysosomales (13,5 µg) 120 min à 37°c, P6/P7 : GPX + xanthine oxydase + acétaldéhyde (10 mM) 30 min à 37°c + protéases lysosomales 120 min à 37°c.

PISTES	INTENSITE (mV)
P2 (O-, L-, X.O.)	15
P3 (O-, L-, ac.)	27,3
P4 (O+, L-)	13
P5 (O-, L+, ac.)	22
P6 (O+, L+)	12,5
P7 (O+, L+)	14,5

Table III-3 : Mesure de l'intensité des bandes de la figure III-21. L +/- : présence ou absence de protéases lysosomales, O +/- : présence ou absence des anions superoxydes, XO : xanthine oxydase, Ac : acétaldéhyde.

Figure III-22 : Electrophorèse dénaturante de la GPX exposée à la xanthine oxydase en présence de différents inhibiteurs de la protéolyse. P2 : GPX seule, P3 : GPX (1 µg) + xanthine oxydase 120 min à 37°c, P4 : GPX + xanthine oxydase + soybean trypsin inhibitor (2 µg) 120 min à 37°c, P5 : GPX + XO + NEM (2 µg) 120 min à 37°c, P6 : GPX + XO + α-toluène sulfonylfluoride (3,6 µg) 120 min à 37°c, P7 : GPX + XO + pepstatine (1 µg) 120 min à 37°c, P8 : GPX + XO + leupeptine (2 µg) 120 min à 37°c.

PISTES	INTENSITE (mV)
P2 (GPX seule)	24
P3 (GPX + X.O.)	8,5
P4 (GPX + X.O. + STI)	21
P5 (GPX + X.O. + NEM)	11
P6 (GPX + X.O. + PMSF)	15
P7 (GPX + X.O. + Pepst.)	12
P8 (GPX + X.O. + Leu.)	12,5

Table III-4 : Mesure de l'intensité des bandes de la figure III-22. STI : soybean trypsin inhibitor, NEM : Néthylmaléimide, PMSF : α-toluène sulfonylfluoride, pepst. : pepstatine, leu : leupeptine, XO : xanthine oxydase.

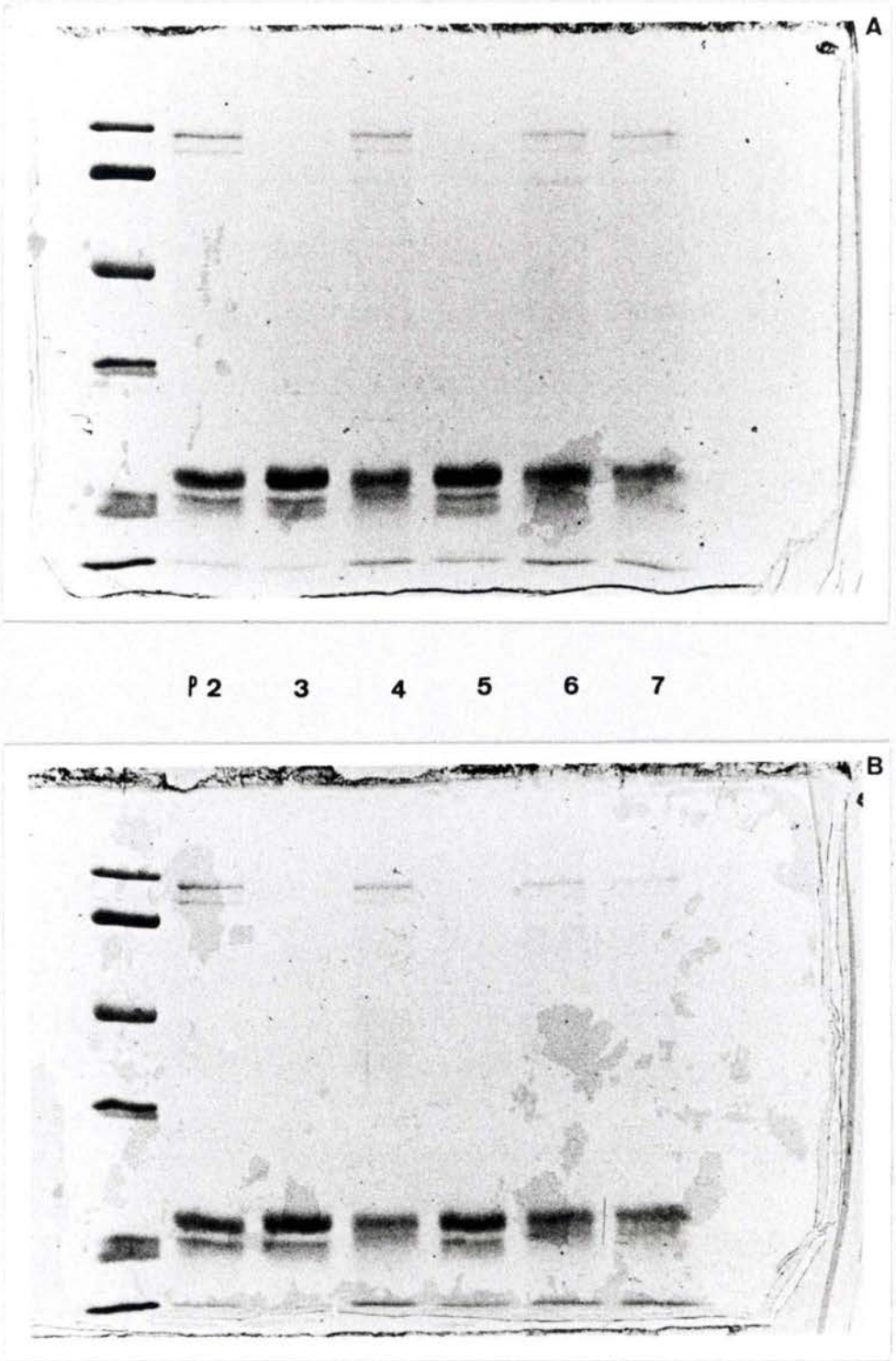


Figure III-23 : A/B : P2 : GPX (2 µg) + xanthine oxydase + STI (1,4 µg) 90 min à 37°c + incubation avec allopurinol 3 min à 37°c, P3 : GPX + acétaldéhyde (20 mM) + STI 90 min à 37°c + incubation avec allopurinol 3 min à 37°c, P4 : GPX + acétaldéhyde + XO + STI 90 min à 37°c + incubation avec allopurinol 3 min à 37°c, P5 : GPX + acétaldéhyde + STI 90 min à 37°c + papaïne (0,25 µg) et allopurinol 3 min à 37°c, P6/P7 : GPX + acétaldéhyde + XO + STI 90 min à 37°c + papaïne et allopurinol 3 min à 37°c.

répète dans les deux expériences. Ceci nous permet de penser que l'enzyme ayant subi une première dégradation par les radicaux est dégradée plus rapidement ensuite par les protéases lysosomales que l'enzyme native.

La figure III-21 représente l'expérience correspondante pour le système xanthine oxydase / acétaldéhyde et la table III-3 la valeur de l'intensité des bandes. Après 120 minutes d'incubation de la GPX avec le système produisant ces anions superoxydes, l'allopurinol 10 $^{-3}$ M est ajouté en même temps que les protéases de manière à assurer l'arrêt de la production des radicaux et le pH est abaissé à 5. La quantité de GPX utilisée dans cette expérience est de 1 µg. Le calcul de l'effet sur la susceptibilisation à la protéolyse se complique par le fait que, ici, non seulement les anions superoxydes seuls ont un effet, mais en plus que la xanthine oxydase elle-même a un effet du fait de la présence de protéase(s) contaminante(s). Ceci se remarque bien sur la table III-3 entre la piste 3 et la piste 2. L'effet des anions superoxydes se calcule par la différence entre la piste 2 et la piste 4. L'effet des protéases lysosomales seules se calcule par la différence entre la piste 3 et la piste 5. Ainsi, pour détecter un effet des anions superoxydes sur la susceptibilisation à la protéolyse, il faut que l'effet observé lorsque les superoxydes sont produits et que les protéases lysosomales ont agi soit supérieur à l'effet des constituants pris séparément. On calcule facilement que l'effet de la xanthine oxydase est de - 12,3 mV, celui des protéases lysosomales de - 5,3 mV et celui du système xanthine oxydase / acétaldéhyde de - 2 mV. L'ensemble nous donne une diminution de 19,6 mV alors que l'effet observé, moyenne entre les pistes 6 et 7 est une diminution de 14,8 mV. Il est donc difficile de mettre en évidence dans ce cas un effet susceptibilisant à la protéolyse principalement du fait de l'effet important dû à la présence des protéases dans la solution de xanthine oxydase. Nous avons donc voulu inhiber l'activité protéolytique contaminante de la xanthine oxydase avant de recommencer une expérience similaire et nous avons incubé la GPX en présence de xanthine oxydase et d'une série d'inhibiteurs de la protéolyse : soya bean trypsin inhibitor, N-éthylmaléimide (NEM), pepstatine, leupeptine et l' α-toluène-sulfonyl-fluoride (détail voir légende). A 2 µg de GPX sont ajoutées 2,9 mU de xanthine oxydase et un même volume d'inhibiteur. Après 120 minutes d'incubation à 37°C l'électrophorèse est réalisée et donne les résultats montrés à la figure III-22. L'intensité des bandes fut mesurée et les résultats se trouvent à la table III-4. On remarque que tous les inhibiteurs utilisés agissent mais par contre, qu'aucun inhibiteur n'inhibe à 100 % l'activité

PISTES	A INTENSITE (mV)	B INTENSITE (mV)
P2 (O-, P-, X.O.)	24	27
P3 (O-, P-, ac.)	25,8	30,7
P4 (O+, P-)	17,3	19,1
P5 (O-, P+, ac.)	25	27
P6 (O+, P+)	15	18,4
P7 (O+, P+)	17,5	17

Table III-5 : A/B : Mesure de l'intensité des bandes des figures III-23 A/B. P+/- : présence ou absence de papaïne, O+/- : présence ou absence d'anions superoxydes, XO : xanthine oxydase, Ac : acétaldéhyde.

Oxydants / Traitement	—	TBHP	H_2O_2	$O_2^{\cdot -}$	$OH^{\cdot}$
—	—	—		+	+
PROTEASES LYSOSOMIALES	+	+ +	+ +	+	+ +
PAPAINE	+			+	

Table III-6 : Résumé de l'activité protéolytique et de susceptibilisation à la protéolyse des radicaux libres et des peroxydes seuls ou avant traitement par des protéases, sur la GPX

protéolytique de la xanthine oxydase. Le plus actif des inhibiteurs est le soya bean trypsin inhibitor (STI).

Nous avons alors recommencé l'expérience de la figure III-21 mais en utilisant comme protéase la papaïne et en inhibant l'activité protéolytique de la xanthine oxydase par le STI. La quantité de GPX utilisée est de 2 µg. La papaïne est incubée avec la GPX pendant 3 minutes à 37°C.

La figure III-23 montre les résultats de cette expérience en électrophorèse et la table III-5 l'intensité des bandes de GPX. L'effet de l'activité protéolytique contaminante est notablement réduit mais non nul (- 1,8 mV). L'effet des anions superoxydes est la différence entre la piste 2 et la piste 4 (- 6,7 mV). L'effet de la papaïne seule est la différence entre la piste 3 et la piste 5 (- 0,8 mV). La somme de ces trois effets est de - 9,3 mV alors que l'effet observé, différence entre la moyenne des pistes 6 et 7 et du contrôle de la piste 3 est de - 9,6 mV. Pour le second gel, l'activité protéolytique de la xanthine oxydase se traduit par une diminution de l'intensité de la bande de GPX de 3,7 mV. L'effet des anions superoxydes est de - 7,9 mV, celui de la papaïne de - 3,7 mV. Ceci donne un total pour les trois effets pris séparément de - 15,3 mV contre - 13 mV pour l'effet observé lorsque les trois conditions sont remplies simultanément. Nous concluons de ces résultats qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence un effet de susceptibilisation à la protéolyse de la GPX par les anions superoxydes.

1.2.3 Discussion.

La résistance de la GPX à la protéolyse par la trypsine n'est sans doute pas très surprenante. En effet, cette protéase est assez spécifique, ne coupant les liens peptidiques qu'après une lysine ou une arginine (Lehninger 1977). Ceci suggère que la GPX possède peu de ces acides aminés exposés librement à l'action de la trypsine. La résistance à la chymotrypsine est plus étonnante étant donné la moindre spécificité de cette enzyme. Les autres protéases utilisées sont également peu spécifiques. Davies (1987) utilise des extraits de globules rouges pour ses expériences de protéolyse. Dans notre cas ce système ne semble pas très actif. De façon à être proche des protéases impliquées in vivo, nous avons également essayé de travailler avec une fraction soluble de fibroblastes mais les résultats ont également été négatifs. L'activité protéolytique de cette fraction est probablement trop faible et en augmenter la concentration entraînait une surcharge en protéine sur les gels d'électrophorèse.

L'action des radicaux libres sur la GPX entraîne une dégradation rapide de l'enzyme. Ce phénomène d'altération des protéines par les radicaux libres est bien décrit par Davies *et al.* (1987 a, b, c). Ce dernier montre que tous les acides aminés sont susceptibles de subir des modifications à la fois par les radicaux hydroxyles et par les anions superoxydes. Les tryptophane, histidine, tyrosine et cystéine sont cependant particulièrement sensibles. Ce phénomène est dû à la très grande réactivité des radicaux libres qui leur permet de réagir avec tous les types de molécules biologiques (Halliwell et Gutteridge 1985). Par conséquent, la présence de radicaux libres dans le voisinage des protéines provoque des modifications chimiques des acides aminés et donc de la structure primaire de la protéine. L'altération de la structure primaire conduit à la dénaturation des protéines (Davies *et al.*, 1987 c). C'est par ce phénomène que Davies explique l'activité importante de très nombreuses protéases différentes vis à vis des protéines oxydées en comparaison aux protéines natives. Vu cette diminution de spécificité l'importance du choix des protéases pour tester la susceptibilisation à la protéolyse devient moins crucial. Ainsi, on pourrait penser que les protéases seront aussi plus actives sur la GPX oxydée que sur la GPX native. Cette idée cependant n'est pas en accord avec les résultats que nous obtenons pour les anions superoxydes. En effet, la figure III-18 nous montre que les anions superoxydes seuls dégradent la GPX. On peut donc penser qu'ils agissent par un mécanisme similaire à celui des radicaux hydroxyles. Mais, l'exposition de la GPX altérée par les anions superoxydes aux protéases lysosomiales et à la papaïne ne nous permet pas de voir une dégradation accrue de l'enzyme oxydée par rapport à l'enzyme native. Il est connu que les anions superoxydes sont moins réactifs que les radicaux hydroxyles (Halliwell et Gutteridge 1985). L'altération pourrait donc être plus faible et l'effet accru des protéases moins marqué. Nous voyons que les mesures d'intensité de bandes sont assez peu sensibles. De plus la technique en elle-même est assez complexe. Un effet faible pourrait être masqué par ce manque de finesse des mesures. Ceci est d'autant plus vrai que la mesure n'est pas directe puisqu'il faut tenir compte de l'effet des superoxydes seuls, de la xanthine oxydase seule et des protéases seules. L'application d'une technique plus précise comme la mesure de la radioactivité libérée en solution lors de la dégradation d'une protéine marquée améliorerait la résolution et pourrait peut-être mettre en évidence des phénomènes plus subtils.

Nous avons vu que les deux peroxydes utilisés (TBHP et H_2O_2), s'ils

n'entraînent pas de protéolyse directe de la GPX la susceptibilise par contre aux protéases. La susceptibilisation à la protéolyse par les peroxydes se réalise sans doute par un mécanisme différent de celui des radicaux libres. En effet, l'action de ces molécules est moins agressive que celle des radicaux. Elles agissent souvent en oxydant un ou plusieurs acides aminés mais sans rompre les liaisons covalentes des liens peptidiques. Il faut noter que l'effet des peroxydes n'est pas toujours susceptibilisant. En effet des résultats avec la pronase ont montré qu'il n'y aurait pas de susceptibilisation de la GPX par H_2O_2 et TBHP pour cette protéase. L'oxydation semble être repérée par certaines protéases mais pas d'autres. La protaglandine H synthétase (Pan Chen *et al.* 1987), les protéines de Escherichia coli (Davies et Lin 1988) et la superoxyde dismutase (Salo *et al.* 1988) sont aussi des protéines qui montrent une susceptibilisation à la protéolyse lorsqu'elles sont mises en présence de H_2O_2. Salo *et al.* (1988) montrent que la SOD inactivée par H_2O_2 est sélectivement dégradée par des enzymes protéolytique d'érythrocytes bovins. Pacifici et Davies (1988) ont réussi a identifié un complexe protéasique de 700 Kdaltons des globules rouges qui apparaît être responsable de la dégradation des protéines oxydativement dénaturées. Il semble donc que des protéines oxydées sans être fragmentées puissent être reconnues sélectivement par des protéases. Le mécanisme semble plus spécifique que pour les protéines dénaturées par l'action des radicaux libres ce qui pourrait expliquer l'activité de certaines protéines et pas d'autres.

Ces résultats résumés à la table III-6 montrent que la GPX est sensible aux dérivés de l'oxygène soit par des attaques et coupures directes soit par sa susceptibilisation aux protéases. Ainsi, la GPX ne possède pas de protection particulière contre les attaques oxydatives. La SOD qui fait aussi partie du système antioxydant ne semble pas non plus être plus résistante que d'autres protéines à la dégradation suite à l'inactivation oxydative (Salo *et al.* 1988). A la lumière des mécanismes proposés par la littérature on imagine d'ailleurs mal que certaines protéines soient mieux protégées que d'autres particulièrement vis à vis des radicaux libres puisque leur action sur quelque protéine que ce soit semble aboutir à une dénaturation importante.

Les résultats de la figure III-18 piste 2 restent obscurs. La bande à 45.000 daltons apparaît probablement suite à l'incubation en conditions acides. Plus loin, on montrera en chromatographie d'exclusion que la GPX incubée à pH 6,5 s'agrège pour former des complexes de poids moléculaire très élevé. Ici, le poids moléculaire correspond à celui du dimère de la GPX. Comme l'enzyme est pure, cette bande peut difficilement représenter autre chose que

de la GPX. Notons que, comme l'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes, ce dimère serait constitué de deux monomères liés de manière covalente. Awasthi *et al.* (1975) avaient découvert en purifiant la GPX à partir de globules rouges humains une sélénoprotéine possédant une activité spécifique de 4 % par rapport à celle de la GPX. Ils avaient pu montrer que cette protéine était identique à la GPX sauf au niveau du poids moléculaire double à peu près de la sous unité de l'enzyme (47 Kda). Ils supposaient que cette protéine était de la GPX altérée de manière telle que la dissociation n'était plus possible en présence de SDS et d'urée. Il semble que l'incubation que nous avons pratiquée ici nous conduise au même phénomène. De plus on remarque que l'addition des peroxydes et des radicaux libres fait disparaître presque totalement cette bande alors que par ailleurs les conditions sont identiques. Cependant, à notre connaissance, il n'est pas décrit de phénomène de dimérisation covalente sous l'influence du pH. Ce phénomène reste donc une question ouverte.

1.2.4 Conclusions.

De ce chapitre, nous pouvons conclure que :

- La GPX peut être dégradée par les protéases lysosomales, la pepsine, la papaïne, la pronase mais pas par la trypsine et la chymotrypsine.
- Les peroxydes, qui inhibent la GPX, ne peuvent pas induire sa dégradation directe. En revanche, il peuvent susceptibiliser l'enzyme à la protéolyse.
- Les radicaux libres hydroxyles et superoxydes dégradent l'enzyme par eux-même. Les radicaux hydroxyles favorisent en plus l'action des protéases sur l'enzyme qu'ils ont altérée. Nous obtenons des résultats négatifs en ce qui concerne la susceptibilité à la protéolyse de la GPX après traitement par les radicaux superoxydes. Un effet faible n'est cependant pas à exclure étant donné les contraintes techniques liées à cette expérience.
- La GPX ne possède pas de caractéristiques particulières qui lui permettrait de résister mieux que les autres protéines aux oxydants et aux radicaux libres.

CHAPITRE 2 LA GLUTATHION PEROXYDASE AU COURS DU VIEILLISSEMENT DES FIBROBLASTES WI-38.

2.1 Introduction

Le vieillissement des organismes vivants se caractérise par la diminution progressive du métabolisme des tissus. Cette diminution est le résultat de modifications qui surviennent dans les mécanismes biochimiques et génétiques opérant au niveau subcellulaire.

Les acteurs principaux du métabolisme cellulaire étant les enzymes, il est intéressant d'étudier les altérations qu'ils subissent et qui pourraient expliquer, en partie au moins, la perte de leur fonction. De plus la compréhension de ces processus d'altérations et la mise en évidence des agents responsables permettraient de tester les hypothèses sous-jacentes aux théories du vieillissement. Par exemple, il est certain que des modifications de séquence de l'enzyme s'inscriraient bien dans l'hypothèse des mutations somatiques ou de l'erreur de synthèse proposée dans la théorie de l'erreur catastrophique de Orgel (1963). Par contre des altérations post-traductionnelles pourraient aussi être reprises dans le cadre de l'hypothèse de l'erreur catastrophique généralisée (Orgel 1973).

De nombreux résultats suggèrent que la diminution du pouvoir réducteur des cellules au cours du vieillissement ou leur incapacité à détruire des molécules oxydantes pourrait être un facteur important dans l'apparition des modifications qui sont liées à ce vieillissement.

En effet, Somville *et al.* (1985) ont montré que le NADPH protège la SOD de l'altération. Iminashi *et al.* (1985) montre une augmentation de la quantité de glutathion oxydé et une diminution du glutathion réduit dans les globules rouges humains d'âge vieux. Mbemba *et al.* (1985) ont mis en évidence dans les fibroblastes humains en culture une augmentation de glutathion réduit pendant quelques générations suivie d'une diminution drastique au cours des deux ou trois dernières générations. Noy *et al.* (1985) ont trouvé dans le muscle de souris au cours du vieillissement de l'animal une augmentation des trois rapports NAD^+/NADH, GSSG/GSH, $NADP^+$/NADPH. Gafni (1983) propose que l'altération de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase soit due à l'exposition de l'enzyme à des conditions oxydantes; le mercaptoéthanol permettant de réversibiliser l'altération. Kay *et al.* (1986) ont provoqué une déficience en

vitamine E dans l'alimentation, ce qui entraîne un vieillissement prématuré des globules rouges. Ils proposent l'oxydation comme un mécanisme possible pour le vieillissement cellulaire. Viceps-Madore et Cristofalo (1978) ont montré que la glutamine synthétase de fibroblastes humains WI-38 s'altérait au cours du vieillissement. Levine *et al.* (1981) et Levine (1983) ont montré de leur côté que la glutamine synthétase s'altérait dans des conditions oxydatives et ont décrit en détail le mécanisme de cette altération. Ainsi l'oxydation pourrait être à l'origine de l'altération de cette enzyme au cours du vieillissement. La capacité de maintenir les constituants cellulaires dans un état réduit et la capacité de détruire les molécules oxydantes semble donc en relation avec le vieillissement. Ces arguments entre autres soutiennent l'hypothèse radicalaire du vieillissement (Gordon, 1974; Tappel *et al.* 1973; Sheldrake, 1974; Nohl *et al.* 1979).

On sait d'autre part que la GPX est l'enzyme la plus efficace pour défendre des cellules artificiellement soumises à une attaque radicalaire (Raes *et al.* 1987). Il était donc intéressant de savoir si elle pouvait contribuer au vieillissement. Subit-elle une perte de fonctionnalité ? S'altère-t-elle au cours du vieillissement ? Certaines données de la littérature suggère l'existence d'une altération pour cette enzyme (Hothersall *et al.* 1981, Hazelton et Lang 1985, Ohrloff *et al.* 1980).

Dans ce chapitre, nous étudierons donc la fonctionnalité de la GPX au cours du vieillissement des fibroblastes humains WI-38 en culture, à savoir l'évolution de son activité spécifique et l'affinité pour son substrat peroxyde. Nous confirmerons également l'existence d'une altération chez l'enzyme des cellules vieilles et tenterons d'identifier cette altération au niveau moléculaire.

2. 2 RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSIONS.

2. 2 1 Evolution de l'activité spécifique au cours du vieillissement.

Afin de déterminer si les cellules étaient moins bien protégées des stress oxydatifs au cours du vieillissement, nous avons mesuré l'évolution de l'activité spécifique de la GPX en fonction du nombre de passages en culture. En préliminaire, nous avons voulu mesurer l'évolution de l'activité spécifique de la GPX au cours de la croissance des cellules à partir du

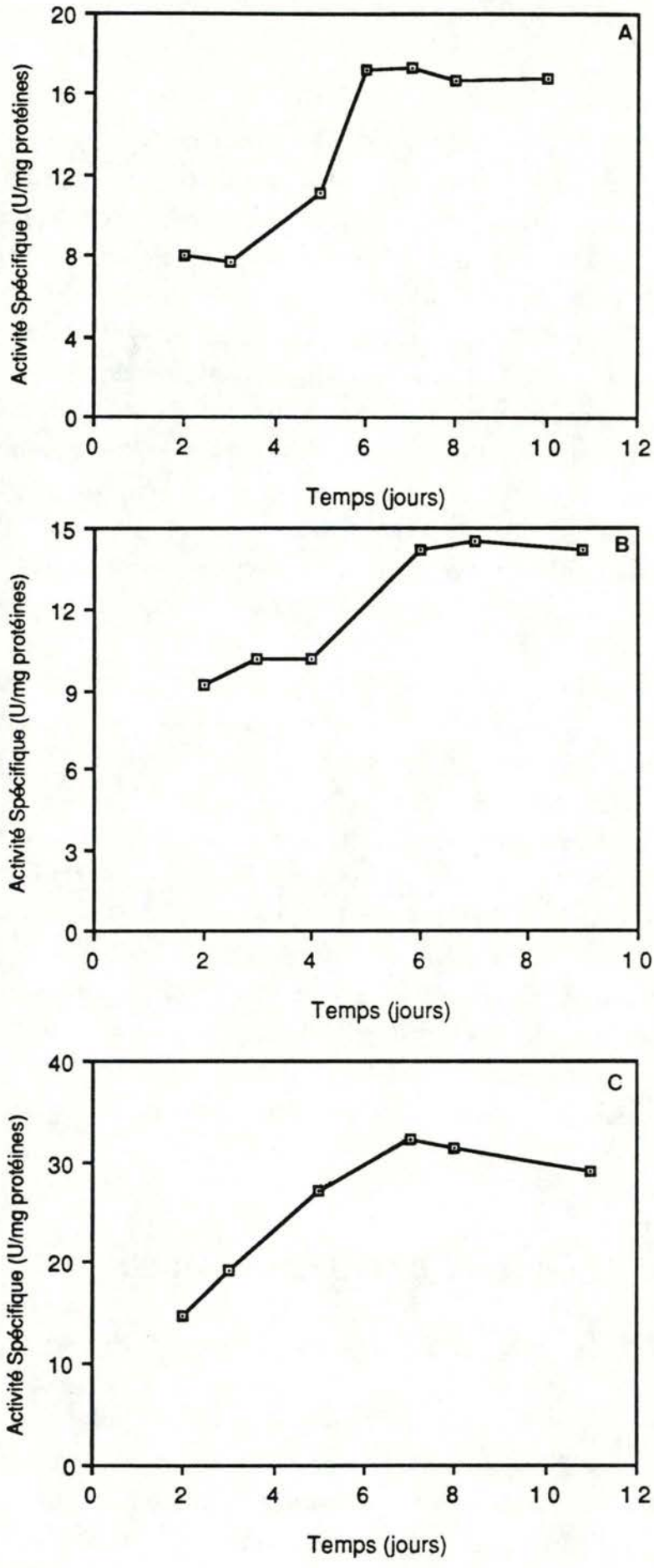


Figure III-24 : Evolution de l'activité spécifique de la GPX dans les fibroblastes WI-38 en fonction du temps après le repiquage en 4 des cellules, jusque la confluence dans la boîte de culture. Le jour 0 correspond au jour du repiquage. A/B : fibroblastes WI-38 jeunes, C : fibroblastes WI-38 vieux. n = 2.

repiquage jusque la confluence. Il s'agissait de voir si l'activité spécifique de la GPX fluctuait lors de la croissance et à confluence afin de s'assurer que la mesure à long terme refléterait bien la mesure de l'activité de la GPX au cours du vieillissement et ne serait pas entachée de variations dues à l'état de la culture au moment de la mesure. Les figures III-24 A et B donnent les résultats de ces mesures pour deux cultures jeunes. Il s'agit de deux lots de cellules différents décongelés à des moments différents et cultivés avec deux lots de sérum de veau foetal différents. La figure III-24 C donne les résultats de la même mesure pour des cellules vieilles issues de la même culture que les cellules de la figure III-24 B. La confluence est atteinte après 6 jours pour les cellules jeunes et après 8 à 9 jours pour les cellules vieilles. Par conséquent, on constate que lorsque la culture est à confluence, à conditions environnantes constantes, l'activité spécifique de la GPX reste stable. Ceci nous permettait donc d'étudier à confluence l'activité spécifique de la GPX au cours du vieillissement.

Les premiers résultats que nous avons obtenus, ont montré une variabilité importante des mesures principalement pour les derniers passages en culture (non montré). Nous n'étions pas satisfaits de l'évolution de ces cultures, car nous avions dû utiliser plusieurs lots de sérum de veau foetal différents. Certains auteurs suggèrent que la GPX est une enzyme inductible sous certaines conditions de stress; (Sinet 1975, Chaudière *et al.* 1987, Coursin *et al.* 1985 et Galiazzo *et al.* 1987) et d'autre part il est montré que la quantité de sélénium du milieu est correlée à l'activité de la GPX (Scott *et al.* 1977, Hafeman *et al.* 1974, Chow et Tappel 1974, Junod *et al.* 1987, Hill *et al.* 1987). Nous nous sommes donc demandé si la variabilité obtenue n'était pas due en partie aux différents lots de sérum dont la quantité en sélénium n'était pas connue. Nous avons alors décidé d'additionner au milieu de culture de la sélénométhionine à 2. 10^{-7} M, un précurseur de la sélénocystéine qui s'incorpore au site actif de la GPX. Selon Golczweski *et al.* (1989) la concentration en sélénium dans le sérum de veau foetal est de l'ordre de 4. 10^{-7} M. Nous avons alors mesuré l'activité spécifique de la GPX de cellules jeunes cultivées en présence de ce sélénium supplémentaire comparativement à des cellules jeunes cultivées sans ce sélénium additionnel. L'activité spécifique de la GPX en présence de sélénium équivalait 144 % de la valeur de l'activité dans les cellules contrôle pour des cellules repiquées en deux et 167 % pour des cellules repiquées en quatre.

L'évolution de l'activité spécifique de la GPX lors de la croissance des

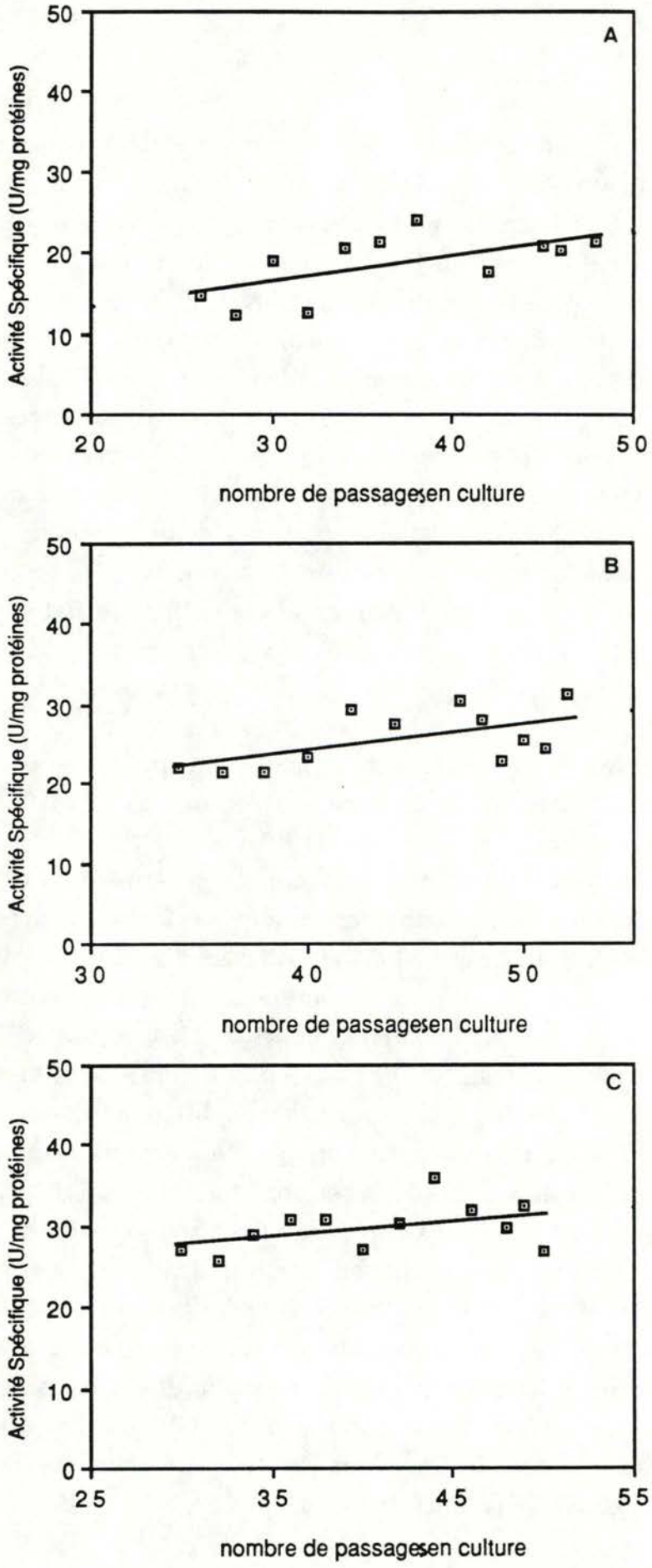


Figure III-25 : Evolution de l'activité spécifique de la GPX dans les fibroblastes WI-38 en fonction du nombre de passages en culture. A : la culture est réalisée sans addition de sélénométhionine, B et C : cultures réalisées avec un milieu additionné de séléno-méthionine à $2\ 10^{-7}$ M. n = 2.

cellules montre aussi une augmentation progressive et se stabilise lors de la confluence. Cette activité est presque doublée entre le deuxième et le septième jour de culture.

Ces résultats confirment la corrélation entre la quantité de sélénium dans le milieu et l'activité de la GPX. Certains auteurs (Nève *et al.* 1989) constatent que cette corrélation n'est vérifiée que lors d'une déficience en sélénium. Au-dessus d'une certaine quantité en sélénium, l'activité de la GPX reste constante. Il semble donc bien que les cellules en culture étaient déficientes en sélénium. Ceci n'est pas étonnant lorsque l'on sait que la quantité de sélénium dans le sérum de veau foetal est de l'ordre de 4.10^{-7} M (Golczweski *et al.* 1989) et dans le plasma humain de 10^{-6} M environ (Nève *et al.* 1989). Comme le sérum est le seul apport de sélénium dans le milieu de culture, sa concentration doit être de l'ordre de 4.10^{-8} M, condition qui in vivo est considérée comme déficiente.

Nous avons alors suivi l'activité spécifique de la GPX pour trois cultures différentes; une pour laquelle aucune addition de sélénium n'a été effectuée et deux autres pour lesquelles du sélénium a été ajouté à une concentration de 2.10^{-7} M. Les résultats sont présentés aux figures III-25 A,B et C. Celles-ci montrent que l'activité spécifique de la GPX augmente légèrement de manière continue au cours du vieillissement des fibroblastes humains WI-38. Si l'apport de sélénium modifie l'activité spécifique de la GPX dans les cultures, il ne modifie pas l'évolution de cette activité au cours du vieillissement. La stimulation de cette activité par le sélénium est identique chez les cellules vieilles et les cellules jeunes. Ceci suggère que le vieillissement n'altère pas le mécanisme d'incorporation du sélénium à l'enzyme. L'addition du sélénium tout au long des cultures n'induit pas de toxicité à long terme puisque le nombre de génération maximum atteint n'est pas diminué.

La légère augmentation de l'activité de la GPX au cours du vieillissement de la culture indique que, en ce qui concerne la GPX en tout cas, les cellules vieilles ne sont sûrement pas moins bien protégées contre le stress oxydant que les cellules jeunes. Nous avons pu constater au laboratoire que les cellules vieilles sont plus sensibles au stress oxydatifs que les cellules jeunes. Nous pouvons dire que pour les fibroblastes WI-38, la raison de cette plus grande sensibilité n'est pas à imputer à la GPX.

Les résultats sur l'évolution de l'activité de la GPX dans divers modèles de vieillissement sont contradictoires dans la littérature. Benzi *et al.* (1988, 1989) rapportent l'évolution de l'activité de la GPX dans quatre régions du

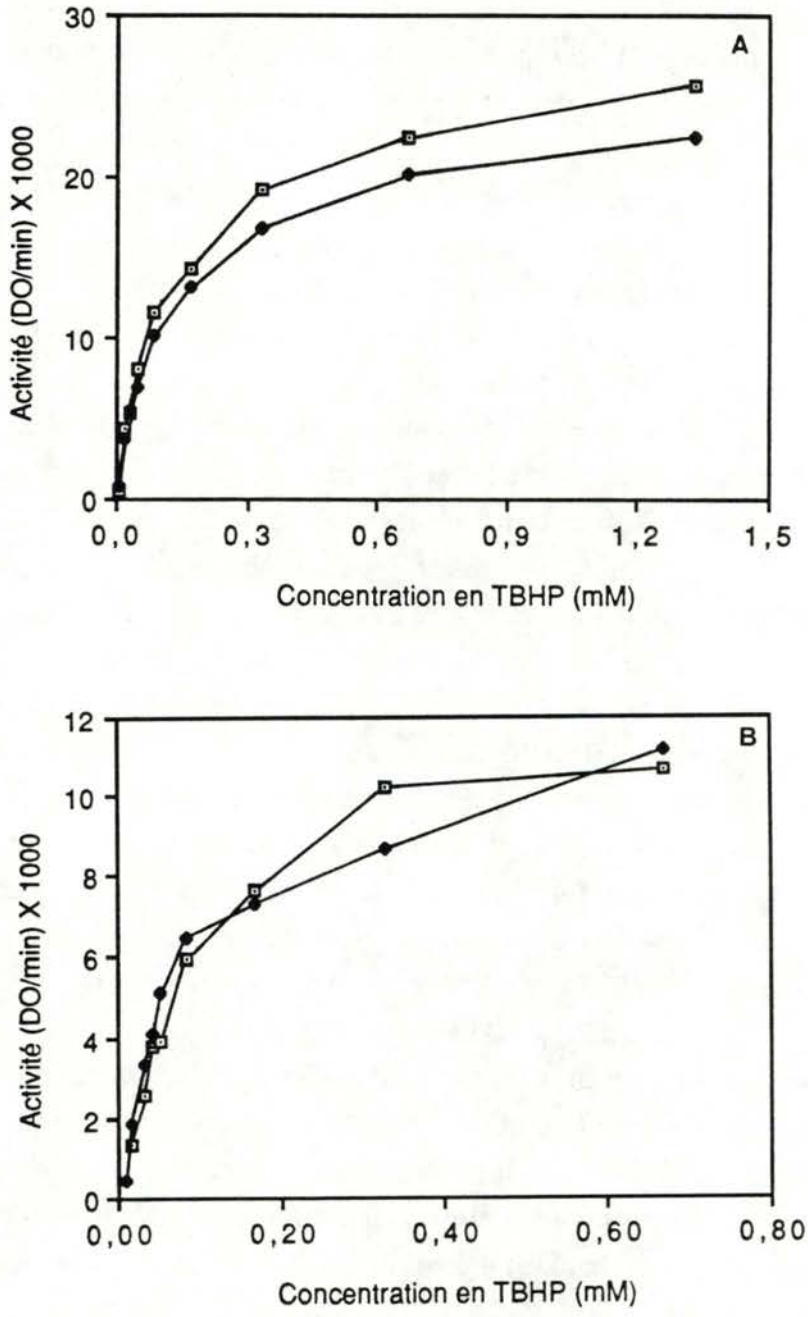


Figure III-26 : Courbe de cinétique de la GPX de fractions solubles de fibroblastes WI-38 en culture en fonction de la concentration en TBHP. □: fractions solubles de fibroblastes jeunes (G 32, 33, 34), ◆ : fractions solubles de fibroblastes vieux (G 48). Activité GPX : A : 17.4 U.E./ml, B : 9,7 U.E./ml. n = 3.

cerveau de rats. Ils constatent que cette activité augmente dans le caudate-putamen et le cortex pariétotemporal, qu'elle diminue dans le thalamus et qu'elle n'est pas modifiée dans la substantia nigra lorsque ces rats vieillissent. Dans des mitochondries de coeur de rat, l'activité de la GPX augmente avec le vieillissement (Nohl et Hegner 1979). Santa Maria et Machado (1987) trouvent quant à eux dans le poumon du rat une activité inchangée pour les femelles mais plus élevée chez les rats mâles vieux que chez le rat adulte. Schisler *et al.* (1988) ont étudié cette activité pour 6 souches de souris différentes dans le foie, le rein, le poumon et le sang. Ils constatent que pour pratiquement tous les tissus murins étudiés, l'activité de la GPX soit reste constante, soit diminue avec l'âge. Hazelton *et al.* (1985) étudiant cette activité dans le coeur, le rein et le foie de souris montrent qu'elle diminue de 27 à 53 % chez les vieilles souris par rapport à des souris de 10 mois (adultes). Rathbun *et al.* (1986) ont montré que dans le cristallin humain entier, l'activité de la GPX augmente jusque 30 ans plus ou moins puis diminue régulièrement et tombe en dessous de la valeur des nouveau-nés au delà de 60 ans. Dans le cristallin du singe rhésus (Macaca mulatta), l'activité de la GPX suit la même évolution (Rathbun et Bovis 1986) tandis que dans le cristallin du boeuf, Ohrloff *et al.* (1980) montrent une diminution progressive de l'activité spécifique en fonction de l'âge de l'animal. Dans des cultures de Paramecium tetraurelia l'activité ne se modifie pas avec l'âge (Croute *et al.* 1985). Dans des érythrocytes humains, Baur *et al.* (1982) et Iminashi *et al.* (1986) montrèrent que l'activité spécifique de cette enzyme diminuait avec l'âge du globule rouge.

L'évolution de l'activité spécifique de la GPX au cours du vieillissement varie donc suivant le type de cellules, de tissus, le sexe ou l'espèce envisagée, mais nous avons vu l'importance de contrôler le taux de Se, ce qui n'est pas toujours le cas dans ces résultats et ce qui complique donc leur interprétation.

2.2.2 Km de la GPX de cellules jeunes et vieilles.

Afin de pouvoir répondre à la question de savoir si l'efficacité de la GPX dans la détoxification des peroxydes n'était pas modifiée avec le vieillissement, nous avons aussi mesuré l'affinité de l'enzyme pour le TBHP en comparant l'enzyme d'une fraction soluble de cellules jeunes à celle d'une fraction soluble de cellules vieilles. Les résultats des figures III-26 A et B montrent que les courbes sont très semblables. Nous avons calculé

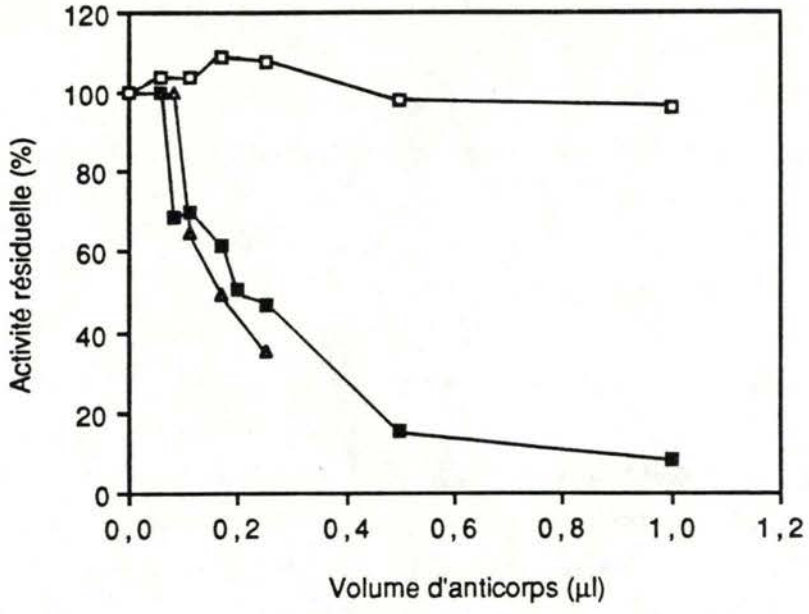


Figure III-27 : Immunotitration de fractions solubles de fibroblastes jeunes (■, G 38) et vieux (Δ, G 50) par une solution d'anticorps anti-GPX purifiés par chromatographie d'affinité. Des aliquots de 0,4 ml de fractions solubles sont additionnés de 0,1 ml d'une solution contenant le volume indiqué d'anticorps purifiés. Après incubation et centrifugation, l'activité GPX est mesurée dans le surnageant. Le contrôle représente 0,4 ml de fractions solubles de fibroblastes jeunes additionné de 0,1 ml de solution d'anticorps de lapin anti-IgG de souris (□). n = 3.

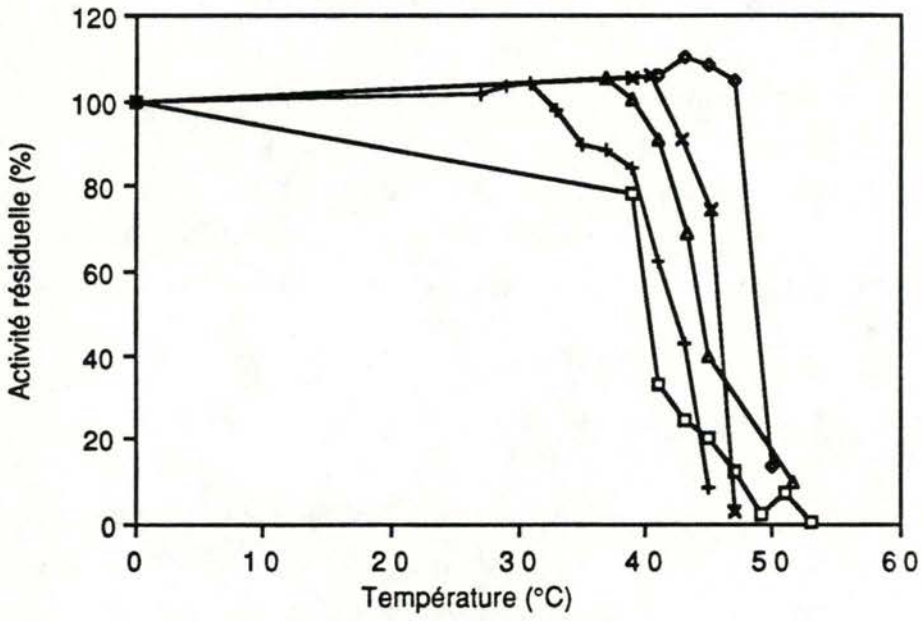


Figure III-28 : Courbe de température de la GPX de différentes fractions solubles de fibroblastes WI-38 jeunes. Ces fractions sont divisées en aliquots qui sont incubés à différentes températures pendant 30 min. L'activité résiduelle est calculée par rapport à celle d'un aliquot maintenu à 4°c. La fraction cytosolique utilisée pour la courbe (□) a été congelée à -70°c pendant 5 jours. n = 2.

les Km des différentes courbes par ajustement direct de l'équation de Michaelis-Menten sur les points expérimentaux grâce au logiciel informatique "Mac Lab"(conception par le laboratoire de Biologie Quantitative, Fac. Univ. N.D. de la Paix, Namur). Le Km calculé pour l'enzyme des cellules jeunes est de 0,118 mM ± 0,030 mM et celui calculé pour l'enzyme des cellules vieilles est de 0.101 mM ± 0,062 mM. Le Km calculé par la même méthode pour l'enzyme purifiée donnait une valeur de 0,112 mM.

La mesure de l'affinité pour le peroxyde montre donc qu'il n'y a pas de différence entre l'enzyme "vieille" et l'enzyme "jeune" dont les valeurs sont identiques à celle de l'enzyme purifiée. Par conséquent, on peut dire que la fonctionnalité de l'enzyme n'est pas altérée au cours du vieillissement. Seule la disponibilité en glutathion pourrait donc différencier la capacité de la cellule jeune et vieille à détoxifier les peroxydes. Nous n'avons pas mesuré le Km apparent de la GPX pour le glutathion. Comme le substrat limitant en conditions physiologiques est le peroxyde et que par contre le glutathion est en excès (de 1 à 10 mM selon le type de cellule), la vitesse globale de la réaction dans la cellule sera plus affectée par la modification du Km apparent pour le peroxyde que pour le glutathion.

2. 2. 3 Détection d'une altération de la GPX de cellules vieilles.

2.2.3.1 par immunotitration.

Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, l'immunotitration est une technique qui a été couramment utilisée pour comparer des enzymes "jeunes" et "vieilles" (Rothstein 1983). Elle consiste à déterminer pour un niveau fixé d'activité enzymatique, l'activité résiduelle dans un surnageant après l'addition de quantités croissantes d'anticorps.

Après avoir purifié par chromatographie d'affinité des anticorps dirigés contre la GPX purifiée (de globules rouges de bovin), la fraction soluble de cellules jeunes et vieilles est incubée avec ces anticorps en quantités croissantes (figure III-27) et après réaction et centrifugation, l'activité résiduelle de la GPX est mesurée. Le contrôle est réalisé en ajoutant aux fractions solubles une même quantité d'une solution d'anticorps de lapin anti-igG de souris préparés de la même façon que les anticorps de lapin anti-GPX. L'activité de l'enzyme "vieille" est au départ de 16,76 UE/ml et celle de l'enzyme "jeune" de 15,66 UE/ml. On constate que ces solutions

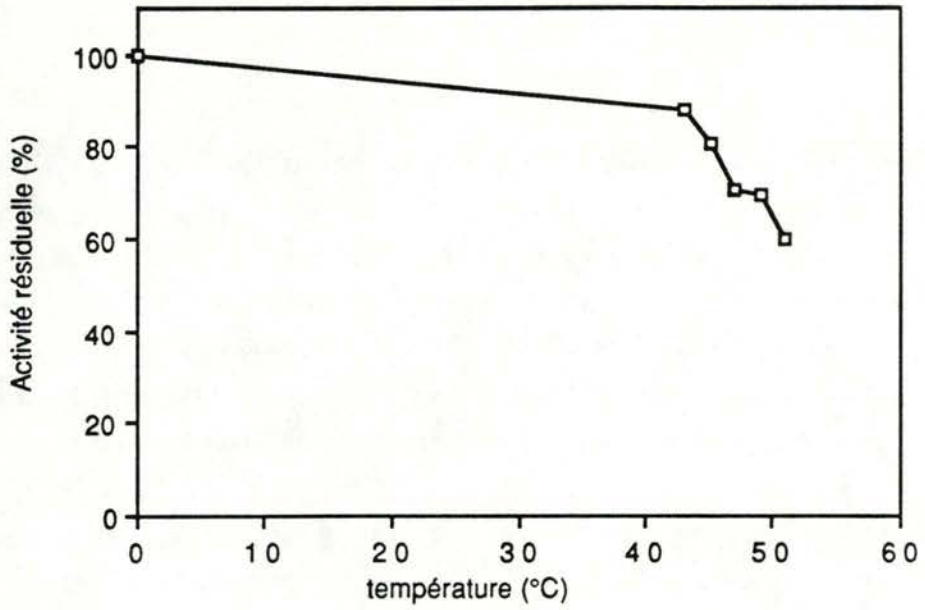


Figure III-29 : Courbe de température de la GPX purifiée commerciale. L'enzyme est diluée dans le tampon de prélèvement des cellules et divisée en aliquots qui sont incubés à différentes températures pendant 30 minutes. L'activité résiduelle est calculée par rapport à celle d'un aliquot maintenu à 4° C. n = 2.

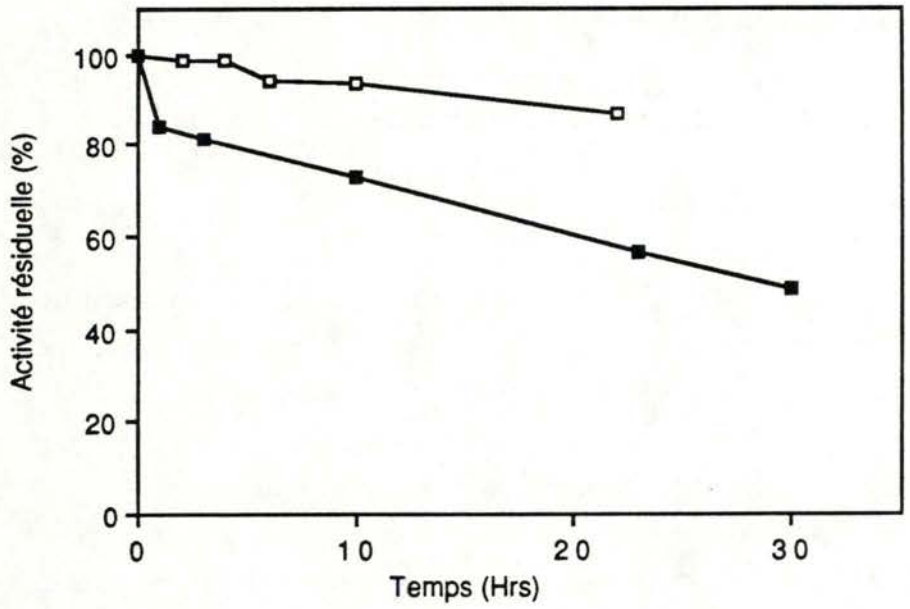


Figure III-30: Evolution de l'activité de la GPX purifiée commerciale en fonction du temps d'incubation à 4° C (■) et à 22° C (□). L'enzyme incubée à 22° C a été diluée dans du tampon de prélèvement des cellules additionné de 1 mg/ml d'ovalbumine et amenée à 14.4 U.E/ml.. L'enzyme incubée à 4° C a été diluée dans du tampon de raclage seul et amenée à 2.6 U.E/ml. L'enzyme est placée à température voulue et à différents temps, 100 µl sont prélevés pour le dosage. n = 3.

d'anticorps ne contiennent plus de GPX contaminante puisque l'activité résiduelle du contrôle reste à 100 % quelle que soit la quantité d'anticorps ajouté. Aucune différence n'est observée entre la courbe de la fraction soluble vieille et celle de la fraction soluble jeune. L'expérience a été réalisée 2 fois dans les mêmes conditions et avec les mêmes résultats.

2.2.3.2 par thermolabilité.

L'inactivation thermique a aussi été utilisée avec succès par de nombreux auteurs afin de mettre en évidence l'altération de certaines enzymes au cours du vieillissement. Nous avons réalisé ce type d'analyse sur la GPX. La première étape était de déterminer à quelle température devait être incubée l'enzyme afin d'obtenir une vitesse d'inactivation permettant de détecter de manière optimale de telles différences : c'est la courbe de température. La deuxième étape était de suivre l'inactivation de l'enzyme au cours du temps à cette température donnée : c'est la courbe de thermolabilité.

La courbe de température vise à déterminer quelle est le température à laquelle, après trente minutes d'incubation, l'activité de l'enzyme a atteint plus ou moins 30 % de l'activité de départ. Nous avons d'abord réalisé ces courbes de température sur l'enzyme cytoplasmique. Une fraction soluble de fibroblastes est préparée par centrifugation d'un homogénat à 39.000 RPM pendant 30 minutes dans du PBS. 350 µl sont placés dans des tubes calibrés. Ceux-ci sont placés dans des bains thermostatisés à différentes températures et dosés. Nous avons utilisé des cellules jeunes pour réaliser cette expérience. La figure III-28 nous montre 5 courbes de températures pour de telles fractions solubles. La température moyenne donnant 30 % d'activité résiduelle est de 45,0 ± 5,5°C. Cependant à 45°C les courbes présentent une activité résiduelle allant de 5 % à plus de 100 % de l'activité initiale. L'enzyme purifiée semble avoir une résistance thermique un peu plus élevée (figure III-29). Il n'était donc pas possible dans ces conditions d'espérer obtenir des courbes de thermolabilité montrant de manière nette et reproductible des différences entre l'enzyme des cellules jeunes et celle des cellules vieilles. Nous avons donc dû nous attacher à déterminer les facteurs susceptibles d'induire une telle variabilité.

En étudiant la stabilité de l'enzyme purifiée à basse température, nous avons obtenu des résultats qui nous ont permis de suspecter deux

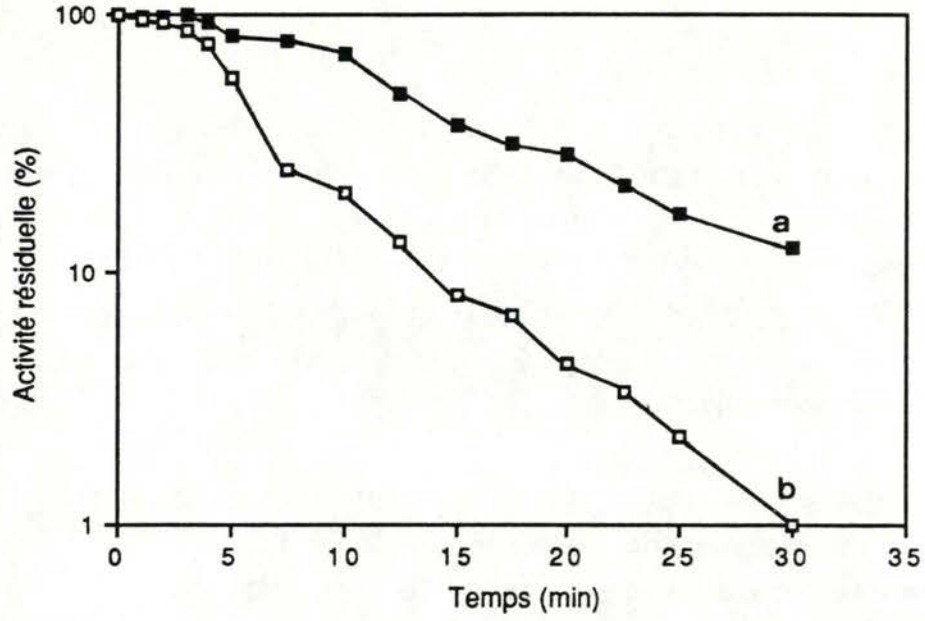


Figure III-31: Evolution de l'activité de la GPX en fonction du temps d'incubation à 45° C d'une fraction soluble de fibroblastes WI-38 jeunes (G 33) en culture. Une même fraction cytosolique a été divisée en deux. Une partie a été congelée à -70° C pendant une semaine avant de subir le traitement thermique (□ b). L'autre a subi la thermoinactivation immédiatement (■, a). Dans toutes les courbes de thermolabilité, chaque point représente la moyenne de trois dosages d'un même échantillon (n = 3). Sauf indiqué dans le texte, les expériences sont réalisées une seule fois.

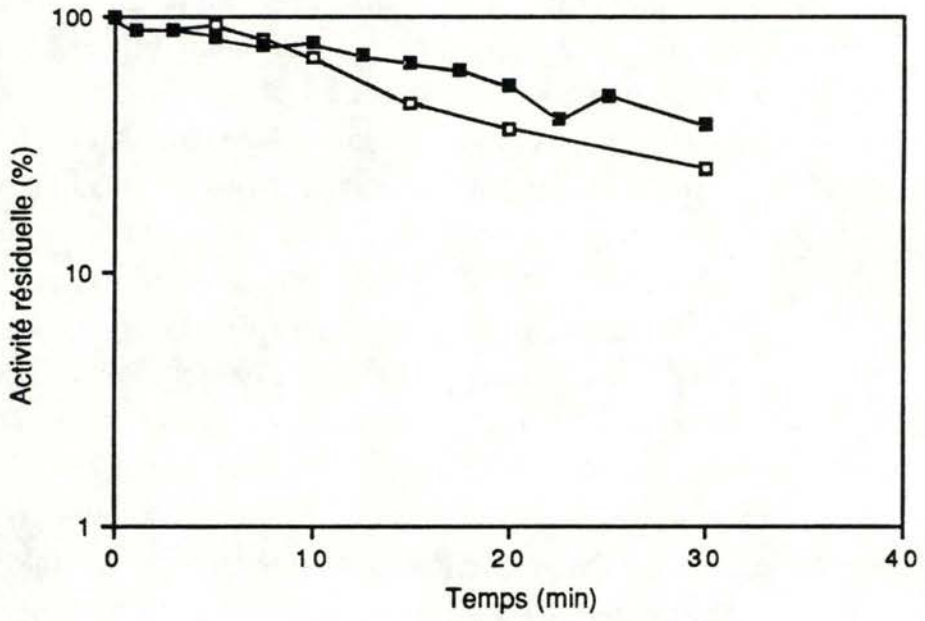


Figure III-32 : Evolution de l'activité de la GPX en fonction du temps d'incubation à 45° C d'une fraction soluble de fibroblastes WI-38 jeunes (G35) en culture. Des aliquots de fractions solubles ayant subi une thermoinactivation sont divisés en deux. Une partie est dosée immédiatement (■); l'autre est congelée à -70° C pendant cinq jours et dosée (□).

paramètres pouvant influencer l'inactivation de l'enzyme. La figure III-30 présente les résultats d'une inactivation à 4°C et une inactivation à 22°C de GPX purifiée. L'enzyme a été diluée dans un tampon phosphate 50 mM, EDTA 1mM en présence ou non d'ovalbumine (1mg/ml) et incubée pendant 22 ou 30 heures. Au cours de ces incubations, des échantillons ont été prélevés et l'activité Glutathion Peroxydase mesurée. On constate une inactivation plus rapide à 4° C qu'à 22° C, ce qui semble a priori contradictoire avec nos connaissances actuelles. En fait, ceci ne peut s'expliquer que par le fait que l'enzyme incubée à 4° C a été plus diluée que l'enzyme incubée à 22° C (activité enzymatique: 2,6 U.E./ml contre 14,4 U.E./ml) et/ou qu'elle a été diluée dans une solution tampon sans protéines alors que l'enzyme incubée à 22° C se trouvait dans la même solution tampon additionnée de 1mg/ml d'ovalbumine. La fig. III-30 indique donc que la concentration en protéines et/ou l'activité de départ influence la vitesse d'inactivation de l'enzyme. Pour les courbes de température réalisées sur les fractions cytosoliques (figure III-28), la concentration en protéines était de l'ordre de 1 mg/ml. Etant donné les nombreux paramètres différant entre ces courbes, tels que la concentration en protéines, l'activité enzymatique de départ ou le pourcentage de la durée de vie accompli, il est difficile de dégager l'importance de chacun d'eux dans la variabilité observée. De plus, il est à noter que la fraction cytosolique utilisée pour réaliser une des courbes a été congelée à -70° C avant d'être soumise aux différentes températures pendant 30 minutes, ce qui n'est pas le cas des autres courbes. On constate dans ce cas une plus faible thermorésistance de l'enzyme. La congélation est donc peut être aussi un facteur influençant le comportement thermosensible de l'enzyme.

Devant ces observations indiquant que le problème était sans doute complexe, nous avons alors abordé de façon systématique l'étude de ces différents paramètres (congélation, concentration en protéines, activité de départ, générations) sur les courbes de thermolabilité.

Courbes de thermolabilité

Méthode

Des cellules à confluence sont rincées, raclées, homogénéisées et centrifugées de la même façon que pour les courbes de température. Le

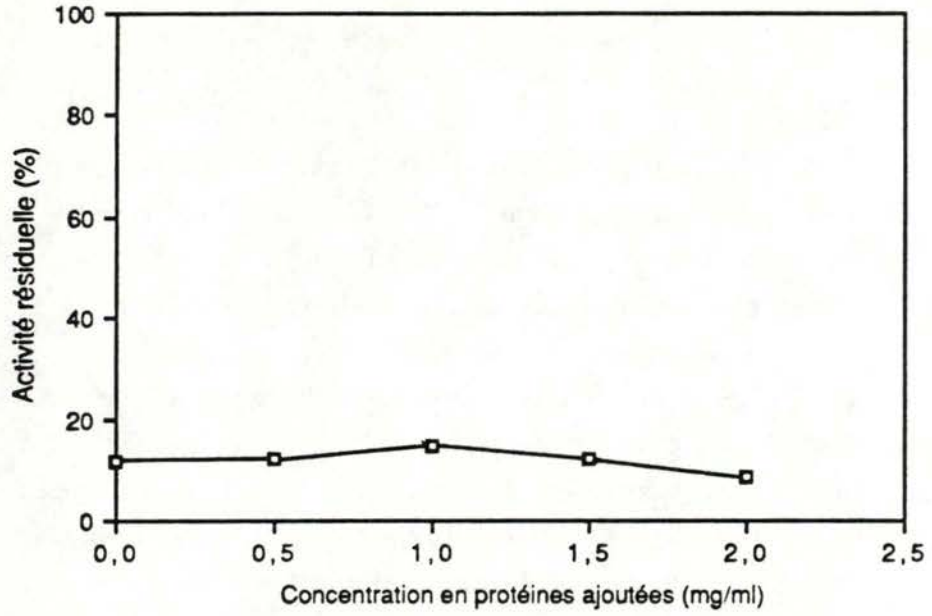


Figure III-33 : Activité résiduelle de la GPX après une incubation à 45° C pendant 30 minutes avec différentes concentrations en protéines. Une fraction soluble de fibroblastes WI-38 en culture est divisée en aliquots. A chacun de ceux-ci sont ajoutées des quantités d'ovalbumine différentes. La concentration de protéines dans la fraction cytosolique seule est de 0.8 mg/ml. Les aliquots sont ensuite divisés en deux parties dont l'une est soumise au traitement thermique. Chaque valeur est calculée par rapport à l'autre partie qui n'a pas subi ce traitement.

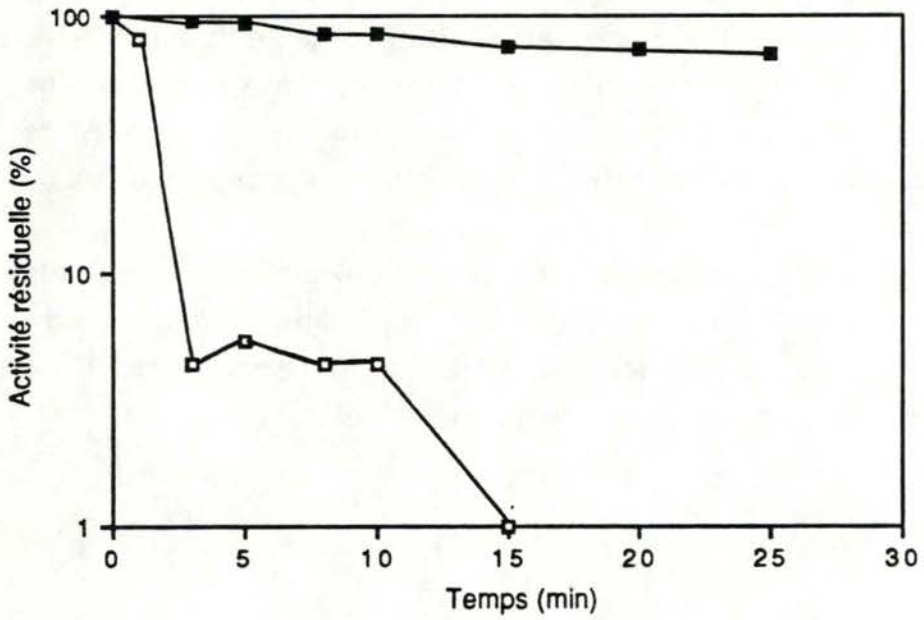


Figure III-34 : Evolution de l'activité GPX en fonction du temps d'incubation à 45°c d'une fraction soluble de fibroblastes WI-38 jeunes en culture divisée en deux, dont une partie a été diluée avec du PBS additionné de 0,7 mg/ml d'ovalbumine (□) et l'autre n'a pas été diluée (■). La fraction non diluée contenait 0,7 mg/ml de protéines. Activités de départ : 6,2 U.E/ml (■), 4,1 U.E/ml (□).

surnageant est décanté et divisé en aliquots de 350 µl dans des tubes calibrés et ceux-ci sont placés dans un bain thermostatisé à 45° C précis. Les tubes sont prélevés à différents temps et plongés dans la glace. L'activité enzymatique de chacun d'eux est ensuite dosée.

2.2.3.2.1 Effet de la congélation

Puisque nous soupçonnions la congélation d'être un facteur contrariant la reproductibilité des résultats, nous avons testé ce facteur avant et après avoir effectué la thermoinactivation. La figure III-31 présente l'évolution de l'activité de la GPX au cours de l'incubation à 45°C d'une fraction cytosolique diluée dont une partie a été congelée à -70°C pendant une semaine avant de réaliser l'inactivation thermique. Il apparaît clairement que après une semaine de congélation, l'enzyme s'inactive plus vite que son homologue non congelé. L'activité résiduelle après 30 minutes d'incubation à 45°C de l'enzyme congelée n'est plus que de 1 %; elle est de 12,5 % pour l'enzyme non congelée.

L'enzyme dont les résultats de thermoinactivation sont présentés à la figure III-32 a été congelée après l'inactivation à 45°C et avant d'effectuer le dosage. La congélation de la solution a fait perdre plus de 25 % de l'activité absolue de l'enzyme mais ceci de manière uniforme pour les différents tubes. En effet, ramenée au tube non chauffé à 45°C, l'évolution de la perte d'activité est très semblable pour les deux courbes avec malgré tout une légère perte d'activité aux temps plus longs, après congélation. L'effet de la congélation après traitement thermique est donc faible. Il faut cependant noter que dans ces deux expériences (figures III-31 et III-32), l'activité de départ, le pourcentage de la durée de vie accompli et la dilution de la fraction cytosolique étaient différents`.

2.2.3.2.2 Effet de la concentration en protéines et de la dilution

Nous avons testé ces deux facteurs d'abord indépendamment l'un de l'autre puis simultanément. La figure III-33 exprime les résultats obtenus lorsque une fraction soluble de fibroblastes WI-38 est incubée pendant 30 minutes à 45°C avec différentes concentrations ajoutées en ovalbumine. La concentration en protéines dans la fraction cytosolique est de 0,8 mg/ml. On peut voir que la concentration en protéines étrangères n'influence pas l'inactivation thermique de l'enzyme dans cette zone de

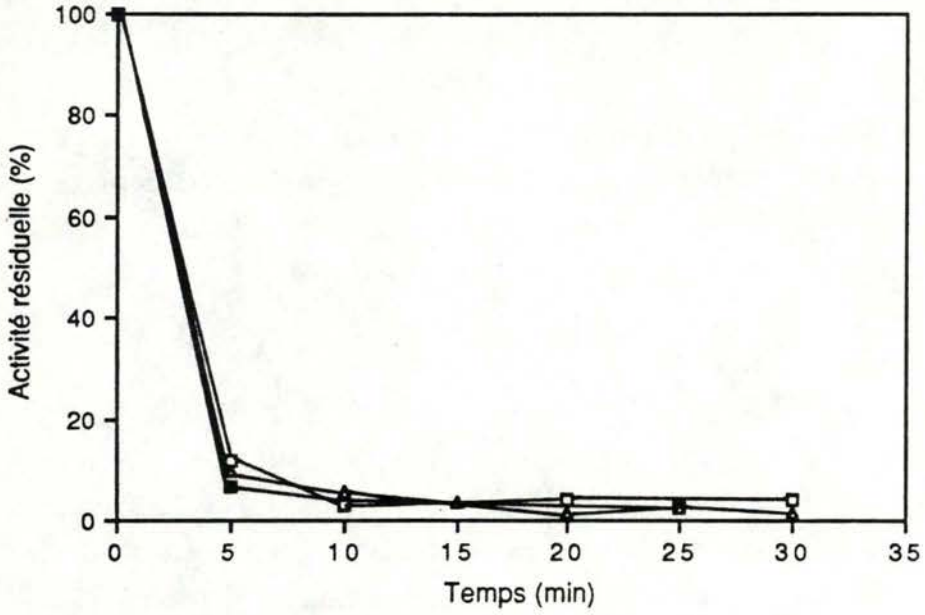


Figure III-35 : Effet simultané de la dilution et de la concentration en protéines. Evolution de l'activité de la GPX au cours d'une incubation à 45°c d'une fraction soluble de fibroblastes divisée en trois et qui furent diluées avec du tampon de prélèvement des cellules sans protéines (■) ou contenant 0,5 mg/ml d'ovalbumine (Δ) ou 1,5 mg/ml d'ovalbumine (□). L'activité avant inactivation était de 4,8 U.E/ml.

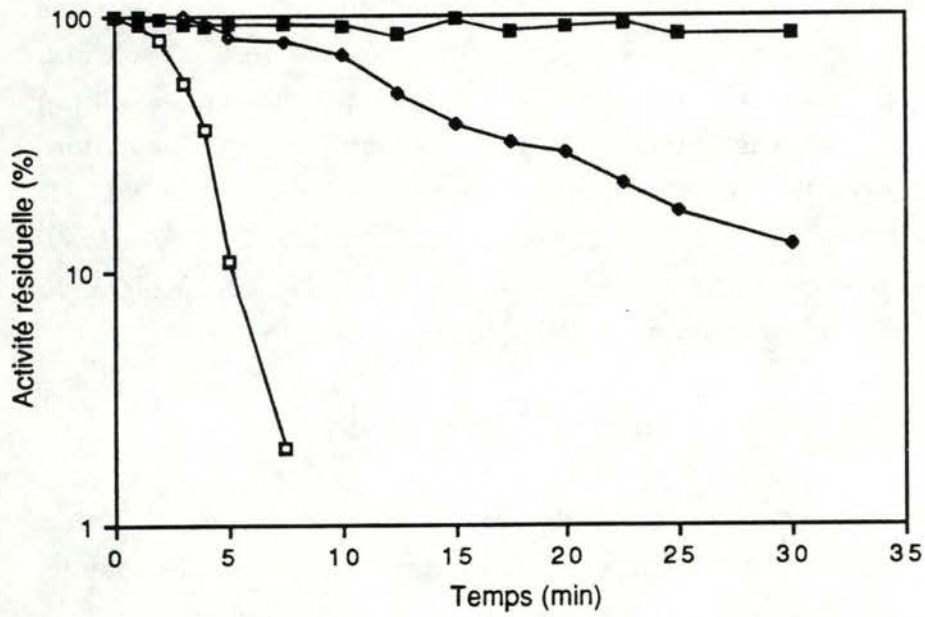


Figure III-36 : Evolution de l'activité de la GPX en fonction du temps d'incubation à 45°c d'une fraction soluble de fibroblastes WI-38 (G 45) divisée en trois et dont chaque partie a été diluée différemment. Activités de départ : 6,9 U.E/ml (□), 10,8 U.E/ml (◆), 22,9 U.E/ml (■).

concentrations puisque les valeurs d'activité résiduelle n'augmentent pas et restent comprises autour des 12 % par rapport au contrôle. Nous avons alors testé l'effet de la dilution sur l'inactivation thermique. Une fraction soluble a été divisée en deux. Une partie a été diluée 1,5 fois par du tampon additionné d'ovalbumine de manière à ce que la concentration en protéines ne varie pas avec la dilution. L'autre partie n'a pas été diluée. Les deux fractions ainsi obtenues ont été incubées pendant différents temps à 45°C. La figure III-34 montre clairement une inactivation rapide dans les premières minutes de l'enzyme se trouvant dans la fraction diluée.

L'effet simultané de la dilution et de la concentration en protéine a également été testé. une fraction soluble de fibroblastes a été divisée en trois tubes. Le premier a été dilué par du tampon seul, le deuxième par du tampon contenant 0,5 mg/ml d'ovalbumine et le troisième par du tampon contenant 1,5 mg/ml d'ovalbumine. La fraction non diluée contenait 1mg/ml de protéines. Chaque tube a fait l'objet d'une inactivation thermique dont les résultats sont exprimés à la figure III-35. On peut voir clairement que la quantité de protéines totales n'influence pas l'effet dû à la dilution. Les trois préparations d'enzyme ainsi diluées s'inactivent de manière spectaculaire au cours des premières minutes d'incubation. Pareille observation a déjà été mentionnée à la figure III-34. L'addition de l'ovalbumine ne permet pas de protéger la GPX.

2.2.3.2.3 Effet de l'activité enzymatique de départ

Suite à ces résultats, nous avons voulu tester l'importance de l'activité de la GPX dans la préparation sur sa vitesse d'inactivation thermique. La figure III-36 exprime les résultats de l'inactivation thermique d'une fraction soluble de fibroblastes diluée de manière à obtenir trois préparations ayant une activité enzymatique de départ différente. Cette fraction n'a pas été congelée. On remarque clairement que plus l'activité au départ est élevée et plus l'inactivation thermique est lente. On retrouve l'inactivation extrêmement rapide à la dilution la plus élevée.

Une expérience complémentaire a ensuite été réalisée en modifiant cette fois la quantité de GPX présente dans la préparation par addition d'enzyme purifiée. Une fraction soluble de fibroblastes a été diluée ou non diluée et additionnée d'enzyme purifiée afin d'obtenir des activités différentes; les courbes de thermolabilité à 45° C furent ensuite réalisées.

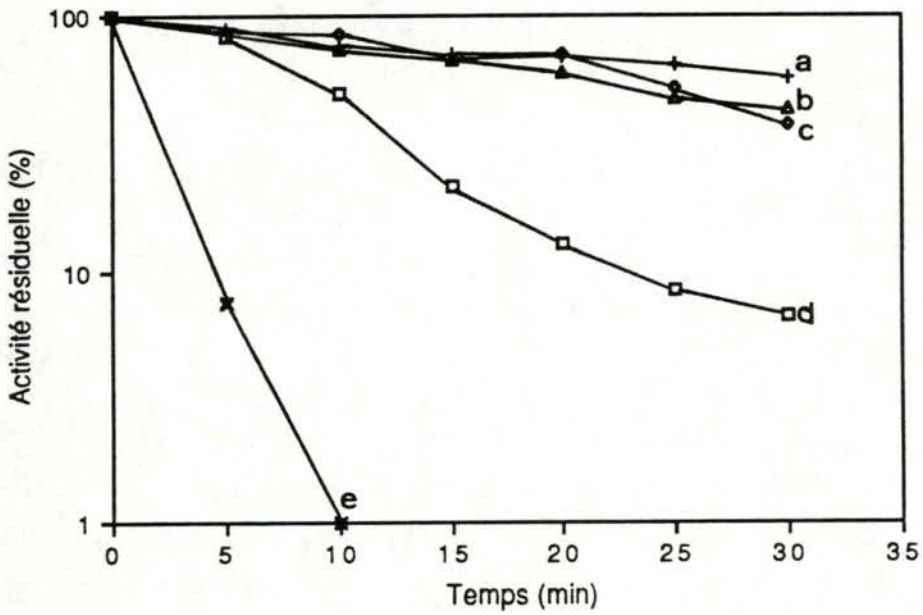


Figure III-37 : Evolution de l'activité de la GPX en fonction du temps d'incubation à 45°c d'une fraction soluble de fibroblastes WI-38 divisée en cinq et dont une partie est diluée (X, e), non diluée (□ d) ou additionnée d'enzyme purifiée (◊, c;Δ, b;+, a). Activités de départ : 4,1 U.E/ml (X), 7 U.E/ml (□), 11,9 U.E/ml (◊), 17,5 U.E/ml (Δ) et 21,4 U.E/ml (+).

La figure III-37 donne, comme pour la figure III-36, les résultats de l'inactivation thermique en fonction du temps d'incubation. Il apparaît clairement qu'une augmentation d'activité engendre une stabilisation importante de l'enzyme et une vitesse d'inactivation réduite. Celle-ci tend vers une valeur constante au-delà d'une certaine concentration en GPX. Les résultats des expériences réalisées sur la concentration en protéines, la dilution des fractions cytosoliques et l'activité de l'enzyme au départ d'une courbe d'inactivation, montrent clairement que c'est la concentration en enzyme qui est primordiale pour déterminer la façon dont l'inactivation thermique va se dérouler. Les résultats sur la dilution de la fraction cytosolique pouvait encore laisser supposer que c'était la concentration d'un des facteurs présents dans le milieu qui protégeait l'enzyme de l'inactivation thermique. La diminution de la vitesse d'inactivation observée lors de l'addition de GPX purifiée montre bien qu'il s'agit uniquement de la concentration de l'enzyme elle-même.

2.2.3.2.4 Effet des générations

Ayant mis en évidence l'influence de la congélation, de l'activité de départ et/ou de la dilution, en respectant ces paramètres, nous avons réalisé des courbes de thermolabilité sur des cellules d'âges différents. Des fractions cytosoliques provenant de cellules ayant accompli 58, 74, 87 et 89 % de leur durée de vie, non congelées et de même activité enzymatique de départ, ont été soumises à une incubation à 45°C pendant des temps croissants. La figure III-38 montre l'évolution de l'activité résiduelle en fonction du temps d'incubation pour ces différentes générations. On peut voir que la vitesse d'inactivation de l'enzyme est d'autant plus rapide que les cellules sont plus âgées. Après 10 minutes à 45°C, il reste respectivement 78,7%, 49,4%, 4,5% et 0,8% d'activité pour les 4 préparations suivant leur "âge". Ceci suggère donc l'existence d'une altération croissante de l'enzyme au cours du vieillissement cellulaire. Cette altération rendrait l'enzyme plus sensible à l'inactivation thermique.

2.2.3.2.5 Discussion des courbes de thermolabilité

Le manque de reproductibilité des courbes de température observé initialement (fig. III-27) nous a amené à étudier plus systématiquement

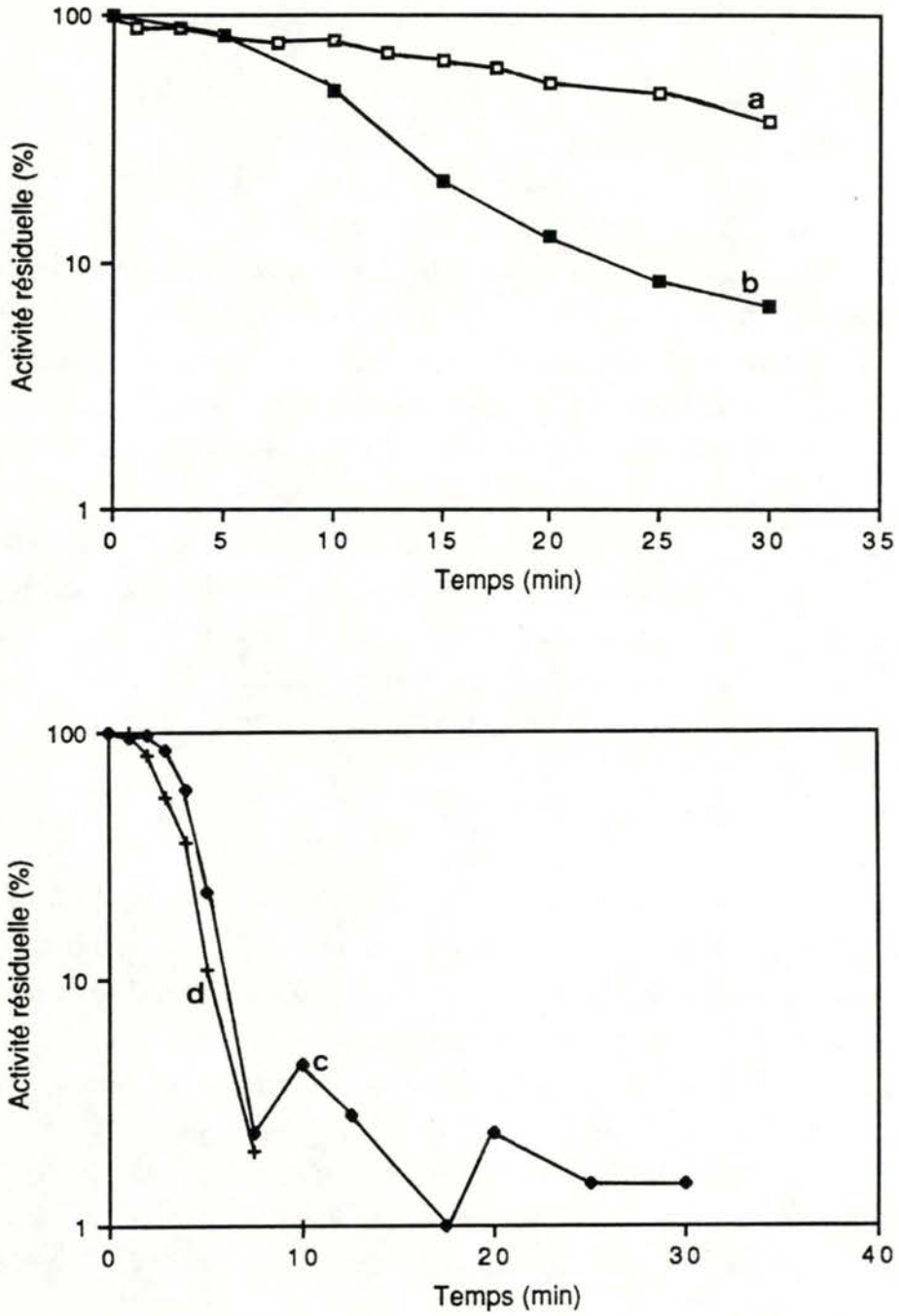


Figure III-38: Evolution de l'activité de la glutathion peroxydase en fonction du temps d'incubation à 45° C de fractions solubles provenant de cellules ayant accompli 58 (□ a), 74 (■, b), 87 (◆, c) et 89 (+, d) % de leur durée de vie. Les fractions n'ont été ni congelées, ni additionnées d'enzyme purifiée et ont toute la même activité enzymatique de départ: 7.0 U. E./ml.

l'effet des paramètres qui différaient d'une courbe à l'autre afin de pouvoir mettre en évidence le processus qui était à la base des variations de comportement de l'enzyme. L'étude de la stabilité de la GPX (fig. III-29) nous a indiqué que la dilution de l'enzyme et/ou la concentration en protéines pouvaient influencer la thermoinactivation. Dans les expériences réalisées afin de déterminer l'importance relative de ces deux facteurs, nous avons clairement montré que c'est la concentration de l'enzyme elle-même qui influence son comportement à haute température. Ce phénomène n'est pas un cas isolé pour la GPX. En effet, Ranieri-Raggi (1983) montre pour l'AMP déaminase de muscle squelettique de lapin un effet similaire de l'activité de départ sur l'inactivation à froid de l'enzyme. Sadana et Henley (1985) observent le même effet pour la G6PD de globule rouge de lapin et d'homme. Osborne *et al.* (1985) décrivent pour la lipoprotéine lipase du lait bovin que, comme dans les deux cas précédents et dans nos expériences, la vitesse d'inactivation augmente avec la diminution de la concentration en enzyme. Ces auteurs concluent que ce phénomène ne peut s'expliquer que par des interactions entre les molécules d'enzyme résultant en une modification de la structure de la population enzymatique lorsque sa concentration varie. Ranieri-Raggi (1983) propose un mécanisme d'inactivation en accord avec ses résultats, passant par la dissociation des sous-unités de l'enzyme. De plus, il est connu que pour des enzymes multimériques, il existe un équilibre entre les différents oligomères et les monomères de l'enzyme (Canceda *et al.* 1973, Bonsignore *et al.* 1971, Cohen et Rosemeyer 1968, Luther *et al.* 1986, Huang *et al.* 1987, Rendon *et al.* 1989) et Mc Evily et Harrisson (1986) montrent clairement que des fortes dilutions de la citrate synthétase porcine provoque une dissociation de cette enzyme dimérique en monomère. Dans le cas de la GPX, l'enzyme est tétramérique mais nous supposons que comme d'autres enzymes multimériques, il pourrait se dissocier en dimères. Suivant les lois de l'équilibre, la concentration de la molécule en solution influencera sa structure quaternaire de la manière suivante:

$1\,T \rightleftharpoons 2D$ T = tétramères

D = dimères

La constante d'équilibre lorsque les concentrations en D et en T sont à l'équilibre est $Keq = [D]^2 / [T]$.

Dans le cas où la préparation est diluée deux fois, T et D diminuent chacun leur concentration par 2, et on obtient un rapport qui diffère de la constante d'équilibre et qui vaut :

$[0.5\,D]^2 / [0.5\,T] = 0.25\,[D]^2 / 0.5\,[T] = 0.5\,([D]^2/[T])$. On voit donc qu'une dilution rompt l'équilibre. Celui-ci se rétablit alors par augmentation de [D] et diminution de [T].

Par conséquent, lorsqu'une dilution s'opère sur un tel système, la proportion de D s'élève par rapport à T; il y a dissociation des sous-unités. L'inverse se passe lorsqu'il y a concentration de l'enzyme.

Puisque nous observons que, lors de la dilution, l'inactivation thermique s'accentue et que, d'autre part, nous savons que la dilution provoque une dissociation de l'enzyme, nous pouvons donc supposer qu'une dissociation des sous-unités de l'enzyme accentue son inactivation thermique. Ceci nous permet d'avancer une hypothèse quant au mécanisme de l'altération de la GPX observée au cours du vieillissement à la figure III-38. Le raisonnement que nous proposons est le suivant :

L'immunotitration (fig. III-26) nous a montré que pour une même activité d'enzyme "jeune" et d'enzyme "vieille", la quantité de GPX en protéine est identique. Puisque l'activité des enzymes "jeunes" et "vieilles" est égale au départ des courbes de thermolabilité nous supposons donc que leur concentration en enzyme est identique. D'autre part, nous constatons que, lorsque l'âge de la culture augmente, les courbes d'inactivation thermique sont de plus en plus accentuées suivant ainsi le comportement obtenu par dilution. Par analogie nous pouvons donc penser que lorsque l'âge de la culture augmente et à concentration égale en GPX, il y a dissociation accrue des sous-unités.

L'hypothèse est donc qu'au cours du vieillissement, l'altération de la GPX est caractérisée par une modification de la constante d'équilibre entre les sous-unités, favorisant ainsi la dissociation des tétramères.

Sur base de cette hypothèse, est-il possible de décrire un modèle d'inactivation thermique qui rendrait compte des résultats expérimentaux?

Le mécanisme d'inactivation thermique des enzymes est un domaine qui connaît actuellement un intérêt grandissant. L'instabilité thermique des enzymes s'est présentée comme un frein majeur au développement de la biotechnologie et du génie enzymatique. Dès lors, les mécanismes d'inactivation thermique ont souvent été étudiés. De telles études permettent de mieux comprendre les relations entre la structure et l'activité des enzymes et d'agir ainsi de manière optimale afin de les stabiliser. (Sadana et Henley 1985, Sadana et Henley 1986, Henley et Sadana 1986, Ulbrich *et al.* 1986, Go 1975, Ahern et Klibanov 1985, Jorgensen et Andersen, 1986).

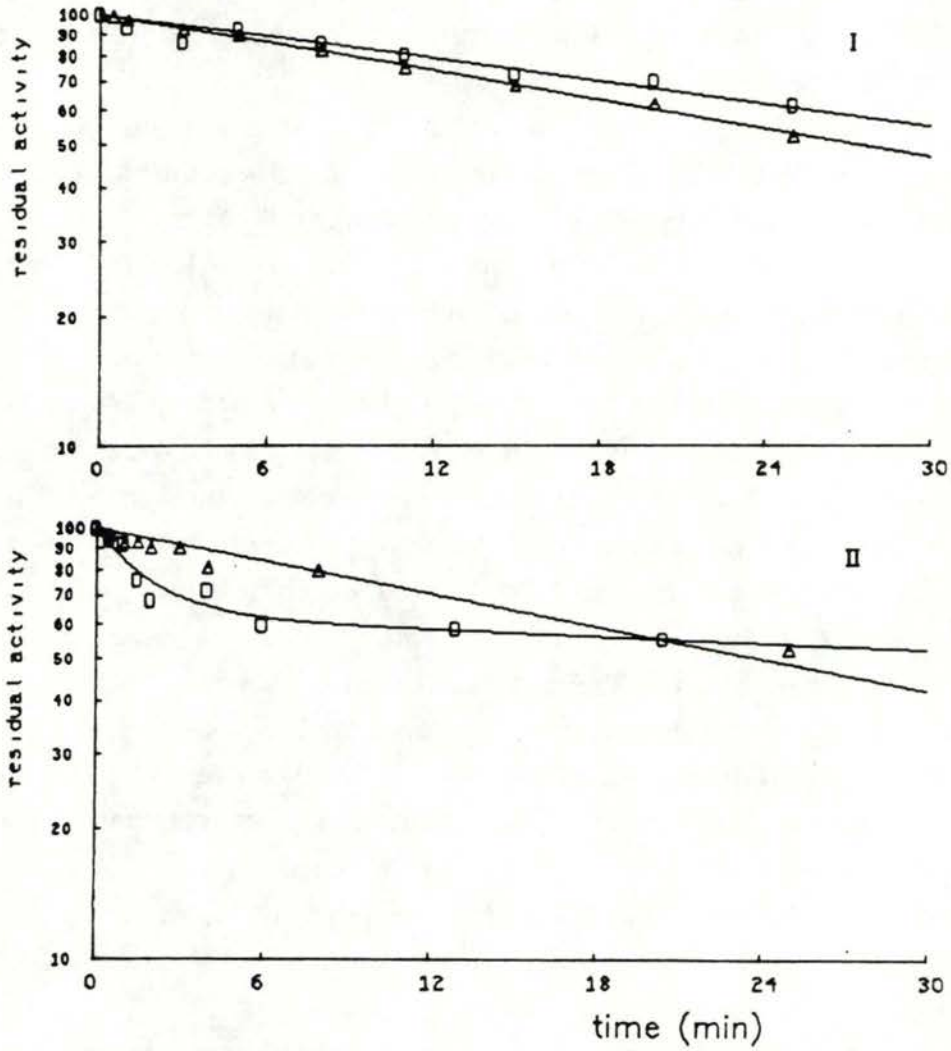


Fig. 1. Inactivation curves obtained at 70°C in the SET buffer on the mitochondrial (○) or cytoplasmic (□) SOD from cells at generation 29 (I), and 52 (II). The activities are expressed as percentages of maximal activity along side the incubation times. Curves have been optimized by a single exponential function except for curve IIB where optimization was obtained by the summation of two exponential functions. Statistical data are given in Table II.

Figure III-39 : Graphique représentant les courbes d'inactivation thermique de la SOD à différentes générations des fibroblastes en culture. La courbe II 0 correspond à l'équation générale (1) (Somville *et al.* 1985).

Grâce à ces études, divers modèles d'inactivation thermique ont pu être construits. Au laboratoire, deux enzymes ont déjà été étudiées en détail : la G6PD et la SOD (Houben *et al.* 1984 a et b; Somville *et al.* 1985, Mbemba *et al.* 1985). Leur inactivation thermique semble suivre un même modèle du type :

$$Y(t) = a1 \cdot \exp(-k1 \cdot t) + a2 \cdot \exp(-k2 \cdot t) \quad (1)$$

où Y représente l'activité mesurée en fonction du temps; a1 et a2 représentent les proportions de deux sous population d'enzymes qui suivent chacun une inactivation du premier ordre et de constante de vitesse d'inactivation de k1 et k2 respectivement. Il s'agit d'un modèle où deux formes enzymatiques différentes s'inactivent indépendamment l'une de l'autre, mais qui, exécutant la même réaction biochimique, contribuent toutes les deux à l'activité globale mesurée Y.

$$E1 \xrightarrow{k1} Ei$$

$$E2 \xrightarrow{k2} Ei \qquad Ei = \text{enzyme inactive.}$$

Si l'on se réfère à l'hypothèse émise ci-dessus, on pourrait imaginer que la forme jeune de l'enzyme serait sous forme tétramérique et correspondrait dans ce modèle à E1 alors que l'apparition des dimères lors du vieillissement correspondrait à l'apparition de la forme E2.

Ce modèle rend bien compte des courbes biphasiques expérimentales que l'on observe en échelle semi-logarithmique pour les deux enzymes citées notamment. Un exemple de ce type de courbes est illustré à la figure III-39 qui représente l'inactivation de la SOD de cellules à divers stades de vieillissement. Il n'est cependant pas possible avec ce modèle d'expliquer les courbes obtenues pour la GPX : droites, sigmoïdes ou convexes en échelle semi-logarithmique. Nous ne pouvons donc pas nous baser sur les connaissances de l'inactivation de la SOD ou de la G6PD pour comprendre le phénomène moléculaire responsable des courbes d'inactivation thermique de la GPX.

Modèle de l'inactivation consécutive

Après avoir éliminé plusieurs modèles dont celui de l'inactivation consécutive simple qui ne rendait pas compte de la complexité de nos courbes, nous avons étudié en détail celui proposé par Sadana et Henley (1985) dont les résultats expérimentaux semblaient se rapprocher des nôtres. Une première caractéristique de ce modèle est qu'il suppose que l'enzyme au départ n'existe que sous une seule forme. La deuxième caractéristique importante de ce modèle est que l'état enzymatique final n'a pas nécessairement une activité spécifique nulle :

$$E \xrightarrow{k1} E1 \xrightarrow{k2} E2$$

L'enzyme suit deux étapes irréversibles d'inactivation de premier ordre.

On suppose que E, E1 et E2 ont des activités spécifiques différentes. L'équation mathématique qui décrit l'évolution de l'activité totale en fonction du temps est la suivante

$$Y(t) = [1 + a1.\ k1/(k2 - k1) - a2.\ k2/(k2 - k1)] .\ \exp(-k1.\ t) - [k1/(k2 - k1)] .\ (a1 - a2) .\ \exp(-k2 .\ t) + a2 \quad (2)$$

où a1 et a2 représentent le rapport de l'activité spécifique de E1 et E2 respectivement sur l'activité spécifique de E (a1 = E1/E; a2 = E2/E). Par simulation sur ordinateur (logiciel Excel pour Macintosh de Apple), nous avons étudié l'impact des paramètres a1, a2, k1 et k2 sur la configuration des courbes répondant à l'équation. Nous avons remarqué que toutes nos courbes pouvaient s'ajuster sur ce modèle.

Nous avons limité la valeur de a1 à des valeurs proches de 1. Les raisons en sont les suivantes :

- Etant donné qu'il s'agit d'une inactivation enzymatique, il est peu probable que a1 prenne des valeurs plus élevées que 1. En effet, a1 représentant le rapport de l'activité spécifique de E1 sur l'activité spécifique de E, des valeurs de a1 > 1 signifieraient donc que la forme E1, première étape de l'inactivation, aurait une activité spécifique supérieure à la forme enzymatique de départ (E). Il n'est cependant pas interdit à a1 de prendre des valeurs supérieures à 1, ce qui signifie une activation de l'enzyme au cours de son incubation à 45°C dans un premier temps. Ce phénomène a déjà été observé pour la G6PD par exemple (Mbemba *et al.* 1985), la catalase

et l'alanine déshydrogénase (non publié). C'est un phénomène que nous n'avons jamais observé cependant pour la GPX.

- D'autre part, nous pouvons montrer qu'il est possible de décrire tous les résultats expérimentaux sans faire varier a1 à condition que celui-ci soit proche de 1. Par exemple, la courbe c de la figure III-38 coïncide avec une équation dans laquelle a1 est proche ou peut même être supérieur à 1 tandis que a2 tend vers 0,01. k1 et k2 sont également élevés.

Si on considère des valeurs de a1 plus grandes que 1,5 il n'est plus alors possible de décrire toutes les configurations en ne faisant varier que les trois autres paramètres. Des valeurs faibles (en-dessous de 0,9) ne permettent plus non plus de retrouver toutes les configurations observées en faisant varier les trois autres parmètres. Se basant sur le principe qui consiste à rechercher l'explication à la fois la plus simple et qui permet de rendre compte de tous les faits observables, nous avons travaillé avec des valeurs de a1 proches de 1.

L'étude de fonction détaillée est présentée dans l'annexe 2 de ce travail.

Evolution des paramètres a2, k1 et k2 dans les résultats obtenus.

Analyse des résultats présentés à la figure III-37

On constate dans ce graphique que l'activité de départ (ou la concentration) de l'enzyme affecte les propriétés de thermorésistance : plus l'activité de départ est faible, plus la thermorésistance est faible.

Par simulation, nous constatons que pour passer de la configuration de la courbe d à la configuration de la courbe e, il faut nécessairement une diminution de a2 et une augmentation de k1 et k2. Le passage de la configuration de la courbe a vers la configuration de la courbe d (en passant par b et c) peut être simulé par ces mêmes variations de a2, k1 et k2 bien que pour ces courbes cela ne soit pas absolument nécessaire. Ce passage peut aussi être simulé par une simple variation de k1 ou k2 par exemple.

On peut penser, en toute logique, que la dilution croissante de l'enzyme agit sur sa thermorésitance par un mécanisme unique et progressif c'est à dire continu. On s'attend par conséquent à ce que le passage de la configuration de la courbe a vers la configuration de la courbe e se fasse par une variation progressive d'un ou plusieurs paramètres (a2, k1 et k2). Puisque le passage de la configuration de la courbe d à la courbe e s'effectue

obligatoirement par une diminution de a2 et une augmentation de k1 et k2, il nous semble plus probable que le passage de la configuration de la courbe a à la configuration de la courbe e s'effectue aussi par une variation progressive des trois paramètres à savoir une diminution croissante de a2 et une augmentation croissante de k1 et k2. Ces variations dans la valeur de a2, k1 et k2 signifient que lorsque a2 diminue, l'activité spécifique de la dernière forme de l'enzyme (E2) diminue et que lorsque k1 et k2 augmentent la vitesse de passage de E vers E1 et E1 vers E2 augmente (la vitesse d'inactivation augmente).

Analyse des résultats présentés à la figure III-38.

Cette figure montre le même type d'évolution des courbes que la figure précédente mais cette fois avec une même activité au départ pour des enzymes provenant de cellules d'âges différents. Le même raisonnement peut être tenu pour l'évolution des paramètres lorsque la configuration passe de la courbe a à la courbe d. On peut même visualiser facilement dans cette figure que le passage de la configuration de la courbe b vers celle de la courbe c s'effectue par diminution de a2 et une augmentation de k1 et k2. En effet, pour des courbes sigmoïdes on peut se rendre compte facilement de la valeur de a2 puisque c'est la valeur vers laquelle tend Y(t) pour les temps élevés. Pour la courbe b, a2 est de l'ordre de 0,08 et pour la courbe c de 0,02 environ. L'augmentation de k1 et de k2 se reflète dans l'augmentation de la pente de la courbe. On peut donc postuler que la modification que l'enzyme subit au cours du vieillissement est du même type que celle qu'elle subit lors de la dilution.

En ce qui concerne l'effet de la congélation de la figure III-31, les deux courbes ont un a2 petit et le passage de la courbe a vers b peut s'effectuer par une augmentation soit de k1, soit de k2, soit de k1 et k2. Il n'est cependant pas interdit de penser que a2 soit également modifié. Remarquons également que k1 et k2 sont suffisament différents pour que la forme sigmoïde de la courbe n'apparaisse pas. Comme on le voit, l'étude qualitative ne permet pas ici de déterminer l'évolution des paramètres dans ce cas.

Interprétation biologique du modèle :

Nous pouvons estimer que les résultats expérimentaux s'ajustent bien

au modèle d'une inactivation consécutive de l'enzyme. Ceci suggère donc que l'inactivation de la GPX s'effectuerait en deux étapes. Dans une première étape, l'enzyme serait modifiée en une structure dont l'activité spécifique serait pratiquement aussi élevée que l'enzyme native mais qui en serait toutefois bien distincte. Nous avons en effet posé que a1 est proche de 1 ce qui veut dire que l'activité spécifique de la forme E1 est proche de l'activité spécifique de la forme native E. C'est la formation de cet intermédiaire qui donne à l'inactivation de la GPX son caractère particulier. La transformation est de premier ordre et affecte donc la vitesse d'inactivation de l'enzyme. Cet intermédiaire s'inactive à son tour suivant une réaction de premier ordre pour donner une enzyme dénaturée mais dont l'activité spécifique pourrait ne pas être nulle. A la température à laquelle nous travaillons et dans certaines conditions, la protéine tendrait donc vers une structure dénaturée (E2) mais relativement stable à cette température et encore active (a2 différent de 0).

La similitude de l'évolution de la configuration des courbes lors de la dilution et lors du vieillissement se retrouve donc dans l'évolution de la valeur des paramètres : a2 diminue alors que k1 et k2 augmentent.

a2 représente l'activité spécifique de la dernière forme enzymatique E2. Lors de la dilution, une des modifications qui apparaît est une diminution croissante de a2.

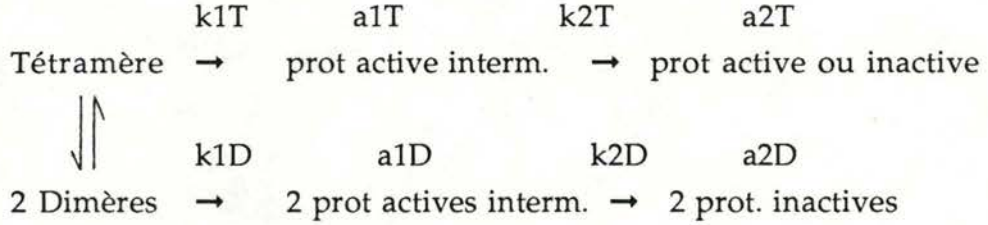
Il est difficile de croire que E1 et E2 pourraient être des formes continuellement variables d'une même enzyme avec des activités spécifiques variant continuellement en fonction des conditions expérimentales, par exemple la dilution.

Mais il a été montré que la dilution influençait l'équilibre entre les différents oligomères des enzymes. Nous proposons de réintroduire cette information dans notre modèle et de considérer E1 et E2 non pas comme des entités moléculaires uniques mais comme des proportions de tétramères et de dimères s'inactivant à des vitesses variables. En effet, lors de la dilution, on observe aussi une autre modification dans le comportement à haute température : k1 et k2 augmentent. Cela voudrait donc dire que lorsque la proportion de dimères par rapport aux tétramères augmente (dilution croissante) la vitesse d'inactivation (de passage de E vers E1 et de E1 vers E2) augmente. Par conséquent, nous pouvons penser que la vitesse d'inactivation des dimères est plus plus rapide que la vitesse d'inactivation des tétramères.

Ces proportions de dimères et de tétramères pouvant varier de manière

continue en fonction notamment de la dilution, elles entraînent une valeur de E1 et E2 variant aussi de manière continue.

Le modèle de Sadana et Henley n'explique pas l'effet de la dilution sur l'inactivation de l'enzyme. Nous avons donc complété ce modèle pour qu'il rende compte de nos résultats en incorporant la possibilité qu'a l'enzyme de se trouver sous forme de tétramère ou de dimère. Nous pouvons proposer le modèle suivant :



k1 serait une combinaison de k1T et k1D,
k2 serait une combinaison de k2T et k2D,
a1 serait une combinaison de a1T et a1D,
a2 serait une combinaison de a2T et a2D.

Les formes E1 et E2 du modèle général dont les activité spécifiques a1 et a2 variaient de manière continue en fonction des conditions expérimentales représentent bien maintenant 4 formes discrètes de l'enzyme ayant chacune une activité spécifique unique (a1T, a2T, a1D, a2D) mais dont la combinaison en proportion variable peut conduire à des valeurs variables de a1 et a2.

Suivant ce modèle, on peut imaginer que la dilution entraîne une variation continue de la proportion en tétramères et en dimères dans la forme intermédiaire E1. Ceci n'est pas en contradiction avec le fait que a1 ne varie pas. En effet, la première forme de l'inactivation (E1), qu'il s'agisse de tétramères ou de dimères est supposée avoir une activité proche de celle de la forme de départ (E). Par conséquent, a1 du tétramère et a1 du dimère doivent aussi être proches de 1 et a1 global reste proche de 1 quelle que soit

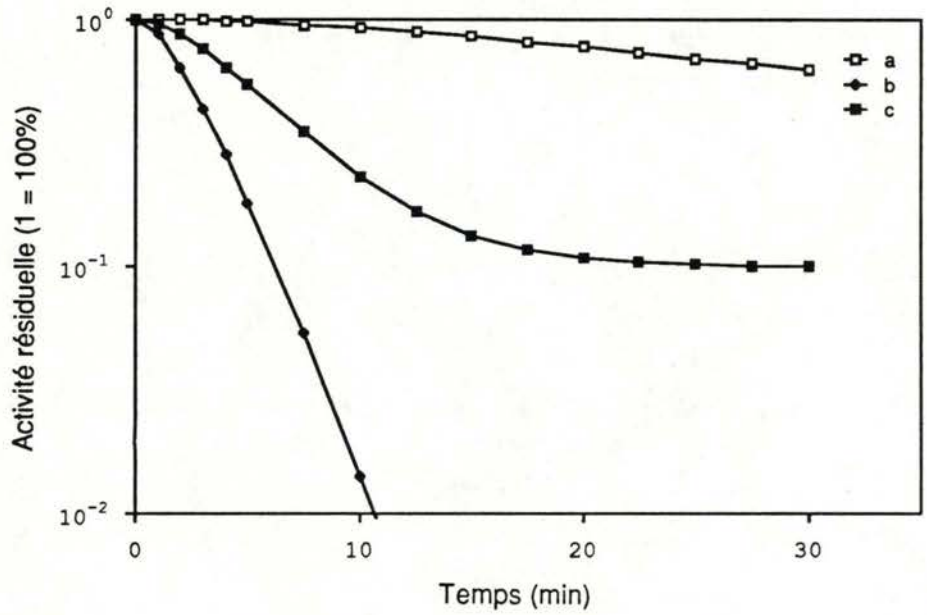


Figure III-40 : Courbes d'inactivation théoriques obtenues par calcul à partir de l'équation (2) du modèle. Paramètres de la courbe A : $\alpha 1 = 1$; $\alpha 2 = 0.2$; $k1 = 0.05$; $k2 = 0.055$. Courbe B : $\alpha 1 = 1$; $\alpha 2 = 0$; $k1 = 0.6$; $k2 = 0.65$. Courbe C : $\alpha 1 = 1$; $\alpha 2 = 0.1$; $k1 = 0.325$; $k2 = 0.352$.

la proportion de tétramères et dimères présents. Par contre, lorsque la dilution est forte, la proportion en dimères est très élevée et on constate dans les résultats que a2 tend vers 0. Ceci suggère que a2 du dimère est proche de 0. Lorsque la dilution est faible c'est la proportion en tétramère qui est très élevée et dans ce cas, on obtient des a2 non nul. Ceci suggère que a2 du tétramère a une valeur non nulle. Lors de la dilution, par conséquent, lorsque la proportion en dimères augmente, a2 global diminue, et ceci peut expliquer l'existence d'un nombre infini d'a2.

Nous pouvons montrer graphiquement que la présence simultanée de tétramères et de dimères donne bien le type de configuration que nous obtenons et ceci avec des valeurs discrètes des divers paramètres du modèle.

Si nous posons a1T = 1; a2T = 0,2; k1T = 0,05; k2T = 0,055; a1D = 1; a2D = 0; k1D = 0,6; k2D = 0,65 et que nous faisons varier le rapport tétramères/dimères de 1 jusque 0, nous obtenons des courbes théoriques montrées à la figure III-40.

La présence des seuls tétramères donne une droite d'inactivation à faible pente (A); la présence des seuls dimères donne une courbe convexe de forte pente (B); la proportion croissante de dimères par rapport aux tétramères donne des courbes dont la configuration évoluera de A vers B en passant par des courbes sigmoïdes. Par exemple pour une population de tétramères et de dimères telle que chacune des formes de l'enzyme participe pour moitié aux paramètres globaux de l'équation (a1 = 1, a2 = 0,1, k1 = 0,325, k2 = 0,352) on obtient la courbe C. Ceci ne représente pas une situation de départ où les tétramères et les dimères seraient en quantités équivalentes.

Dans le développement général du modèle, nous n'avons pas émis de restrictions quant à l'évolution de l'équilibre tétramères/dimères au cours de l'inactivation : il est certain que cet équilibre peut se modifier en cours d'expérience principalement du fait que la vitesse d'inactivation du dimère semble beaucoup plus rapide que celle du tétramère. Ceci ne remet pas du tout en question le modèle proposé ci-dessus mais apporte une incertitude quant à la contribution respective des dimères et tétramères dans le processus d'inactivation.

On constate que les courbes théoriques III-40 représentent bien une évolution des courbes telles qu'on peut les observer par exemple en diluant l'enzyme tétramérique, la courbe C correspondant à un mélange de dimères et de tétramères comme pour la courbe X de la figure III-37. Si ce modèle représente bien les résultats expérimentaux, on peut se demander si un modèle plus simple ne pourrait pas non plus satisfaire à ces exigences. Etant

donné les résultats obtenus sur l'inactivation de la G6PD et de la SOD, on pense notamment à une dissociation à haute température du tétramère en dimère qui pourrait alors s'inactiver. Dans ces conditions, E1 représenterait la forme dimérique active de l'enzyme. Ce modèle simplifié ne peut être correct essentiellement pour les raisons suivantes :

- Si E1 représentait le dimère, le modèle d'inactivation ne pourrait être linéaire E → E1 → E2. En effet, il faut expliquer pourquoi nous observons des valeurs de a2 différentes par exemple lors de dilutions croissantes. Une seule forme moléculaire E2 ne permettrait de visualiser qu'une seule valeur de a2. Pour obtenir plusieurs a2, il faudrait imaginer que le dimère (E1) s'inactiverait selon plusieurs voies différentes pour donner plusieurs structures différentes. Le modèle minimum deviendrait :

E → E1 → E2
→ E2'

Dès lors, l'expression mathématique du modèle serait différente de celle que nous avons ici. De plus biologiquement, il est peu probable qu'une structure (E1) dans un même environnement et à une même température s'inactive de deux ou de plusieurs manières différentes.

- Le modèle mathématique utilisé ici est tel que E1 ne peut être présent au départ de l'inactivation. Si l'on postule l'existence d'un équilibre préalable entre les tétramères et les dimères, cette condition n'est pas remplie. Si les dimères représentaient E1, l'équation mathématique serait différente de celle que nous avons ici. Elle serait du type de l'équation de Ullbrich *et al.* (1986) :

$$Y(t) = X \cdot \exp(-k1.t) + (1 - X) \cdot \exp(-k2.t)$$

$$\text{où } X = ((KA - KB.k1/(k1 - k2)) \cdot [E]_0) \; / \; (KA \cdot [E]_0 + KB \cdot [E1]_0)$$

et $[E]0$ représente la concentration en E au temps t = 0
$[E1]0$ représente la concentration en E1 au temps t = 0
KA représente l'activité spécifique de E
KB représente l'activité spécifique de E1

E2 est inactif, ce qui semble correspondre à nos résultats où le dimère placé à 45°C produit une protéine inactive.

Ce modèle tient compte de l'existence avant le début de l'inactivation thermique de la proportion en forme E1 et E2.

Des simulations sur cette équation ont également été réalisées et ne

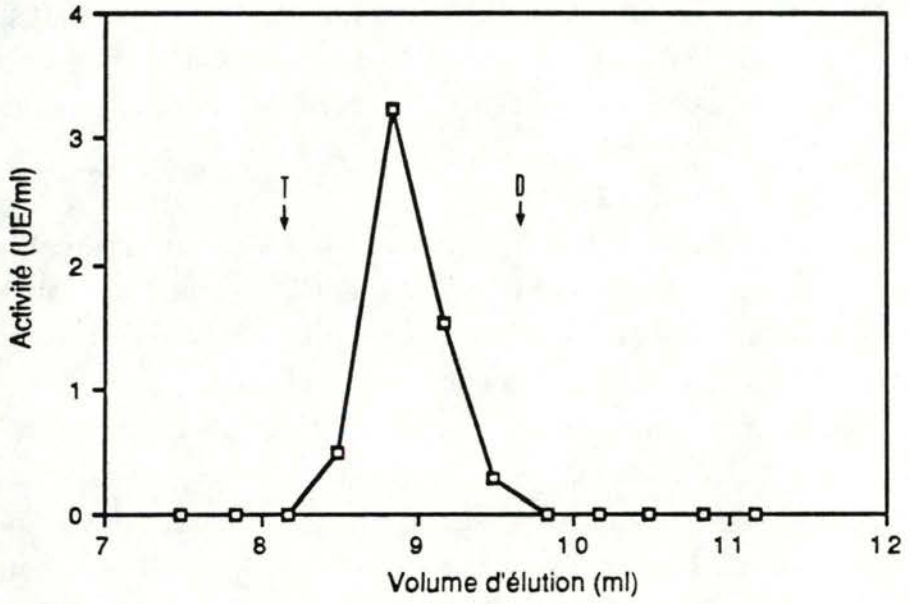


Figure III-41 : Activité de la GPX mesurée dans des volumes collectés à la sortie d'une colonne de chromatographie d'exclusion HPLC TSK G3000 SW (7.5 mm X 300 mm). De la GPX purifiée a été diluée et passée directement sur la colonne. Selon l'étalonnage les tétramères devraient passer à 8.14 ml (T) et les dimères à 9.64 ml (D).

permettent pas de retrouver les courbes sigmoïdes caractéristiques de l'inactivation de la GPX telle que nous l'observons.

En conclusion, nous conserverons donc le modèle complexe présenté ci-avant et répondant globalement à l'équation (2) de Sadana et Henley (1985)

L'étude qualitative de cette fonction (2) ne permet pas de quantifier a1, a2 k1 et k2. Une régression non linéaire serait nécessaire pour déterminer ces valeurs. Nous ne pouvons donc être certain de l'évolution de ces paramètres dans nos courbes expérimentales. Cependant, vu les nombreuses courbes de thermolabilité que nous avons réalisées, vu le caractère physique du sujet de notre étude et les connaissances que nous avons du comportement enzymatique, il est sûr que ces paramètres ne peuvent pas prendre n'importe quelle valeur et que les contraintes sur ces valeurs sont très importantes. Notre modèle rend compte de toutes les observations réalisées, il est donc plausible et ne semble pas pouvoir être réduit sans perte d'information.

2. 2. 4 Approches visant à confirmer le modèle d'altération de la GPX.

Le modèle que nous avons proposé repose sur une modélisation des courbes d'inactivation et constitue donc une approche indirecte. Des approches directes étaient souhaitables pour confirmer ou infirmer ce modèle. Pour ce faire, nous avons utilisé des techniques de chromatographie d'exclusion, et d'électrophorèse en conditions non dissociatives de manière à mettre en évidence les tétramères et les dimères dans différentes conditions.

2.2.4.1 Problèmes techniques liés aux colonnes HPLC TSK G 3.000 SW.

La figure III-41 montre l'élution de l'activité de la GPX purifiée déposée sur une colonne d'exclusion TSK 3.000 W. L'enzyme s'élue en un pic unique. Cependant le poids moléculaire moyen de ce pic calculé à partir de la droite d'étalonnage serait de 67.000 soit un poids moléculaire médian entre celui des tétramères et celui des dimères. L'expérience recommencée plusieurs fois a donné les mêmes résultats. Nous nous sommes interrogés alors sur le poids moléculaire de l'enzyme que nous avions. Toute la littérature renseigne un poids moléculaire pour la GPX compris entre 80.000 et 95.000 (Flohé *et al.* 1973, Chiu *et al.* 1976, Awasthi *et al.* 1979, Chaudière et

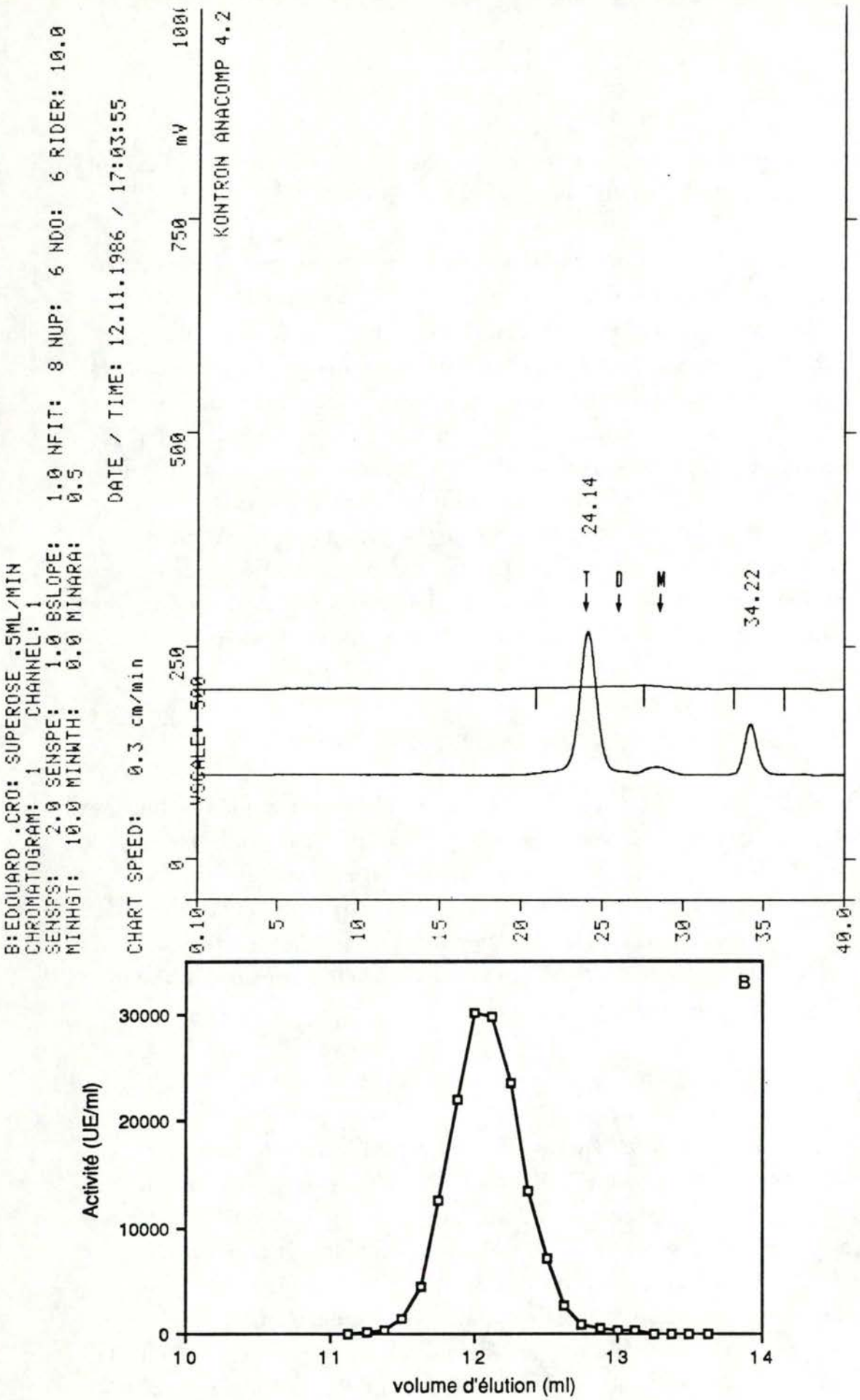


Figure III-42 : A : Chromatographie d'exclusion sur une colonne Superose 12 (10 mm X 300 mm) de GPX purifiée. 72 µg dans 50µl de NaH_2PO_4 50 mM pH 7,0 NaCl 0,9 % sont injectés sur la colonne. Mesure de l'absorbance à 280 nm, débit : 0.5 ml/min (temps d'élution = 2 X volume d'élution).
B : Mesure de l'activité GPX de l'éluat de la colonne de chromatographie de la figure A.

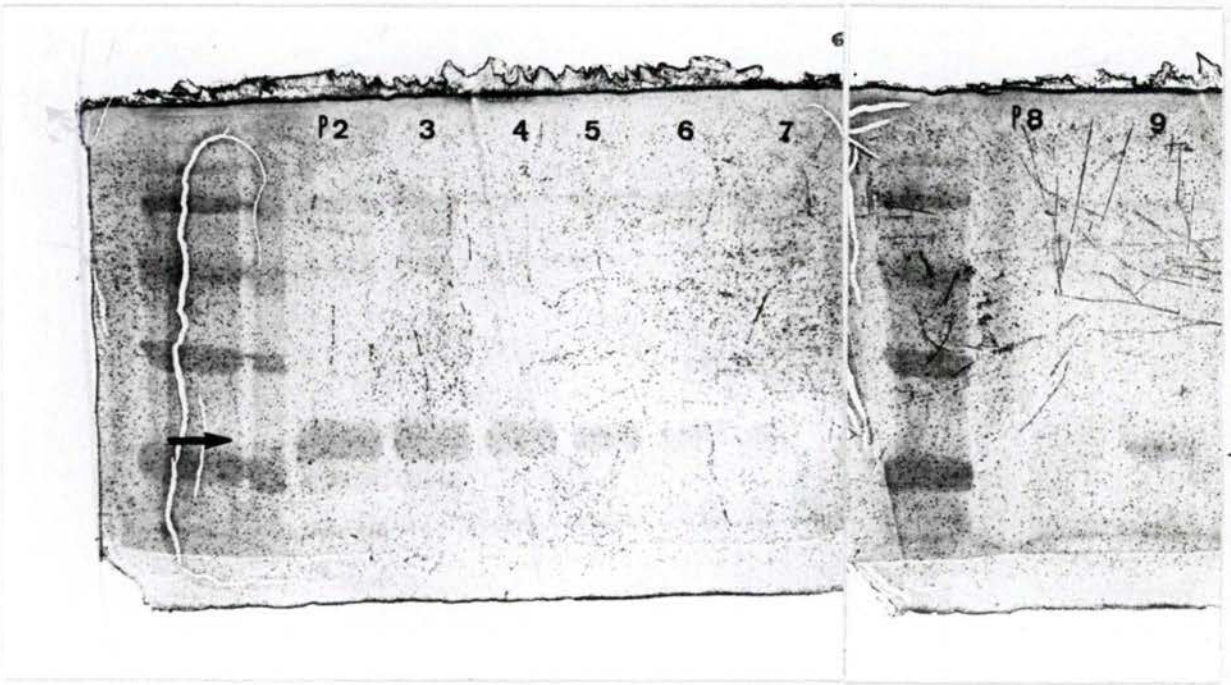


Figure III-43 : Electrophorèse en conditions dénaturantes de différentes fractions d'élution de la colonne de chromatographie d'exclusion de la figure III-42. Coloration à l'argent.

P2 : Fraction du volume d'élution de 11.75 ml à 12.37 ml.
P3 : Fraction du volume d'élution de 12.37 ml à 12.5 ml.
P4 : Fraction du volume d'élution de 12.5 ml à 12.62 ml.
P5 : Fraction du volume d'élution de 12.62 ml à 12.75 ml.
P6 : Fraction du volume d'élution de 12.75 ml à 13 ml.
P7 : Fraction du volume d'élution de 13 ml à 13.25 ml.
P8 : Fraction du volume d'élution de 13.25 ml à 13.5 ml.
P9 : Fraction du volume d'élution de 14 ml à 14.25 ml.

Tappel 1983, Broderick *et al.* 1987. Les électrophorèses en conditions dénaturantes (voir chapitre 1.2) nous donnait pour le monomère de l'enzyme un poids moléculaire de 23.000 environ. Nous avons réalisé egalement des chromatographies d'exclusion sur une colonne Superose 12 et dans ce cas nous avons constaté que le poids moléculaire calculé donnait 85.000 (figure III-42). La présence de GPX dans ce pic fut confirmée par des électrophorèses en conditions dénaturantes des éluats de cettes colonne (figure III-43). On peut donc penser que la GPX a une affinité particulière pour la colonne TSK qui retarde son élution. Ce phénomène a été également observé pour des fragments F(ab)2 d'anticorps qui s'éluent sur une colonne d'exclusion classique (Ultrogel ACA 44) à un poids moléculaire de 100.000 alors que sur la TSK G 3.000 SW ils s'éluent autour de 85.000. Ce renseignement une fois connu, nous avons dû réaliser certaines expériences sur la colonne TSK. En effet, la dilution élevée des fractions cellulaires sur la Superose 12 engendrait des problèmes de seuil de détection à la sortie de la colonne, ce qui était beaucoup moins le cas pour la TSK G 3.000 SW.

Les figures III-42 et III-43 montrent que l'enzyme pure se trouve presqu'exclusivement sous forme tétramérique. Selon l'étalonnage, les tétramères doivent s'éluer à 24,1 minutes, les dimères à 26,2 minutes et les monomères à 28,6 minutes (sur chaque graphique est indiqué par une flèche le moment où doivent s'éluer, selon l'étalonnage, les tétramères (T), les dimères (D) et éventuellement les monomères (M)). Aucun pic n'est détecté à 26,2 minutes (figure III-42) et aucune bande n'apparaît en électrophorèse pour ce volume d'élution (figure III-43, 13 ml, P7, P8). Par contre, un pic (à 28,5 minutes environ), et une bande en électrophorèse (P9) correspondant aux monomères apparaissent nettement. Ces monomères représentent probablement l'enzyme dénaturée suite aux traitements de la purification et aux quelques cycles de congélation et décongélation que l'aliquot de l'enzyme pure à subi.

2.2.4.2 Activité enzymatique des dimères.

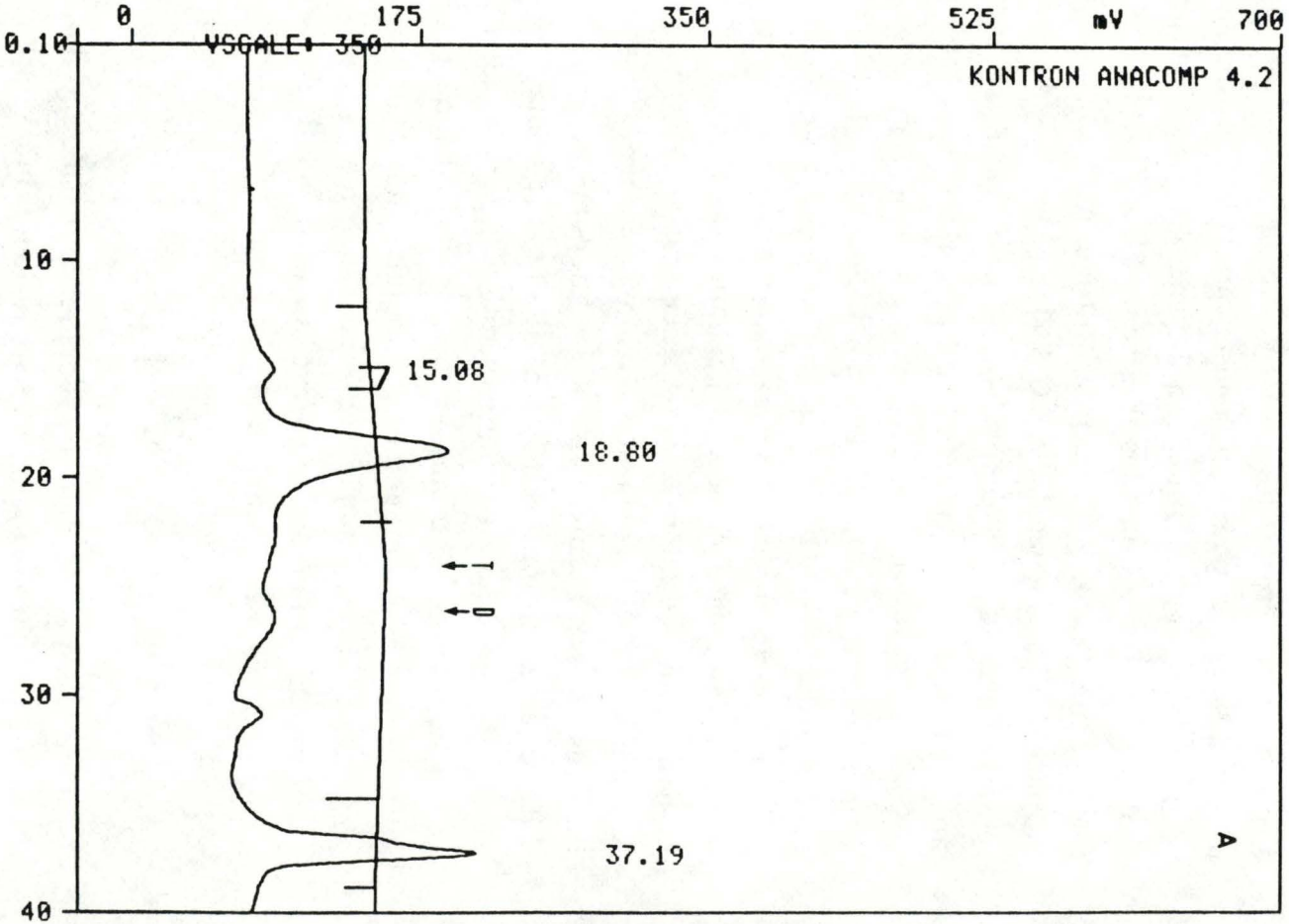
Pour essayer de mettre en évidence les tétramères et les dimères de l'enzyme par chromatographie d'exclusion, il fallait être sûr que les dimères étaient actifs car les quantités de protéines représentées par la GPX sont très faibles et il est donc impossible de les mettre en évidence sur base d'une détection des protéines dans une fraction soluble cellulaire.

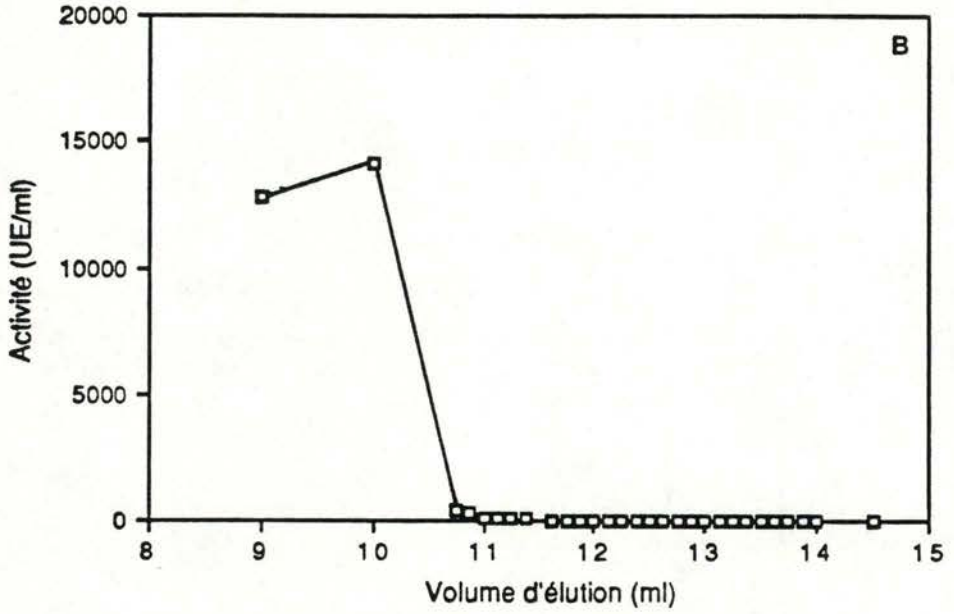
Pour mesurer l'activité des dimères, nous avons essayé de faire

B:EDOUARD .CRO: SUPEROSE 12 0.5ML/MIN
CHROMATOGRAM: 1 CHANNEL: 1
SENSPS: 2.0 SENSPE: 1.0 BSLOPE: 0.5 NFIT: 8 NUP: 6 NDO: 6 RIDER: 10.0
MINHGT: 3.0 MINWTH: 0.0 MINARA: 0.5

DATE / TIME: 04.07.1986 / 08:44:36

CHART SPEED: 0.3 cm/min





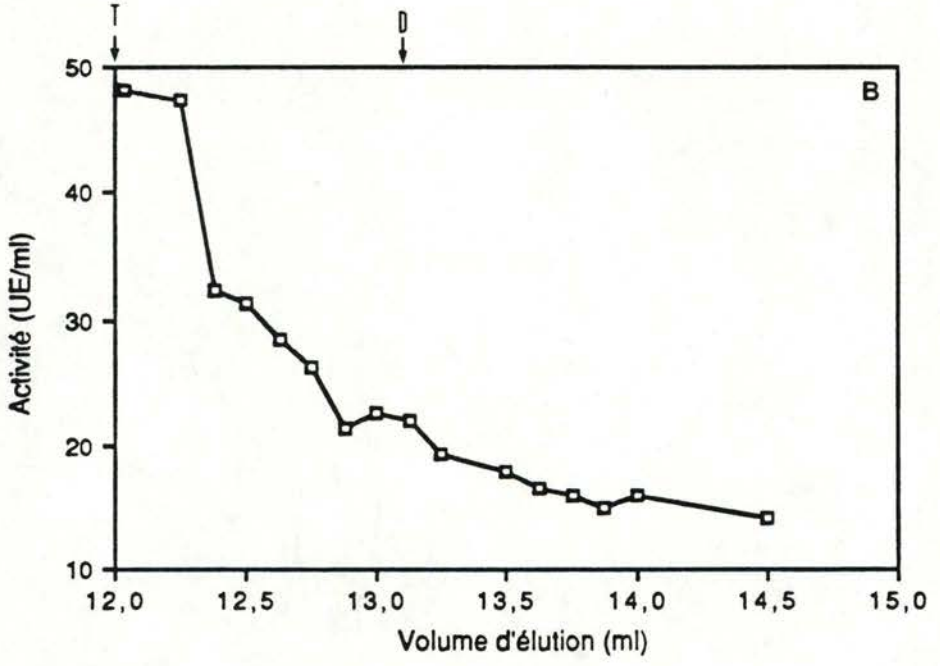
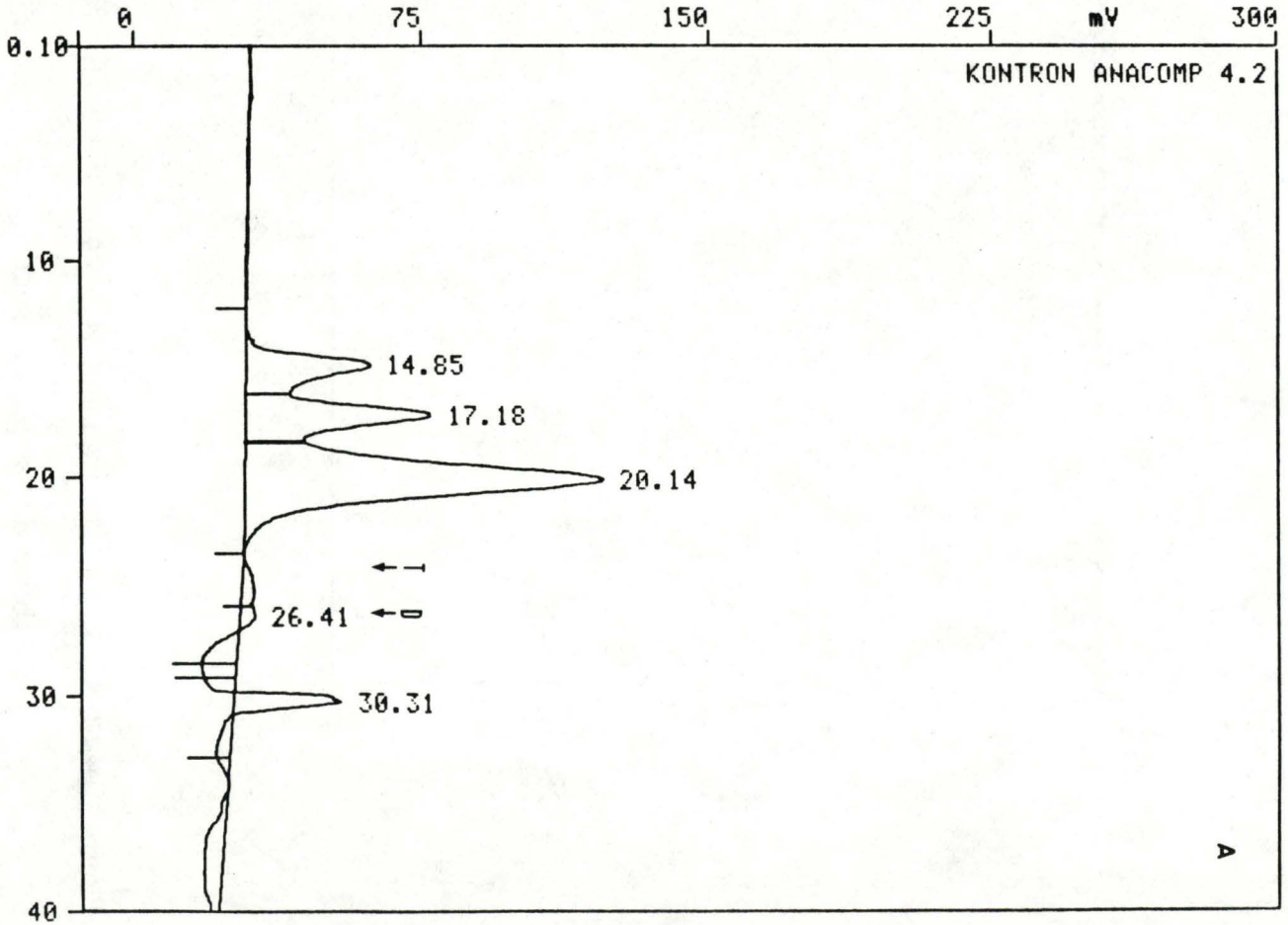


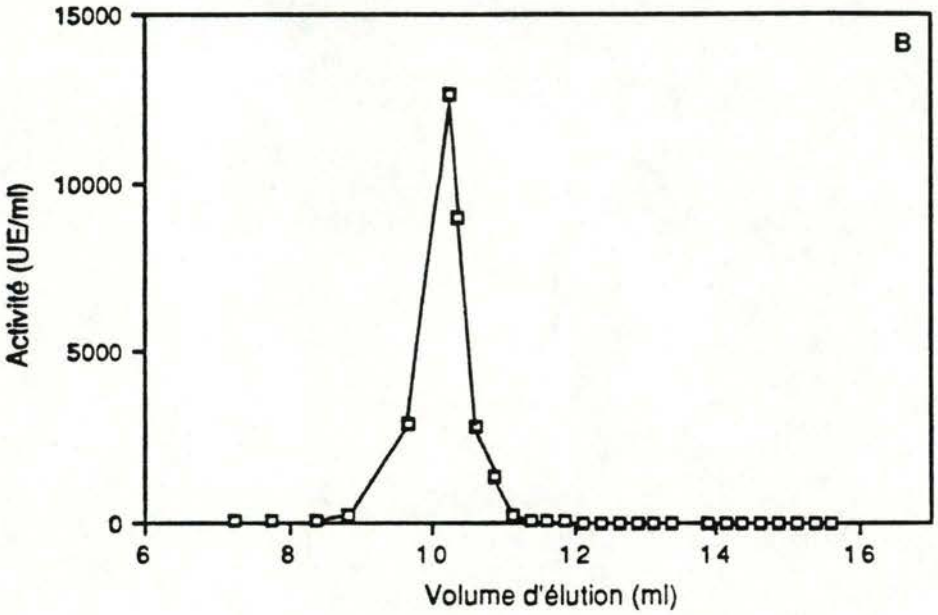
Figure III-44 : A : Chromatographie d'exclusion sur une colonne Superose 12 (10 mm X 300 mm) de GPX purifiée et incubée préalablement à pH 9 pendant 24 heures. Mesure de l'absorbance à 280 nm à la sortie de la colonne. Débit : 0,5 ml/min.
B : Mesure de l'activité GPX dans les fractions récoltées à la sortie de la colonne de la chromatographie à deux échelles différentes.

B:EDOUARD .CRO: SUPEROSE 12 0.5ML/MIN
CHROMATOGRAM: 1 CHANNEL: 1
SENSPS: 2.0 SENSPE: 1.0 BSLOPE: 0.5 NFIT: 8 NUP: 6 NDO: 6 RIDER: 10.0
MINHGT: 3.0 MINWTH: 0.0 MINARA: 0.5

DATE / TIME: 08.08.1986 / 08:19:43

CHART SPEED: 0.3 cm/min





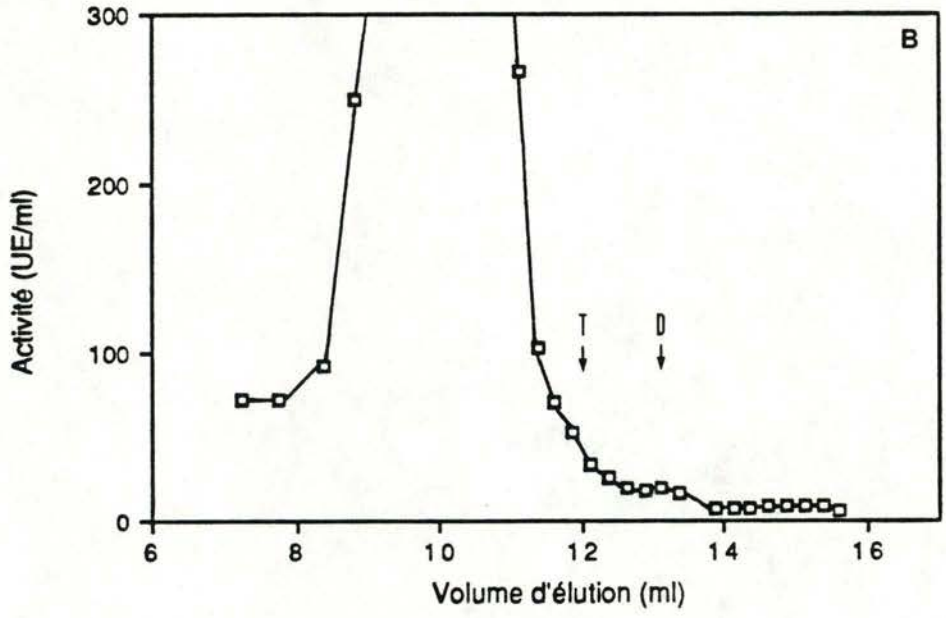


Figure III-45 : A : Chromatographie d'exclusion sur une colonne superose 12 (10 mm X 300 mm) de GPX purifiée et incubée préalablement à pH 6,5 pendant 24 heures. Mesure de l'absorbance à 280 nm à la sortie de la colonne. Débit : 0,5 ml/min.
B : Mesure de l'activité GPX dans les fractions récoltées à la sortie de la colonne de la chromatographie à deux échelles différentes.

apparaître cette forme de l'enzyme en l'incubant à divers pH. On sait (Rendon *et al.* 1989, McEvily et Harrisson 1986, Luther *et al.* 1986, Cohen et Rosemeyer 1969) que le pH peut influencer l'équilibre entre les sous-unités d'une enzyme. Nous avons incubé la GPX à pH 9 et à pH 6,5 pendant 24 heures avant de passer l'échantillon sur une chromatographie d'exclusion. Les figures III-44 et III-45 montrent les chromatogrammes obtenus et la mesure de l'activité de la GPX. Ce que l'on observe avant tout est que dans ces deux conditions, la GPX s'agrège pour former des complexes de PM élevés. A pH 9, on distingue 4 pics à 1.528.000 daltons (pic à 15,08 min.), 436.000 daltons (pic à 18,8 min), 38.600 daltons (pic à 26,3 min) et < 5.000 daltons (pic à 37,19 min.). L'activité se retrouve de 15 à 30 minutes d'élution (7.5 à 15 ml d'élution). Le pic de PM < 5.000 daltons ne possède pas d'activité GPX : il est indéterminé. Le pic principal (436.000 daltons, 18,8 minutes ou 9,4 ml d'élution) correspond à peu près à l'agrégation de 5 tétramères de GPX. Le pic de 38.600 daltons (26 minutes, D) correspond aux dimères de l'enzyme. Lorsqu'on étudie l'activité GPX de ces pics d'absorbance, on constate une légère augmentation au niveau de ce pic de 38.600 daltons. Cependant, selon la droite d'étalonnage, les tétramères doivent s'éluer à 24,1 minutes (12 ml) et sur la figure III-44 A on peut voir que la quantité de protéine qui s'élue à ce moment (mesurée par la densité optique à 280 nm) est identique à celle qui s'élue à 26 minutes alors que sur la figure III-44 C, l'activité GPX qui s'élue à 13 ml (26 minutes) est deux fois plus faible que celle qui s'élue à 12 ml (24 minutes, T).

A pH 6,5, le même phénomène d'agrégation apparaît encore plus important, donnant lieu ici à des pics de 1.650.000 (14,85 minutes), 753.000 (17,18 minutes), 278.000 (20,14 minutes) daltons. L'enzyme tétramérique existe encore (24,5 minutes) et la forme dimérique semble également présente (26,41 minutes). Cependant, de nouveau, alors que la densité optique s'élève aux environs de 26 minutes, l'activité ne montre qu'un épaulement sans pic véritable. La quantité de protéine qui s'élue à 24,5 minutes est de nouveau identique à celle qui s'élue à 26,41 minutes mais l'activité GPX correspondant à ces deux pics (12,2 ml et 13,2 ml respectivement) n'est pas identique; elle est 1,54 fois plus élevée à 12,2 ml qu'à 13,2 ml. Les résultats de ces expériences nous suggèrent que les dimères possèdent une activité mais leur activité spécifique serait légèrement inférieure à celle des tétramères.

Etant donné que les calculs d'activité spécifique des tétramères vis à vis des dimères ont été réalisés à partir de profil d'élution qui ne présentent pas

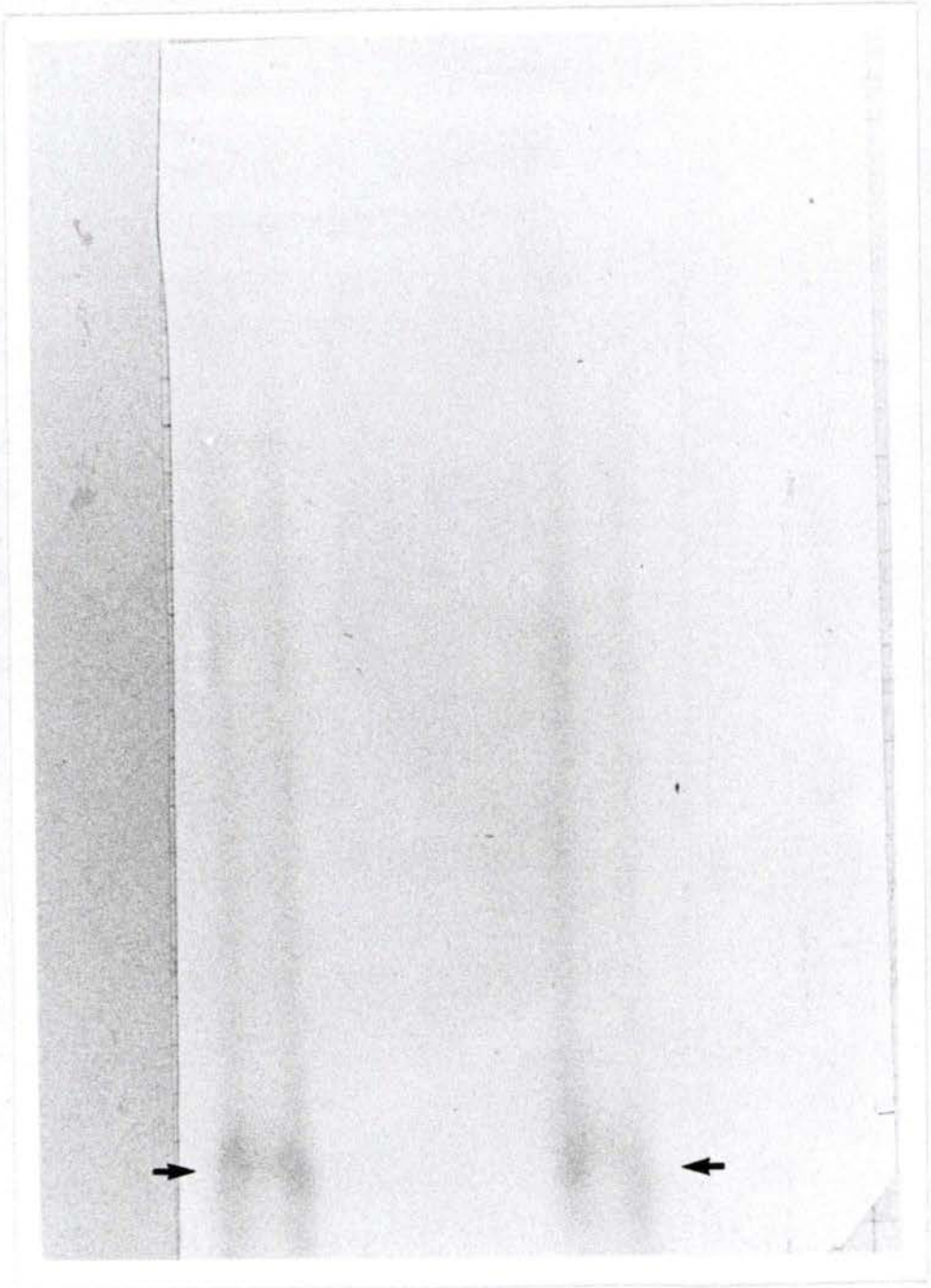


Figure III-46 : Electrophorèse en conditions non dénaturantes de GPX pure (3 µg). Gel d'acrylamide 7%, migration 8,5 heures, révélation par immunoblotting.

des pics francs de tétramères et de dimères, nous avons effectué un autre type d'expérience visant également à déterminer ces activités spécifiques. Selon le principe de la dissociation des sous-unités lors de la dilution, il suffisait de réaliser une mesure de l'activité de l'enzyme en fonction de la dilution. Plus la dilution est grande et plus la dissociation est importante, plus la proportion de dimères par rapport aux tétramères augmente. Par conséquent, si l'activité spécifique du dimère est identique à celle du tétramère, une dilution par un facteur x doit entraîner une diminution de l'activité d'un facteur x. Par contre, si cette activité spécifique est moindre ou nulle, au fur et à mesure de l'augmentation de la proportion de dimères, on observera une diminution d'activité supérieure à ce facteur x. Nous avons réalisé cette expérience avec de l'enzyme purifiée et en attendant jusque 30 minutes après la dilution pour mesurer l'activité. Celle-ci est restée directement proportionnelle à la dilution (non montré) infirmant ainsi les résultats que nous avions calculé à partir des chromatographies d'exclusion. De ces expériences nous pouvons conclure que les dimères semblent bien actifs mais que nous ne pouvons pas nous prononcer sur le rapport entre l'activité spécifique des tétramères et l'activité spécifique des dimères.

2.2.4.3 Tentative de mise en évidence directe des dimères.

Nous avons réalisé d'autres expériences visant à mettre en évidence des tétramères et des dimères de l'enzyme par des méthodes directes. Nous avons effectué plusieurs types d'expériences à partir de l'enzyme purifiée : incubation à 4°C pendant 24 heures, conditions qui favorisaient aussi la dissociation des sous-unités de la G6PD (Houben *et al.* 1984 a et b, Mbemba *et al.* 1985), incubation de l'enzyme avec de fortes concentrations en sel (2,5 M NaCl), dilution importante de l'enzyme avant la chromatographie d'exclusion. Nous n'avons cependant jamais pu observer d'activité enzymatique ni de pic d'absorption à 280 nm dans les fractions correspondant au volume d'élution des dimères. Seuls les tétramères étaient observables. Nous avons également réalisé parallèlement des chromatographies d'exclusion et des électrophorèses en conditions non dénaturantes révélée par immunoélectroblotting. La figure III-46 montre une électrophorèse de ce type réalisée sur l'enzyme pure où une seule bande

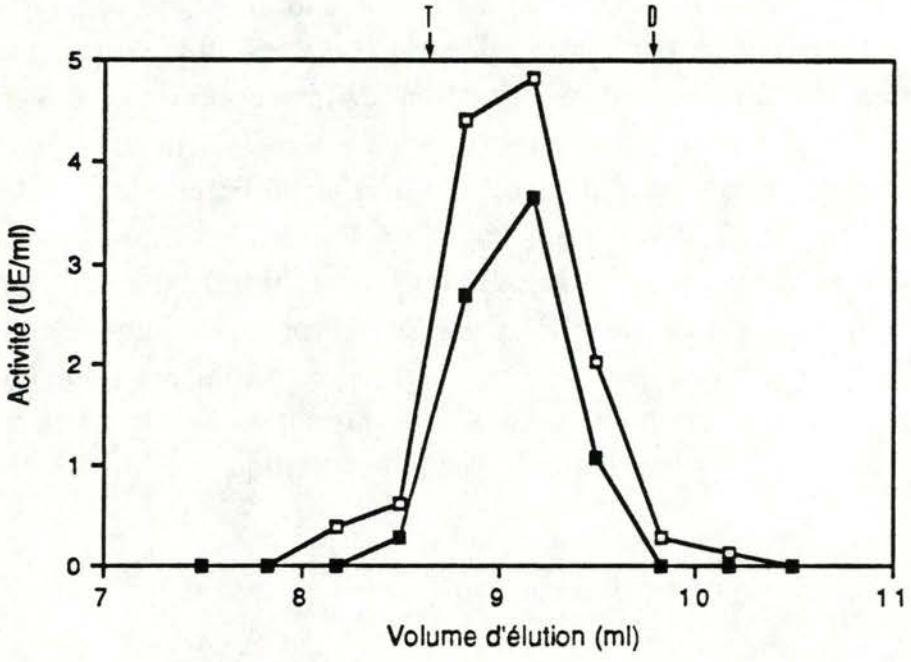


Figure III-47 : Chromatographie d'exclusion sur une colonne TSK G 3000 SW (7.5 mm X 300 mm) de deux fractions solubles de fibroblastes WI-38 jeunes (□ 56 % de leur durée de vie) et vieux (■, 90 % de leur durée de vie) préparées fraîchement. Mesure de l'activité GPX dans l'éluat de la colonne. Selon l'étalonnage, les tétramères devraient passer à 8,65 ml et les dimères à 9,78 ml.

est détectable. Des électrophorèses réalisées sur des fractions solubles de fibroblastes jeunes et vieux préparés fraîchement nous ont donné les mêmes résultats (une seule bande) et les chromatographies ne révélaient qu'un seul pic au niveau des tétramères (Figure III-47). Par contre des fractions solubles de fibroblastes jeunes et vieux congelés et décongelés deux fois ne révèlent qu'un seul pic en chromatographie d'exclusion (Figure III-48) alors que l'électrophorèse révélée par immunoblotting (Figure III-49) montre l'existence de deux bandes. Il y a de bonnes raisons de croire que la bande la plus intense représente les tétramères, comme ceux-ci sont la forme que nous avons toujours facilement détectée dans nos expériences et comme la chromatographie d'exclusion ne révèle qu'un seul pic correspondant aux tétramères. Des agrégats de GPX se sont révélés actifs (voir figures III-42 et III-43) et nous n'avons pas observé d'activité à la sortie de la colonne pour des poids moléculaires élevés. Ils est donc peu probable que des agrégats soient présents dans ces échantillons. Ces arguments suggèrent que la bande de plus forte intensité soit des tétramères et la bande d'intensité plus faible soit des dimères ou des monomères.

Il ne nous a donc pas été possible de mettre en évidence directement les dimères de l'enzyme. La très faible quantité de protéines observées au volume d'élution des dimères lors de la chromatographie de l'enzyme pure (figure III-42) ainsi que la difficulté de faire apparaître ces dimères dans diverses conditions nous suggèrent que la constante de dissociation des tétramères en dimères est faible défavorisant fortement cette dissociation. Ceci nous permet de penser que le phénomène de dissociation apparaît seulement pour des dilutions fortes de l'enzyme. Or, afin de pouvoir détecter l'enzyme à la sortie de la colonne de chromatographie, nous avons toujours travaillé avec des concentrations en GPX supérieures à celles que nous avons utilisé pour les courbes de thermolabilité. C'est probablement la raison pour laquelle nous n'avons pu mettre en évidence la présence de dimères par chromatographie, alors que ceux-ci sont présents lors des courbes de thermolabilité qui, elles, sont réalisées avec des activités très faibles (l'activité déposée sur chromatographie excède toujours 20 U.E/ml alors que les courbes de thermolabilité sont effectuées avec une activité de départ de 7 à 10 U.E/ml environ).

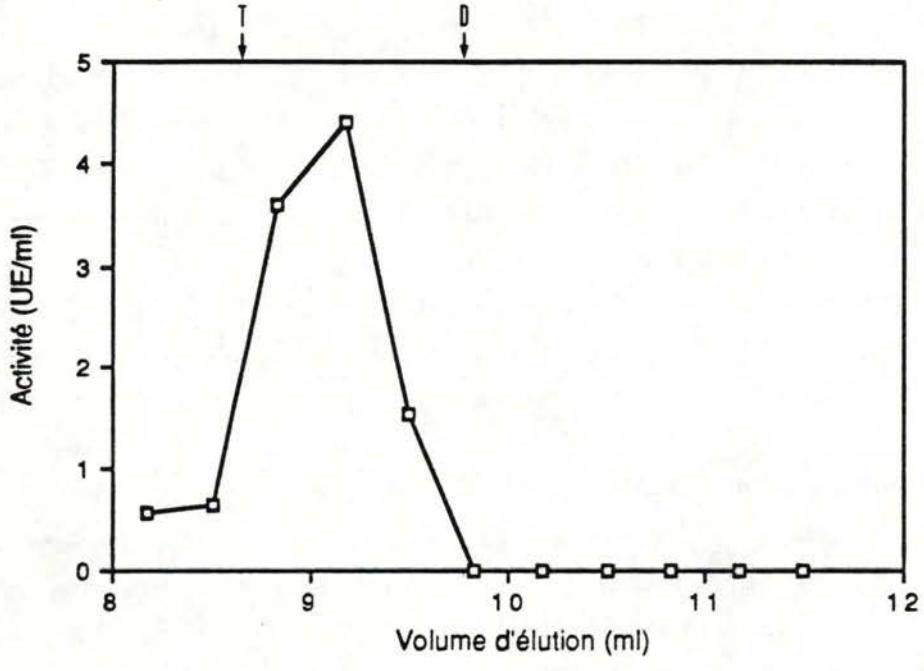


Figure III-48 : Chromatographie d'exclusion sur TSK d'une fraction soluble de fibroblastes WI-38 (G52) en culture qui a été congelée et décongelée deux fois. Mesure de l'activité GPX dans l'éluat de la colonne. Selon l'étalonnage, les tétramères devraient passer à 8,65 ml et les dimères à 9,78 ml.

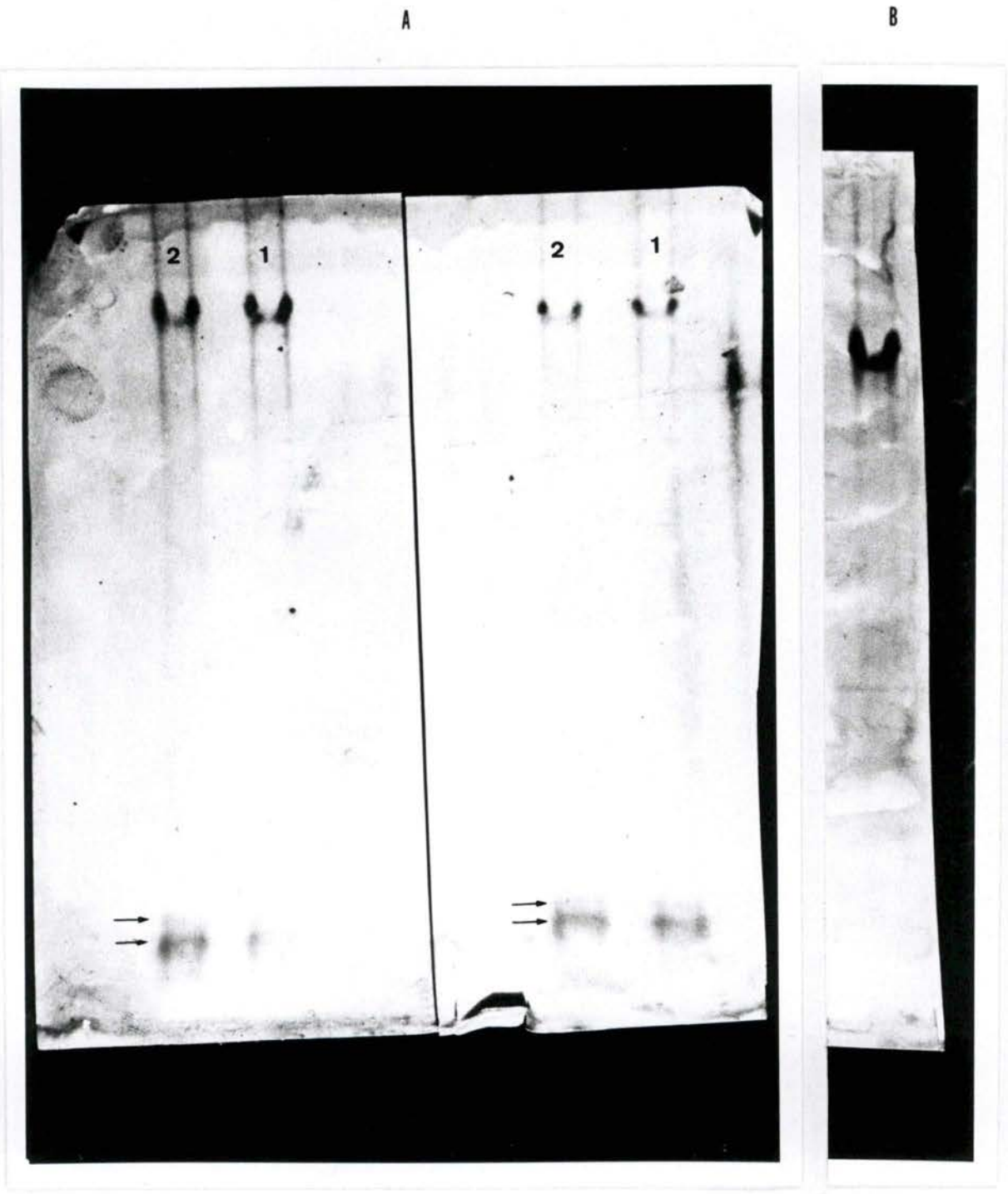


Figure III-49 : A Electrophorèse en conditions non dénaturantes de fractions solubles de fibroblastes G44 et G52 congelées et decongelées deux fois. Gel d'acrylamide 7 %, migration 8,5 heures, révélation par immunoblotting. 1 : G52, 2 : G44.
B. contrôle de la révélation de l'immunoblotting (les anticorps primaires ne sont pas déposés sur la feuille) avec une piste de fraction soluble de cellules jeunes.

2.2.4.4 Autres modifications possibles de l'enzyme.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce travail, divers types de modifications peuvent apparaître au cours du vieillissement. Nous avons voulu voir si une protéolyse partielle, une modification oxydative et l'incubation à pH élevé ne pouvaient pas provoquer une altération de même type que celle qui apparaît au cours du vieillissement. Pour ce faire, nous avons soumis l'enzyme à des conditions oxydantes, protéolytiques ou de pH élevé puis, nous avons réalisé des courbes de thermolabilité afin de voir si un comportement thermolabile identique à celui de l'enzyme "vieille" était induit.

2.2.4.4.1 Conditions oxydantes

a-Effet du TBHP

L'enzyme pure concentrée (5.500 U.E/ml) est incubée dans les mêmes conditions que lors de l'étude de l'inhibition par le TBHP pendant 11 minutes à 37°C avec ou sans TBHP 5.10^{-5} M. Les activités sont mesurées et les enzymes diluées avec du tampon phosphate 50 mM pH 7,4 et 1 mg/ml d'ovalbumine pour donner une activité identique dans le test et le contrôle. Cette activité est de l'ordre de l'activité de départ des courbes de thermolabilité de surnageant (10 U.E/ml). Les résultats présentés à la figure III-50 montrent que l'enzyme inhibée par le TBHP n'acquiert pas un comportement thermolabile différent de l'enzyme normale.

b-Effet des $OH^{\cdot}$

L'enzyme pure concentrée (5.500 U.E/ml) est incubée en présence de Fe^{++} $5.\ 10^{-5}$ M, Ascorbate 10^{-2} M, EDTA 1 mM pH 7,4 pendant 2 heures à 37°C. Le contrôle est incubé dans les mêmes conditions en absence d'ascorbate. Le contrôle et le test sont alors dilués avec du tampon phosphate 50 mM, EDTA 1 mM pH 7,4 contenant de la desferrioxamine 10^{-3} M et du mannitol 50 mM afin de stopper la production d'$OH^{\cdot}$. 1 mg/ml d'ovalbumine est aussi ajouté. Les activités sont égalisées de la même manière que pour l'expérience avec le TBHP. Les figures III-51 A et B montrent les résultats de cette expérience. On y constate un effet de diminution de la résistance thermique de l'enzyme suite à l'exposition aux

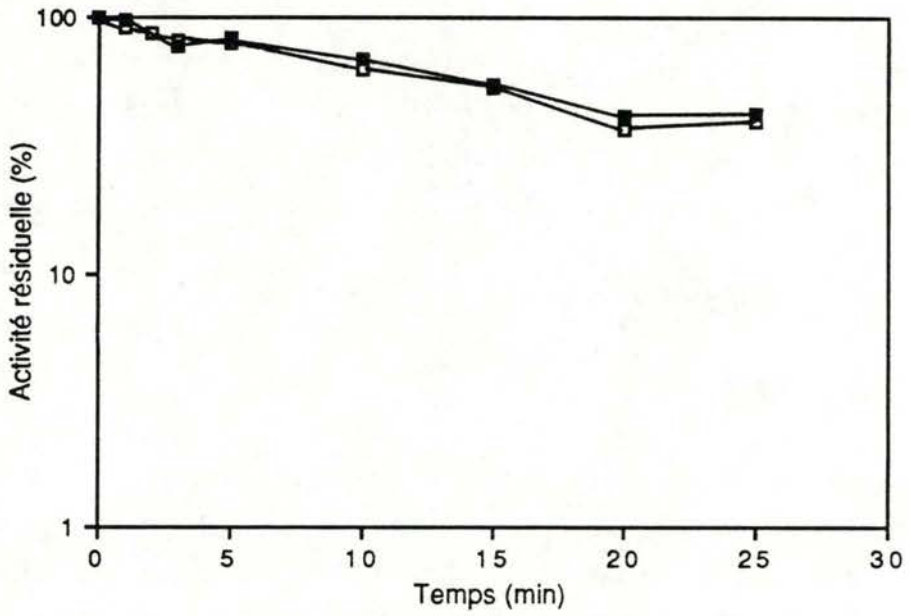
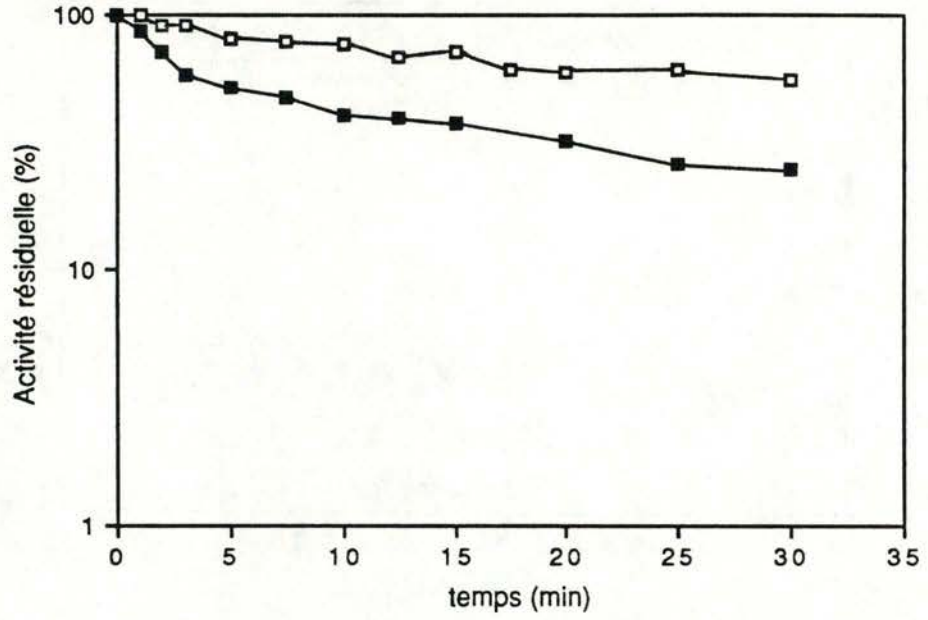


Figure III-50 : Evolution de l'activité GPX au cours de l'incubation à 45°c de l'enzyme purifiée préalablement mise en présence de TBHP 10^{-3} M pendant 11 min à 37°c puis amenée à 7.7 U.E./ml. □: incubée à 37°c sans TBHP, ■ : incubée à 37°c avec TBHP.



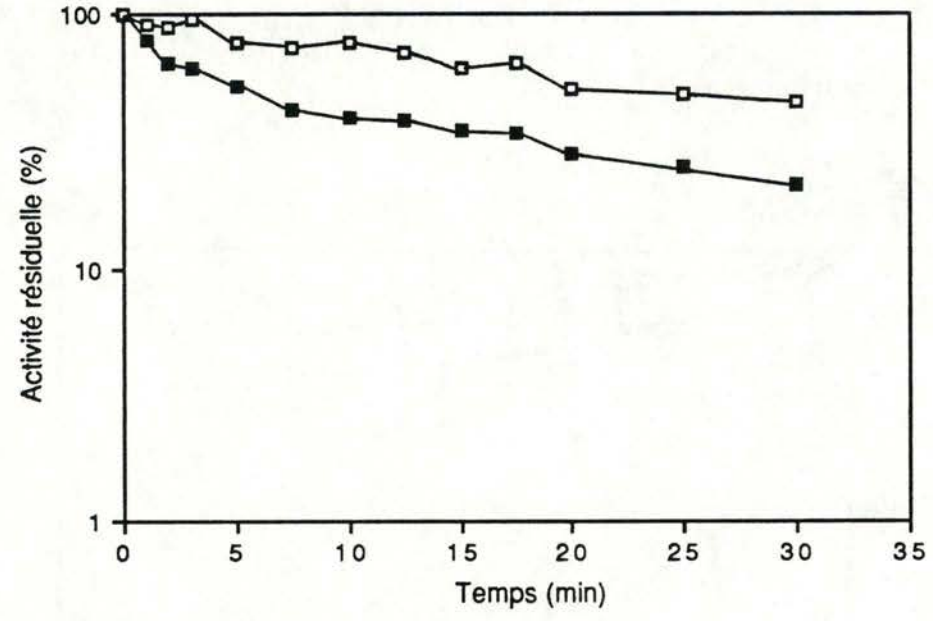


Figure III-51 : Evolution de l'activité GPX au cours de l'incubation à 45°c de l'enzyme purifiée préalablement mise en présence de ascorbate (10^{-2} M) et Fe^{++} (5 10^{-5} M) pendant 120 min à 37°c puis amenée à 7,0 U.E/ml (A) et 6,9 U.E/ml (B). La dilution de l'enzyme pour l'amener à cette activité fut réalisée avec du tampon phosphate 50 mM pH 7.4 EDTA 1 mM, mannitol 100 mM et desferrioxamine 10^{-3} M. □: incubée avec Fe^{++} seul à 37°c, ■ : incubée avec ascorbate/Fe^{++} à 37°c.

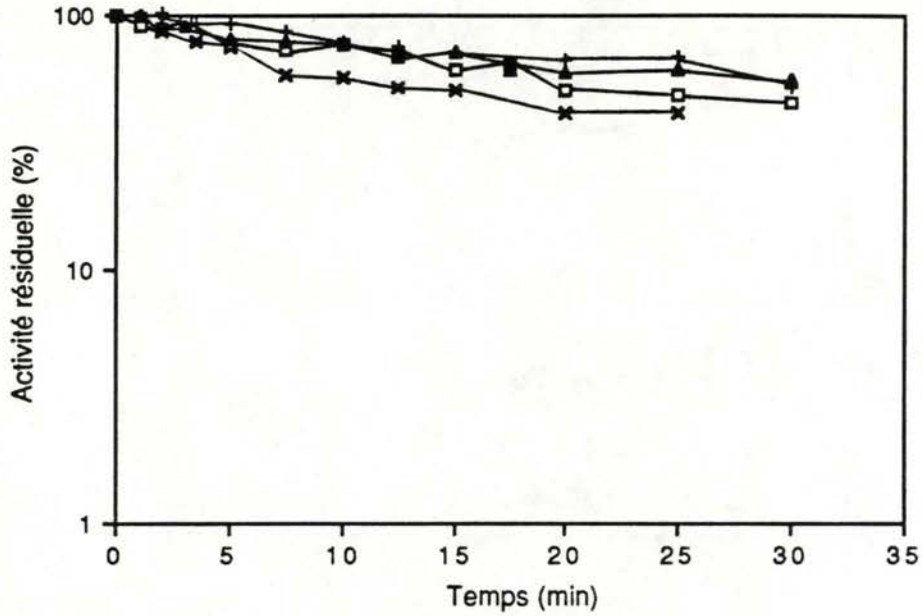


Figure III-52 : Evolution de l'activité de la GPX au cours de l'incubation à 45°c de l'enzyme purifiée préalablement mise en présence de xanthine oxydase seule (+) (1,6 mg/ml), d'acétaldéhyde 5 mM seul (X) ou sans ces molécules (□ ▲) pendant 120 min à 37°c puis amenée à 8 U.E/ml.

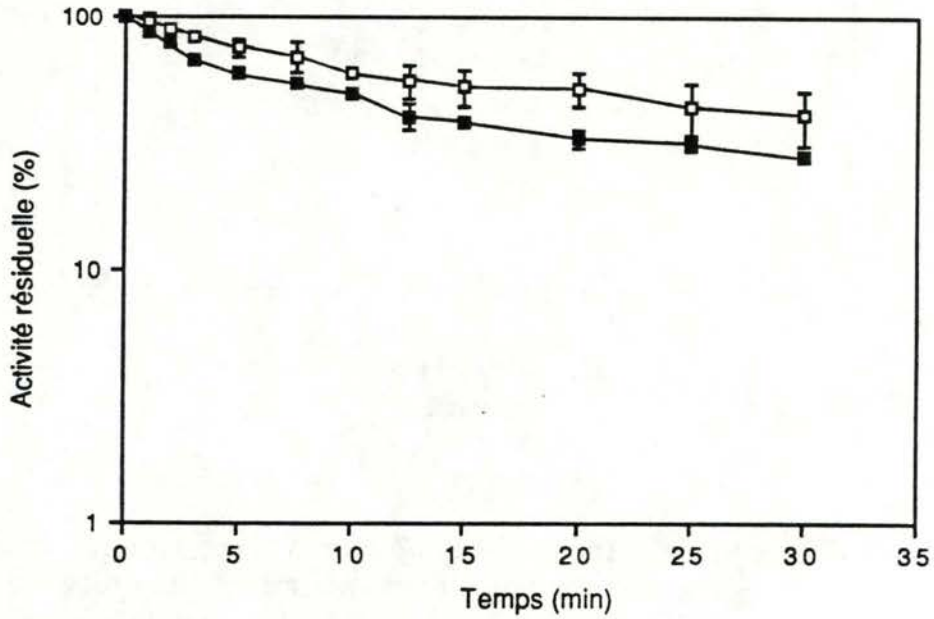


Figure III-53 : Evolution de l'activité de la GPX au cours de l'incubation à 45°c de l'enzyme purifiée préalablement mise en présence de xanthine oxydase et acétaldéhyde (■) ou de xanthine oxydase dénaturée et d'acétaldéhyde (□) puis amenée à 7,5 U.E/ml par dilution avec le tampon phosphate 50 mM pH 7.4 EDTA 1 mM et allopurinol 10^{-3} M. n = 3; l'expérience a été réalisée deux fois et chaque point représente la moyenne de deux expériences ± 1 ecart type.

radicaux hydroxyles. Cependant, cet effet ne donne pas naissance à un comportement thermolabile caractéristique de l'enzyme "vieille": la forme de la courbe est différente de celle que l'on obtient avec l'enzyme des cellules vieilles.

c-Effet des anions superoxydes

Le système de production des anions superoxydes étant l'acétaldéhyde et la xanthine oxydase, il fallait d'abord vérifier l'effet de ces réactifs seuls sur la thermolabilité de l'enzyme. La GPX concentrée (5.500 U.E/ml) fut incubée avec l'acétaldéhyde 5 mM seul ou la xanthine oxydase (1,6 mg/ml proteines). Après 2 heures d'incubation à 37°C, l'enzyme est diluée à 8 U.E/ml et une courbe de thermolabilité est réalisée. La figure III-52 montre que la xanthine oxydase ne modifie pas la résistance thermique de la GPX. Par contre, l'acétaldéhyde a un léger effet de déstabilisation de l'enzyme.

Nous avons alors placé l'enzyme en présence des deux réactifs afin de la soumettre aux effets des $O_2^{\cdot -}$. Le contrôle est réalisé par l'incubation de l'enzyme en présence d'acétaldéhyde 5 mM et de xanthine oxydase dénaturée. La figure III-53 montre que la présence de $O_2^{\cdot -}$ réduit la résistance thermique de l'enzyme par rapport à l'acétaldéhyde seule. Cet effet est cependant très faible, plus faible qui celui exercé par les radicaux hydroxyles.

2.2.4.4.2 Protéolyse partielle

La GPX purifiée concentrée (5.500 U.E/ml) fut incubée avec le surnageant d'une fraction lysosomale de foie de rat ayant subi plusieurs cycles de congélation, décongélation comme décrit au chapitre 2. 10 µl de ce surnageant (2,7 mg/ml protéines) furent additionnés à 5 µl de GPX et 5 µl de tampon acétate 0,4 M pH 5. Après 2 heures d'incubation à 37°C, l'enzyme fut diluée avec du tampon phosphate 50 mM EDTA 1 mM pH 7,4 et ovalbumine 1 mg/ml pour donner une activité de 6,7 U.E/ml. Une courbe de thermolabilité à 49°C fut ensuite réalisée. Le contrôle contenait aussi 10 µl de surnageant de fraction lysosomale mais dénaturée préalablement à 95°C pendant 60 minutes. Les résultats de cette thermolabilité sont présentés à la figure III-54. La présence des protéases lysosomales ne diminue pas la thermorésistance de la GPX.

Une expérience identique fut réalisée en incubant la GPX avec la papaïne. 4 µl de GPX (5.500 U.E/ml) fut incubée avec 9 µl de tampon

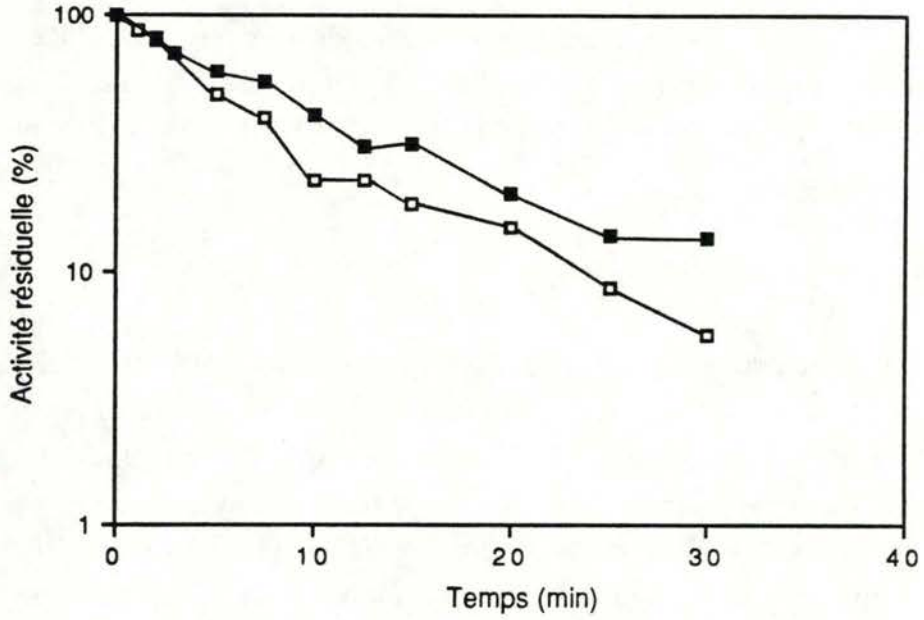


Figure III-54 : Evolution de l'activité de la GPX au cours de l'incubation à 49°c de l'enzyme purifiée préalablement mise en présence d'un lysat de lysosomes de foie de rat (27 µg) pendant 120 min à 37°c et pH 5 puis amenée à 6,7 U.E/ml et pH 7.4. □: incubée avec le lysat de lysosomes inactivé par la chaleur , ■ : incubée avec le lysat de lysosomes.

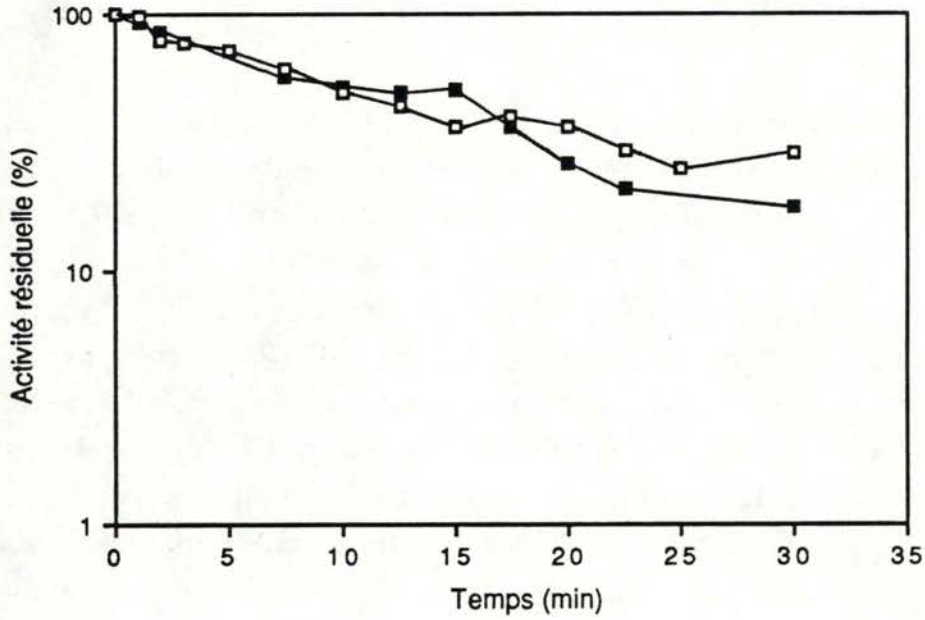


Figure III-55 : Evolution de l'activité de la GPX au cours de l'incubation à 49°c de l'enzyme purifiée préalablement mise en présence de papaïne (4 µg) pendant 30 min à 37°c puis amenée à 10 U.E/ml avec un tampon phosphate 50 mM pH 7.4 EDTA 1 mM contenant le leupeptine à 5 10^{-7} M. □: incubée à 37°c avec la papaïne inactivée par la chaleur, ■ : incubée à 37°c avec la papaïne active.

phosphate 50 mM, EDTA 1 mM pH 7,4 et 4 µl de papaïne (1 mg/ml). Le contrôle contenait de la papaïne dénaturée par inactivation thermique (95°C, 60 minutes). Après une incubation de 30 minutes, la GPX est diluée avec le même tampon contenant de la leupeptine à 5.10^{-7} M afin d'inhiber la papaïne active. L'activité de la GPX après dilution était de 10 U.E/ml. Une courbe de thermolabilité fut réalisée comme pour l'expérience précédente. Les résultats sont présentés à la figure III-55. Comme pour les protéases lysosomales, la papaïne ne diminue pas la résistance thermique de la GPX. Dans ces deux cas, on ne voit pas apparaître le comportement caractéristique de l'enzyme vieille.

2.2.4.4.3 Incubation à pH acide ou basique.

Houben *et al.* (1984 a et b)ont montré que l'altération de la G6PD induite in vitro est de même type que celle que l'on rencontre chez les cellules vieilles et pouvait disparaître lorsque l'enzyme était incubée à pH plus acide que le pH physiologique. D'autre part, Stadtman (1988) et Lowenson et Clarke (1988) indiquent que la déamidation qui apparaît pour certaines protéines au cours du vieillissement peut être induite in vitro par hydrolyse basique.

Suite à l'incubation de la GPX à pH 9 que nous avons réalisée et qui montrait une modification du PM de l'enzyme, nous avons réalisé une courbe de thermolabilité. Les résultats sont exposés à la figure III-56. On constate que ces conditions ne modifient pas la résistance thermique de la GPX. De la même façon, nous avons incubé la GPX à pH 6,5 pendant 24 heures à 4°C ce qui modifie le profil délution de l'enzyme en chromatographie d'exclusion. Des poids moléculaires élevés apparaissaient (voir la figure III-45). La figure III-57 montre la courbe de thermolabilité de l'enzyme ainsi traitée. De nouveau, la résistance thermique de l'enzyme n'est pas modifiée.

2.2.4.4.4 Influence de l'environnement.

Somville *et al.* (1985) ont montré que la Cu/Zn SOD purifiée, mais incubée en présence de fractions cytosoliques de fibroblastes vieux s'altérait. Cette altération se détectait par thermoinactivation et l'enzyme altérée de

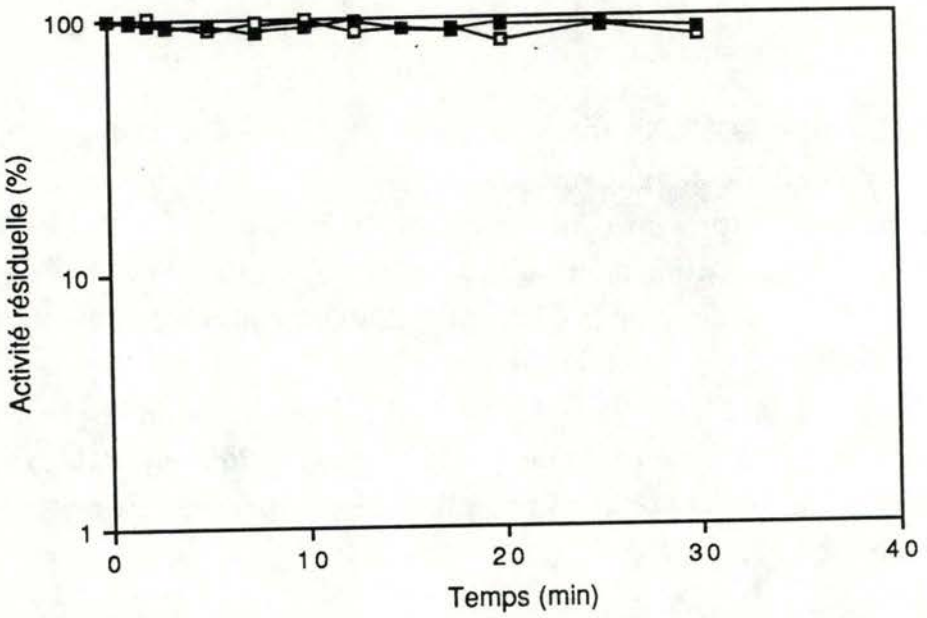


Figure III-56 : Evolution de l'activité de la GPX au cours de l'incubation à 45°c de l'enzyme purifiée préalablement incubée à pH 9.0 ou pH 7.4 pendant 24 heures à 4°c. Avant la thermoinactivation, les deux échantillons sont amenés à la même activité enzymatique (7.6 U.E./ml) et à pH 7.4. □: incubée à 4°c à pH 7.4 , ■ : incubée à 4°c à pH 9,0

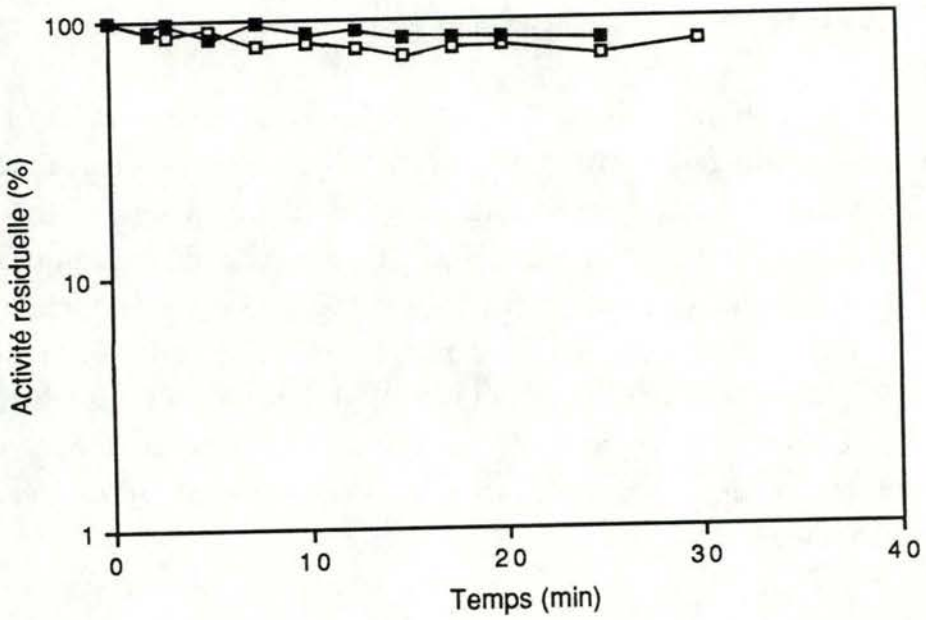


Figure III-57 : Evolution de l'activité de la GPX au cours de l'incubation à 45°c de l'enzyme purifiée préalablement incubée à pH 6.5 ou pH 7.4 pendant 24 heures à 4°c. Avant la thermoinactivation, les deux échantillons sont amenés à la même activité enzymatique (6.9 U.E./ml) et à pH 7.4. □: incubée à 4°c à pH 7.4 , ■ : incubée à 4°c à pH 6.5

cette manière montrait les mêmes caractéristiques cinétiques d'inactivation que l'enzyme native des cellules vieilles. De plus, l'altération de l'enzyme des cellules vieilles disparaissait en cultivant ces cellules en présence de vincamine, un alcaloïde possédant un effet stimulateur sur la croissance des cellules in vitro. L'environnement cellulaire était bien responsable de l'altération et celle-ci était réversible.

Nous avons réalisé une expérience semblable en incubant la GPX purifiée dans des fractions cytosoliques de fibroblastes jeunes (57 % de leur durée de vie) et vieux (95 % de leur durée de vie) pendant 24 heures à 4°C et de manière à ce que la GPX endogène représente moins de 1 % de l'activité totale de la GPX après l'addition de la GPX purifiée (10 µl d'enzyme pure (diluée dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4 additionné de 1 mg/ml d'ovalbumine) dans 1 ml de fraction cytosolique). Nous avons ensuite réalisé une courbe d'inactivation à 45°C. Les résultats sont présentés à la figure III-58. On ne détecte pas de différence significative entre l'enzyme incubée dans un environnement jeune et celle incubée dans un environnement vieux.

Les tentatives de reproduire in vitro les modifications de la GPX "vieille" n'ont pas abouti. Nous savons pourtant que le TBHP, les radicaux hydroxyles et superoxydes, les protéases et le pH agissent d'une manière ou d'une autre sur l'enzyme. Ces résultats suggèrent que les modifications de l'enzyme suite à l'exposition à ces divers agents ne sont pas de même nature que la modification qui apparaît au cours du vieillissement. Ceci, en fait, est un argument en faveur du modèle proposé puisque les modifications induites ici (sauf peut être le pH) sont supposées agir en modifiant des résidus de l'enzyme et pas nécessairement sur l'équilibre entre les tétramères et les dimères.

Le type de courbe de thermolabilité que l'on observe pour l'effet des radicaux hydroxyles (figure III-51) par exemple s'apparente plus au modèle décrit par Somville *et al.* (1985) ou à celui de Ulbrich *et al.* (1986). Cela voudrait dire que l'action des radicaux crée une population nouvelle de GPX dont les caractéristiques d'inactivation thermique (la constante d'inactivation principalement) sont différentes de l'enzyme native. Le modèle d'inactivation de la GPX vaut toujours mais parallèlement aux tétramères s'inactivant pour donner une droite en échelle semi-logarithmique (caractéristique de l'enzyme jeune ou de l'enzyme pure concentrée), une nouvelle population est présente qui s'inactiverait parallèlement à la population non altérée. Cette double inactivation est

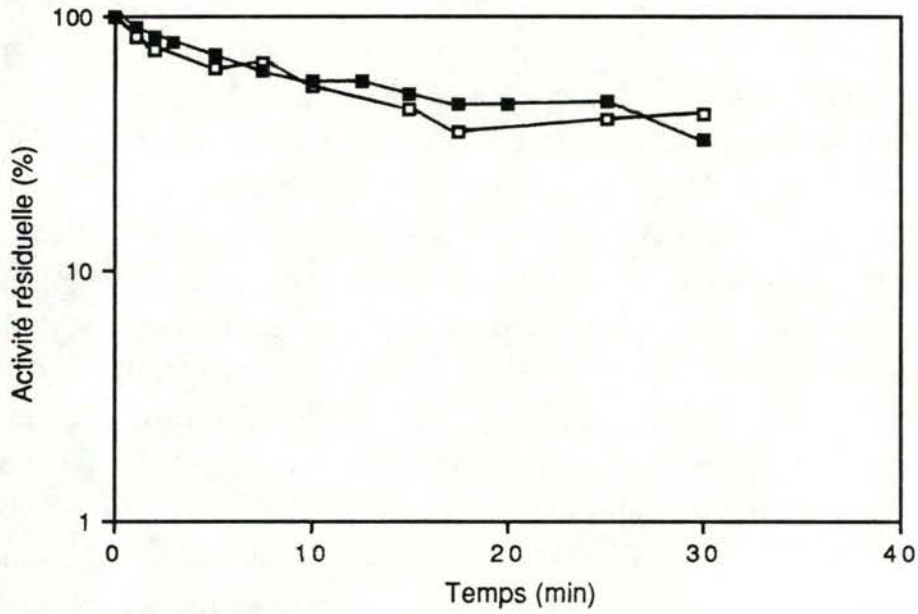


Figure III-58 : Evolution de l'activité de la GPX au cours de l'incubation à 45°c de l'enzyme purifiée préalablement incubée dans une fraction solube de fibroblastes WI-38 jeunes (57% de leur durée de vie) ou vieux (95% de leur durée de vie) pendant 24 heures à 4°c. Avant la thermoinactivation, les deux échantillons sont amenés à la même activité enzymatique (10 U.E./ml). □: incubée avec la fraction soluble des cellules jeunes, ■ : incubée avec la fraction soluble des cellules vieilles.

caractéristique de la courbe biphasique d'inactivation que l'on observe à la figure III-51.

Enfin, les résultats obtenus à propos de l'influence de divers paramères de l'environnement incitent à penser que l'altération de la GPX ne serait pas due à son exposition aux conditions du milieu des cellules vieilles comme c'est le cas pour la SOD et la G6PD (Houben *et al.* 1984 a et b).

2.2.4.5 Conclusions

L'étude du comportement de la GPX au cours du vieillissement nous a donné des informations de nature différente. Tout d'abord, nous avons pu remarquer que les cultures sont déficientes en sélénium. Un apport de cet élément provoque une augmentation importante de l'activité de la GPX. Nous voyons donc qu'il faut être très prudent dans l'extrapolation des résultats obtenus in vitro lorsque toutes les conditions expérimentales n'ont pas été contrôlées.

Ensuite, l'étude de l'évolution de l'activité et du Km de l'enzyme vis-à-vis du peroxyde tendent à montrer que, au cours du vieillissement des fibroblastes, la GPX ne perdrait pas sa fonctionnalité. Par conséquent, une réduction de la protection contre le stress oxydant accompagnant le vieillissement ne peut pas être imputée à cette enzyme. Si la thermolabilité montre que l'enzyme des cellules vieilles possède des caractéristiques différentes de l'enzyme des cellules jeunes, l'immunotitration montre que l'activité spécifique de la GPX "jeune" n'est pas différente de celle de la GPX "vieille". Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'au cours du vieillissement, la constante d'équilibre entre tétramères et dimères diminue. Cette modification entraîne des propriétés différentes pour l'enzyme jeune et vieille dans nos conditions de travail. Cette altération n'entraîne probablement aucune modification notable de l'état de la GPX à l'intérieur des cellules vieilles où l'enzyme est bien plus concentrée que dans les conditions in vitro dans lesquelles nous avons travaillé. Cette modification, qui ne s'exprime pas en terme de fonctionnalité de l'enzyme dans les cellules vieilles, est pourtant bien réelle. Malheureusement, une étude plus approfondie est nécessaire pour répondre à la question de savoir à quoi est due cette variation dans la constante d'équilibre. C'est au niveau moléculaire qu'il faudrait chercher la réponse. Les nombreuses expériences que nous avons réalisées sur l'influence de divers facteurs n'ont pas permis de répondre à cette question. Vu la faible quantité d'enzyme disponible

dans la plupart des modèles, la réponse pourrait être difficile à acquérir. Remarquons cependant que l'altération de l'enzyme semble être un processus continu lors de la culture. Elle n'apparaît pas de manière brusque en relation avec l'apparition de la phase III. Excepté pour les activités spécifiques des enzymes, ce phénomène est peu décrit dans la littérature où l'on se concentre davantage sur les différences entre très jeunes et très vieux représentants d'un modèle. Ce type de modifications s'accorde peu avec une théorie telle que celle de la mutation somatique puisqu'il faudrait imaginer des mutations continues pour expliquer la modification continue en termes de l'équilibre entre tétramères et dimères. L'altération décrite ici ne contredit cependant aucune autre théorie (vieillissement programmé, théorie des radicaux libres, erreur catastrophique). Bien que nous ne connaissons pas le ou les facteurs influençant l'équilibre entre les dimères et les tétramères, nous avons pu développer un modèle qui représente bien les diverses courbes d'inactivation thermique. Ce modèle implique l'existence d'un intermédiaire ayant une activité enzymatique importante. En ce sens, notre travail s'intègre dans l'ensemble des travaux qui étudient le comportement des protéines vis à vis de la température et qui essaient de l'influencer (Henley et Sadana 1986, Ahern et Klibanov 1985, Ulbrich *et al.* 1986).

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS GENERALES.

Les systèmes de régulation et les sytèmes de protection contre les perturbations des paramètres du milieu environnant et contre les éléments agressifs venant de ce milieu, sont des systèmes primordiaux pour maintenir la constance et la survie des êtres vivants. Ils permettent aux êtres vivants de s'adapter aux conditions extérieures dans lesquelles ils sont plongés.

Au niveau de l'organisme entier, le système nerveux, le système endocrinien et le système immunitaire sont les trois systèmes adaptatifs majeurs. Au niveau cellulaire, le simple maintien de la constance structurelle nécessite essentiellement un système de contrôle et de réparation des erreurs qui apparaissent au niveau de l'ADN, un système qui assure la synthèse et la dégradation des protéines, des lipides, et des sucres, un sytème qui procure de l'energie, et pour les organismes aérobies un système qui préserve la capacité réductrice et maintient la concentration en espèces oxygénées réactives à un faible niveau.

C'est à ce dernier système que notre travail s'est intéressé. Son but était d'étudier la stabilité du système antioxydant c'est à dire sa résistance vis à vis des espèces oxydantes elles-mêmes, et plus particulièrement en ce qui concerne un élément essentiel du système, la GPX, le maintien de sa structure et sa fonction au cours du vieillissement.

Nous voulions par là apporter de nouveaux arguments expérimentaux permettant d'éclairer un peu plus le débat des théories du vieillissement en général et celui de la théorie des radicaux libres en particulier.

Les résultats que nous avons obtenus en étudiant l'effet des radicaux et des peroxydes sur les enzymes antioxydantes montrent que les trois enzymes directement impliquées dans la détoxification de ces molécules sont sensibles à au moins une espèce réactive de l'oxygène. Ceci confirme l'idée d'une protection mutuelle des enzymes et de la nécessité de leur présence conjointe pour protéger efficacement les cellules. La construction mathématique réalisée à partir de ces résultats illustre très bien la notion de seuil critique, que l'on perçoit intuitivement : un système régulateur ou protecteur peut remplir ses fonctions même s'il est altéré de l'une ou l'autre manière mais il accepte ces altérations jusqu'à une certaine limite (seuil critique) au-delà de laquelle, globalement, il ne peut plus fonctionner. Dès lors, les paramètres qu'il contrôle s'éloignent de leur état stationnaire ce qui

entraîne des perturbations à d'autres niveaux dans la cellule qui perd son homéostasie.

En ce qui concerne le système antioxydant, les résultats mathématiques montrent qu'une perturbation de la fonction de la GPX peut conduire à dépasser ce seuil critique alors qu'une perturbation de la SOD par exemple n'engendre pas un tel effet dans le modèle tel qu'il est décrit. Ceci ne veut pas dire que la SOD n'est pas importante dans le système mais suggère que la GPX a un rôle primordial dans la mesure ou une perturbation de son activité peut entraîner toute la cellule vers la mort. Ceci renforce l'idée selon laquelle la GPX aurait un rôle primordial dans la défense antioxydante (Michiels et Remacle 1988 a et b, Michiels et al 1988).

Bien que nos résultats soient issus d'expériences in vitro, avec des concentrations en radicaux et peroxydes très élevées, ce concept de seuil critique permet néanmoins de postuler que dans des conditions pathologiques comme une hyperoxie ou une ischémie/reperfusion par exemple, le seuil critique pourrait être dépassé très localement et entraîner des réactions en chaîne résultant en perturbations macroscopiques.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de Davies *et al.* (1987 a, b, c) qui montrent que les radicaux libres sont capables de fragmenter les protéines et que les radicaux libres et les peroxydes susceptibilisent les protéines à la dégradation par les protéases. Nous pouvons ajouter que les enzymes antioxydantes ne possèdent pas de protection particulière à cet égard puisque la GPX est susceptibilisée à la protéolyse par ces molécules, ce qui a aussi été démontré pour la SOD (Salo et al 1988).

En ce qui concerne les modifications de la GPX au cours du vieillissement des cellules, la modification la plus spectaculaire est la sensibilité excessive de l'enzyme présente dans les cellules vieilles à la température. La vitesse d'inactivation à 45°C est multipliée par un facteur très important entre l'enzyme des cellules jeunes et des cellules vieilles. Nous avons essayé de reproduire une altération similaire en incubant la GPX dans diverses conditions et l'on a vu qu'il ne s'agissait pas d'un effet du pH ou d'une attaque radicalaire ni d'une protéolyse par des protéases. Il ne semble donc pas que ces modifications soient dues à ces facteurs extérieurs de l'enzyme. De plus, l'incubation de fractions solubles de vieilles cellules avec de l'enzyme pure ne permet pas de provoquer une altération. Ainsi, les modifications sont bien intrinsèques à l'enzyme et ne dépendent pas de son environnement cytoplasmique comme c'était le cas pour la SOD ou la G6PD.

L'établissement d'un modèle cinétique d'inactivation de l'enzyme nous a montré que les résultats s'expliquent bien si l'on admet qu'il existe un équilibre entre l'enzyme tétramérique et dimérique et que l'inactivation passe par un intermédiaire actif. Si ce modèle est correct, on peut penser que l'enzyme des cellules vieilles se dissocie plus vite en dimères que l'enzyme natif des cellules jeunes. En tout cas cette explication est vraisemblable. Nous avions déjà mentionné dans l'introduction de ce travail que plusieurs modifications chimiques avaient déjà été observées sur des enzymes provenant de cellules vieilles : il s'agit principalement de déamidation des résidus asparagine et glutamine (Yuan *et al.*), des modifications covalentes d'acides aminés par oxydation (Oliver *et al.* 1987, Dulic *et al.* 1987, Gafni 1983, Gordillo *et al.* 1988, Noy *et al.* 1985), de glycosylation de groupes lysine (Cerami *et al.* 1987), de la racémisation des résidus aspartiques et asparagines (Lowenson et Clarkes 1988, Van den Oetelaar *et al.* 1989), à des changements spontanés dans la conformation des protéines (Rothstein 1984, Sharma et Rothstein 1980), à une protéolyse partielle (McFall *et al.* 1986, Takemoto *et al.* 1987 a et b) et à une carboxyméthylation (Sellinger *et al.* 1988). Nous avons déjà pu éliminer les phénomènes d'oxydation ou de protéolyse partielle. Par contre, les déamidations constituent une possibilité que l'on pourrait retenir. En effet, elles provoqueraient l'apparition de charges négatives supplémentaires sur les sous-unités qui pourraient favoriser leur dissociation telle que nous l'observons chez l'enzyme des cellules vieilles. Nous avons observé que cette altération apparaît graduellement au cours du vieillissement et est déjà présente lorsque les cellules ont épuisé 74% de leur durée de vie maximale. Cette évolution graduelle peut se comprendre dans le contexte d'une modification chimique post traductionnelle et se comprend donc dans le cadre des modifications stochastiques liées au vieillissement.

Nous ne connaissons pas les conséquences physiologiques possibles d'un tel comportement. Il faut signaler que la vitesse d'inactivation de l'enzyme vieux est extrêmement rapide à 45°C soit quelques degrés seulement au-dessus de la température physiologique. On pourrait imaginer que l'inactivation de l'enzyme chez les cellules vieilles soit plus rapide que chez les cellules jeunes. Mais nous avons vu que ces différences n'étaient perceptibles qu'aux fortes dilutions qui ne représentent pas la situation physiologique. Des études de renouvellement de l'enzyme dans les cellules devraient pouvoir donner une réponse définitive à cette hypothèse.

Si les modifications de la GPX sont bien de type stochastiques, le fait que l'activité de la GPX ne se modifie pas ne permet pas de dire que ces modifications ont une quelconque influence sur le rôle de protection de la GPX dans le processus du vieillissement. Par contre, la notion de seuil critique permet néanmoins d'apporter un éclairage nouveau sur la problématique du vieillissement, en réconciliant les deux grands groupes de théories : celles du vieillissement programmé et celles du vieillissement stochastique. En effet, jusqu'à présent, chaque théorie a permis d'expliquer certains faits mais aucune ne peut rendre compte de toutes les observations expérimentales. Nous pensons que le concept de seuil critique permet de rassembler dans un même mécanisme explicatif programmation génétique et pression de l'environnement.

La notion de seuil critique peut être généralisée à d'autres systèmes régulateurs et protecteurs de la cellule qui protègent celle-ci contre les agressions de l'environnement. Chacun de ces systèmes est constitué de protéines dont les concentrations cellulaires sont déterminées génétiquement et sont différentes d'un type de cellule à l'autre et pour un même type cellulaire suivant l'état de différenciation. L'ensemble de ces systèmes conditionne la résistance de la cellule à un stress particulier. Dans les conditions normales, le système peut faire face aux légères variations du milieu et maintenir l'homéostasie cellulaire. En cas de stress, soit les altérations produites sont en-dessous d'un seuil critique et le système protecteur arrive à les éliminer, soit elles sont au-delà du seuil, le système protecteur est dépassé, et toutes les fonctions cellulaires subissent des altérations telles que la cellule est entraînée irréversiblement vers la mort.

Au cours du vieillissement, la diminution des défenses cellulaires vis à vis des pressions de l'environnement pourrait être telle que des variations normales des paramètres du milieu ou un stress léger ne pourraient plus être régulés par ces systèmes de défense et engendreraient des erreurs au-delà du seuil critique, entraînant la cellule vers la mort. Ce processus permettrait d'expliquer le développement plus facile de certaines pathologies chez les individus agés, la variabilité entre individus, la susceptibilité différente des différents tissus et l'influence des facteurs environnementaux sur la survie des cellules vieilles.

Ainsi, de petites modifications, peut-être comme celles que nous avons observées pour la GPX des cellules vieilles, mais certainement comme les inhibitions de cette enzyme par les hydroperoxydes, pourraient

s'additionner les unes aux autres pour conduire la cellule dans une évolution de déterioration irréversible qui aboutirait à sa mort.

ANNEXES

Annexe 1. Système de production - destruction des radicaux libres dans une cellule.

Nous avons présenté (figure III-13) les principales réactions de production et d'élimination des radicaux libres au sein de la cellule. Les constantes kj (j=1,...,16) qui y interviennent sont les constantes de vitesses des réactions chimiques considérées.

Nous avons noté [A] la concentration en une substance A dans le modèle suivant. Introduisons alors les notations suivantes.

1) Substances toxiques pour la cellule ("variables").

(a) radicaux libres:

$[O_2^{\cdot(-)}]$=X (ions superoxydes)
$[OH^{\cdot}]$=Z (radicaux hydroxyles)
$[R^{\cdot}]$=W (chaînes carbonées radicalaires)
$[ROO^{\cdot}]$=U (radicaux peroxyles)

(b) peroxydes lipidiques:

$[H_2O_2]$=Y (peroxyde d'hydrogène)
[ROOH]=R (peroxydes lipidiques)

2) Enzymes ("paramètres").

[superoxyde dismutase]=S
[oxydases]=D
[catalase]=C
[glutathion réduit]=G
[glutathion peroxydase]=P

3) Divers.

$[Fe^{3+}]$=F (paramètre)
$[Fe^{2+}]$=f (paramètre)
$[O_2]=\zeta$ (paramètre)
[XHH]=V (constante)
[RH]=π (constante)
$[e^-]=\epsilon$ (constante)
[SH]=σ (constante)

La figure III-13 nous permet d'écrire les équations décrivant la cinétique des diverses réactions qui y sont représentées. Notons [·A] la vitesse à laquelle évolue la concentration [A] (d[A]/dt). Nous obtenons alors:

$$[\cdot X] = K_1 \zeta \varepsilon - K_2 X^2 - [K_3 S (1-\alpha Y) + K_4 F + K_5 V + K_{10} \pi] X \quad (1)$$

$$[\cdot Y] = [K_5 V + K_3 S (1 - \alpha Y)]X + K_6 \sigma D - (K_7 f + K_8 C) Y - (K_9 K_{9'} G) (K_9 Y + K_{9'} G)^{-1} (1 - \beta R) P Y \quad (2)$$

$$[\cdot Z] = K_7 f Y - (K_{11} \pi + K_{16} V) Z \quad (3)$$

$$[\cdot W] = K_{10} \pi X + K_{11} \pi Z + K_{13} \pi U - (K_{12} \zeta + K_{15} V) W \quad (4)$$

$$[\cdot R] = K_{13} \pi U - (K_{14} K_{14'} G) (K_{14} R + K_{14'} G)^{-1}. (1 - \beta R).P R \quad (5)$$

$$[\cdot U] = K_{12} \zeta W - K_{13} \pi U \quad (6)$$

Les constantes α et β décrivent respectivement l'inhibition de la superoxyde dismutase par l'H_2O_2 et l'inhibition de la GPX par les peroxydes lipidiques. Ces constantes empiriques sont telles que:

$$0 < \alpha \leq (\text{Max } [H_2O_2])^{-1} \text{ et } 0 < ß \leq (\text{Max } [ROOH])^{-1}$$

Les termes fractionnaires qui interviennent dans les équations (2) et (5) décrivent la cinétique propre de la glutathion peroxydase.

Traitement des équations stationnaires.- Recherche d'instabilité dans le système.

1) Superoxyde dismutase (SOD).

a) Pas de terme d'inhibition de la SOD ou de la GPX ($\alpha = \beta = 0$).

Le système dynamique décrit par les équations (1),..., (6) possède un et un seul état stationaire (Xo, Yo, Zo, Wo, Ro, Uo) satisfaisant aux conditions: $\cdot X = \cdot Y = \cdot Z = \cdot W = \cdot R = \cdot U = 0$. Nous calculons aisément,

$$Xo= (1/k2) [[(K_3 S + K_4 F + K_5 V + K_{10} \pi)^2 + 4 K_1K_2 \zeta]^{1/2} - (K_3 S + K_4 F + K_5 V + K_{10} \pi)]$$

Toutes les valeurs exactes de (Yo, Zo, Wo, Ro, Uo) se déduisent de la même manière à partir des équations (1),..., (6). En intégrant l'équation (1), nous trouvons,

$$X(t)= (1/k2) [(T + r) - (T - r) \exp(t+a)] (\exp (t + a)- 1)^{-1}$$

où $T= K_3 S + K_4 F + K_5 V + K_{10} \pi$, $r= (T^2 + 4 K_1K_2 \zeta \varepsilon)^{1/2}$ et $a>0$.

Un calcul direct montre que la limite de X(t) est Xo lorsque le temps t tend vers l'infini.

Remarquons que les équations (1) et (2) ne dépendent que de X et Y lorsque $\alpha = \beta = 0$. Nous pouvons donc étudier le système [(1), (2)] indépendamment des autres équations.

Puisque la jacobienne $J(X, Y) = \delta(\cdot X, \cdot Y)/ \delta(X, Y)$ est telle que le déterminant de la jacobienne est positif (det J(Xo, Yo)>0) et que la trace de la jacobienne est négative (tr J(Xo, Yo)<0), nous voyons que (Xo, Yo) est un état stationnaire stable du système [(1), (2)]. Cet état peut être un noeud stable ou un foyer stable selon que la quantité suivante, 4 det J(Xo, Yo) - (tr J(Xo, Yo))^2 est respectivement négative ou positive.

Nous allons maintenant montrer que (Xo,Yo, Zo, Wo, Ro, Uo) est un état stationnaire stable du système [(1),..., (6)]. Pour cela, introduisons la jacobienne,

$$J(X,...,U) = \delta(\cdot X, ...,\cdot U)/ \delta(X, ..,U)$$

La stabilité est assurée si et seulement si les racines de l'équation caractéristique,

$$\det J(Xo ...,Uo) - \lambda\, 1_6)=0, \qquad (7)$$

ont des parties réelles strictement négatives. L'équation (7) peut s'écrire,

$(a_1+ \lambda) (a_2+ \lambda) (a_3 + \lambda)[\lambda^3+ (a_4 +a_5 +a_6) \lambda^2 +(a_4 a_5 + a_4 +a_6+ a_5 a_6-a_7 +a_8) \lambda + (a_4 a_5 a_6 -a_7 a_8 a_9)]=0$

où a_j (j=1,..., 9) sont des constantes strictement positives et où $a_4 > a_8$.

Dès lors, nous devons uniquement analyser les racines de l'équation,

$$\lambda^3+ (a_4 +a_5 +a_6) \lambda^2 +(a_4 a_5 + a_4 a_6+ a_5 a_6 +a_7 a_8) \lambda + (a_4 a_5 a_6 -a_7 a_8 a_9)=0$$

Le critère de Routh-Hurwitz (Meirovitch, 1970) assure que ces racines ont une partie réelle strictement négative si et seulement si,

$a_4 + a_5 + a_6 > 0$ et (8)

$[(a_4 + a_5 + a_6)(a_4 a_5 + a_4 a_6 + a_5 a_6 + a_7 a_8)] - [1.(a_4 a_5 a_6 - a_7 a_8 a_9)] > 0$ (9)

La condition (8) est triviale et la condition (9) découle du fait que $a_4 > a_8$.

Si nous ne tenons pas compte des inhibitions enzymatiques, le système de production et d'élimination des radicaux libres reste donc stable, au sein de la cellule, par rapport à un changement arbitraire des paramètres. Ce fait n'est pas confirmé par les expériences. En effet, Remacle *et al.* (1984) et Michiels et Remacle (1988) ont montré que le système cellulaire devenait très instable si l'on réduit de 30 % la concentration cellulaire en glutathion ou de 21% l'activité en glutathion peroxydase.

b) Terme d'inhibition de la SOD incorporé dans le modèle ($\alpha \neq 0, \beta = 0$).

Après avoir résolu (graphiquement) les équations, $\dot{X}(X, Y, \alpha) = \dot{Y}(X, Y, \alpha) = 0$ (10), on montre assez facilement que le système (1),..., (6) n'admet alors qu'un et un seul état stationnaire. L'utilisation de critères de stabilité (calcul de la jacobienne, critères de Routh-Hurwitz (Meirovitch, 1970)) nous montrons que le point stationnaire (Xo, Yo, Zo, Wo, Ro, Uo) est stable si et seulement si,

$-2b_1 Xo - b_2 - b_4 - (b_5)/[(1 + b_6 Yo)^2] + b_7(Yo - Xo) < 0$ (11)

et

$2b_1 Xo + b_2 - b_7 Yo)(b_4 + (b_5)/[(1 + b_6 Yo)^2] + b_7 Xo(2b_1 Xo + b_2 - b_3) > 0$ (12)

où b_j (j=1,..., 7) sont des constantes strictement positives et où $b_2 > b_3$. En portant la solution des équations (10) et les conditions (11) et (12) sur un même graphique, nous voyons que ces dernières sont toujours satisfaites. Dès lors, l'introduction d'un terme inhibiteur de la SOD par le peroxyde d'hydrogène n'induit aucune instabilité dans le système. Ceci n'est pas étonnant; en effet, les termes qui s'ajoutent au système (1),..., (6) lorsque $\alpha = 0$ ne sont "pas assez" non linéaires que pour modifier la stabilité du système. Le seul effet d'une inhibition de la SOD n'est alors que de limiter la production de peroxide d'hydrogène. En effet, on peut montrer que $Yo < (k_5 V + k_3 S)/(k_3 S\alpha)$.

c) Terme d'inhibition de la GPX incorporé dans le modèle ($\alpha = 0, \beta \neq 0$).

L'introduction d'un terme inhibiteur de la GPX change totalement la situation. En effet, les solutions des équations stationnaires conduit pour $\alpha = 0$ et $\beta \neq 0$ à l'existence d'un point critique dont les coordonées sont $P_c = [K_{13} \pi Uo (1 + n ro)] . [K_{14} ro (1 - \beta ro)]^{-1}$ (sur l'axe de la concentration en GPX) et

$ro = [(\beta^2 + \beta)^{1/2} - \beta] . [\beta \pi]^{-1}$ (sur l'axe da la concentration en peroxyde lipidique) où $n=K_{14}/ K_{14'} G$

Le comportement du système va donc dépendre en particulier de la concentration en GPX par rapport à ce point critique. Après traitement des équations et si nous utilisons les critères de Routh-Hurwitz, nous voyons que l'état stationnaire (Xo, ..., Uo) est stable si et seulement si $0 \leq Ro \leq ro$. Nous obtenons donc les trois situations suivantes.

Si [GPX] < P_c, il n'y a aucun état stationnaire possible.

Si [GPX] = P_c, il y a un et un seul état stationnaire.

Si [GPX] > P_c, il y a deux états stationnaires dont un est stable et l'autre instable.

Il est aussi à noter que l'introduction des deux termes d'inhibition $\alpha \neq 0, \beta \neq 0$ à la fois entraîne un comportement similaire du système dynamique (topologiquement) équivalent à celui que nous venons juste de décrire.

Graphiquement, ces résultats mathématiques peuvent être visualisés de 2 manières. La première se présente sous la forme de la bifurcation présentée à la figure III-15. Lorsque P>Pc, le système dynamique présente un "bassin d'attraction", déterminé par l'état stationnaire stable: la branche inférieure de la bifurcation représente la concentration minimale en peroxyde lipidique qui existe dans le système, et par l'état stationnaire instable: la branche supérieure de la bifurcation représente la concentration maximale en peroxyde lipidique que la cellule peut supporter. La distance entre les deux états tend vers O lorsque P tend vers P_c. Biologiquement, cela signifie que si la concentration en GPX (P) diminue trop, tout en restant supérieure à la valeur critique pour permettre l'existence du sytème, une petite fluctuation de concentration en peroxyde lipidique autour de l'état stable ne sera plus amortie. Au contraire, elle pourra être amplifiée entraînant ainsi la cellule vers une mort probable.

La deuxième manière de présenter graphiquement ces résultats est donnée sur la figure III-16 qui présente le "portrait de phase" (ROOH, ROO·). Ce portrait de phase donne l'évolution de la concentration en radicaux peroxydes ROO· en fonction de la concentration en peroxides lipidiques ROOH. On y remarquera plusieurs points importants. Tout d'abord, ce portrait de phase prend en considération l'existence d'une faible concentration en ROOH et ROO· même lorsque le système ne subit pas de fluctuations en radicaux libres (ce qui correspond à la branche inférieure de la bifurcation). Ensuite, si le système subit des fluctuations radicalaires, il va s'éloigner de son état stationnaire. Cet éloignement ne sera temporaire pour autant que cette fluctuation reste en-deçà d'une concentration critique (ce qui correspond à la branche supérieure de la

bifurcation). Au delà de cette concentration critique, le système sera incapable de revenir à l'état stationnaire et va donc en dévier de plus en plus, entraînant la cellule vers une mort très probable.

Annexe 2 : Etude de la fonction de Sadana et Henley décrivant l'inactivation consécutive.

Cette annexe présente l'étude qualitative de fonction de l'équation de Sadana et Henley (1985) modélisant l'inactivation successive d'une enzyme schématisée de la manière suivante :

$$E \rightarrow E1 \rightarrow E2$$

L'équation de l'activité mesurée en fonction du temps décrite par ce modèle est la suivante :

$$Y(t) = [1 + a1 \cdot k1/(k2 - k1) - a2 \cdot k2/(k2 - k1)] \cdot \exp(-k1.t) - [k1/(k2 - k1). (a1 - a2) \cdot \exp(-k2.t)] + a2$$

où : Y(t) = activité mesurée en fonction du temps.

k1 = constante d'inactivation de premier ordre de E vers E1.

k2 = constante d'inactivation de premier ordre de E1 vers E2.

a1 = rapport de l'activité spécifique de E1 sur l'activité spécifique de E.

a2 = rapport de l'activité spécifique de E2 sur l'activité spécifique de E.

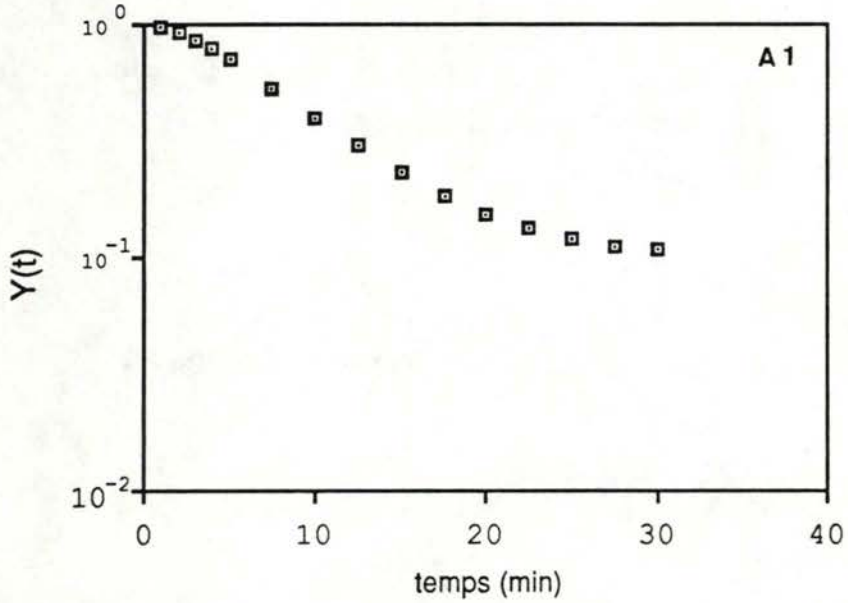
La représentation graphique indique en ordonnée l'activité mesurée Y(t) sur une échelle logarithmique, en abscisse le temps sur une échelle linéaire. L'activité spécifique de E est normalisée à 1 (ou 100 %) et l'échelle de temps de 0 à 30 de façon à reproduire les valeurs que nous avons obtenues expérimentalement et à se rendre ainsi compte de l'ordre de grandeur des paramètres dans le cas concret de la GPX. La normalisation de E (= 1 ou 100 %) entraîne que a1 = E1/E représente en fait l'activité spécifique de E1 et a2 = E2/E l'activité spécifique de E2.

Notons que de manière globale :

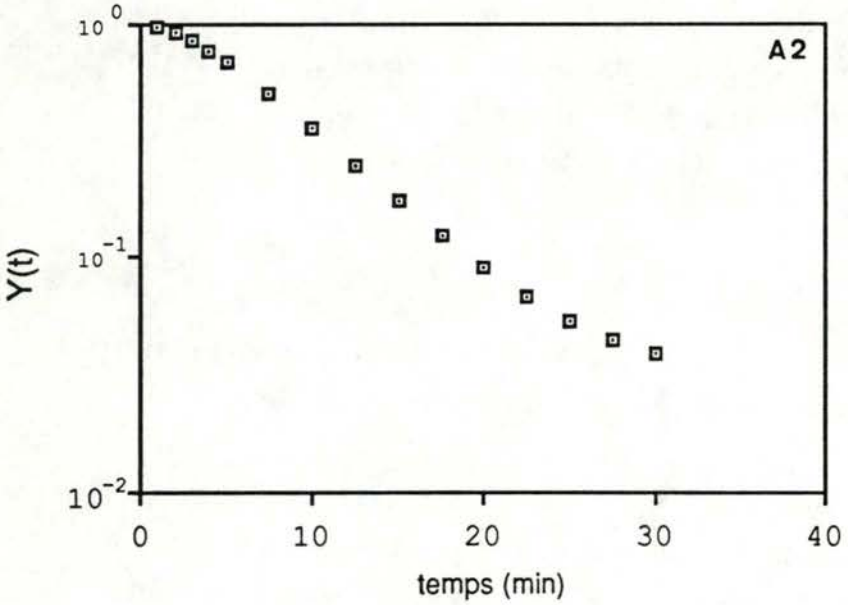
$k1$ et $k2 > 0$; $a1 \geq 0$; $0 \leq a2 \leq 1$.

Du point de vue mathématique, il n'y a pas de restriction supplémentaire sur la valeur de a1. Nous avons cependant limité la valeur de a1 à des valeurs proches de 1.

L'équation permet des valeurs de $a2 > 1$. (a2 = E2/E et dans notre cas l'activité spécifique de E2, la forme enzymatique à laquelle aboutit l'inactivation). Cependant ces valeurs de $a2 > 1$ donnent naissance à une courbe qui tend vers une valeur $Y(t) > 1$ pour des temps grands (égale à la valeur de a2), ce qui n'a jamais été le cas de nos résultats expérimentaux.



a1 = 0.95
a2 = 0.1
k1 = 0.2
k2 = 0.25



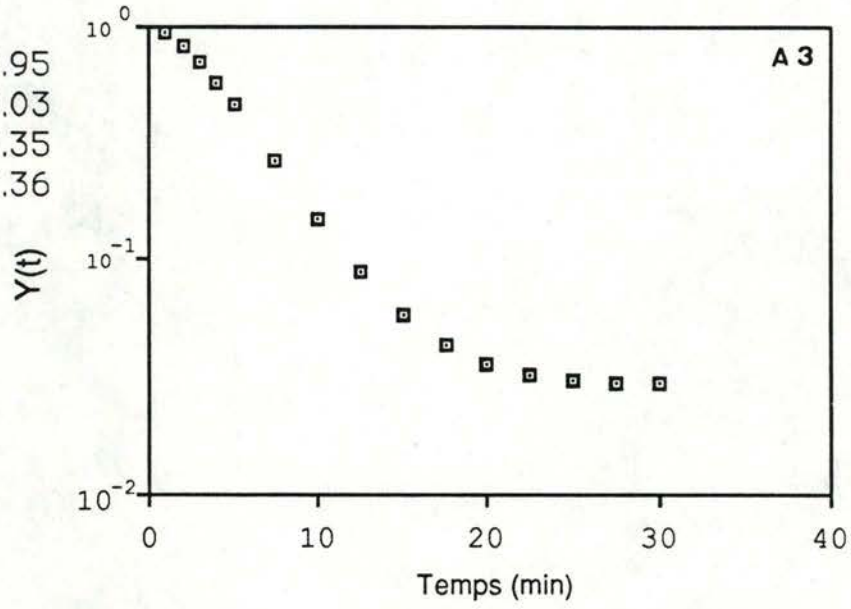
a1 = 0.95
a2 = 0.03
k1 = 0.2
k2 = 0.25

k1 doit être différent de k2 du fait de l'expression algébrique de l'équation. Notons que ceci n'est pas une contrainte biologique et que nous pouvons nous rendre compte de la configuration des courbes lorsque k1 est tellement proche de k2 que, en pratique, nous pouvons dire qu'ils sont équivalents.
Pour décrire l'impact des paramètres a1, a2, k1 et k2 sur la configuration de la courbe obtenue, nous partons des conditions nécessaires pour produire une courbe sigmoïde car ces conditions sont les plus contraignantes pour les paramètres. Ces conditions sont les suivantes : a1 et a2 doivent être nettement différents (a1 proche de 1 et a2 proche de 0). Cette condition est nécessaire mais non suffisante. k1 et k2 doivent avoir des valeurs assez proches l'une de l'autre (différence inférieure à un facteur 5)(figure A1). Plus la différence entre k1 et k2 augmente, plus la forme sigmoïde disparaît. On constate que les courbes sigmoïdes des travaux de Sadana et Henley (1985 a et b) pour lesquelles les valeurs des paramètres ont été calculées par régression non linéaire, répondent aussi à ces conditions.
A partir de ces conditions donnant lieu à des courbes sigmoïdes, par simulation sur ordinateur, nous avons étudié l'évolution de la configuration des courbes en faisant varier les divers paramètres (a1; a2; k1; k2)

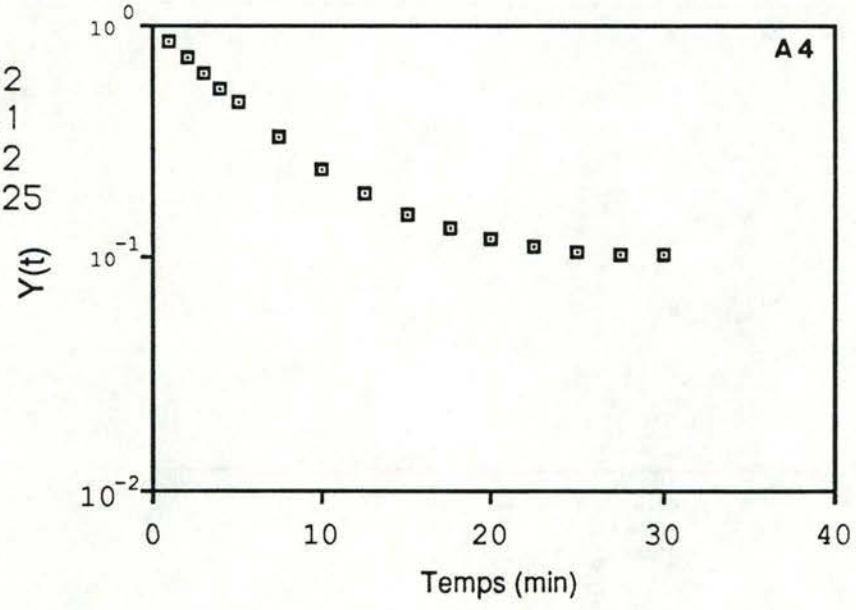
Evolution de la configuration sigmoïde :

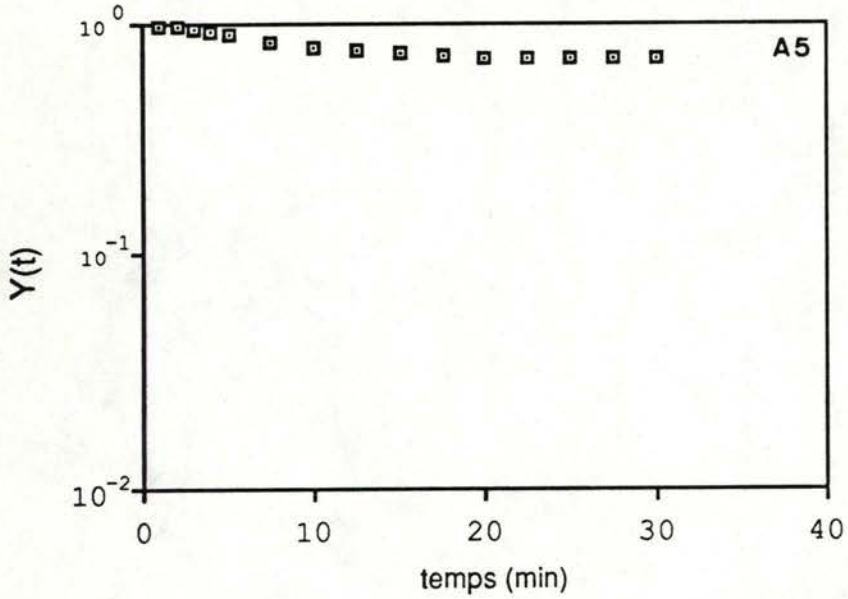
Pour accentuer la pente de la partie médiane d'une sigmoïde, il faut accentuer la différence entre a1 et a2 soit rapprocher a2 de 0 (figure A2). Une accentuation supplémentaire se réalise en augmentant k1 et k2 tout en maintenant leur valeur proche l'une de l'autre (figure A3).
Variations de a1 : à partir des conditions donnant naissance à une courbe sigmoïde, la diminution de a1 en-dessous de 1 fait progressivement disparaître cette configuration au profit d'une courbe concave (figure A4).
Variations de a2 : Lorsque a2 est proche de 1, la fonction a une forme biphasique constituée de 2 droites (figure A5). Lorsque a2 diminue, une courbe sigmoïde apparaît dont la pente de la partie médiane s'accentue avec cette diminution et dont la valeur Y(t) au temps 30 minutes diminue (figure A2) : cette valeur Y(t) tend vers la valeur a2. Lorsque la diminution s'accentue encore, la forme sigmoïde disparaît laissant place à une quasi droite de pente prononcée dont la première partie est convexe (figure A6).
Variations de k1 : lorsque la valeur de k1 est faible, la fonction donne lieu à une droite de pente faible comparable à celle que l'on obtient lorsque a2 se

a1 = 0.95
a2 = 0.03
k1 = 0.35
k2 = 0.36

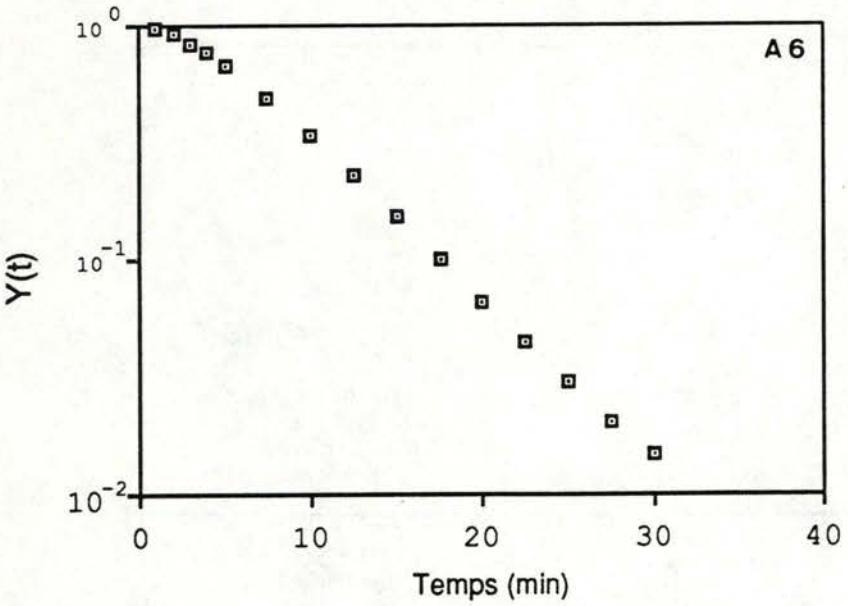


a1 = 0.2
a2 = 0.1
k1 = 0.2
k2 = 0.25



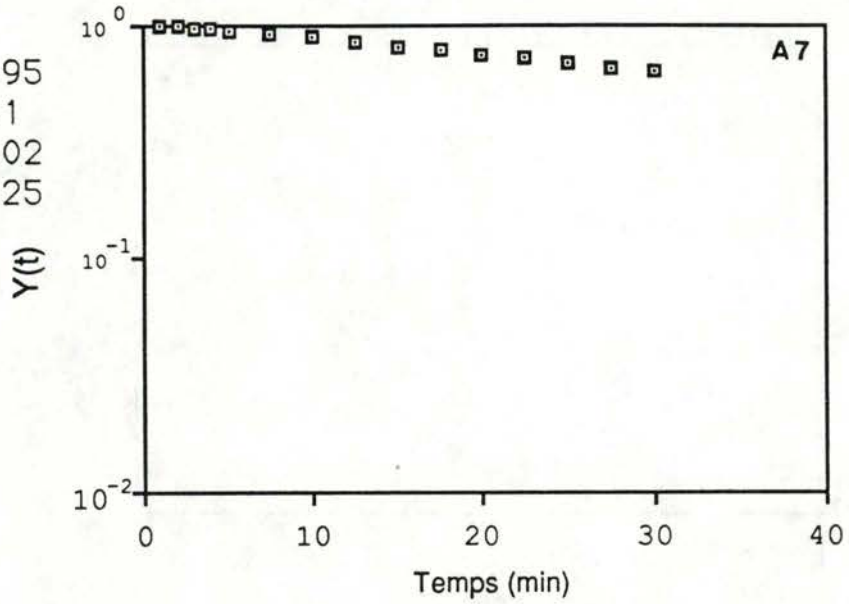


a1 = 0.95
a2 = 0.7
k1 = 0.2
k2 = 0.25

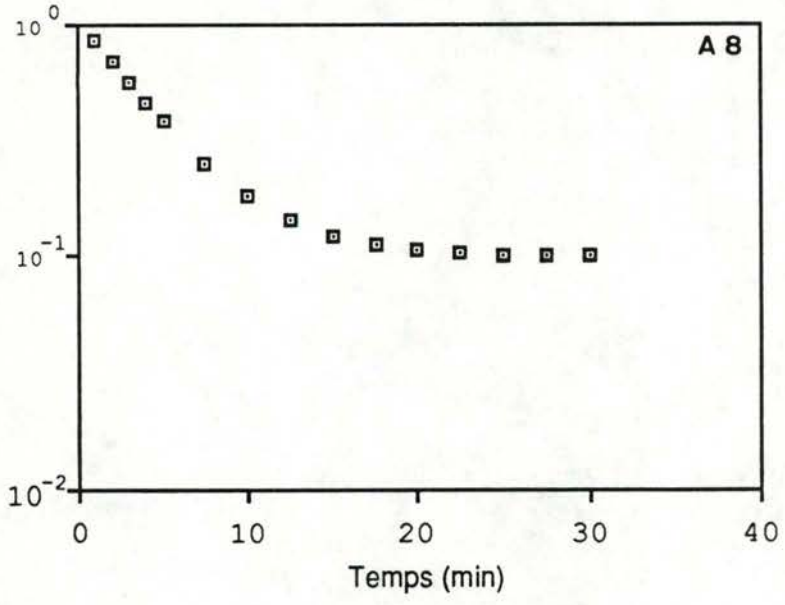


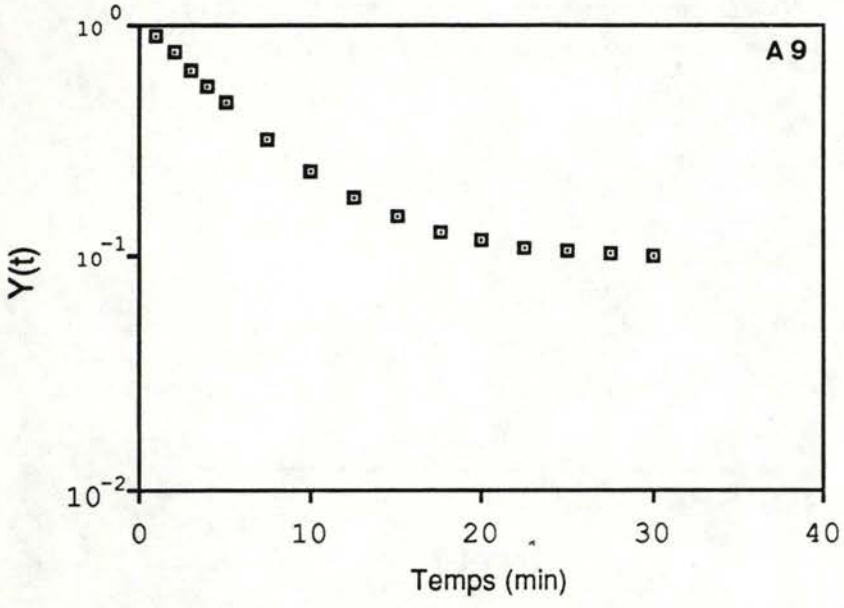
a1 = 0.95
a2 = 0.005
k1 = 0.2
k2 = 0.25

a1 = 0.95
a2 = 0.1
k1 = 0.02
k2 = 0.25



a1 = 0.95
a2 = 0.1
k1 = 2
k2 = 0.25





a1 = 0.95
a2 = 0.1
k1 = 0.2
k2 = 2

rapproche de 1 (figure A7). Lorsque cette valeur augmente, la configuration devient sigmoïde et une augmentation supplémentaire fait apparaître une courbe concave entraînant rapidement les valeurs de Y(t) vers la valeur de a2.

Variation de k2 : Lorsque k2 est faible, comme dans le cas de k1, une droite de faible pente représente la fonction Y(t). Avec l'augmentation de k2, la configuration passe par une courbe légèrement convexe de pente faible avant de devenir une sigmoïde puis enfin, comme dans le cas de k1, une courbe concave dont la valeur Y(t) tend vers les valeurs de a2 lorsque t est grand (figure A9).

Par conséquent, lorsque les conditions pour donner une sigmoïde sont réunies :

une diminution de k1 seul a le même effet qu'une diminution de k2 seul : la sigmoïde devient une droite de faible pente.

une augmentation de k1 seul a le même effet que une augmentation de k2 seul ou une diminution de a2 seul : la sigmoïde devient une courbe concave.

une diminution de a2 seul donne lieu à une accentuation de la pente de la partie médiane de la sigmoïde puis à une courbe convexe alors que son augmentation vers 1 donne naissance à une courbe biphasique.

BIBLIOGRAPHIE

A

Aebi, H. (1974).
In : Methods of enzymatic analysis vol 2. Ed : H.V. Bergmeyer. Academic Press, Inc. New-York. pp 674-684.

Ahern, T.J. and Klibanov, A.M. (1985). The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C.
Science, 228, 1280-1284.

Akasaka, M.; Mizoguch, J.; Yoshimura, S. and Watanabe, K. (1989). Nucleotide sequence of cDNA for rabbit Glutathione Peroxidase.
Nucl. Acid Res., 17, 2136.

Antonenkov, V.D.; Gusev, V.A. and Pomchenko, L.F. (1987). Effect of clofibrate treatment on GSH content and the activity of the enzymes related to peroxide metabolism in rat liver and heart.
Int. J. Biochem., 19, 187-192.

Armstead, W.M.; Mirro, R.; Busija, D.W. and Leffler, C.W. (1988). Postischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain.
Am. J. Physiol., 255, H401-H403.

Aust, S.D.; Morehouse, L.A. and Thomas, C.E. (1985). Role of metals on oxygen radical reactions.
J. Free Radicals Biol. Med., 1, 3-25.

Avissar, N.; Within, J.C.; Allen, P.Z.; Wagner, D.D.; Liegey, P. and Cohen, H.J. (1989). Plasma selenium-dependent Glutathione Peroxidase. Cell of origin and secretion.
J. Biol. Chem., 264, 15850-15855.

Awasthi, Y.C.; Beutler, E. and Srivastava, S.K. (1975). Purification and properties of human erythrocyte Glutathione Peroxidase.
J. Biol. Chem., 250, 5144-5149.

Awasthi, Y.C.; Dao, D.D.; Lal, A.K. and Srivastava, S.K. (1979). Purification and properties of Glutathione Peroxidase from human placenta.
Biochem. J., 177, 471-476.

Axley, M.J. and Stadtman, T.C. (1989). Selenium metabolism and selenium-dependent enzymes in microorganisms.
Ann. Rev. Nutr., 9, 127-137.

B

Babizhaev, M.A.; Arkhijenko, Y.V. and Kagan, V.E. (1987). Antioxidant enzyme activity and peroxide metabolism in the lens and their role in cataract formation.
Bull. Exp. Biol. Med., 103, 156-160.

Baker, J.E.; Felix, C.C.; Olinger, G.N. and Kalyanaraman, B. (1988). Myocardial ischemia and reperfusion : direct evidence for free radical generation by electron spin resonance spectroscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2786-2789.

Baker, M.A. and Tappel, A.L. (1986). Effects of ligands on cold inhibition of selenium Glutathione Peroxidase.
Biochem. Pharmacol., 35, 2417-2422.

Bansal, M.P.; Oborn, C.J.; Danielson, R.G. and Medina, D. (1989). Evidence of two selenium binding proteins distinct from Glutathione Peroxidase in mouse liver.
Carcinogenesis, 10, 541-546.

Barja de Quiroga, G.; Lopez-Torres, M. and Gil, P. (1989). Hyperoxia decreases the lung size of amphibian tadpoles without changing Glutathione Peroxidase or tissue peroxidation.
Comp. Biochem. Physiol., 92A, 581-588.

Baur, G.; Jung, A. and Wendel, A. (1982). Die aktivität des glutathione-redox systems in menschlicken erythozyten unterschiedlichen alters.
Klin. Wochenschr. 60, 867-869.

Beauchamp, C.O. and Firdovich, I. (1973). Isoenzymes of SOD from wheat germ.
Biochim. Biophys. Acta, 317, 50-64.

Behne, D; Hofer, T.; Vonberwski,R. and Elger, W. (1982). Selenium in the testis of the rat : studies on its regulation and its importance for the organism.
J. Nutr. 112, 1682-1687.

Beloqui, O. and Oderbaum, A.I. (1986). Prevention of microsomal production of OH· but not lipid peroxidation by the glutathione-Glutathione Peroxidase system.
Biochem. Pharmacol., 35, 2663-2669.

Bem, E.M.; Mailer, K. and Elson, C.M. (1985). Influence of mercury(II), cadmium(II), methylmercury and phenylmercury on the kinetic properties of rat liver Glutathione Peroxidase.
Canad. J. Biochem. Cell Biol., 63, 1212-1231.

Benzi, G.; Pastoris, O. and Villa, R.F. (1988). Changes induced by aging and drug treatment on cerebral enzymatic antioxidant system.
Neurochem. Res., 13, 467-468.

Benzi, G.; Pastoris, O.; Marzatico, F. and Villa, R.F. (1989). Cerebral enzyme antioxidant system. Influence of aging and phosphatidylcholine.
J. Cerebral Blood Flow Met., 9, 373-380.

Bertini, I.; Luchinat, C.; Viezzoli, M.S. and Wang, Y. (1989). Active site modification of SOD by H_2O_2 studied through ^1H NMR of the cobalt derivatives.
Arch. Biochem. Biophys., 269, 586-594.

Beutler, E.; West, C. and Beutler, B. (1974). Electrophoretic polymorphism of Glutathione Peroxidase.
Ann. Human Gen., 38, 163-169.

Biemond, P.; Swaak, A.J.G.; Biendorff, C.M. anf Korler, J.F. (1986). Superoxide dependent and independent mechanisms of iron mobilization from ferritin by xanthine oxydase. Implication for oxygen-free-radical-induced tissue destruction during ischaemia and inflammation.
Biochem. J., 239, 169-173.

Blech, D.M. and Borders, C.L. (1983). Hydroperoxide anions, HO_2^- is an affinity reagent for the inactivation of yeast Cu, Zn superoxide dismutase : modification of one histidine per subunit.
Arch. Biochem. Biophys., 224, 579-586.

Blum, J. and Fridovich, I. (1985). Inactivation of Glutathione Peroxidase by superoxide radical.
Arch. Biochem. Biophys., 240, 500-508.

Bonsignore, A.; Cancedda, R.; Nicolini, A.; Daniani, G. and De Flora, A. (1971). Metabolism of G6PD of human erythrocytes : interconversion of multiple molecular forms.
Arch. Biochem. Biophys., 147, 493-501.

Braquet, P. and Braquet, M. (1983).
In : Biochimie de l'inflammation. Eds : F. Blotman; A. Castres de Paulet et L. Simon. Masson, Paris, France. p 70.

Bray, M.C.; Cockle, S.A.; Fielden, E.M.; Roberts, P.B.; Motilio, G. and Calabrese L. (1974). Inactivation of bovine superoxide dismutase by hydrogen hydroperoxide : destruction of one histidine residue per subunit.
Biochem. J. 139, 43-48.

Broderik, D.J.; Deagen, J.T. and Whanger, P.D. (1987). Properties of Glutathione Peroxidase isolated from human plasma.
J. Inorg. Biochem., 30, 299-309.

Brunauer, L.S. and Clarke, S. (1986). Age dependent accumulation of protein residues which can be hydrolyzed to D-aspartic acid in human erythrocytes.
J. Biol. Chem. 261, 12538-12543.

Bryant, R.W. and Bailey J.M. (1980). Altered lipoxigenase metabolism and decreased Glutathione Peroxidase activity in platelets from selenium deficients rats.
Biochem. Biophys. Res. Com. 92, 268-276.

Bult, H.; Vandenbosch, P.; Vandenbosch, R.; Vanhoydonck,A. and Herman, A.G. (1981). Selenium deficiency impairs the biosynthesis of prostacyclin in rat aorta.
Thromb. Haemat. 46, 272.

C

Cancedda, R.; Ogunneola, G. and Luzzatto, L. (1973). Genetic variants of human erythrocytes G6PD : discrete conformational states stabilized by $NADP^+$ and NADPH.
Eur. J. Biochem., 34, 199-204.

Capasso, J.M. and Zimmerman, J.A. (1980). Age-related alterations in the heat stability of mouse heart phosphorylase.
Exp. Gerontol., 15, 161-165.

Carmagnol, F.; Sinet, P.M. and Jérome, H. (1983). Selenium dependent and on selenium dependent Glutathione Peroxidase in human tissue extracts.
Biochim. Biophys. Acta, 759, 49-57.

Ceballos, I.; Delabar, J.M.; Nicole, A.; Lynch, R.E.; Hallewell, R.A.; Kamoun, P. and Sinet, P.M. (1988). Expression of transfected human CuZn Superoxide dimsutase gene in mouse L cells and NS20Y neuroblastoma cells induces enhancement of Glutathione Peroxidase activity.
Biochim. Biophys. Acta, 949, 58-64.

Cerami, A.; Vlassara, H. and Brownlee, M. (1987). Glucose and aging.
Scient. Am. 256, 90-96.

Chada, S.; Whitney, C. and Newburger, P.E. (1989). Post-transcriptional regulation of GPX gene expression by Selenium in the HL-60 human myeloïd cell line.
Blood, 74, 2535-2541.

Chambers, I. and Harisson, P.R. (1987). A new puzzle in selenoprotein biosynthesis : selenocysteine seems to be encoded by the 'stop' codon, UGA.
Trends Biochem. Sci., 12, 255-256.

Chambers, E.; Parks, D.A.; Patterson, G.; Roy, R.; McCord, J.M.; Yoshida, S.; Parmley, L.F. and Dawney, J.M.. (1985). Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischaemia.
J. Mol. Cell Cardiol. 17, 145-152.

Chambers, I.; Frampton, J.; Goldfrab, P.; affara, N.; McBrain, W. and Harrisson, P.R. (1986). The structure of the mouse Glutathione Peroxidase gene : the selenocysteine in the active site is encoded by the termination codon TGA.
EMBO J., 5, 1221-1227.

Chance, B. (1950). The reactions of catalase in the presence of the notatin system.
Biochem. J., 46, 387-402.

Chance, B.; Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.
Physiol. Rev., 59, 527-605.

Chaudière, J. (1986). Rôle possible de la glutathion peroxydase dans la régulation de l'activité collagénase.
Ann. Biol. Clin., 44, 181-187.

Chaudière, J. and Tappel, A.L. (1983). Purification and characterization of selenium-Glutathione Peroxidase form hamster liver.
Arch. Biochem. Biophys., 226, 448-457.

Chaudière, J. and Tappel, A.L. (1984). Interaction of gold(I) with the active site of selenium Glutathione Peroxidase.
J. Inorg. Biochem., 20, 313-325.

Chaudière, J.; Wilhelmsen, E.C. and Tappel, A.L. (1984). Mechanism of selenium Glutathione Peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans.
J. Biol. Chem., 259, 1043-1050.

Chaudière, J.; Gérard, D.; Clément, M. and Bourré, J.M. (1987). Induction of selenium Glutathione Peroxidase by stimulation of metabolic H_2O_2 production in vivo.
Biochem. Bioenerg., 18, 247-256.

Chin, D.T.Y.; Stult, F.H. and Tappel, A.L. (1976). Purification and properties of rat lung soluble Glutathione Peroxidase.
Biochim. Biophys. Acta, 445, 558-566.

Chow, C.K. and Tappel, A.L. (1974). Response of Glutathione Peroxidase to dietary selenium in rats.
J. Nutr., 104, 444-451.

Chow, C.K.; Dillard, C.J. and Tappel, A.L. (1974). Glutathione Peroxidase system and lysozyme in rats exposed to ozone or nitrogen dioxide.
Environ. Res., 7, 311-319.

Cikryt, P.; Fenerstein, S. and Wendel, A. (1982). Selenium and non selenium glutathione peroxidases in mouse liver.
Biochem. Pharmacol., 31, 2873-2877.

Cohen, B.H. and Zubenko, G.S. (1985). Aging and the biophysical properties of cell membranes.
Life Sci., 37, 1403-1409.

Cohen, P. and Rosemeyer, M.A. (1969). Subunit interactions of G6PD from human erythrocytes.
Eur. J. Biochem., 8, 8-15.

Cohen, G. and Hochstein, P. (1963). Glutathione Peroxidase : the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes.
Biochemistry, 2, 1420-1428.

Cohen, G. (1985). Oxidative stress in the nervous system.
In : oxidative stress. Ed : Sies, H., Academic Press, Florida USA, pp 395-396.

Cohen, H.J. and Takahashi, K. (1986). Human plasma Glutathione Peroxidase : isolation and characterization of a unique selenium enzyme.
Clin. Res., 34, 635A.

Condell, R.A. and Tappel; A.L. (1983). Evidence for suitability of Glutathione Peroxidase as a protective enzyme : studies of oxidative damage, renaturation and proteolysis.
Arch. Biochem. Biophys., 223, 407-416.

Corbisier, P. (1989). Importance des mitochondries dans un processus de vieillissement cellulaire.
Thèse de doctorat, FNDP, Namur, Belgique.

Cotgreave, I.A. and Moldeus, P. (1988). Lung protection by thiol containing antioxidants.
Bull. Eur. Physiopathol. respir., 23, 275-277.

Cotgreave, I.A.; Duddy, S.K.; Kass, G.E.N.; Thompson, D. and Moldeus, P. (1989). Studies on the antiinflammatory activity of ebselen.
Biochem. Pharmacol., 38, 649-656.

Coursin, D.B.; Cihla, H.P.; Will, J.A. and McCreary, J.L. (1985). Adaptation to chronic hyperoxia. Biochemical effects and the response to subsequent lethal hyperoxia.
Am. Rev. Respir. Dis. 135, 1002-1006.

Crosti, N.; Bajer, J.; Gentile, M.; Resta, G. and Serra, A. (1989). Catalase and Glutathione Peroxidase activity in cells with trisomy 21.
Clin. Gen., 36, 107-116.

Croute, F.; Vidal, S.; Dupery, D.; Soleilharoup, J.P. and Serre, G. (1985). Studies on catalase, Glutathione Peroxidase and SOD activities in aging cells of *Paramecium tetraurelia*.
Mech. Age. Dev., 29, 53-62.

Cupp, M.S.; Combs, G.F. and Covradino, R.A. (1989). Ascorbate interacts with sodium selenite to increase Glutathione Peroxidase activity in Se deficient chick duodena in vitro.
Biol. Trace El. Res., 20, 87-94.

Cutler, R.G. (1984). Free radicals and aging.
In : Molecular basis of aging. Eds Roy, A.K. and Chatterjee, B., Academic Press Inc., Orlando Florida, USA, PP 263-354.

D

Davies, M.J.; Donkor, R.; Dunster, C.A.; Gee, C.A.; Jonas, S. and Willson, R.L. (1987). Desferrioxamine (desferal) and superoxide free radicals. Formation of an enzyme-damaging nitroxide.
Biochem. J., 246, 725-729.

Davies, K.J.A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects.
J. Biol. chem., 262, 9895-9901.

Davies, K.J.A. and Delsignore, M.E. (1987). Proteins damage and degradation by oxygen radicals. III Modification of secondary and tertiary structure.
J. Biol. Chem., 262, 9908-9913.

Davies, K.J.A. and Goldberg, A.L. (1987a). Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes.
J. Biol. Chem., 262, 8220-8226.

Davies, K.J.A. and Goldberg, A.L. (1987b). Protein damaged by oxygen radicals are degraded in extracts of red blood cells.
J. Biol. Chem., 262, 8227-8234.

Davies, K.J.A. and Lin, S.W. (1988a). Degradation of oxydatively denaturated proteins in *E. coli*.
Free Radicals Biol. Med., 5, 215-223.

Davies, K.J.A. and Lin, S.W. (1988b). Oxydatively denaturated proteins are degraded by ATP-independent proteolytic pathway in *E. coli*.
Free Radicals Biol. Med., 5, 225-236.

Davies, K.J.A.; Delsignore, M.E. and Lin, S.W. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals : II Modification of amino-acids.
J. Biol. Chem., 262, 9902-9907.

Davison, A.J.; Kettle, A. and Fatur, D.J. (1986). Mechanism of the inhibition of catalase by ascorbate. Roles of actives oxygen species, copper and semidehydroascorbate.
J. Biol. Chem., 261, 1193-1200.

Deagen, J.T.; Butler, J.A.; Beilstein, M.A. and Whanger, P.D. (1987). Effects of dietary selenite, selenocysteine and selenomethionine on selenocysteine lyase and Glutathione Peroxidase activities and on selenium levels in rat tissues.
J. Nutr., 117, 91-98.

Dean, R.T. (1987). A mechanism for accelerated degradation of intracellular proteins after limited damage by free radicals.
FEBS Lett., 220, 278-282.

Dean, R.T. and Cheeseman, K.H. (1987). Vitamin E protects proteins against free radical damage in lipid enironments.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 148, 1277-1282.

Dean, R.T. and Pollak, J.K. (1985). Endogenous free radical generation may influence proteolysis in mitochondria.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 126, 1082-1089.

Dereu, N. and Graf, E. (1984). Ebselen.
Drugs of the future, 9, 741-742.

Di Ilio, C.; Sacchetta, P.; Lo Bello, M.; Caccuri, A.M. and Frederici, G. (1986). Selenium independent Glutathione Peroxidase activity associated with cationic forms of GSH transferase in human heart.
J. Mol. Cell. Cardiol., 18, 983-995.

Dillard, C.J.; Hu, M.C. and Tappel, A.L. (1987). Effect of aurothioglucose on GSH and GSH-metabolizing and related enzymes in rat liver and kidney.
Chem. Biol. Interactions, 64, 103-114.

Downey, J.M.; Hearse, D.J. and Derek, M.Y. (1988). The role of xanthine oxidase during myocardial ischaemia.
J. Mol. Cell. Cardiol., 20, 55-63.

Dreyfus, J.C.; Kahn, A. and Schapira, F. (1978). Posttranslationnal modifications of enzymes.
In : Current topics in cellular regulation. Eds : B. Horecker and E.R. Stadtman. Academic Press Inc. New-York. pp 243-297.

Duan, Y.J.; Komura, S.; Fiszer-Szafarz, B.; Szafarz, D. and Yagi, K. (1988). Purification and characterization of a novel monomeric Glutathione Peroxidase form rat liver.
J. Biol. Chem., 263, 19003-19008.

Dulic, V. and Gafni, A. (1987). Mechanism of aging of rat muscle gly-3-P-dehydrogenase studied by selective enzyme oxidation.
Mech. Ageing Dev., 40, 289-306.

E

Elsayed, N.M.; Hacher, A.D.; Kuehn, K.; Mustafa, M.G. and Sehrauzer, G.N. (1983). Dietary antioxidants and the biochemical response to oxidant inhalation. II Influence of dietary selenium on the biochemical effects of ozone exposure of mouse lung.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 71, 398-406.

Epp, O.; Ladenstein, R. and Wendel, A. (1983). The refined structure of the seleno-enzyme Glutathione Peroxidase at 0.2 nm resolution.
Eur. J. Biochem., 133, 51-69.

Erden, M. and Bor, N.M. (1984). Changes of reduced glutathione, Glutathione Reductase and Glutathione Peroxidase after radiation in guinea pigs.
Biochem. Med., 31, 217-227.

Esaki, N.; Nakamura, T.; Tanaka, H. and Soda, K. (1982). Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine.
J. Biol. Chem., 257, 4386-4391.

Esterbauer, H. (1982). Aldehydic products of lipid peroxidation.
In : Free radicals, lipid peroxidation and cancer. Eds : D.C.H. McBrien and T.F. Slater. Academic Press Inc, London. pp101-128.

F

Fee, J.A.; Peisach, J. and Mims, W.B. (1981). Superoxide dismutase : examination of the metal binding site by electron spin echo spectroscopy.
J. Biol. Chem. 256, 1910-1914.

Fico, M.E.; Poirier, K.A.; Watrach, A.M., Watrach, M.A. and Milner, J.A. (1986). Differential effects of selenium on normal and neoplastic canine mammary cells.
Canc. Res. 46, 3384-3388.

Fielden, E.M.; Roberts, P.B.; Bray, R.C. and Rotillio, G. (1973). Mechanism and inactivation of SOD activity.
Biochem. Soc. Trans., 1, 52-53.

Finch, C.E. (1972). Enzyme activities, gene functions and ageing in mammals.
Exp. Geront. 7, 52-67.

Fita, I. and Rossmann, M.G. (1985). The NADPH binding site of beef liver catalase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 1604-1608.

Flaherty, J.T. and Weisfeldt, M.L. (1988). Reperfusion injury.
Free Radicals Biol. Med., 5, 409-491.

Fleshman, K.R.; Margolis, J.W.; Fu, S.J. and Wagner, B.J. (1985). Age changes In bovine lens endopeptidase activity.
Mech. Age. Dev., 31, 37-47.

Flohé, L. (1982). Glutathione Peroxidase brought into focus.
In : Free radicals in biology, vol V. Ed : Pryor, A.W., Academic Press, Inc, New-York pp 223-254.

Flohé, L. and Gunzler, W.A. (1984) Assays of Glutathione Peroxidase.
Meth. Enzymol., 105, 114-121.

Flohé, L.; Loschen, G.; Günzler, A.G. and Eichele, E. (1972). Glutathione Peroxidase, V. Kinetic mechanism.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 987-999.

Flohé, L.; Günzler, W.A. and Schoek, H.H. (1973). Glutathione Peroxidase : a seleno-enzyme.
FEBS Lett., 32, 132-134.

Flohé, L.; Beehmann, R.; Giertz, H. and Loschen, G. (1985). Oxygen centered free radicals as mediators of inflammation.
In : Oxidative stress. Ed Sies, H.; Academic Press, Orlando Florida, USA pp 403-435.

Foote, C.S. (1976). Photosensitized oxidation and singlet oxygen : consequences in biological systems.
In : Free radicals in Biology vol 2. Ed Pryor, W.A., Academic Press, London, pp 85-133.

Forstrom, J.W.; Zakowski, J.J. and Tappel, A.L. (1978). Identification of the catalytic site of rat liver Glutathione Peroxidase as selenocysteine
Biochemistry, 17, 2639-2644.

Forstrom, J.W. and Tappel, A.L. (1979). Donor substrate specificity and thiol reduction of glutathione disulfite peroxydase.
J. Biol. Chem., 254, 2888-2891.

Forward, R. and Rami, A. (1985) Separation of two forms of Glutathione Peroxidase form human erythrocytes by hydrophobic chromatography.
J. Chromat., 330, 383-387.

Fridovich, I. (1974). Superoxide dismutases.
Adv. Enzymol. 41, 35-97.

Fridovich, I. (1983). Superoxide radical : an endogenous oxidant.
Am. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23, 239-257.

Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases.
Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol. 58, 61-97.

G

Gaetani, G.F.; Galiano, S.; Carrefa, L.; Ferraris, A.M. and Kirkman, H.N. (1989). Catalase and Glutathione Peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes.
Blood, 73, 334-339.

Gafni, A. (1983). Molecular origin of the aging effects in G3PDH.
Biochim. Biophys. Acta, 742, 91-99.

Galiazzo, F.; Sekiesser, A. and Rotilio, G. (1987). Glutathione Peroxidase in yeast. Presence of the enzyme and induction by oxidative conditions.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 147, 1200-1205.

Garland, D.; Russel, P. and Zigler J.S. (1988). The oxidative modification of lens proteins.
In : Oxygen radicals in Biology and Medicine. Eds : M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward and C. Von Sonntag. Plenum Press, New-York, vol 49 pp 347-352.

Geiger, T. and Clarke, S. (1987). Deamidation, isomerization and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides.
J. Biol. Chem. 262, 785-794.

Gharagozloo, F.; Melendez, F.J.; Hein, R.A.; Shemin, R.J.; DiSera, V.J. and Cohn, L.H. (1988). The effect of SOD and catalase on the extended preservation of the ex vivo heart for transplantation.
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 95, 1008-1013.

Gherson, H. and Gherson, D. (1973). Inactive enzyme molecules in aging mice : liver aldolase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 909-913.

Giloni, L.; Takeshita, M.; Johnson, F.; Iden, C. and Grollman, A. (1981). Bleomycin-induced strand-scission of DNA. Mechanism of deoxyribose cleavage.
J. Biol. Chem., 256, 8608-8615.

Go, N. (1975). Theory of reversible denaturation of globular proteins.
Pept. Prot. Res. 7, 313-323.

Golczewski, J.A. and Frenkel, G.D. (1989). Cellular selenoproteins and the effects of selenite on cell proliferation.
Biol. Trac. El. Res., 20, 115-126.

Goldstein, S.; Scotland, D. and Cordeiro, R.A.J. (1976). Decreased proteolysis and increased amino acid efflux in aging human fibroblasts.
Mech. Age. Dev. 5, 221-233.

Gordilla, E.; Ayala, A.; Lobato, M.; Bantista, J. and Machato, A. (1988). Possible involvment of histidine residues in the loss of enzymatic activity of rat liver malic enzyme during aging.
J. Biol. Chem., 263, 8053-8058.

Gordon, P. (1974). Free radicals and the aging process.
In : Theoritical aspects of aging. Eds : Rockstein, M.; Sussman, M.C. and Chesky, J. Academic Press, Inc., London, pp 61-103.

Green, R.C. and O'Brien, P.J. (1970). The cellular localisation of Glutathione Peroxidase and its release from mitochondria during swelling.
Biochim. Biophys. Acta, 197, 31-39.

Griffith, O.W. and Suresh, S. (1980). The apparent glutathione oxidase activity of γ-glutamyl transpeptidase.
J. Biol. Chem., 255, 5011-5014.

Griffiths,H.R.; Lunec, J.; Blake, D.R. and Willson, R.L. (1988). Free radical denaturation of immunoglobulin G is due to amino acid oxidation : implications of Rheumatoïd arthritis.
In : Oxygen radicals in Biology and Medicine. Eds : M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward and C. Von Sonntag. Plenum Press, New-York, vol 49 pp 357-360.

Griffiths, H.R.; Lunec, J.; Jefferis, R.; Blake, D.R. and Willson,R.L. (1988). A study of ROS induced denaturation of IgG 3 using monoclonal antibodies : implication for inflammatory joint disease.
In : Oxygen radicals in Biology and Medicine. Eds : M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward and C. Von Sonntag. Plenum Press, New-York, vol 49 pp 361-364.

Gromaddzinska, J.; Wasowicz, W.; Sklodonske, M. and Strozynski, H. (1988). Glutathione Peroxidase activity, lipid peroxides and selenium status in blood in patients with Down's syndrome.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 26, 255-258.

Grossmann, A. and Wendel, A. (1985).
In : Handbook of methods for oxygen radical research. Ed : Greenwald, R.A., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, U.S., pp 39-45.

Gupta, S.K. and Rothstein, M. (1976). Phosphoglycerate kinase from young and old *Turbatrix aceti*.
Biochim. Biophys. Acta, 445, 632-644.

H

Hafeman, D.G.; Sunde, R.A. and Hoekstra, W.G. (1974). Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver Glutathione Peroxidase in rat.
J. Nutr., 104, 580-587.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1981). Formation of a thiobarbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the presnce of iron salts : the role of superoxide and hydroxyl radicals.
FEBS Lett., 128, 347-352.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transitions metals and disease.
Biochem. J., 219, 1-14.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1985).
In : Free radicals in biology and medicine. Eds Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Oxford University Press, London, UK.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1988). Free radicals and antioxidant protections : mechanisms and significance in toxicology and disease.
Human Toxicol., 7, 7-13.

Hamers, M.N. and Roos, D. (1985). Oxidative stress in human neutrophilic granulocytes : host defence and self-defence.
In : Oxidative stress. Ed : Sies, H., Academic Press, Inc., Orlando, Florida USA p353.

Harding, J. (1973). Altered heat lability of a fraction of glutathione reductase in aging human lens.
Biochem. J., 134, 995-1000.

Harlan, J.M.; Levine, J.D.; Callahan, K.S. and Schwartz, B.R. (1984). Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide.
J. Clin. Invest., 73, 706-713.

Hatzelmann, A.; Schatz, M. and Ullrich, V. (1989). Involvment of Glutathione Peroxidase activity in the stimulation of 5-lipoxygenase activity by glutathione depleting agents in human polymorphonuclear lymphocytes.
Eur. J. Biochem., 180, 527-533.

Hawkes, W.C. and Tappel, A.L. (1983). In vitro synthesis of Glutathione Peroxidase from selenite translational incorporation of selenocysteine.
Biochim. Biophys. Acta, 739, 225-234.

Hawkes, W.C.; Lyons, D.E. and Tappel, A.L. (1982). Identification of a selenocysteine-specific aminoacyl transfer RNA from rat liver.
Biochim. Biophys. Acta, 699, 183-191.

Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.
Exp. Cell. Res. 37, 614-636.

Hayflick, L. (1974). The longevity of cultured human cells.
J. Am. Ger. Soc. 22, 1-12.

Hayflick, L. (1985). Theories of biological ageing.
Exp. Gerontol., 20, 145-159.

Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains.
Exp. Cell. Res. 25, 585-621.

Hayflick, L. and Finch, E. (1977).
In : Handbook of the biology of ageing. Ed : Van Nostrand; Rheinold Comp. New-York, pp 626-627.

Hazelton, G.A. and Lang, C.A. (1985). Glutathione Peroxidase and Reductase activities in the aging mouse.
Mech. Age. Dev., 29, 71-81.

Hearse, D.J. and Tosaki, A. (1988). Free radicals and calcium : simultaneous interacting triggers as determinants of vulnerability to reperfusion-induced arrythmias in the rat heart.
J. Mol. Cell. Cardiol., 20, 213-233.

Henley, J.P. and Sadana, A. (1986). Deactivation theory.
Biotechnol. Bioengin. 28, 1277-1285.

Heuer, H.J.; Muller, E. and Bernaner, W. (1988). Differential effects of SOD on high energy phosphates, creatine kinase release and arrythmias during post ischemic reperfusion in isolated rat hearts.
Basic Res. Cardiol., 83, 149-157.

Hill, K.E.; Burk, R.F. and Lane, J.M. (1987). Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione dependent enzymes in the rat.
J. Nutr., 117, 99-104.

Hirsh, G. (1983). Error measurment methods in aging research.
In : Altered proteins and aging. Eds : Adelman, R.C. and Roth, G.S., CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S., pp 35-52.

Ho, Y.S.; Howard, A.J. and Crapo, J.D. (1988). Nucleotide sequence of a rat Glutathione Peroxidase cDNA.
Nucl. Acid Res., 16, 5207.

Hodgson, E.K. and Fridovich, I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte SOD with H_2O_2 : inactivation of the enzyme.
Biochemistry, 14, 5294-5299.

Hoekstra, W.G. (1975). Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E.
Fed. Proc., 34, 2083-2089.

Holliday, R. (1988). Toward a biological understanding of the ageing process.
Persp. Biol. Med., 32, 109-123.

Hong, S.L.; Carty, T. and Deykin, D. (1980). Tranylcipromine and 15-hydroxiarachidonate affect arachidonic acid release in addition to inhibition of prostacyclin synthesis in calf aortic endothelial cells.
J. Biol. Chem. 255, 9538-9540.

Hothersall, J.S.; El-Hassan, A.; McLean, P. and Grennbaum, A.L. (1981). Age-related changes in enzymes of rat brain. Redox system linked to NADP and glutathione.
Enzyme, 26, 271-276.

Houben, A.; Raes, M.; Houbion, A. and Remacle, J. (1984a). Alteration of enzymes in aging human fibroblasts in culture. 1. Conditions for the appearance of an alteration in G6PD.
Mech. Age. Dev., 25, 23-34.

Houben, A.; Raes, M.; Houbion, A. and Remacle, J. (1984b). Alteration of enzymes in aging human fibroblasts in culture. 2. Conditions for reversibility and mechanisms of the alteration of G6PD.
Mech. Age. Dev., 25, 35-45.

Housset, B.; Ody, C.; Rubin, D.B.; Elemer, G. and Junod, A.F. (1983). Oxygen toxicity in cultured aortic endothelium : Se-induced partial protective effect.
J. Appl. Physiol., 55, 343-352.

Huang, C.; Berns, D.S. and McColl, R. (1987). Kinetics of allophycocyanin's Trimer-monomer equilibrium.
Biochemistry, 26, 243-245.

I

Ichinose, T. and Sagai, M. (1982). Studies on biochemical effects on nitrogen dioxide : changes of the antioxidative protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by chronic exposure.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 66, 1-8.

Iminashi, H.; Nakai, T.; Abe, T. and Takino, T. (1985). Glutathione metabolism in red cell aging.
Mech. Age. dev., 32, 57-62.

Iminashi, H.; Nakai, T.; Abe, T. and Takino, T. (1986). Glutathione-linked enzyme activities in red cell aging.
Clin. Chim. Acta, 159, 73-76.

Ishida, K.; Morino, T.; Takagi, K. and Sukenaga, Y. (1987). Nucleotide sequence of a huma gene for human Glutathione Peroxidase.
Nucl. Acid Res., 15, 10051.

Ip, C. (1981). Prophylaxis of mammary neoplasia by Se supplementation in the initiation and promotion phases of chemical carcinogenesis.
Cancer Res., 41, 4386-4390.

J

Jenkinson, S.G.; Spence, T.H.; Lawrence, R.A.; Hill, K.E.; Dunean, C.A. and Johnson, K.H. (1987). Rat lung glutathione release : response to oxidative stress and Se deficiency.
J. Appl. Physiol., 62, 55-60.

Jennings, R.B.; Reimer, K.A.; Hill, M.L. and Mayer, S.E.. (1981). Total ischaemia in dog hearts in vitro I. Comparison of high energy phosphate production, utilization and depletion and of adenosine catabolism in total ischaemia in vitro versus severe ischaemia in vivo.
Circul. Res. 49, 892-900.

Jewett, S.L.; Cushing, S.; Gillespie, F.; Smith, D. and Sparks, S. (1989). Reaction of bovine liver Cu/Zn SOD with hydrogen peroxide. Evidence for reaction with H_2O_2 and HOO^- leading to loss of copper.
Eur. J. Biochem., 180, 569-575.

Jolly, R.S. and Lucchesi, B.R. (1983). Effect of BW755C in a occlusion-reperfusion model of ischaemic myocardial injury.
Am. Heart J. 106, 8-17.

Jones, D.P.; Eklow, L.; Thor, H. and Orrenius, S. (1981). Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes. Relative contributions of catalase and Glutathione Peroxidase in decomposition of endogenously generated hydrogen peroxide.
Arch. Bioch. Biophys. 210, 505-516.

Jones, D.P. (1985). The role of oxygen concentration in oxidative stress : hypoxic and hyperoxic models.
In : Oxidative stress. Ed : H. Sies. Academic press, Inc. Orlando, Florida, USA, pp152-195.

Jorgensen, P.L. and Andersen, J.P. (1986). Thermoinactivation and aggregation of a β subunits in soluble and membrane bound (Na, K)-ATPase.
Biochemistry, 25, 2889-2897.

Junod, A.F.; Jornot, L. and Grichting, G. (1987). Comparative study on the selenium and N-acetylcysteine related effects on the toxic action of hyperoxia, paraquat and the enzyme reaction hypoxanthine-xanthine oxidase in cultured endothelial cells.
Agents Actions, 22, 176-183.

K

Kanungo, M.S. (1980).
In : Biochemistry of ageing. Ed : M.S. Kanungo. Academic Press, London, p 281.

Kapor, M. and Lewis, J. (1987). Heat-shock induces peroxidase activity in *Neurospora crassa* and confers tolerance toward oxidative stress.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 147, 904-910.

Kappus, H. (1987). A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems.
Chim. Phys. Lip. 45, 105-115.

Kawai, S.; Komura, J.; Asada, Y. and Niwa, Y. (1988). Experimental burn induced changes in lipid peroxide levels and activity of SOD and Glutathione Peroxidase in skin lesions, serum and liver of mice.
Arch. Dermatol. Res., 280, 171-175.

Kay, M.M.B.; Bosman, J.G.M.; Shapiro, S.S. ; Bendich, A. and Bassel, P.S. (1986). Oxidation as a possible mechanism of cellular aging : vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 83, 2463-2467.

Kazuhiko, J.; Newburger, P.E. and Cohen, M.J. (1986). Glutathione Peroxidase proteine : absence in selenium deficiency states and correlation with enzymatic activity.
J. Clin. Invest., 77, 1402-1404.

Keilin, D. and Hartree, E.F. (1951). Purification of horse radish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methemoglobin.
Biochem. J., 49, 88-104.

Keilin, D. and Hartree, E.F. (1955). Catalase, peroxidase and methemoglobin as catalysts of coupled peroxidate reactions.
Biochem. J., 60, 310-325.

Kirkman, H.N.; Galiano, S. and Gaetani, G.F. (1987). The function of catalase-bound NADPH.
J. Biol. Chem. 262, 660-666.

Kono, Y. and Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase.
J. Biol. Chem., 257, 5751-5754.

Korpela, H. (1988). Comparative effect of selenate and selenite on serum Se concentration and Glutathione Peroxidase activity in Se depleted rats.
Ann. Nutr. Metab., 32, 347-351.

Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1978). The glutathione status of cells.
Int. Rev. Cytol. 54, 109-160.

Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1983). Glutathione and cell membrane thiol status.
In : Functions of glutathione. Biochemical, physiological toxicological and clinical aspects. Eds : A. Larrson, S. Orrenius, A. Holmgren, and B. Mannervik. Raven Press, New-York, pp 307-316.

Kraus, J.R.; Prohaska, J.R. and Ganther, H.A. (1980). Oxidized forms of ovine erythrocyte Glutathione Peroxidase : cyanide inhibition of 4-glutathione : 4-selenoenzyme.
Biochim. Biophys. Acta, 615, 19-26.

Kumar, K.S.; Sancho, A.M. and Weiss, J.F. (1986). A Novel interaction of DDC (diethyldithiocarbamate) with the GSH/GSH peroxidase system.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 12, 1463-1467.

Kwon, T.W. and Watts, B.M. (1963). Determination of malonaldehyde by ultraviolet spectrophometry.
J. Food Sci., 28, 627-630.

L

Ladenstein, R.; Epp, O.; Bartels, K.; Jones, A. and Huber, R. (1979). Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme Glutathione Peroxydase at 2.8 Â resolution.
Mol. Biol., 134, 199-218.

Lawrence, A.R. and Burk, R.F. (1976). Glutathione Peroxidase activity in selenium-deficient rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 71, 952-958.

Lawrence, A.R. and Burk, R.F. (1978). Species tissue and subcellular distribution of non Se-dependent Glutathione Peroxidase activity.
J. Nutr., 108, 211-215.

Lee, B.L.; Worland, P.J.; Davis, J.N.; Stadtman, T.C. and Hatfield, D.C. (1989). Identification of a selenocysteyl tRNA ser in mammalian cells that recognizes the nonsense codon UGA.
J. Biol. Chem., 264, 9724-9728.

Lehninger, A.L. (1977).
In : Biochimie. Ed : Lehninger, A.L.. Flammarion, Paris, France. p 104.

Leinfelder, W.; Stadtman, T.C. and Bock, A. (1989). Occurence in vivo of selenocysteyl-t-RNA in *E. coli*.
J. Biol. Chem., 264, 9720-9724.

Leurs, R.; Timmerman, H. and Bast, A. (1989). Inhibition of superoxide anion radical production by ebselen (PZ51) and its sulfur analogue (PZ25) in guinea pig alveolar macrophages.
Biochem. Int., 18, 295-299.

Levine, L.R. (1983). Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation due to loss of one histidine residue.
J. Biol. Chem., 258, 11823-11827.

Levine, L.R. (1983). Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system.
J. Biol. Chem., 258, 11828-11833.

Levine, R.L.; Oliver, C.N.; Fulks, R.M. and Stadtman, E.R. (1981). Turnover of bacterial glutamine synthetase : oxidative inactivation precedes proteolysis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2120-2124.

Lötscher, H.R.; Winterhalter, K.H.; Carafoli, E. and Richter, C. (1980). Hydroperoxide induced loss of pyridine nucleotides and release of Ca^{++} from rat liver mitochondria.
J. Biol. Chem. 255, 9325-9330.

Lowerson, J. and Clarke, S. (1988). Does the chemical instability of aspartyl and asparaginyl residues in proteins contribute to erythrocyte aging.
Blood Cells, 14, 103-117.

Lowry, O.H., Rosebrough, R.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Luther, M.A.; Cai, G.Z. and Lee, J.C. (1986). Thermodynamic of dimer and tetramer formations in rabbit muscle phosphofructokinase (PFK).
Biochem., 25, 7931-7937.

M

Maddipati, K.R. and Marnett, L.J. (1987). Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma : purification and properties of a Se-dependent Glutathione Peroxidase.
J. Biol. Chem., 262, 17398-17403.

Maiorino, M.; Roveri, A.; Gregolin, C. and Urisini, F. (1986). Different effects of triton X100, deoxycholate and fatty acids on the kinetics of Glutathione Peroxidase and phospholipid hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PHGPX).
Arch. Biochem. Biophys., 251, 600-605.

Maiorino, M.; Roveri, A.; Coassin M. and Urisini, F. (1988). Kinetic mechanism ans substrate specificity of Glutathione Peroxidase activity of ebselen (PZ51).
Biochem. Pharmacol., 37, 2267-2271.

Mannervik, B. (1985). Glutathione Peroxidase.
Meth. Enzymol., 113, 490-495.

Mannervik, B.; Guthenberg, C.; Jensson, H.; Warholm, M. and Alin, P. (1983). Isoenzyme of glutathione S-transferases in rat and human tissues.
In : Functions of glutathione. Biochemical, physiological toxicological and clinical aspects. Eds : A. Larrson, S. Orrenius, A. Holmgren, and B. Mannervik. Raven Press, New-York, pp 75-88.

Manning, A.; Bernier, M.; Crome, R.; Little, S. and Hearse, D. (1988). Reperfusion-induced arrythmias : a study of the role of xanthine oxidase derived free radicals in the rat heart.
J. Mol. Cell. Cardiol., 20, 35-45.

Marklund, S.L. (1988). Role of toxic effects of oxygen in reperfusion damage.
J. Mol. Cell. Cardiol., 20, 23-30.

Martin, G.M.; Curtis, A.; Sprague, B.S. and Epstein, C.J. (1970). Replicative lifespan of cultivated human cells.
Lab. Invest. 23, 86-92.

Maruyama, H.; Inoue, M.; Arias, E.M. and Listowsky, I. (1983). Ligandins or glutathione S transferases : a family of multifunctional proteins in the rat.
In : Functions of glutathione. Biochemical, physiological toxicological and clinical aspects. Eds : A. Larrson, S. Orrenius, A. Holmgren, and B. Mannervik. Raven Press, New-York, pp 89-98.

Masoro, E.J. (1988). Retardation of the aging proceses by food restriction : a search for mechanisms.
ISI Atlas of Sciences. Biochemistry, 1, 329-332.

Masters, P.M.; Bada, J.L. and Zigler, J.S. (1977). Aspartic acid racemization in the human lens during aging and cataract formation.
Nature, 268, 71-77.

Masters, P.M.; Bada, J.L. and Zigler, J.S. (1978). Aspartic acid recemization in heavy molecular weigth crystallins and water insoluble protein from normal lenses and cataracts.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 75, 1204-1208.

Mbemba, F.D.L.; Houbion, A. and Remacle, J. (1985)a. Alteration of enzymes in ageing human fibroblasts in culture. IV. Effect of glutathione on the alteration of glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Mech. Ageing Dev., 32, 249-266.

Mbemba, F.D.L.; Houbion, A.; Raes, M. and Remacle, J. (1985)b. Subcellular localization and modification with aging of glutathione, Glutathione Reductase and Glutathione Peroxidase activities in human fibroblasts.
Biochim. Biophys. Act. 838, 211-220.

McCord, J.M. (1985). Oxygen derived free radicals in post ischaemic tissue injury.
New Engl. J. Med. 312, 159-163.

McCord, J.M. (1988). Free radicals and myocardial ischaemia : overview and outlook.
Free Radicals Biol. Med., 4, 9-14.

McEvily, A. and Harrisson, J.M. (1986). Subunit equilibra of porcine heart citrate synthase.
J. Biol. Chem., 261, 2593-2598.

McFall, N.M.; Horwitz, J.; Ding, L.L. and Lacey, L. (1986). Age dependent changes in the heat-stable crystallin, ßBP, of the human lens.
Cur. Eye Res., 5, 387-394.

Medina, D. and Oborn, C. J. (1984). Selenium inhibition of DNA synthesis in mouse mammary epithelial cell line YN-4.
Canc. Res. 44, 4361-4365.

Medina, D.; Morrisson, D.G. and Oborn, C.J. (1985). Selenium retention and inhibition of cell growth in mouse mammary epithelial cell lines in vitro.
Biol. Trace El. Res. 8, 19-35.

Meirovitch, L. (1970).
in : Methods of analytical dynamics, L. Meirovitch Ed., Mc Graw-Hill Book Company, New-York.

Meister, A. (1983) : Metabolism and transport of glutathione and other γ glutamyl compounds.
In : Functions of glutathione. Biochemical, physiological toxicological and clinical aspects. Eds : A. Larrson, S. Orrenius, A. Holmgren, and B. Mannervik. Raven Press, New-York, pp 1-22.

Meister, A. (1982). Metabolism and functions of glutathione : an overview.
Bioch. Soc. Transact. 10, 78-79.

Mercurio, S.D. and Combs, G.F. (1986). Synthetic selenoorganic compound with Glutathione Peroxidase-like activity in the chick.
Biochem. Pharmacol., 35, 4505-4509.

Merril, C.R. and Goldman, D. (1984). Detection of polypeptides in two-dimensional gels using silver staining.
In : Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. Eds : J.E. Colis and R. Bravo. Academic Press Inc, London pp 93-109.

Michelson, A.M. and Maral, J. (1983). Carbonate anions, effects on the oxidation of luminol, oxidative hemolysis, γ irradiations and the reaction of activated species with enzymes containing various active centers.
Biochimie, 65, 95-104.

Michiels, C. (1989). La dégénérescence cellulaire : importance des systèmes de défenses contre les radicaux libres.
Thèse de doctorat, FNDP, Namur, Belgique.

Michiels, C. and Remacle J. (1988)a. Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance.
Eur. J. Biochem. 117, 435-441.

Michiels, C. and Remacle, J. (1988)b. Quantitative study of natural antioxidant systems for cellular nitrofurantoïn toxicity.
Biochim. Biophys. Act. 967, 341-347.

Michiels, C.; Raes, M.; Zachary,M-D.; Delaive, E. and Remacle, J. (1988). Microinjection of antibodies against SOD and Glutathione Peroxidase.
Exp. Cell. Res. 179, 581-589.

Michiels, C.; Toussaint, O. and Remacle, J. Soumis pour publication. Comparative study of oxygen toxicity on human fibroblasts and endothelial cells.
J. Cell. Physiol.

Milano, G.; Caldani, L.; Khates, R.; Launay, J.M.; Sonmmer, A.M.; Namer, M. and Schneider, M. (1988). Time and dose dependent inhibition of erythrocyte Glutathione Peroxidase by cisplatine.
Biochem. Pharmacol., 37, 981-982.

Mills, G.C. (1957). Hemoglobin catabolism : Glutathione Peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown.
J. Biol. Chem., 229, 189-197.

Mullenbach, G.T.; Tabaizi, A.; Irvine, B.D.; Bell, G.J.; Tainer, J.A. and Hallewell, R.A. (1987). Sequence of a cDNA coding for human Glutathione Peroxidase confirms TGA encoded active site : selenocysteine.
Nucl. Acid Res., 15, 5484.

Mullenbach, G.T.; Tabaizi, A.; Irvine, B.D.; Bell, G.J.; Tainer, J.A. and Hallewell, R.A. (1988)a. Selenocysteine mechanism of incorporation and evolution revealed in cDNAs of three glutathione peroxidases.
Prot. Engin., 2, 239-246.

Mullenbach, G.T.; Tabaizi, A.; Irvine, B.D.; Bell, G.J.; Tainer, J.A. and Hallewell, R.A. (1988)b. c-DNA of three glutathione peroxidases : selenocysteine incorporation.
In : Oxy-radicals in molecular biology and pathology. Eds : P.A. Cerutti, I. Fridovich and J.M. McCord. Alan R. Liss Inc. New-york. pp313-326.

Müller, A.; Cadenas, E.; Graf, P. and Sies, H. (1984). A novel biologically active organoselenium compound. 1 Glutathione Peroxidase like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ-51 (Ebselen).
Biochem. Pharm. 22, 3235-3239.

N

Nakamura, W.; Hosoda, J. and Hayashi, K. (1974). Purification and properties of rat liver Glutathione Peroxidase.
Biochim. Biophys. Acta, 358, 251-261.

Nakano, E.; Takashige, K.; Toshima, Y.; Tokunaga, K. and Minakami, S. (1989). Oxidative damage in Se deficient hearts on perfusion with adryamycin : protective role of Glutathione Peroxidase system.
Cardiovasc. Res., 23, 498-504.

Najima, J.; Knight, R.D.; Fallon, J.T.; Uemura, N.; Mander, T.; Canfield, D.R.; Cohen, M.V. and Vatner, S.F. (1989). SOD reduces reperfusion arrythmias but fails to salvage regional function on myocardium at risk in conscious dog.
Circulation, 79, 143-153.

Nève, J.; Sinet, P.M.; Molle, L. and Nicole, A. (1983). Selenium, zinc and copper in Down's syndrome (trisomy 21) : blood levels and relations with Glutathione Peroxidase and SOD.
Clin. Chim. Acta., 133, 209-214.

Nève, J.; Vertongen, F.; Canchie, P.; Gnat, D. and Molle, L. (1984). Sélénium et Glutathion Peroxydase dans le plasma et les éryhtrocytes des patients atteints du syndrome de Down (trisomie 21).
J. Ment. Defic. Res., 28, 261-268.

Nève, J.; Henry, M.; Peretz, A. and Mareschi, J.P. (1987). L'importance nutritionnelle du sélénium.
Cahier Nutr. Diet., 22, 145-163.

Nève, J.; Vertongen, F.; Peretz, A. and Carpentier, Y.A. (1989). Valeurs usuelles du sélénium et de la glutathion peroxydase dans une population belge.
Ann. Biol. Clin., 47, 138-143.

Nohl, H.; Hegner, D. and Summer, K.H. (1979). Response of mitochondrial SOD, catalase and Glutathione Peroxidase activities to aging.
Mech. Ageing Dev., 11, 145-151.

Nohl, H. and Jordan, W. (1980). The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide.
Eur. J. Biochem. 111, 203-210.

Nohl, H. and Jordan, W. (1986). The mitochondrial site of superoxide formation.
Biochem. Biophys. res. Comm., 138, 533-539.

Nohl, H. and Hegner, D. (1978). Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?
Eur. J. biochem., 82, 563-567.

Noy, N.; Schwarts, H. and Gafni, A. (1985). Age related changes in the redox status of rat muscle cells and this role in enzyme aging.
Mech. Age. Dev., 29, 63-69.

O

Ohrloff, C.; Lange, G. and Hockwin, O. (1980). Postsynthetic changes of Glutathione Peroxidase and glutathione reductase in the aging bovine lens.
Mech. Age. Dev., 14, 453-458.

Ohrloff, C.; Teimann, U. and Hockwin, O. (1979). Postsynthetic changes alterations of bovine lens enzymes demonstrated by heat lability.
Doc. Ophtal. Proc. Ser., 18, 205-217.

Oliver, C.N.; Ahn, B.; Moerman, E.; Goldstein, S. and Stadtman, E.R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins.
J. Biol. Chem., 262, 5488-5491.

Omar, R.A.; Yano, S. and Kihkawa, Y. (1987). Antioxidant enzymes and survival of normal and simian virus 40 transformed mouse embryo cells after hyperthermia.
Cancer Res., 47, 3473-3476.

Orgel, L.E. (1963). The maintenance of accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing.
Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 9, 517-521.

Orgel, L.E. (1973). Ageing of clones of mammalian cells.
Nature, 243, 441-444.

Orr, C.W.H. (1966). The inhibition of catalase by ascorbic acid.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 23, 854-860.

Orr, C.W.H. (1967a). Studies on ascorbic acid. I. Factors influencing the ascorbate-mediated inhibition of catalase.
Biochemistry, 6, 2995-2999.

Orr, C.W.H. (1967b). Studies on ascorbic acid. II. Inhibition of catalase can be ascribed to free radical attack of the protein.
Biochemistry, 6, 3000-3006.

Orrenius, S. (1987). Roles and functions of GSH. The role of GSH in oxidative stress.
Biochem. Soc. Transactions, 15, 717-718.

Orrenius, S.; Jewell, S.A.; Bellomo, G.; Thor, H.; Jones, D.P. and Smith, M.T. (1983). Regulation of calcium compartmentation in the hepatocyte. A critical role of glutathione.
In : Functions of glutathione. Biochemical, physiological toxicological and clinical aspects. Eds : A. Larrson, S. Orrenius, A. Holmgren, and B. Mannervik. Raven Press, New-York, pp 261-272.

Osborne, J.C.; Bengtsson-Olivecrona, G.; Lee, N.S. and Olivecrona, T. (1985). Studies on inactivation of lipoprotein lipase : role of the dimer to monomer dissociation.
Biochemistry, 24, 5606-5611.

Ozaki, Y.; Nichol, C.A. and Duch, D.S. (1987). Utilization of dihydroflavine mononucleotide and superoxide anion for the decyclization of L-tryptophan by murine epididymal indoleamine-2,3-dioxygenase.
Arch. Biochem. Biophys., 257, 207-216.

P

Pacifici, R.E. and Davies, K.J.A (1988). A 700 KDa red cell proteinase which selectively degrades oxidatively denatured hemoglobin.
FASEB J. 2, 4135.

Paglia, D.E. and Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte Glutathione Peroxidase.
J. Lab. Clin. Invest., 70, 158-169.

Pan Chen, Y.N.; Bienkowski, M.J. and Marnett, L.J. (1987). Controlled tryptic digestion of prostaglandin H synthase.
J. Biol. Chem., 262, 16892-16899.

Pigeolet, E.; Raes, M.; Houbion, A. and Remacle, J. (1988). Effect of procaïne on cultivated human WI-38 fibroblasts.
Exp. Geront. 23, 87-96.

Pigeolet, E.; Corbisier, P.; Houbion, A.; Lambert, D.; Michiels, C.; Raes, M.; Zachary, M.-D. and Remacle, J. (1990). Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase and Catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals.
Mech. Age. Dev. Sous presse.

Pinto, R.E. and Bartley, W. (1969). The effect of age and sex on GSSG reductase and Glutathione Peroxidase activities and on aerobic GSH oxidation in rat liver homogenates.
Biochem. J., 112, 109-115.

Prohaska, J.R. and Ganther, H.E. (1977). Glutathione Peroxidase activity of glutathione S-transferase.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 76, 437-445.

Prohaska, J.R.; Oh, S.H.; Hoekstra, W.G. and Ganther, H.E. (1977). Glutathione Peroxidase : inhibition by cyanide and release of selenium.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 74, 64-71.

Pryor, W.A. (1984). Free radicals in autoxidation and aging.
In : Free radicals in molecular biology, aging and disease. Eds : Armstrong, D.; Sohal, R.S.; Cutler, R.G. and Slater, T.F. Raven Press, New-York, pp 13-43.

R

Raes, M.; Michiels, C. and Remacle, J. (1987). Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen derived free radicals : the key role of glutathione peroxydase.
Free Radicals Biol. Med. 3, 3-7.

Ranieri-Raggi, M. and Raggi, A. (1983). pH dependent cold lability of rabbit skelettal muscle deaminase.
Biochim. Biophys. Acta, 742, 623-629.

Rao, N.A.; Romero, J.L.; Sevanian, A.; Fernandez, M.A.; Wong, C.; Ward, P.A. and Marak, G.E. (1988). Anti-inflammatory effect of Glutathione Peroxidase on experimental lens-induced uveitis.
Ophtalmic Res., 20, 213-219.

Rathbun, W.R. and Bovis, M.G. (1986). Activity of Glutathione Peroxidase and glutathione reductase in the human lens related to age.
Cur. Eye Res., 5, 381-385.

Rathbun, W.B.; Bovis, M.G. and Holleschan, A.M. (1986). GSH peroxidase, GSH reductase and GSH-S-transferase activities in the rhesus monkey lens as a function of age.
Cur. Eye Res., 5, 195-199.

Reddy, A.P.; Hsu, B.L.; Reddy, P.S.; Li, N.J.; Thiagaraju, K.; Reddy, C.C.; Tam, M.F. and Tu, C.P.D. (1988). Expression of Glutathione Peroxidase I gene in selenium-deficient rats.
Nucl. Acid Res., 16, 5557-5568.

Reid, T.J.; Murthy, M.R.N., Sieignano, A., Tanaka, N., Musiek, W.D.L. and Rossman, M.G. (1981). Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4767-4771.

Reiss, U. and Rothstein, M. (1974). Heat labile isoenzymes of isocitrate lyase from aging *Turbatrix aceti.*
Biochem. Biophys. Res. Comm., 61, 1012-1016.

Reiss, U. and Gherson, D. (1976). Rat liver superoxide dismutase purification and age related modifications.
Eur. J. Biochem. 63, 617-623.

Reiter, R. and Wendel, A. (1984). Selenium and drug metabolism. II. Independence of Glutathione Peroxidase and reversibility of hepatic enzyme modulations in deficient mice.
Biochem. Pharmacol., 33, 1923-1928.

Remacle, J.; Houbion, A. and Houben, A. (1980). Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts. Comparison between young and old cells.
Biochim. Biophys. Acta, 630, 57-70.

Remacle, J.; Raes, M.; Lambert, D.; Corbisier, P.; Pigeolet, E.; Michiels, C.; Houbion, A.; Delaive, E.; Toussaint, O.; Knott, I. and Zachary, M.-D. (soumis pour publication). Cell degeneration and aging as the result of a critical threshold of error accumulation.

Rendon, J.L. and Mendoza-Hernandez, G. (1989). Dimer-tetramer equilibrium of glutathione reductase from the cyanobacterium *Spirulina maxima.*
Arch. Biochem. Biophys., 268, 255-263.

Reznick, A. and Gherson, D. (1977). Age-related alterations in purified fructose-1-6-diphosphate aldolase from the nematode *Turbatrix aceti.*
Mech. Age. Dev., 6, 345-353.

Roberts, C.R.; Mart, J.S. and Roughley, P.D. (1988). Degradation of the proteoglycans of human articular cartilage by reactive oxygen metabolites.
In : Oxygen radicals in Biology and Medicine. Eds : M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward and C. Von Sonntag. Plenum Press, New-York, vol 49 pp 353-356.

Rokutan, K.; Hosokawa, T.; Nadamura, K.; Koyama, K.; Aoike, A. and Kawai, K. (1988). Increased $O_2^{\cdot -}$ production and Glutathione Peroxidase activity in peritoneal macrophages from auto-immune prone MRL/MP-LPR/LPR mice.
Int. Arch. Allergy, 87, 113-119.

Romero, F.J. and Cadenas, E. (1987). Hydroperoxide metabolism in vitamin E deficient hepatocytes. Studies on low level chemiluminescence lipid peroxidation and glutathione status.
Pharmacol. Ther., 33, 179-186.

Rothstein, M. (1982).
In : Biochemical appraoches to ageing. Ed : M. Rothstein, Academic Press Inc, New-York. pp 74-86 et 132-170.

Rothstein, M. (1983). Detection of altered proteins.
In : Altered proteins and ageing. Eds : Adelman, C. and Roth, G.S., CRC Press Inc., Boca Raton, Floride, U.S., pp 1-8.

Rothstein, M. (1984). Changes in enzymatic proteins during aging.
In : Molecular basis of aging. Eds : A.K. Roy and B. Chaterjee. Academic press Inc., London, pp 209-235.

S

Sadana, A. and Henley, J.P. (1985). A mathematical analysis of the influence of aging on enzyme deactivation kinetics.
Mech. Age. Dev., 32, 113-130.

Sadana, A. and Henley, J.P. (1986). Mechanistic analysis of complex enzyme deactivations : influence of various parameters on series type inactivations.
Biotech. Bioengin., 28, 977-987.

Saedi, M.S.; Smith, C.G.; Frampton, J.; Chambers, I.; Harrisson, P.R. and Sunde, R.A. (1988). Effect of selenium status on mRNA levels for Glutathione Peroxidase rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 153, 855-861.

Salo, D.C.; Lin, S.W.; Pacifici, R.E. and Davies, K.J.A. (1988). SOD is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood cells following modification by H_2O_2.
Free Radicals Biol. Med., 5, 335-339.

Salonen, J.T.; Alfthan, G. Huttunen, J.K. and Puska, P. (1984). Association between serum selenium and the risk of cancer.
Am. J. Epidem. 120, 342-349.

Salonen, J.T.; Salonen, R.; Lappetel, R.; Maenpaa, P.H.; Alfthan, G. and Puska, P. (1985). Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium and vitamin A and vitamin E. Matched case control analysis of perspective data.
Br. Med. J. 290, 417-420.

Santa Maria, C and Machado, A. (1987). Effect of development and ageing on pulmonary NADPH-cyt C reductase, Glutathione Peroxidase,glutathione reductase and thioredoxin reductase activities in male and female rats.
Mech. Age. Dev. 37, 183-195.

Schisler, N.J. and Singh, S.M. (1988). Modulation of Se-dependent Glutathione Peroxidase activity in mice.
Free Radicals Biol. Med., 4, 147-153.

Schulde-Frohlinde, D. and Von Sonntag, C. (1985). Radiolysis of DNA and model systems in the presence of oxygen.
In : Oxidative stress. Ed: H. Sies. Academic press, pp 11-40.

Scott, D.L.; Kelletter, J. and Losowsky, M.S. (1977). The influence of dietary selenium and vitamin E on Glutathione Peroxidase and glutathione in rat.
Biochim. Biophys. Act., 497, 218-224.

Scott, V.L. and Hales, B.F. (1987). Effect of glutathione depletion by buthionine sulfoximine on rat embryonic development in vitro.
Biochem. Pharmacol., 36, 683-688.

Searle, A.J. and Wilson, R.L. (1980). Glutathione Peroxidase : effect of superoxide, hydroxyl and bromide free radicals on enzyme activity.
Int. J. Radiat. Biol., 37, 213-217.

Sellinger, O.Z.; Kramer, C.M.; Conger, A. and Duboff, G.S. (1988). The carboxymethylation of cerebral membrane-bound proteins increases with age.
Mech. Age. Dev., 43, 161-173.

Sharma, H.K. and Rothstein, M. (1978). Serological evidence for the alteration of enolase during aging.
Mech. Age. Dev., 8, 341-354.

Sharma, H.K. and Rothstein, M. (1980). Altered enolase in aged *Turbatrix aceti* results from conformational changes in the enzyme.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5865-5868.

Sheldrake, A.R. (1974). The aging, growth and death of cells.
Nature, 250, 381-385.

Shibanuma, M.; Kuroki, T. and Nose, K. (1988). Superoxide as a signal for increase in intracellular pH.
J. Cell. Physiol., 136, 379-383.

Sies, H.; Brigelius, R. and Akerboom, T.P.M. (1983). Intrahepatic glutathione status.
In : Functions of glutathione. Biochemical, physiological toxicological and clinical aspects. Eds : A. Larrson, S. Orrenius, A. Holmgren, and B. Mannervik. Raven Press, New-York, pp 51-64.

Simmons, T.W.; Jamall, J.S. and Lockshin, R.A. (1987). The effect of selenium deficiency on peroxidative injury in the housefly *Musca domestica*.
FEBS Lett., 218, 251-254.

Simmons, T.W. and Jamall, T.S. (1989). Relative importance of intracellular Glutathione Peroxidase and catalase in vivo for prevention of peroxidation to the heart.
Cardiovasc. Res., 23, 774-779.

Simmons, T.W. and Jamall, T.S. (1988). Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes : primacy of Glutathione Peroxidase.
Biochem. J., 251, 913-917.

Sinet, P. (1975). Increase in Glutathione Peroxidase activity of erythrocytes from trisomy 21 subjects.
Biochim. Biophys. Act. 67, 910-915.

Sinet, P.M.; Michelson, A.M.; Bazin, A.; Lejeune, J. and Jérome, M. (1975). Increase in Glutathione Peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 67, 910-915.

Sleyster, E.C. and Knook, D.L. (1980) Aging and multiple forms of acid phosphate in isolated rat liver cells.
Mech. Age. Dev., 14, 443-452.

Somville M. (1982) Modifications enzymatiques des SOD au cours de la sénescence des fibroblastes WI-38 en culture.
Thèse de doctorat. FNDP Namur.

Somville, M.; Houben, A.; Raes, M.; Houbion, A.; Henin, V. and Remacle, J. (1985). Alteration of enzymes in ageing human fibroblasts in culture. III. Modification of superoxide dismutase as an environmental and reversible process.
Mech. Age. Dev., 29, 35-51.

Splittgerber, A.G. and Tappel, A.L. (1979). Steady state and pre-steady state kinetic properties of rat liver Se-Glutathione Peroxidase.
J. Biol. Chem., 254, 9807-9813.

Stadtman, E.R. (1988). Minireview : protein modification in aging.
J. Gerontol., 43, B112-B120.

Stadtman, E.R.; Oliver, C.N.; Levine, R.L.; Fucci, L. and Rivett, A.J. (1988). Implication of protein oxidation in protein turnover, aging and oxygen toxicity.
In : Oxygen radicals in Biology and Medicine. Eds : M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward and C. Von Sonntag. Plenum Press, New-York, vol 49 pp 331-339.

Stanley, J.F.; Pye, D. and Mc Gregor,A. (1975). Comparison of doubling numbers attained by cultured animal cells with life span of species.
Nature, 255, 158-159.

Stanulis-Preager, B.M. (1987). Cellular senescence revisited : a review.
Mech. Age. Dev., 38, 1-48.

Strehler, B.L. (1967). The nature of cellular age changes.
Symp. Soc. Exp. Biol. 21, 149-177.

Stults, F.H.; Forstrom, J.W.; Chin, D.T.Y. and Tappel, A.L. (1977). Rat liver gluathione peroxidase : purification and study of multiple forms.
Arch. Biochem. Biophys., 183, 490-497.

Sugiyama, S.; Hayakawa, M.; Kato, T.; Ham-naki, Y.; Shimizu, K. and Ozawa, T. (1989). Adverse effects of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria : disturbances in Glutathione Peroxidase activity.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 159, 1121-1127.

Sukenaga, Y.; Ishida, K.; Takeda, T. and Takagi, K. (1987). cDNA sequence coding for human Glutathione Peroxidase.
Nucl. Acid Res., 15, 7172.

Sunde, R.A. and Evenson, J.K. (1987). Serine incorporation into the selenocysteine moiety of Glutathione Peroxidase.
J. Biol. Chem., 262, 933-937.

Suttorp, N.; Toeffer, W. and Roka, L. (1986). Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells : glutathione redox cycle versus catalase.
Am. J. Physiol., 251, C671-C680.

T

Takahashi, K.; Avissar, N.; Whitin, J. and Cohen, H. (1987). Purification and characterization of human plasma Glutathione Peroxidase. A selenoglycoprotein distinct form the known cellular enzyme.
Arch. Biochem. Biophys., 256, 677-686.

Takahashi, K. and Cohen, H.J. (1986). Selenium dependent Glutathione Peroxidase protein and activity : immunological investigations on cellular and plasma enzymes.
Blood, 68, 640-645.

Takemoto, L.; Takemoto, D.; Brown, G.; Takekana, M.; Smith, S. and Horwitz, J. (1987)a. Clavage of the N-terminal region of ßBP crystallin during aging of the human lens.
Exp. Eye Res., 45, 385-392.

Takemoto, L.; Kodema, T. and Takemoto, D. (1987)b. Covalent changes at the N- and C-terminal regions of γ-crystallin during aging of the normal human lens.
Exp. Eye Res., 45, 207-214.

Tappel, A.; Fletcher, B. and Deamer, D. (1973). Effects of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse.
J. Geront. 28, 415-424.

Tollefsbol, T.O. and Cohen, M.J. (1986). Expression of intracellular biochemical defects of lymphocytes in aging : proposals of a general aging mechanism which is not cell-specific.
Exp. Gerontol., 21, 129-148.

Toyoda, H.; Himeno, S.I. and Imura, N. (1989). The regulation of Glutathione Peroxidase gene expression relevant to species differences and the effects of dietary selenium manipulation.
Biochim. Biophys. Acta, 1008, 301-308.

Tunakoshi, S. and Deutsch, J.F. (1981) : Human carbonic anhydrase. VI : Levels of isoenzymes in young and old erythrocytes and in various tissues.
J. Biol. Chem. 246, 1088-1092.

Turner, E.; Hager, L.J. and Shapiro, B.M. (1988). Ovothiol replacs Glutathione Peroxidase as a hydrogenperoxide scavenger in sea urchin eggs.
Science, 242, 939-941.

U

Ulbrich, R.; Schellenberger, A. and Damerau, W. (1986). Studies on the thermal inactivation of immobilized enzymes.
Biotechnol. Bioengin. 28, 511-522.

Ursini, F. and Bindoli, A. (1987). The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes.
Chem. Phys. Lipids, 44, 255-276.

Ursini, F., Maiorino, M. and Gregolin, C. (1986). Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PHGPX).
Int. J. Tissue Reactions, 8, 99-103.

Ursini, F.; Maiorino, M. and Gregolin, C. (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide Glutathione Peroxidase.
Biochim. Biophys. Act., 839, 62-70.

V

Vaca, C.E.; Wilhem, J. and Harms-Ringdahl, M (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review.
Nutr. Res. 195, 137-149.

Vaitukaitis, J.L. (1981). Production of antisera with small doses of immunogen by multiple intradermal injections.
Meth. Enzymol. 73, 46-52.

Van den Oetelaar, P.J.M. and Hoenders, H.J. (1989). Racemization of aspartyl residues in proteins from normal and cataractous human lenses : an aging process without involvement in cataract formation.
Exp. Eye Res., 48, 209-214.

Van Klee, F.S.; Dejong, W.W. and Hoenders, J.H. (1975). Stepwise degradation and deamidation of the eye lens protein α-crystallin in aging.
Nature, 258, 264-266.

Van Kuijk, F.J.G.M.; Sevanian, A.; Handelman, G.J. and Drotz, E.A. (1987). A new role for phospholipase A_2 : protection of membranes from lipid peroxidation damage.
Trends Biochem. Sci., 12, 31-34.

Velez, M.; Machado, A. and Satrustegui, J. (1985). Age dependent modifications of rat heart succinate dehydrogenase.
Mech. Age. Dev., 32, 131-140.

Vernie, L.N.; De Goeij, J.J.M.; Zegers, C.; De Vries, M.; Baldew, G.S. and McVie, J.G. (1988). Cisplatin induced changes of selenium levels and Glutathione Peroxidase activation in blood of testis tumor patients.
Cancer Lett., 40, 83-89.

Vicep-Madore, D. and Cristofalo, V.J. (1978). Age-associated changes in glutathione synthetase activity in WI-38 cells.
Mech. Age. Dev., 8, 43-50.

Vuillaume, M.; lafont, R.; Hubert, M.; Jonve, M.; Calvaysac, R. and Best-Belpomme, M. (1988). A new property of catalase : the concerted synthesis of nucleotide triphosphates.
Bioelectrochem. Bioenerg., 19, 541-556.

W

Watrach, A.M.; Milner, J.A; Watrach, M.A. and Poirier, K.A. (1984). Inhibition of human breast cancer cells by selenium.
Cells Lett. 25, 41-47.

Weiss, A.P.C.; Moore, J.R.; Randolph, M.A. and Weiland, A.J. (1988). Preventing oxygen free radical injury in ischaemic revascularized bone grafts.
Plastic Reconstruction Surg., 82, 486-498.

Wendel, A. (1981). Glutathione Peroxidase.
Meth. Enzymol., 77, 325-333.

Whiteside, C. and Hassan, H.M. (1988). Role of oxyradicals in the inactivation of catalase by ozone.
Free Radicals Biol. Med., 5, 305-312.

Willet, W.C.; Morris, J.S.; Pressel, S.; Taylor, J.O.; Polk, B.F.; Stampfer, M.J.; Rosner, B.; Schneike, K. and Hames, C.G. (1983). Prediagnostic serum selenium and risk of cancer.
The Lancet, 2, 130-134.

Williams, J.A. and John, R.A. (1979). Generation of aspartate aminotransferase multiple form by deamidation.
Biochem. J. 177, 121-217.

Wolff, S.P.; Garner, A. and Dean, R.T. (1986). Free radicals, lipids and protein degradation.
Trends Biochem. Sci. 11, 27-31.

Y

Yang, J.G.; Morrisson-Plummer, J. and Burk, R.F. (1987). Purification and quantitation of a rat plasma Se-protein distinct from Glutathione Peroxidase using monoclonal antibody.
J. Biol. Chem., 262, 13372-13375.

Yoshimura, S.; Takehoshi, S.; Watanabe, K. and Fujii-Kusiyama, Y. (1988). Determination of nucleotide sequence of cDNA coding rat Glutathione Peroxidase and diminished expression of the mRNA in selenium deficient rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 154, 1024-1028.

Yu, S.Y.; Ao, P.; Wang, L.M.; Huang, S.L.; Chen, H.C.; Lu, X.P. and Liu, Q.Y. (1988). Biochemical and cellular aspects of the anticancer activity of selenium.
Biol. Trace El. Res., 15, 243-255.

Yuan, P.M.; Talent, J.M. anb Gracy, R.W. (1981). Molecular basis for the accumulation of acidic isoenzymes of triphosphate isomerase on aging.
Mech. Age. Dev., 17, 151-162.

Z

Zakowski, J.J.; Forstrom, J.W.; Condell, R.A. and Tappel, A.L. (1978). Attachment of selenocysteine in the catalytic site of Glutathione Peroxidase.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 84, 248-253.

Zeelon, A.; Gherson, H. and Gherson, D. (1973). Inactive enzyme molecules in aging organisms. Nematode fructose-1-6-diphosphate aldolase.
Biochemistry, 2, 1743-1750.

Zinoni, F.; Birkmann, A.; Stadtman, T.C. and Boch, A. (1986). Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine containing polypeptide of formate dehydrogenase from *E. coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4650-4654.

Zubay, G. (1983).
In : Biochemistry. Ed : Zubay, G. Addison Wesley Publishing Company Inc. P 1161.

Zweier, J.L. and Kuppusamy, P. (1988). Electron paramagnetic resonance measurements of free radicals in the intact beating heart : a technique for detection and characterization of free radicals in whole biological studies.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5703-5707.

Zweier, J.L.; Kuppusamy, P. and Lutty, G.A. (1988).
Measurement of endothelial cell free radical generation : evidence for a central mechanism of free radical injury in post ischemic tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4046-4050.

Zweier, J.L. (1988) Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury.
J. Biol. Chem., 263, 1353-1357.

BUMP
0 0 3 4 4 7 2 8 2
*FT B03/1990/03