

## THESIS / THÈSE

### DOCTEUR EN SCIENCES

#### Rôle du cuivre et de la protéine Prion dans le vieillissement cellulaire

Boilan, Emmanuelle

*Award date:*  
2012

*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.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
Faculté des Sciences

Octobre 2012

# Du rôle du cuivre et de la protéine Prion dans le vieillissement cellulaire

---

Emmanuelle Boilan

Jury :

Dr. Benâissa ElMoualij (Université de Liège)

Prof. Bertrand Friguet (UPMC – Paris 6)

Prof. Carine Michiels (FUNDP)

Prof. Yves Poumay (FUNDP)

Dissertation présentée en vue  
de l'obtention du diplôme  
de Docteur en Sciences



Promoteur : Dr. Olivier Toussaint  
Co-promoteur : Dr. Florence Debacq-Chainiaux



*Rien n'est poison, tout est poison.*

*Le poison, c'est la dose.*

– *Paracelse*

---

Paracelse (1493-1541), de son vrai nom Philippus Theophrastus Aureolus Bombastus von Hohenheim, né en Suisse près de Zurich, fut un alchimiste, astrologue et médecin. Précurseur dans de nombreux domaines, il préfigurait déjà des notions modernes, comme le montre cette citation. Il voyagea beaucoup pour accroître ses connaissances en alchimie, et plus particulièrement sur la minéralogie. Il découvrit le Zinc.



# Résumé

## Du rôle du cuivre et de la protéine Prion dans le vieillissement cellulaire

En 1961, le Pr. L. Hayflick pose les bases du vieillissement cellulaire avec la découverte de la sénescence répliquative. Par la suite, il a été montré que différents stress peuvent déclencher l'apparition d'une sénescence prématurée, nommée Sénescence Induite Prématurément par les Stress (SIPS). Depuis, la liste d'acteurs impliqués dans la sénescence ne cesse de croître mais peu de recherches ont été réalisées sur le rôle des métaux dans la sénescence. Le cuivre joue un rôle important dans le monde du vivant car il est le catalyseur de nombreuses réactions biochimiques et peut être impliqué dans la structure et la fonction des protéines. L'importance de l'homéostasie du cuivre au cours du vieillissement a été démontrée chez un champignon filamenteux *Podospora anserina*. Les résultats de ce travail donnent de nouvelles indications qui suggèrent que le lien entre l'homéostasie du cuivre et le vieillissement ne peut être restreint à *P. anserina*, mais est conservé.

La première partie de ce travail a mis en évidence que le cuivre est impliqué dans la sénescence des fibroblastes diploïdes humains (FDHs) WI-38. En utilisant différentes techniques, nous avons montré, pour la première fois au niveau cellulaire, qu'une accumulation de cuivre apparaissait dans les FDHs en sénescence répliquative. Nous avons également montré que le cuivre pouvait jouer un rôle actif dans l'établissement du phénotype sénescence. En effet, une incubation avec un milieu enrichi en cuivre engendre un stress oxydatif, une réponse antioxydante mais aussi l'apparition prématurée de marqueurs de la sénescence. Ce dernier phénomène est dépendant du stress oxydatif généré par le cuivre et de p38<sup>MAPK</sup>.

Une autre partie de ce travail porte sur le rôle de la protéine Prion (PrP) dans la sénescence. Nous avons montré que PrP est surexprimée dans les PBMC (peripheral blood mononuclear cell) provenant de personnes âgées en comparaison avec des personnes jeunes, dans les FDHs en sénescence répliquative et en sénescence prématurée induite par le cuivre ou par d'autres stress oxydants. Les FDHs WI-38 incubés avec le milieu enrichi en cuivre montrent une surexpression de PrP sous sa forme normale (PrPc) et localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Nous avons ensuite montré que l'inactivation de l'expression de PrP par siRNAs spécifiques engendre déjà à elle seule l'apparition de marqueurs de la sénescence. Cette inactivation semble également induire une augmentation de la production de ROS et des dommages à l'ADN. Ces résultats suggèrent que PrPc joue un rôle dans la protection contre les stress oxydatif, les dommages à l'ADN et la sénescence.

Ce travail met en avant le rôle des métaux tels que le cuivre dans les mécanismes de la sénescence.



# Abstract

## On the role of copper and the Prion protein in cellular aging

In 1961, Prof. L. Hayflick lays the foundations of cellular aging with theory of replicative senescence. It was subsequently shown that stress can trigger a premature senescence, called Stress-induced premature senescence (SIPS). Since then, the list of actors involved in senescence is growing with a little consideration for metals. Copper plays an important role in the living world as it is the catalyst for many biochemical reactions and may be involved in the structure and function of proteins. The importance of copper homeostasis during aging has been demonstrated in a filamentous fungus *Podospora anserina*. The results of this study provide new evidence suggesting that the link between copper homeostasis and aging can not be restricted to *P. anserina*, but is conserved.

The first part of this work showed that copper is involved in senescence of WI-38 human diploid fibroblasts (HDFs). Using different techniques, we showed for the first time at the cellular level, an accumulation of copper in FDHs during replicative senescence. We also showed that copper could play an active role in establishing the senescent phenotype. Indeed, incubation with an copper-enriched medium generates an oxidative stress, an antioxidant response but also the premature appearance of senescence markers. The latter phenomenon is dependent of the oxidative stress generated by copper and p38<sup>MAPK</sup>.

Another part of this work concerns the role of Prion protein (PrP) in senescence. We have shown that PrP is overexpressed in PBMC from elderly compared with young people, in HDFs in replicative senescence and in premature senescence induced by copper and other oxidative stresses. WI-38 HDFs incubated with copper-enriched medium showed an overexpression of PrP under its normal conformational form (PrP<sup>c</sup>) which is localized in both cytoplasm and nucleus. We showed that the invalidation of PrP expression by specific siRNAs already induces the appearance of premature senescence. This invalidation seems to increase ROS production and DNA damages. These results suggest that PrP plays a protective role against oxidative stress, DNA damages and senescence.

This work highlights the fact that metals such as copper can play a role in the mechanisms of senescence.



# Table des matières

<b>I</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Le vieillissement cellulaire</b>	<b>2</b>
1.1	Contexte général . . . . .	2
1.2	La sénescence cellulaire . . . . .	3
1.2.1	La découverte de la sénescence réplivative . . . . .	3
1.2.2	Les marqueurs caractéristiques de la sénescence . . . . .	3
1.3	Les causes de la sénescence cellulaire . . . . .	9
1.3.1	La sénescence induite par le raccourcissement des télomères . . . . .	9
1.3.2	La sénescence induite par les dommages à l'ADN . . . . .	10
1.3.3	La sénescence induite par un oncogène . . . . .	10
1.3.4	La sénescence induite prématurément par des stress (SIPS) . . . . .	11
1.4	Le stress oxydatif et les réponses antioxydantes . . . . .	11
1.4.1	Le stress oxydatif . . . . .	11
1.4.2	Les molécules réactives impliquées dans le stress oxydatif . . . . .	12
1.4.3	Les systèmes antioxydants . . . . .	12
1.4.4	La voie de signalisation de Nrf2 . . . . .	14
1.5	De la théorie des radicaux libres au concept de SIPS . . . . .	15
1.5.1	La sénescence induite prématurément par les stress oxydatifs . . . . .	15
1.5.2	Transduction du signal impliquée dans la SIPS . . . . .	16
1.5.3	La SIPS <i>in vivo</i> ? . . . . .	19
<b>2</b>	<b>Les métaux</b>	<b>20</b>
2.1	Les métaux et la biologie . . . . .	20
2.2	Le classement des métaux . . . . .	20
2.3	Les métaux de transition . . . . .	22
2.4	Rôles des métaux en biochimie . . . . .	22
2.5	Homéostasie et toxicité des métaux . . . . .	23
<b>3</b>	<b>Le cuivre</b>	<b>24</b>
3.1	En bref . . . . .	24
3.2	Le cuivre dans l'environnement et la pollution . . . . .	24
3.2.1	Dans les sols, l'eau et l'air . . . . .	24
3.2.2	La pollution au cuivre . . . . .	24
3.3	Le cuivre et ses propriétés chimiques . . . . .	25
3.3.1	Les propriétés d'oxydoréduction du cuivre, le double jeu du cuivre . . . . .	25
3.3.2	Les propriétés de liaison du cuivre . . . . .	26
3.4	Les rôles du cuivre dans les systèmes biologiques . . . . .	28

3.4.1	Description des rôles joués par le cuivre au niveau moléculaire . . . . .	28
3.4.2	Description de rôles joués par le cuivre dans différents mécanismes biologiques . . . . .	29
3.5	Le métabolisme du cuivre . . . . .	32
3.5.1	Le métabolisme du cuivre au niveau de l'organisme . . . . .	32
3.5.2	Le métabolisme du cuivre au niveau cellulaire . . . . .	34
3.5.3	L'homéostasie du cuivre . . . . .	40
3.6	Les carences, excès et maladies liées au métabolisme du cuivre . . . . .	40
3.6.1	Les carences en cuivre . . . . .	41
3.6.2	L'excès de cuivre . . . . .	41
3.6.3	Les maladies liées à une dérégulation de l'homéostasie du cuivre . . . . .	41
3.7	Existe-t-il un lien entre le cuivre et le vieillissement ? . . . . .	43
<b>4</b>	<b>La protéine Prion</b>	<b>45</b>
4.1	Contexte . . . . .	45
4.2	Les maladies à Prions . . . . .	45
4.3	Le concept de « Prion » . . . . .	46
4.3.1	Historique du concept . . . . .	46
4.3.2	Le concept de « Prion » . . . . .	46
4.3.3	L'élargissement du concept de « Prion » . . . . .	47
4.4	La protéine Prion ou PrP . . . . .	47
4.4.1	L'expression de PrP . . . . .	47
4.4.2	Structures et conformations de PrP . . . . .	48
4.4.3	Les formes PrP <sup>c</sup> et PrP <sup>sc</sup> . . . . .	50
4.4.4	Localisation de PrP . . . . .	52
4.4.5	Partenaires protéiques et non-protéiques de PrP . . . . .	53
4.4.6	Fonctions de PrP . . . . .	53
4.5	Liens entre le cuivre et la PrP . . . . .	54
4.6	Liens entre le vieillissement et la PrP . . . . .	55
<b>5</b>	<b>Les objectifs et le modèle</b>	<b>57</b>
5.1	Les objectifs . . . . .	57
5.2	Le modèle . . . . .	58
5.2.1	Le modèle cellulaire et les consignes de culture . . . . .	58
5.2.2	La molécules libérant des ions de cuivre utilisée dans les différentes expériences . . . . .	59
<b>II</b>	<b>Résultats</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Étude des mécanismes de la sénescence induite par le cuivre</b>	<b>61</b>
6.1	Contexte . . . . .	61
6.2	Une accumulation de cuivre dans la sénescence rélicative . . . . .	61
6.3	Une incubation avec une concentration sub-létale en cuivre induit l'apparition de biomarqueurs de la sénescence . . . . .	62
6.4	Mise au point de l'utilisation de molécules antioxydantes dans notre modèle . . . . .	64
Article 1	. . . . .	65

<b>7</b>	<b>Rôle de la protéine Prion dans la sénescence</b>	<b>103</b>
7.1	Contexte . . . . .	103
7.2	Le rôle de la protéine Prion dans l'apparition des marqueurs de la sénescence . . . . .	103
	Article 2 . . . . .	105
<b>III</b>	<b>Discussion et conclusion</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Discussion et perspectives</b>	<b>131</b>
8.1	Contexte . . . . .	131
8.2	Les fibroblastes humains WI-38 en sénescence présentent-ils des perturbations au niveau de leur homéostasie du cuivre? . . . . .	131
8.2.1	Confirmation et généralisation du phénomène d'accumulation de cuivre . . . . .	133
8.2.2	Études des mécanismes permettant l'accumulation de cuivre . . . . .	133
8.3	Une perte de l'homéostasie du cuivre engendre-t-elle l'apparition de la sénescence? . . . . .	136
8.3.1	Confirmation et généralisation de la participation active du cuivre dans la sénescence . . . . .	137
8.3.2	Étude des mécanismes qui génèrent l'accumulation intracellulaire de cuivre et l'apparition de la sénescence . . . . .	137
8.3.3	Étude de l'implication du stress oxydatif dans la sénescence prématurée induite par le cuivre	138
8.3.4	Le rôle de Nrf2, p38 <sup>MAPK</sup> et du TGF- $\beta$ 1 dans la sénescence prématurée induite par le cuivre . . . . .	140
8.4	Le rôle de la PrPc dans l'apparition de la sénescence chez les fibroblastes humains WI-38 . . . . .	141
8.4.1	Étude du rôle protecteur de PrPc contre le stress oxydatif et les dommages à l'ADN . . . . .	142
8.4.2	Étude du rôle protecteur de PrPc dans l'apparition de la sénescence . . . . .	143
8.4.3	Perte ou gain de fonction de PrPc au cours de la sénescence? . . . . .	144
8.4.4	Étude des mécanismes engendrant une perte ou un gain de fonction de PrPc observée durant la sénescence . . . . .	144
8.4.5	Étude du lien entre PrPc et le cuivre durant la sénescence . . . . .	145
<b>9</b>	<b>Conclusion</b>	<b>147</b>
9.1	L'importance des métaux pour le maintien de la vie . . . . .	147
9.2	Dans le futur... . . . .	148
<b>IV</b>	<b>Annexes</b>	<b>151</b>
<b>10</b>	<b><i>Podospora anserina</i></b>	<b>152</b>
10.1	Qu'est-ce que <i>Podospora anserina</i> ? . . . . .	152
10.1.1	Cycle de vie . . . . .	152
10.2	Un champignon comme organisme modèle . . . . .	153
10.2.1	Le phénotype sénescence chez <i>Podospora anserina</i> . . . . .	153
10.2.2	Une sénescence dépendante des mitochondries . . . . .	153
10.3	Lien entre l'homéostasie du cuivre et l'apparition de la sénescence chez <i>Podospora anserina</i> . . . . .	154
10.3.1	Rôle du facteur de transcription GRISEA dans la sénescence . . . . .	154
10.3.2	Rôle du cuivre dans la sénescence . . . . .	154
	Article 3 . . . . .	157

<b>11 Les méthodes de détection du cuivre</b>	<b>172</b>
11.1 Contexte . . . . .	172
11.2 Le test colorimétrique du Quantichrom Copper Assay Kit . . . . .	172
11.2.1 La méthode . . . . .	172
11.2.2 La procédure utilisée . . . . .	172
11.3 La sonde fluorescente Coppersensor-1 . . . . .	173
11.3.1 La méthode . . . . .	173
11.3.2 La procédure utilisée . . . . .	173
11.4 Le test histologique de l'acide rubéanique . . . . .	174
11.4.1 La méthode . . . . .	174
11.4.2 La procédure utilisée . . . . .	174
11.5 La microscopie électronique à transmission et l'analyse dispersive en énergie . . . . .	174
11.5.1 L'analyse dispersive en énergie ou EDX . . . . .	174
11.5.2 La procédure utilisée . . . . .	175
 <b>Bibliographie</b>	 <b>177</b>

# Liste des abréviations

<b>ADAM</b>	A disintegrin and metalloprotease
<b>8-oxodG</b>	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
<b>AD</b>	alzheimer disease
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADNmt</b>	ADN mitochondrial
<b>AOX</b>	alternative oxidase
<b>ApoJ</b>	apolipoprotein J
<b>ARE</b>	antioxidant response element
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ATF-2</b>	activating transcription factor-2
<b>ATM</b>	ataxia telangiectasia mutated
<b>Atox1</b>	antioxidant protein 1
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>ATP7A</b>	ATPase 7A ou protéine de Menkès
<b>ATP7B</b>	ATPase 7B ou protéine de Wilson
<b>ATR</b>	ataxia telangiectasia related
<b>Bach1</b>	BTB and CTC homolog 1
<b>BCS</b>	bathocuproine disulphonate
<b>BME</b>	basal medium eagle
<b>BMK1</b>	big MAPK 1
<b>BODIPY</b>	bore dipyrrométhène
<b>CAK</b>	CDK activating kinase
<b>CCS</b>	copper chaperone for superoxide dismutase
<b>CDK</b>	cyclin-dependent kinase
<b>CDKI</b>	CDK inhibitor
<b>CK2</b>	casein kinase 2
<b>COMMD1</b>	copper metabolism MURR1 domain-containing protein 1
<b>Cox11</b>	cytochrome c oxidase 11
<b>Cox17</b>	cytochrome c oxidase 17
<b>Cp</b>	ceruloplasmin
<b>CPD</b>	cumulative population doubling
<b>CPR</b>	Cp receptor

<b>CS1</b>	coppersensor-1
<b>CSF1</b>	macrophage colony-stimulating factor-1
<b>CTGF</b>	connective tissue growth factor
<b>Ctr1</b>	copper transporter 1
<b>Ctr2</b>	copper transporter 2
<b>Cul3</b>	culline-3
<b>CXCL1</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
<b>DDR</b>	DNA damage response
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	eau distillée
<b>DMT1</b>	divalent metal transporter 1
<b>DNA-PK</b>	DNA-dependent protein kinase
<b>DO</b>	densité optique
<b>E2F/DP</b>	E2F-1 / DP-1 complex
<b>ENaC</b>	epithelial sodium channel
<b>ERK</b>	extracellular signal regulated kinase
<b>EtOH</b>	éthanol
<b>FBS</b>	fetal bovine serum
<b>FDHs</b>	fibroblastes diploïdes humains
<b>G0</b>	phase de repos
<b>G1</b>	gap 1
<b>G2</b>	gap 2
<b>GADD153</b>	growth arrest and DNA-damage-inducible protein 153
<b>GADD45A</b>	growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha
<b>GPI</b>	glycosyl-phosphatidyl-inositol
<b>GPX</b>	glutathion peroxydase
<b>GSH</b>	glutathion réduit
<b>GSSG</b>	glutathion oxydé
<b>H2AX</b>	histone 2AX
<b>HO-1</b>	heme oxygenase-1
<b>IGFBP3</b>	insulin-like growth factor binding protein 3
<b>IGFBP7</b>	insulin-like growth factor binding protein 7
<b>IL-1</b>	interleukine 1
<b>IL-15</b>	interleukine 15
<b>IL-6</b>	interleukine 6
<b>IL-8</b>	interleukine 8
<b>JNK</b>	c-Jun-N-terminal kinase

<b>kb</b>	kilobases
<b>Keap1</b>	Kelch-like ECH-associated protein-1
<b>keV</b>	kiloélectron-volt
<b>KO</b>	knock-out
<b>LAP</b>	latency associated protein
<b>LTBP</b>	latent-TGF- $\beta$ 1-binding protein
<b>M</b>	mitosis
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinase
<b>MAPKK</b>	mitogen-activated protein kinase kinase
<b>MAPKKK</b>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
<b>MCJ</b>	maladie de Creutzfeldt-Jakob
<b>MCP1</b>	monocyte chemotactic protein-1
<b>MDA</b>	malonaldéhyde
<b>MDM2</b>	murine double minute
<b>MEC</b>	matrice extracellulaire
<b>MMP</b>	matrix metalloproteinase
<b>MMP1</b>	matrix metalloproteinase 1
<b>MMP2</b>	matrix metalloproteinase 2
<b>MMP3</b>	matrix metalloproteinase 3
<b>M<sup>n+</sup></b>	métal n+
<b>MT2A</b>	metallothionein 2A
<b>MTF1</b>	metal transcription factor 1
<b>NQO1</b>	NAD(P)H déshydrogénase quinone-1
<b>Nrf2</b>	nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
<b>p14<sup>ARF</sup></b>	protéine p14 ARF
<b>p16<sup>INK4A</sup></b>	protéine p16 INK4A
<b>p21<sup>WAF1</sup></b>	protéine p21 WAF1
<b>p38<sup>MAPK</sup></b>	protéine p38 MAPK
<b>p53</b>	protéine p53
<b>PaAox</b>	<i>p. anserina</i> alternative oxidase
<b>PAI-1</b>	plasminogen activator inhibitor-1
<b>PaMT1</b>	<i>p. anserina</i> metallothionein 1
<b>PaSOD1</b>	<i>p. anserina</i> Cu/Zn superoxyde dismutase
<b>PaSOD2</b>	<i>p. anserina</i> Mn superoxyde dismutase
<b>pb</b>	paires de bases
<b>PBMC</b>	peripheral blood mononuclear cell

<b>PBS</b>	phosphate buffer saline
<b>PCNA</b>	proliferating cell nuclear antigen
<b>PI3K</b>	phosphoinositide 3-kinase
<b>PKC</b>	protéine kinase C
<b>pRb</b>	protéine du rétinoblastome
<b>PRDX</b>	peroxiredoxine
<b>PrP</b>	protéine Prion
<b>PrPc</b>	Prion protein cellular
<b>PrPsc</b>	Prion protein scrapie
<b>rbPrP</b>	forme recombinante de la PrP bovine
<b>RE</b>	réticulum endoplasmique
<b>Ref1</b>	redox factor-1
<b>RNS</b>	reactive nitrogen species
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>rpm</b>	revolutions per minute
<b>RX</b>	rayons X
<b>S</b>	synthesis
<b>SA-<math>\beta</math>gal</b>	senescence associated $\beta$ -galactosidase
<b>SASP</b>	senescence-associated secretory phenotype
<b>SCO1</b>	synthesis of cytochrome c oxidase 1
<b>SCO2</b>	synthesis of cytochrome c oxidase 2
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate
<b>senDNAs</b>	senescence-specific circular DNAs
<b>SIPS</b>	sénescence induite par les stress
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>SOD</b>	superoxyde dismutase
<b>SOD1</b>	Cu/Zn SOD
<b>SOD2</b>	Mn SOD
<b>Sp1</b>	specificity protein 1
<b>SPARC</b>	secreted protein acid rich-cystein
<b>SR</b>	sénescence rélicative
<b>STEAP</b>	six-transmembrane epithelial antigen of the prostate
<b><i>t</i>-BHP</b>	<i>tert</i> -butyl hydroperoxyde
<b>TERC</b>	telomerase RNA component
<b>TERT</b>	telomerase reverse transcriptase
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transforming growth factor $\beta$

<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	transforming growth factor $\beta$ 1
<b>TRAF</b>	TNF receptor associated factors
<b>UV</b>	ultraviolets
<b>UVB</b>	ultraviolets de type B



**Première partie**

**Introduction**



# Chapitre 1

## Le vieillissement cellulaire

### 1.1 Contexte général

Depuis toujours l'homme est fasciné, intrigué voire effrayé par le fait de vieillir. Ce processus naturel est en effet caractérisé par une perte progressive des facultés cognitives, sensoriels et motrices de l'organisme. L'organisme devient donc peu à peu incapable d'assurer ses fonctions, ce qui le rend fragile et non-autonome. Tous les êtres vivants vieillissent à travers des mécanismes moléculaires précis et certains de ces mécanismes semblent hautement conservés. Ces mécanismes peuvent être exacerbés par divers stress et engendrer un vieillissement prématuré. Chez l'homme, le vieillissement comporte plusieurs paramètres et fait intervenir des facteurs biologiques, psychologiques et sociaux. Parmi les facteurs biologiques, certains sont des facteurs intrinsèques, liés à la génétique, d'autres sont des facteurs extrinsèques, liés à l'environnement.

L'amélioration de la qualité de la vie humaine a permis à l'Homme de devenir plus vieux, et a engendré une augmentation de notre espérance de vie. En effet, l'espérance de vie à la naissance<sup>1</sup> est en constante augmentation au niveau mondial ; sa moyenne passant de 46 ans en 1950 à 66 ans en 2010. D'un autre côté, le taux de fécondité<sup>2</sup> est en baisse au niveau mondial ; sa moyenne passant d'environ 5 enfants par femme en 1950 à environ 2,5 aujourd'hui. Ces deux phénomènes semblent favoriser un vieillissement de la population humaine (source INED France).

Le vieillissement de la population humaine apparaît dans les données démographiques actuelles avec par exemple l'observation de l'évolution de la population des plus de soixante ans. Cette population, qui représentait 7 % de la population totale, représente aujourd'hui 10 % avec plus de 600 millions d'individus et atteindra 21 % avec environ deux milliards d'individus en 2050 (source OMS, 2011). Ce phénomène, souvent associé aux pays développés qui présentent de faibles taux de natalité<sup>3</sup> et de mortalité<sup>4</sup>, affecte progressivement tous les pays du monde mais avec une intensité variable.

L'accroissement du nombre d'individus âgés peut avoir d'importantes répercussions sur la société, notamment au niveau du financement des retraites, des soins de santé, de l'économie, etc. Il engendre une augmentation du nombre de personnes non-autonomes, du nombre de patients développant des pertes de fonctions au niveau des muscles, des os, des sens, etc. ou atteints de pathologies liées à l'âge comme la maladie d'Alzheimer. Par conséquent, il est essentiel de préparer notre société à répondre aux besoins du nombre croissant de ces personnes âgées. Pour faire face à ce défi, la recherche sur le vieillissement s'est considérablement développée ces dernières années avec pour objectifs d'augmenter les connaissances relatives au vieillissement, d'aider à prévenir ou à retarder l'apparition de fragilités liées à l'âge et de permettre l'amélioration des soins et des services offerts aux personnes âgées.

---

1. L'espérance de vie à la naissance est une donnée statistique qui représente la durée de vie moyenne d'une population fictive qui vivrait toute son existence dans les conditions de mortalité de l'année considérée.

2. Le taux de fécondité représente le rapport entre le nombre annuel de naissances vivantes et le nombre de femmes en âge de procréer (15 à 49 ans).

3. Le taux de natalité représente le rapport entre le nombre annuel de naissances et la population totale exprimée en pour mille.

4. Le taux de mortalité représente le rapport entre le nombre annuel de décès et la population totale exprimée en pour mille.

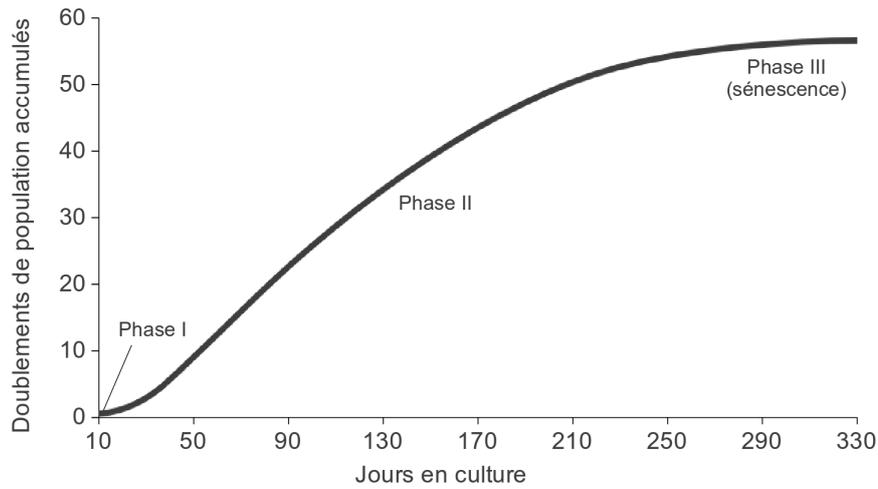


FIGURE 1.1 – Schéma des différentes phases de culture cellulaire menant à la sénescence répliquative. La phase I représente le temps entre la mise en culture d'un explant et l'établissement de la culture primaire. La phase II est la phase de prolifération exponentielle. La phase III représente la sénescence caractérisée par un arrêt des divisions cellulaires.

Source : (Shay et al., 2000)

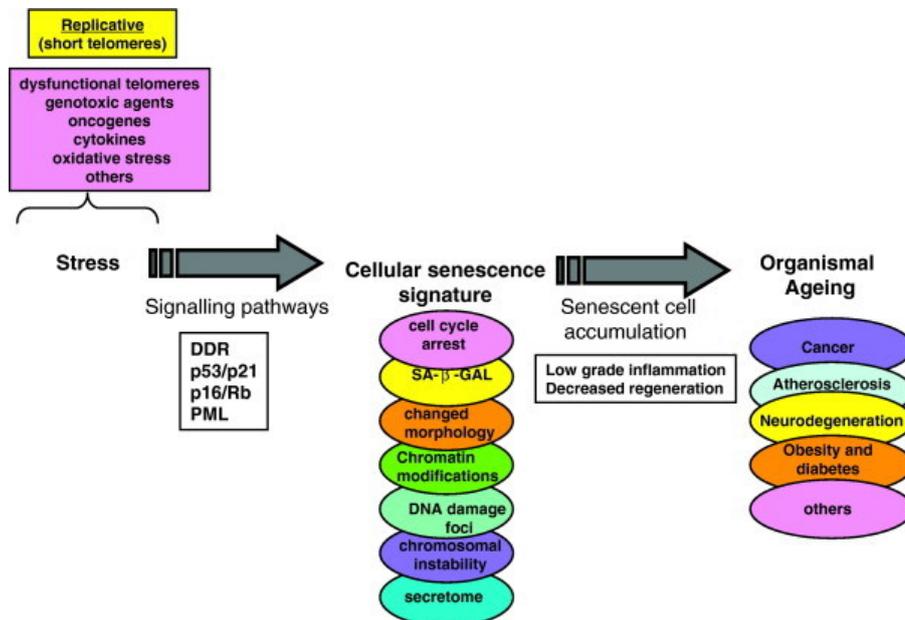


FIGURE 1.2 – Schéma des marqueurs de la sénescence. Les cellules sénescents sont caractérisées par des marqueurs de la sénescence. Ces cellules s'accumulent dans les tissus, réduisant ainsi la capacité de régénération et augmentant l'inflammation, ce qui influence le vieillissement de l'organisme ainsi que les maladies associées à l'âge. L'accumulation de cellules sénescents peut jouer un double jeu, d'une part aider à la régression et suppression des tumeurs et d'autre part favoriser le développement de celles-ci.

Source : (Sikora et al., 2011)

À ce jour, pas moins de septante études longitudinales<sup>5</sup> liées au vieillissement de la population ont été réalisées. Par exemple, l'étude « Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA) » (Shock et al., 1984), qui a commencé en 1958 et qui se poursuit aujourd'hui encore, étudie les effets de l'âge sur l'Homme de manière longitudinale. Malheureusement, la réalisation de telles études est coûteuse et les résultats ne sont exploitables qu'après de nombreuses années de travail.

Depuis plusieurs décennies, des recherches ont donc été menées sur des organismes-modèles (souris, rats, etc.) ou à l'aide de cultures cellulaires *in vitro*, ce qui suppose que les mécanismes étudiés soient au moins partiellement conservés entre les espèces. Cependant, les études réalisées avec ces organismes-modèles sont très souvent controversées et une étude complémentaire est généralement réalisée par la suite sur des cellules humaines en culture *in vitro* (Partridge and Gems, 2007). L'étude du vieillissement niveau cellulaire, appelé aussi sénescence cellulaire, a apporté de nombreux éléments pour comprendre ce phénomène au niveau de l'organisme.

## 1.2 La sénescence cellulaire

### 1.2.1 La découverte de la sénescence répllicative

Les bases de la théorie de la « sénescence répllicative » ont été posées en 1961 par L. Hayflick et P. Moorhead par la mise en évidence de l'existence d'une limite du potentiel de prolifération cellulaire des cellules non transformées, la limite de Hayflick (Hayflick and Moorhead, 1961). Ces recherches ont dans un premier temps été menées sur des FDHs (fibroblastes diploïdes humains) isolés de différents tissus, et maintenus en culture dans des conditions optimales. En suivant la culture cellulaire, ces auteurs ont mis en évidence que l'évolution de celle-ci comportait trois phases, représentées sous forme d'un graphique à la Figure 1.1. Le graphique décrit le nombre de doublements de population accumulés<sup>6</sup> en fonction du nombre de jour en culture. La phase I représente le temps entre la mise en culture d'un explant et l'établissement d'une culture primaire. La phase II est une phase de prolifération exponentielle ; au point de départ de la phase II, les cellules sont dites « jeunes » et prolifèrent jusqu'à l'apparition d'un ralentissement suivi d'un arrêt des divisions cellulaires, la phase III. Cet arrêt irréversible représente la caractéristique principale de la sénescence répllicative. À ce stade, les cellules, dites « âgées », sont encore métaboliquement actives et le restent encore pendant plusieurs mois ou plusieurs années avant de mourir par nécrose. Il a été suggéré que l'arrêt de la prolifération des cellules cultivées *in vitro* pouvait représenter un processus cellulaire présent dans les tissus lors du vieillissement normal d'un organisme. À partir de 1970, de nombreuses recherches ont été menées afin de caractériser les cellules en sénescence répllicative et d'identifier les mécanismes qui sont altérés dans les cellules devenues incapables de se diviser.

### 1.2.2 Les marqueurs caractéristiques de la sénescence

Un ensemble de marqueurs présents dans les cellules sénescents *in vitro* et *in vivo* a été identifié. Outre l'arrêt irréversible de la prolifération cellulaire, les cellules sénescents sont caractérisées par un des dommages à l'ADN (acide désoxyribonucléique), au niveau de l'ADNmt (ADN mitochondrial), un changement de la morphologie cellulaire, une augmentation du nombre et de la taille des lysosomes et des modifications de l'expression génique. D'autres caractéristiques des cellules sénescents ont été mises en évidence, comme une diminution de l'activité du protéasome, une résistance à l'apoptose, etc (Figure 1.2).

5. Une étude longitudinale désigne un suivi de patients volontaires à tous les stades de leur vie ; une telle étude s'étend donc sur plusieurs décennies

6. Le nombre de doublements de population accumulés représente le nombre total de doublement de population d'une lignée cellulaire ou de la souche depuis son lancement *in vitro*

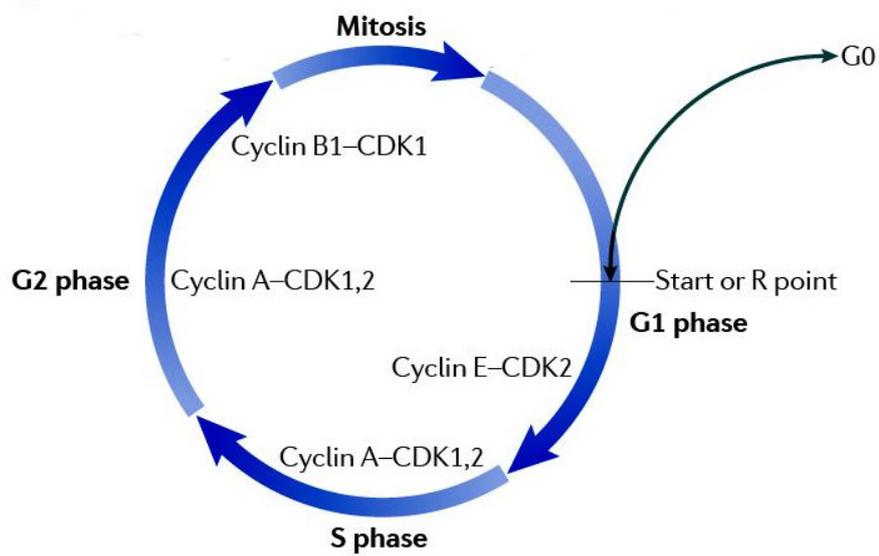


FIGURE 1.3 – Schéma du cycle cellulaire. Chacune des phases principales du cycle cellulaire, les phases G1, S, G2 et la mitose, est commandée par un complexe de kinase dépendante de cycline (CDK) et d'une cycline. Dans les cellules animales, les principaux complexes cycline-CDK sont formés par la cycline A, la cycline B et la cycline E et des CDK de différents types. Le complexe cycline B1-CDK1 est l'élément déclencheur de l'entrée en mitose.

Source : (Pines, 2011)

## Arrêt irréversible du cycle cellulaire

L'arrêt irréversible du cycle cellulaire est un des marqueurs de la sénescence les mieux définis. Avant de détailler les mécanismes potentiellement responsables de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S, il nous a semblé judicieux de faire quelques rappels sur le cycle cellulaire et sa régulation. Les différentes phases du cycle cellulaire sont reprises dans la Figure 1.3.

**Le cycle cellulaire** Le cycle cellulaire est divisé en deux parties : l'interphase, qui occupe 95 % du cycle cellulaire et la mitose. L'interphase est elle-même constituée de trois phases : La phase G1 (gap 1), la phase S (synthesis) et la phase G2 (gap 2). La phase G1 correspond à la période entre la mitose et l'initiation de la réplication de l'ADN. Durant cette phase, les cellules sont métaboliquement actives sans répliquer leur ADN. Cette phase est suivie par la phase S durant laquelle la réplication de l'ADN prend place. La phase S est ensuite suivie de la phase G2 pendant laquelle les cellules se préparent à la mitose en synthétisant des protéines impliquées dans celle-ci. La mitose (phase M (mitosis)) correspond à la division cellulaire proprement-dite avec la séparation des lots de chromosomes et prend fin avec la cytokinèse.

Il existe deux points de contrôle (checkpoint) dans le cycle cellulaire : en phase G1 et en phase G2. Le point de contrôle en phase G1, aussi nommé point de restriction, se situe en fin de phase G1, juste avant l'entrée en phase S et permet de contrôler si la cellule peut se diviser ou doit retarder sa division voire rester en phase G0 (phase de repos). Une fois que ce point a été dépassé, la progression du cycle cellulaire est lancée sans qu'aucun stimulus supplémentaire ne soit nécessaire. Le point de contrôle en phase G2 se situe en fin de phase G2, juste avant l'entrée en phase M et permet de contrôler si la cellule est prête pour réaliser une mitose. Lorsque ce point de contrôle a été dépassé, les mécanismes moléculaires impliqués dans la division cellulaire se poursuivent. Ces deux points de contrôle sont régulés par des protéines spécifiques.

**La régulation du cycle cellulaire** Chez tous les eucaryotes, le cycle cellulaire est contrôlé par des complexes de kinases, les CDK (cyclin-dependent kinase) et leurs partenaires, les cyclines<sup>7</sup>. Les protéines de la famille des kinases sont des enzymes capables de catalyser le transfert d'un groupe phosphate sur l'hydroxyle des chaînes latérales des acides aminés possédant une fonction alcool tels que les sérine, thréonine et tyrosine.

Les CDK sont des sérine/thréonine kinases et leur activité peut être régulée à différents niveaux tels qu'une activation par une cycline, une activation par une CAK (CDK activating kinase)<sup>8</sup> et une inhibition par des CDKI (CDK inhibitor)<sup>9</sup>.

7. Les cyclines produites pendant le cycle cellulaire vont interagir et former des complexes avec leurs CDK spécifiques grâce à une région commune appelée « cyclin box ». L'expression des cyclines est séquentielle, ce qui permet la formation et l'activation de différents complexes CDK-cycline en fonction de l'avancement dans le cycle cellulaire. La formation et l'activation des complexes CDK-cyclines à des moments bien précis permettent la progression du cycle cellulaire et notamment de passer les deux points de contrôle (G1/S et G2/M). On peut distinguer trois types de cyclines : les cyclines mitotiques (A et B), les cyclines de la phase G1 (C, D et E) et celles non associées à une seule étape du cycle cellulaire (F, G et H). La progression du cycle cellulaire dépend donc de la production, de la concentration et de la dégradation de ces différentes cyclines.

8. les kinases activatrices des CDKs (en anglais, CDK-activating kinase (CAK)) peuvent activer les CDKs par une phosphorylation sur le résidu thréonine. Les complexes CDK-cyclines activés peuvent alors activer des protéines régulatrices telles que la protéine du rétinoblastome (pRb).

9. Les inhibiteurs de complexes CDK-cyclines (en anglais CDKI) peuvent réguler les CDKs. Ces inhibiteurs sont classés en deux familles : la famille INK4 et la famille KIP/CIP. Parmi la famille INK4A, la p16<sup>INK4A</sup> (protéine p16 INK4A) peut soit empêcher la formation du complexe CDK-cycline avec la cycline D, soit empêcher le complexe CDK-cycline d'interagir avec son substrat, par exemple pRb ; ce qui mène à l'inhibition de la progression de la phase G1 à la phase S par hypophosphorylation de pRb (Hirai et al., 1995). La famille KIP/CIP, avec notamment la p21<sup>WAF1</sup> (protéine p21 WAF1), est considérée comme universelle car ses membres peuvent inhiber tous les complexes CDK-cyclines présents pendant la phase G1 et même certains en phase G2 (Dulic et al., 1994).

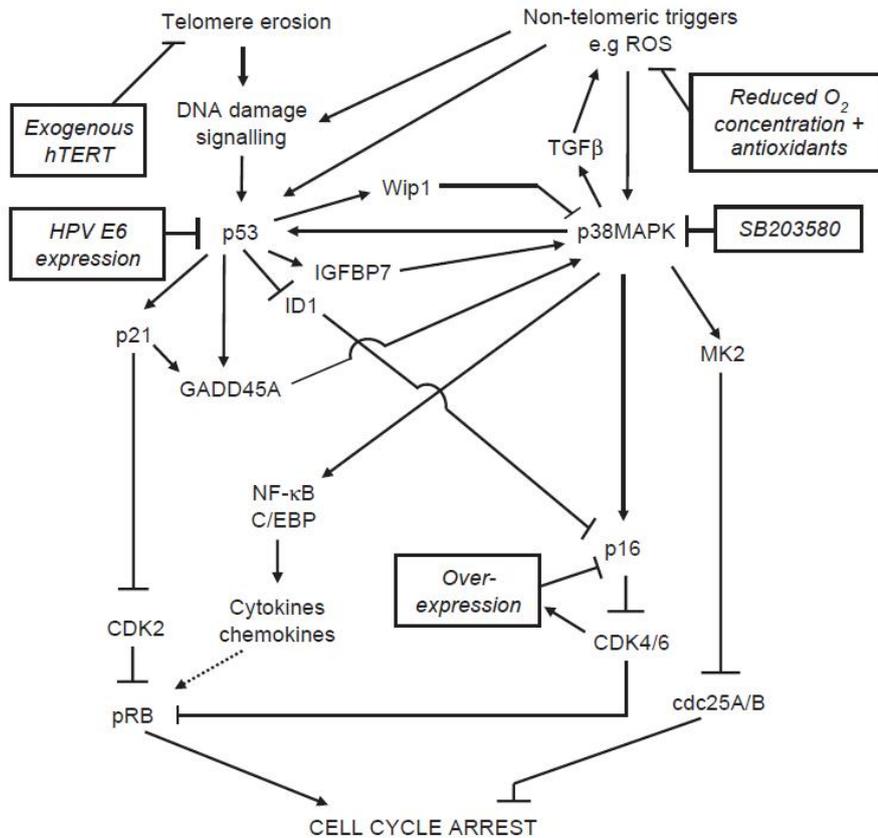


FIGURE 1.4 – Les voies impliquées dans l’arrêt du cycle cellulaire en phase G1 caractéristique de la sénescence. Le raccourcissement des télomères ou des stress (ex. : stress oxydatif) peuvent déclencher un arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence à travers de nombreuses voies régulées par de nombreuses protéines. Cet arrêt peut être renforcé par NF-KB et C/EBP ou p21-p38<sup>MAPK</sup>-TGF-β1. Ces voies peuvent être manipulées pour retarder ou prévenir l’apparition de la sénescence par des interventions expérimentales (dans les cases). Les voies choisies ont été simplifiées pour plus de clarté. ROS : les espèces réactives de l’oxygène.

Source : (Sheerin et al., 2011)

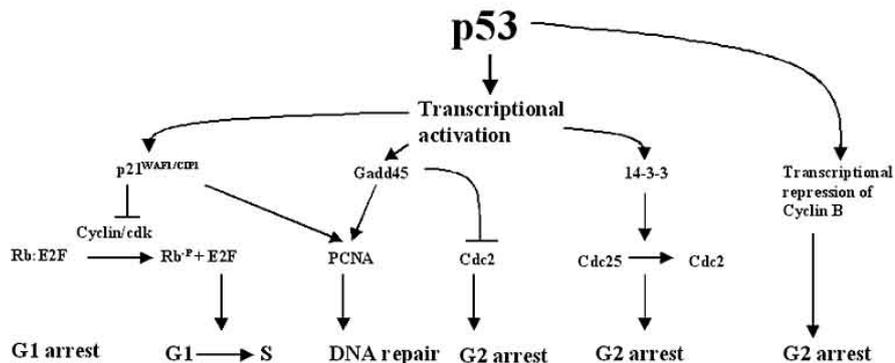


FIGURE 1.5 – Schéma des voies liées au cycle cellulaire en aval de p53. p53 représente une protéine importante dans la régulation du cycle cellulaire car elle est impliquée dans l’arrêt du cycle cellulaire.

Source : (Somasundaram and El-Deiry, 2000)

**Arrêt du cycle cellulaire en phase G1 lors de la sénescence** Les cellules sénescents présentent un arrêt stable et irréversible du cycle cellulaire en phase G1 (avant le point de restriction) et deviennent insensibles aux facteurs de croissance. Cet arrêt du cycle cellulaire est différent de celui des cellules quiescentes qui présentent un arrêt réversible en phase de repos (G0). L'arrêt du cycle cellulaire caractéristique de la sénescence dépend de la régulation de nombreuses protéines telles que p53 (protéine p53), pRb (protéine du rétinoblastome), p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>WAF1</sup>, etc. (Figure 1.4).

Le facteur de transcription p53 est impliqué dans de nombreux mécanismes tels que l'apoptose, la réponse aux stress oxydatifs, la réponse aux dommages à l'ADN, la tumorigenèse etc. Il joue également un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Figure 1.5). p53 est un facteur de transcription dont l'abondance est faible dans des conditions normales puisqu'il est dégradé systématiquement par le protéasome grâce à sa liaison avec l'ubiquitine ligase E3 MDM2 (murine double minute). Des changements post-traductionnels peuvent perturber cette liaison, empêchant ainsi la dégradation de p53. Des protéines, comme la protéine p14<sup>ARF</sup> (protéine p14 ARF), peuvent séquestrer MDM2 et permettre à la protéine p53 d'être active. Chez les cellules sénescents, il a été montré que la protéine p53 est phosphorylée et très active. Ceci est la conséquence de la DDR (DNA damage response) qui active les protéines ATM/ATR (ataxia telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia related) et les protéines « point de contrôle » Chk1/Chk2 (Checkpoint 1/Checkpoint 2), celles-ci pouvant phosphoryler et stabiliser p53 (Herbig et al., 2004). Une telle réponse peut être déclenchée suite au raccourcissement dit « critique » des télomères après de nombreuses divisions ou suite à une accumulation de dommages à l'ADN due à des stress ou à une diminution de l'efficacité des systèmes de réparation (Kong et al., 2011). Suite à son activation, p53 induit notamment de l'expression de p21<sup>WAF1</sup>. Il a en effet été montré que l'expression de cette dernière est également élevée dans les cellules sénescents. p21<sup>WAF1</sup> inhibe les complexes CDK-cyclines (CDK1 ou CDK2) dont la fonction est d'inhiber pRb<sup>10</sup>, permettant ainsi à ce dernier de bloquer le cycle cellulaire. L'activité de blocage du cycle cellulaire de pRb dépend de modifications post-traductionnelles dont sa phosphorylation. Sa phosphorylation par des CDKs (CDK2, CDK4 et CDK6) empêche la liaison de pRb à des complexes protéiques composés des facteurs de transcription E2F/DP (E2F-1 / DP-1 complex), engendrant l'entrée en phase S et donc la progression du cycle cellulaire (Kong et al., 2011). Dans les cellules sénescents, l'activité des CDK est bloquée par la surexpression de CDKI telles que p21<sup>WAF1</sup> et p16<sup>INK4A</sup>. La protéine p16<sup>INK4A</sup>, également surexprimée dans les cellules sénescents, est une CDKI qui peut inhiber les complexes CDK-cyclines (CDK4 et CDK6) et donc empêcher la phosphorylation de pRb, la libération du facteur de transcription E2F/DP et la progression du cycle cellulaire. Plusieurs phénomènes peuvent déclencher l'expression de p16<sup>INK4A</sup>, à savoir le stress oxydatif, des dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes ou autres (Chuaire-Noack et al., 2010).

### Altérations du génome mitochondrial associés à la sénescence

Le génome mitochondrial est composé de 2 à 10 copies de molécules d'ADN circulaires doubles brins. Ce génome, d'environ 16,5 kb (kilobases), code principalement pour des protéines impliquées dans la respiration cellulaire. Lorsque les cellules deviennent sénescents, il a été observé que l'ADNmt (ADN mitochondrial) était endommagé. Ces dommages se présentent sous la forme de délétions, de mutations ou de modifications des nucléotides avec notamment des formes oxydées. Les dommages qui sont le plus souvent décrits au niveau de l'ADNmt sont des oxydations de purines et de pyrimidines dont la 8-oxodG (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine), des cassures (fragments) et des mutations (Pamplona, 2011). Ces mutations peuvent être de deux types : des mutations ponctuelles avec des modifications de nucléotides, ou des délétions. Ainsi, la délétion « commune » de 4977 pb (paires de bases) est considérée comme un marqueur du vieillissement (Lee and Wei, 1997).

10. La protéine pRb, considérée comme une protéine « suppresseur de tumeurs », porte ce nom suite à sa description dans le cadre d'une tumeur maligne nommée rétinoblastome, dans laquelle la protéine est mutée et non-fonctionnelle.

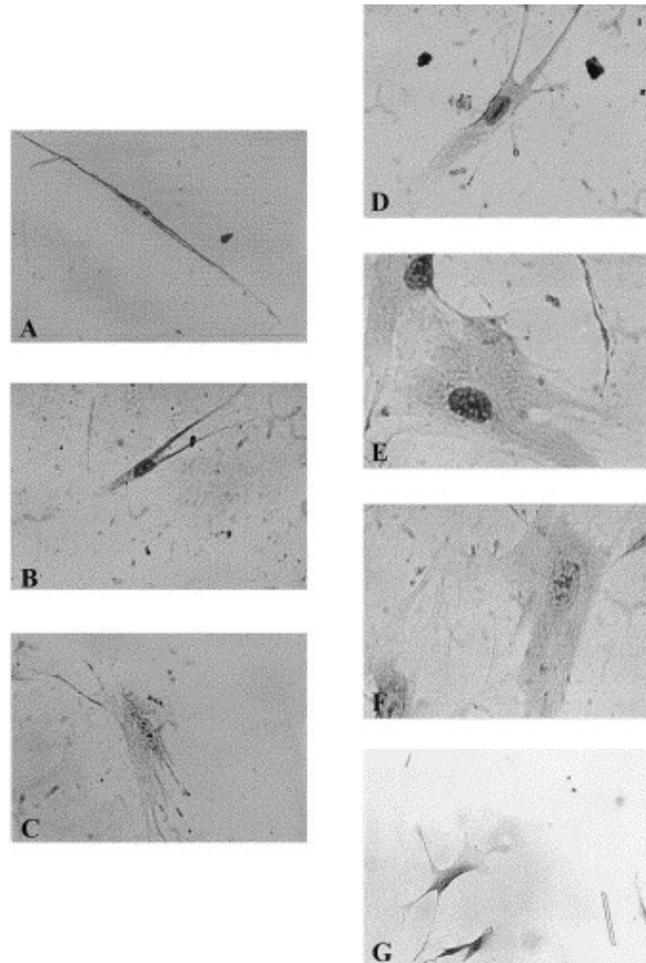


FIGURE 1.6 – Les différents morphotypes des fibroblastes. Les morphotypes sont classés en fonction de (Bayreuther et al., 1988). Les fibroblastes mitotiques (FM) sont présentés dans les images A : FM I, B : FM II et C : FM III et les fibroblastes post-mitotiques (FPM), dans les images D : FPM IV, E : FPM V, F : FPM VI et FPM VII.

Source : (Rogakou and Sekeri-Pataryas, 1999)

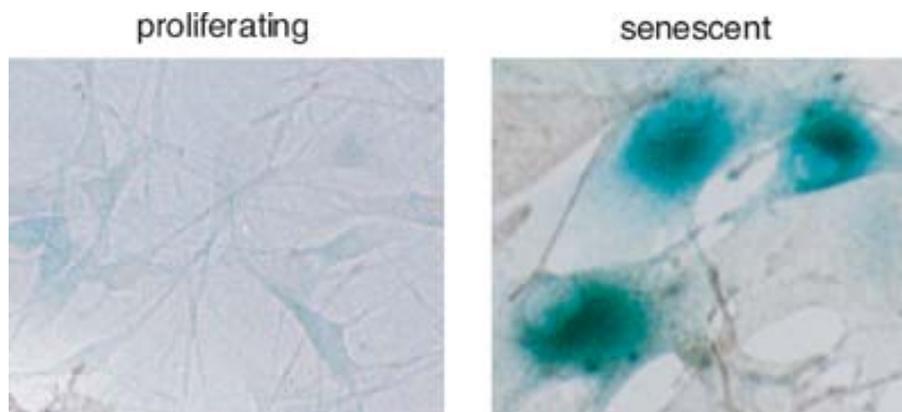


FIGURE 1.7 – Comparaison de l'activité SA- $\beta$ gal entre les cellules prolifératives et sénescents. Les cellules sénescents présentant une activité SA- $\beta$ gal apparaissent en bleu selon le protocole de laboratoire élaboré par (Dimri and Campisi, 1994).

Source : (Medrano, 2005)

### Changements morphologiques

Les cellules en sénescence répliquative présentent une morphologie typique. Ces changements morphologiques ont été particulièrement bien décrits chez les fibroblastes. Au départ, les cellules « jeunes » sont petites et fusiformes. Elles s'étalent et s'allongent progressivement au fil des passages en culture. Ainsi, K. Bayreuther et al. ont mis en évidence sept types de morphologies, appelés morphotypes (Figure 1.6) (Bayreuther et al., 1988). Ces morphotypes peuvent être divisés en deux groupes : les trois premiers correspondent aux fibroblastes mitotiques et les quatre derniers représentent les fibroblastes post-mitotiques. Une population de fibroblastes « jeunes » est composée en majorité de fibroblastes de morphotype I et II, ceux de morphotype III s'accumulent progressivement tout le long de la culture. Lorsque les cellules arrêtent de proliférer et donc que la population devient post-mitotique, la proportion des morphotypes IV, V, VI et VII augmente. Le morphotype VII est un stade de dégénérescence qui précède la mort cellulaire.

### Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ gal)

La  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) est une hydrolase présente dans les lysosomes et active à pH 4,0. L'activité associée à la sénescence de cette enzyme a été découverte en 1995 par l'équipe de Judith Campisi (Dimri et al., 1995). En effet, dans les cellules sénescents, l'activité de cette enzyme est détectée à pH 6,0. Celle-ci correspond à une activité résiduelle de la  $\beta$ -gal liée à une surexpression de son gène (Bassaneze et al., 2008) couplé à une augmentation du nombre de lysosomes les cellules sénescents (Kurz et al., 2000). Cette activité fut dénommée activité SA- $\beta$ gal (Figure 1.7).

La proportion de cellules présentant une activité SA- $\beta$ gal augmente, *in vitro*, avec le nombre de passages en culture et *in vivo*, avec l'âge dans de nombreux tissus (Medrano, 2005). Chez les FDHs, une corrélation entre l'augmentation de la proportion des cellules positives à l'activité SA- $\beta$ gal et la proportion des morphotypes post-mitotiques a également été mise en évidence (Toussaint et al., 2000c).

### La lipofuscine

La lipofuscine a été observée dans différents organes et principalement dans le cerveau, le cœur et le foie. Sa présence est généralement considérée comme un marqueur du vieillissement suite aux résultats de plusieurs études qui ont montré que la quantité en lipofuscine augmentait avec l'âge (Terman and Brunk, 2004, Terman and Brunk, 1998).

La lipofuscine représente du matériel polymérisé qui n'a pas pu être dégradé par les hydrolases des lysosomes. Ce matériel est composé de résidus protéiques oxydés, sous la forme d'acides aminés et de peptides, de résidus de dégradation des lipides avec des triglycérides, des acides gras, du cholestérol et des phospholipides, ainsi que des hydrates de carbone. Environ 2 % des composants sont des composés métalliques avec principalement du fer et du cuivre, mais aussi de l'aluminium, du zinc, du calcium et du manganèse (Jolly et al., 1995). La composition de la lipofuscine varie d'un type cellulaire à l'autre, mais garde sa caractéristique de « non dégradable ». Il semblerait que cette résistance à la dégradation soit dû la formation d'aldéhydes et à la réticulations des peptides, ce qui engendre une structure proche de celle des plastiques (Kikugawa et al., 1989).

Il a été montré que la formation de lipofuscine est exacerbée en présence d'un stress oxydatif. Quand les cellules sont cultivées sous 8 % d'O<sub>2</sub> (oxygène), l'accumulation de lipofuscine est moins importante que lorsque les cellules sont cultivées sous 21 ou 40 % d'O<sub>2</sub><sup>11</sup>. Il a été proposé que les radicaux libres et les réactions d'oxydation conduisent à la formation d'aldéhydes et à la réticulation des protéines, empêchant ainsi leur

11. La tension en O<sub>2</sub> utilisée généralement en culture cellulaire est celle de l'atmosphère, à savoir 21 %. Une tension de 40 % a été utilisée afin d'étudier les cellules sous des conditions oxydantes (von Zglinicki et al., 1995).



dégradation lysosomale (Terman and Brunk, 1998). Le fer représente également un des éléments importants pour la formation de lipofuscine. Ainsi, l'ajout de complexes de phosphate de fer hydraté favorise la formation de lipofuscine alors qu'un chélateur de fer (desferrioxamine) la diminue (Brunk and Terman, 2002).

La présence de la lipofuscine au sein de la cellule peut avoir un impact sur la quantité d'enzymes lysosomales présentes dans la cellule, sur le stress oxydatif avec des conséquences sur différentes fonctions cellulaires telles que la dégradation des protéines par le protéasome, la défense contre les stress oxydatifs et les mécanismes déclencheurs de l'apoptose (Brunk and Terman, 2002). Il a été proposé que la lipofuscine soit toxique à cause de sa capacité à intégrer du cuivre et du fer, pouvant catalyser la réaction de Fenton (Höhn et al., 2010). Différentes pathologies liées à l'âge, avec par exemple les maladies neurodégénératives, la dégénérescence maculaire et les insuffisances cardiaques peuvent également présenter une accumulation de lipofuscine au sein des cellules (Terman and Brunk, 2004).

### **Des modifications dans l'expression de gènes associées à la sénescence**

Durant la sénescence, il a été montré que l'expression de nombreux gènes est modifiée. Ces gènes peuvent intervenir dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que le cycle cellulaire, la matrice extracellulaire, les dommages à l'ADN, le cytosquelette, la transduction du signal, etc.

**Gènes impliqués dans le cycle cellulaire** Les cellules sénescents sont caractérisées par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. De nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire sont surexprimés chez les cellules sénescents. Parmi eux, les gènes codant pour les protéines p21<sup>WAF1</sup> et p16<sup>INK4A</sup> sont surexprimés en sénescence. De même, le gène codant pour l'IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3) est également surexprimé. Ce gène code pour une protéine liant des facteurs de croissance de type insuline. Cette protéine joue alors un rôle d'inhibiteur de croissance et semble impliquée dans l'apparition de plusieurs autres marqueurs de la sénescence comme l'arrêt irréversible de la prolifération cellulaire, l'augmentation de la proportion des cellules positives pour la SA- $\beta$ gal et l'expression de certains gènes associés à la sénescence (Debacq-Chainiaux et al., 2008).

**Gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire** La MEC (matrice extracellulaire) subit des modifications lors de la sénescence avec l'apparition d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la MEC. L'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse ou la dégradation de la MEC est donc modifiée. Parmi ceux-ci, citons les gènes codant pour la fibronectine, l'osteonectine, ainsi que certaines MMP (matrix metalloproteinase) (Hay, 1991). La Fibronectine est une protéine importante pour l'adhérence des cellules à la MEC. Elle joue un rôle dans l'apparition des modifications morphologiques caractéristiques de la sénescence. L'Ostéonectine (ou SPARC – Secreted Protein Acid Cystein Rich) appartient à la famille des protéines de la MEC (Yan and Sage, 1999). Cette protéine est capable de lier le calcium et d'autres cations, et joue un rôle dans la régulation des interactions cellule-matrice (Bornstein, 1995). Elle peut intervenir dans l'activité de nombreux facteurs de croissance (Brekken and Sage, 2000) et donc jouer un rôle dans le cycle cellulaire en se liant à ceux-ci, ce qui inhibe la progression du cycle cellulaire en phase S. Il a également été montré que l'expression de gènes codant pour des protéines de la famille des MMP comme MMP-1, impliquées dans la dégradation de la MEC, était augmentée dans les cellules sénescents (Kar et al., 2010). Enfin, l'expression du CTGF (connective tissue growth factor), une protéine riche en cystéines et dont l'expression dépend du TGF- $\beta$ 1, est augmentée lors de la sénescence (Kim et al., 2004). Celle-ci peut jouer un rôle dans le remodelage de la MEC (Leask and Abraham, 2003).

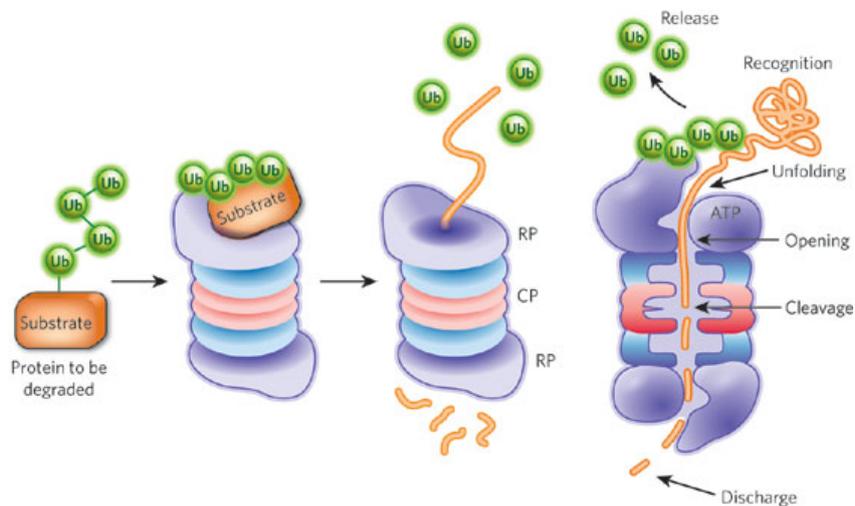


FIGURE 1.8 – La voie de dégradation ubiquitine-protéasome. Cette voie est responsable de la dégradation de nombreuses protéines normales, mal repliées ou aberrantes. La protéine à dégrader est tout d’abord polyubiquitinilée et reconnue par des récepteurs d’ubiquitine localisée dans la partie régulatrice (RP, violet) du protéasome 26S ou des protéines adaptatrices (non représentées) s’associent de façon réversible avec la protéine polyubiquitinilée et les sous-unités du protéasome. Les ATPases déroulent le substrat et le font entrer dans la structure 20S du protéasome (CP, anneaux rouges et bleus), qui abrite les sites protéolytiques. Le substrat y est clivé en petits peptides et l’ubiquitine est normalement recyclée.

Source : (Hochstrasser, 2009)

**Gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN** Les cellules sénescents accumulent des dommages à l'ADN, ce qui peut être lié à une diminution de l'efficacité des systèmes de réparation de ces dommages (Chen et al., 2007). Des modifications dans l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire suite à la détection de ces dommages à l'ADN sont également détectés tels que la surexpression de gènes codant pour les protéines p53, GADD45A (growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha) et GADD153 (growth arrest and DNA-damage-inducible protein 153), etc.) ainsi que PCNA (proliferating cell nuclear antigen), une protéine impliquée dans la réparation de ces dommages.

**Gènes codant pour des cytokines** Le TGF- $\beta$ 1, décrit de façon détaillée dans les sections suivantes, est une cytokine qui joue un rôle actif dans l'apparition des marqueurs de la sénescence. Une augmentation de son expression génique constitue un marqueur important de la sénescence. L'augmentation de l'expression de gènes codant pour des facteurs de croissance a également été mise en évidence durant la sénescence comme l'IGFBP3 décrit précédemment.

### Diminution de l'activité du protéasome

Le protéasome est un complexe multi-enzymatique qui permet la dégradation de type non lysosomal des protéines (Figure 1.8). Cette structure permet de dégrader des protéines normales, anormales, dénaturées, ou endommagées (Ciechanover, 2005). Le protéasome est un complexe protéique avec un noyau protéolytique actif 20 S, composé de 28 sous-unités réparties en quatre structures heptamériques circulaires. Ces structures sont elles-mêmes composées de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (DeMartino and Gillette, 2007). Les structures circulaires extérieures sont composées de sept sous-unités  $\alpha$  et jouent un rôle structural et régulateur, alors que les structures circulaires intérieures sont composées de sept sous-unités  $\beta$  et possèdent des sites actifs qui portent les activités catalytiques. La structure 20 S constitue le noyau protéolytique du complexe 26S qui est la voie principale de dégradation des protéines dépendante de l'ATP (adénosine triphosphate) et de l'ubiquitine (Glickman and Ciechanover, 2002). La régulation de l'activité du protéasome humain n'est pas encore entièrement comprise. Des études réalisées chez la souris montrent que l'expression des sous-unités du protéasome et ses activités relatives peuvent être modulées par des stimuli exogènes.

Une perte de fonction du protéasome dans plusieurs tissus humains durant le vieillissement (Grune et al., 2004) ainsi que dans des cultures primaires sénescents (SITTE et al., 2000) a été observée. D'autres travaux menés sur des cultures de fibroblastes embryonnaires humains en sénescence répliquative ont montré que la réduction des activités du protéasome est accompagnée d'une diminution du contenu du protéasome. Ceci semble être la conséquence d'une diminution de la régulation des sous-unités catalytiques  $\beta$  (Chondrogianni et al., 2003). De plus, le phénotype sénescents apparaît lorsque l'activité du protéasome est partiellement inhibée dans des cultures de fibroblastes jeunes. Il a été découvert que le protéasome pouvait jouer un rôle actif dans l'apparition de la sénescence puisque son inhibition engendre l'apparition du phénotype sénescents (Chondrogianni and Gonos, 2004, Chondrogianni et al., 2003).

L'inhibition du protéasome et/ou l'inhibition d'autres mécanismes de dégradation/d'élimination des protéines ou autres peuvent avoir comme conséquence une accumulation de protéines oxydées et la formation d'agrégats. L'oxydation des acides aminés mène à une inactivation de la protéine qui doit être éliminée par protéolyse. Les acides aminés les plus sensibles à l'oxydation sont les cystéines et les méthionines. L'impossibilité d'éliminer des protéines oxydées amène celles-ci à interagir et à former des agrégats. En effet, les protéines oxydées deviennent plus hydrophobes et peuvent alors interagir et s'associer avec des lipides pour former des agrégats de lipofuscine (?).

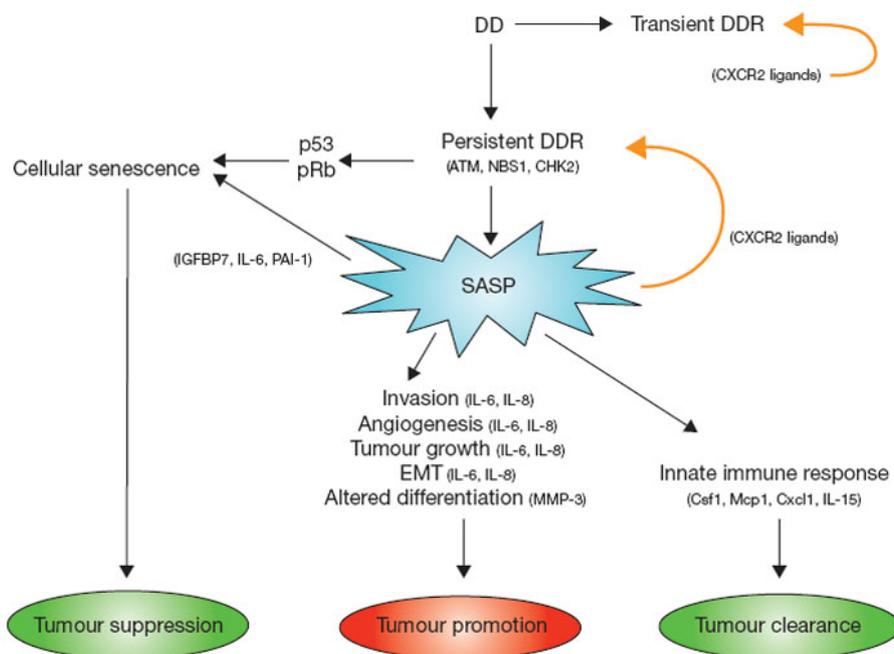


FIGURE 1.9 – Schéma des causes et des conséquences du phénotype sécrétoire associé à la sénescence. L'accumulation de lésions de l'ADN (DD - DNA damages) déclenche une réponse persistante aux dommages de l'ADN (DDR - DNA Damages Response). Cette réponse est responsable de la sécrétion d'un grand nombre de protéines, un phénomène connu sous le nom de phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Les protéines sécrétées permettent de supprimer les tumeurs en maintenant l'état de sénescence par une boucle de rétroaction positive qui soutient le processus de DDR (flèches oranges) ou par l'arrêt du cycle cellulaire. Certaines de ces protéines permettent la régression des tumeurs en activant la réponse immunitaire et en favorisant la clairance tumorale. D'autres sont impliquées dans la promotion des tumeurs en favorisant l'invasion, l'angiogenèse, la croissance tumorale, etc..

Source : (Fumagalli and Di Fagagna, 2009)

### Phénotype sécrétoire associé à la sénescence ou SASP

Le milieu de culture des cellules sénescents est riche en protéines secrétées. Décrit plus récemment, le SASP (senescence-associated secretory phenotype) constitue un nouveau marqueur des cellules sénescents (Young and Narita, 2009) (Figure 1.9).

Le concept de SASP a été proposé pour la première fois par le groupe de J. Campisi lorsqu'il a été découvert que les facteurs sécrétés à partir de fibroblastes sénescents pouvaient favoriser la transformation des cellules épithéliales mammaires pré-tumorales. Parmi ces facteurs sécrétés, certains renforcent l'arrêt du cycle cellulaire lié à la sénescence de manière autocrine alors que d'autres favorisent la dégénérescence ou l'hyperprolifération chez les cellules voisines. La sénescence, très souvent considérée comme un mécanisme suppresseur de tumeur, pourrait donc jouer un double jeu dans l'environnement d'une tumeur. Selon l'environnement, les composants du SASP peuvent avoir des effets divers à travers des mécanismes à la fois autocrine et paracrine, renforçant l'idée que la sénescence est à la fois contrôlée par, et influence activement le milieu extracellulaire.

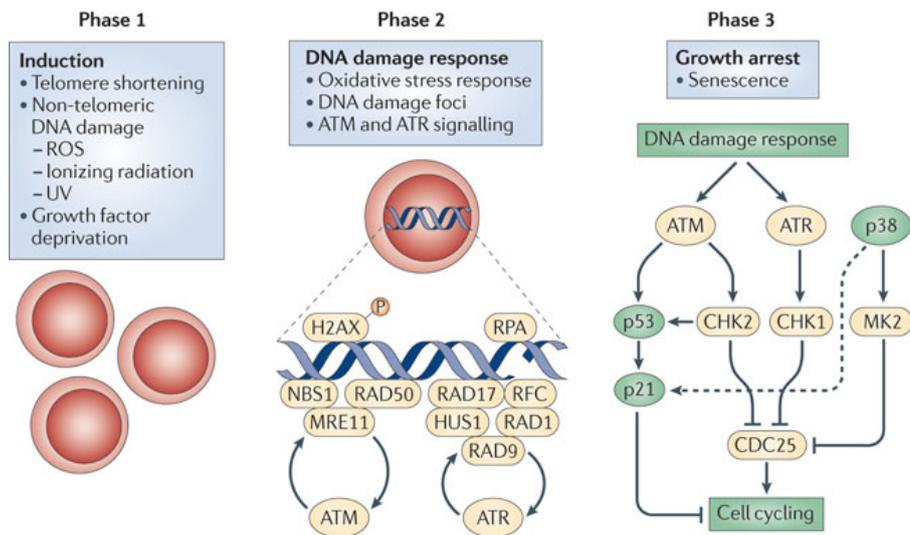
Il a été montré qu'un nombre élevé de dommages à l'ADN pouvait déclencher une réponse persistante des dommages à l'ADN (en anglais DNA Damages Response ou DDR – phénomène décrit plus loin) conduisant à la sénescence cellulaire. La persistance d'une telle réponse peut engendrer la sécrétion d'un grand nombre de protéines impliquées dans la SASP. Ces protéines peuvent maintenir l'état de sénescence par inhibition de la prolifération (par exemple, IGFBP7 (insulin-like growth factor binding protein 7), IL-6 (interleukine 6), PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)), aider à la régression de la tumeur par l'activation de la réponse immunitaire (CSF1 (macrophage colony-stimulating factor-1), MCP1 (monocyte chemotactic protein-1), CXCL1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1) et IL-15 (interleukine 15)) ou promouvoir la tumeur en favorisant l'invasion, l'angiogenèse, la croissance tumorale, la transition épithéliale-mésenchymateuse (IL-6 et IL-8 (interleukine 8)) et modifier la différenciation épithéliale (MMP3 (matrix metalloproteinase 3)) (Fumagalli and Di Fagagna, 2009).

## 1.3 Les causes de la sénescence cellulaire

Quelles sont les causes de la sénescence cellulaire? Elles sont multiples et non-exclusives. En effet, plusieurs causes peuvent agir ensemble et mener la cellule vers la sénescence. La sénescence cellulaire peut être engendrée suite à un raccourcissement critique des télomères, à des dommages à l'ADN non réparés s'accumulant, à des perturbations de la chromatine modifiant l'expression de certains gènes, à l'activation d'oncogènes ou à la suite d'un stress oxydatif (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

### 1.3.1 La sénescence induite par le raccourcissement des télomères

Il a été montré que les cellules entraient en sénescence après l'épuisement de leur potentiel prolifératif, ce qui est le cas de la SR (sénescence réplivative). La SR peut être considérée comme une sénescence dépendante des télomères. Les télomères, structures très conservées chez les vertébrés, sont des régions répétées d'ADN (séquence « TTAGGG » chez l'Homme) et situées aux extrémités des chromosomes. Des protéines dites « de coiffe » sont associées aux télomères et forment des structures qui protègent les extrémités des chromosomes contre une potentielle fusion (Gilley et al., 2005). En plus de leur rôle protecteur, il semblerait que ces structures agissent comme des horloges cellulaires rappelant à la cellule le nombre de divisions effectuées. En effet, les ADN polymérasés sont incapables de répliquer complètement ces régions, ce qui engendre une perte d'environ 50 à 200 paires de bases à chaque division cellulaire. En 1990, une corrélation entre le raccourcissement des télomères et l'apparition de la SR a été mise en évidence (Harley et al., 1990). Après plusieurs divisions cellulaires, les télomères atteignent une longueur « critique » pouvant être considérée comme des dommages à l'ADN et



Nature Reviews | Immunology

FIGURE 1.10 – L'implication de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) dans la sénescence. La phase d'induction peut être déclenchée par différents stimuli (raccourcissement des télomères, stress oxydatif, radiations ionisantes ou UV, absence de facteurs de croissance). La deuxième phase est une réponse aux dommages de l'ADN (DDR) qui inhibe le cycle cellulaire jusqu'à ce que l'ADN est réparé. Différentes protéines sont impliquées dans ce mécanisme : des kinases qui détectent le dommages (ATM et ATR), des protéines qui vont constituer les foyers de dommages à l'ADN (H2AX, RPA et RAD), des kinases activées par ATM/ATR (Chk1 et Chk2), p53 et la cycline-dépendante inhibiteur de kinase p21. Ces voies mènent à l'inhibition de CDC25 et donc à l'arrêt du cycle. La p38<sup>MAPK</sup> peut également participer. Si l'ADN endommagé est réparé, les foyers de dommages à l'ADN se désintègrent, la DDR s'arrête et la cellule reprend le cycle cellulaire. Cependant, une DDR prolongée conduit finalement à la troisième phase : la sénescence.

Source : (Akbar and Henson, 2011)

induisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apparition d'autres marqueurs de la sénescence (di Fagagna et al., 2003). Il a été proposé qu'un raccourcissement des télomères pouvait perturber l'association des protéines « de coiffe », ce qui induit une perte de la protection des extrémités du chromosome (Karseder et al., 2002). La télomérase, une enzyme active notamment chez les cellules tumorales et germinales, est capable de maintenir constante la longueur des télomères pour permettre aux cellules de continuer à se diviser. Elle catalyse l'addition d'une séquence répétée spécifique à l'extrémité des chromosomes. Cette enzyme est composée de deux sous-unités, une sous-unité protéique (TERT (telomerase reverse transcriptase)) qui assure la synthèse de la séquence télomérique et une sous-unité d'ARN (TERC (telomerase RNA component)) qui sert de matrice pour la synthèse de la séquence (Cohen et al., 2007). Il a été montré que l'expression ectopique du gène hTERT codant pour la protéine TERT dans des FDHs permettant l'activité de la télomérase empêchait l'apparition de la sénescence répliquative (Bodnar et al., 1998). L'activité de la télomérase semble impliquée dans l'immortalisation cellulaire ainsi que dans la transformation (Stewart and Weinberg, 2000).

### 1.3.2 La sénescence induite par les dommages à l'ADN

Il a été établi que la sénescence répliquative était dépendante de la longueur des télomères. Lorsque les télomères se raccourcissent, ceux-ci deviennent plus accessibles car non coiffés et des stress peuvent y engendrer des dommages. La voie de signalisation en aval du raccourcissement télomérique et de la sénescence répliquative semble être identique à celle activée par des dommages à l'ADN. Cette voie de signalisation implique les protéines kinase ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ataxia telangiectasia related) et éventuellement, la DNA-PK (DNA-dependent protein kinase). Il a par ailleurs été observé que la phosphorylation de l'H2AX (histone 2AX) facilitait la formation de foyers de dommages à l'ADN au niveau des télomères non coiffés, ceci activant les kinases Chk1/Chk2 et la protéine p53. Le maintien du phénotype sénescence semble dépendre de cette voie de signalisation, ce qui suggère que la sénescence cellulaire peut être considérée comme une persistance de la réponse aux dommages à l'ADN (DNA Damages Response ou DDR) (Figure 1.10) (von Zglinicki et al., 2005). Il a été montré que des dommages à l'ADN et plus particulièrement des cassures double-brin engendraient l'apparition de la sénescence dans de nombreux types cellulaires. La sénescence induite par des dommages à l'ADN dépend fortement de p53 et de p21<sup>WAF1</sup>. Plus tardivement, p16<sup>INK4A</sup> peut également être surexprimée et constituer une deuxième phase pour mener les cellule vers un arrêt du cycle cellulaire (Stein et al 1999). Les cellules présentant une mutation de p53, comme c'est le cas dans certaines cellules cancéreuses, semblent entrer plus difficilement en sénescence induite par des dommages à l'ADN (Schmitt et al 2002).

Il a été montré que des perturbations au niveau de la structure de la chromatine peuvent engendrer une sénescence mais les mécanismes sont encore incompris (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Il a également été proposé que les dommages à l'ADN ne soient pas la cause de l'apparition de la sénescence mais une conséquence de celle-ci. En effet, il se pourrait que les systèmes de réparation de l'ADN deviennent de moins en moins performants en fonction de l'âge de la cellule et du nombre de divisions réalisées (Chen et al., 2007).

### 1.3.3 La sénescence induite par un oncogène

Un oncogène est défini comme une version mutante d'un gène normal jouant initialement un rôle dans la croissance et la division cellulaire. Suite à une mutation, l'oncogène devient capable de transformer la cellule et de favoriser l'apparition de cancers. Il a été observé que la majorité de cellules normales devenaient sénescences suite à la présence d'un oncogène. Par exemple, il a été montré que des fibroblastes humains normaux devenaient sénescents suite à l'expression d'une forme mutée du gène Ras, un proto-oncogène (Serrano et al., 1997). La



protéine Ras est une petite protéine impliquée dans la prolifération cellulaire et qui lorsqu'elle est mutée, devient constamment active, favorisant ainsi la prolifération cellulaire. Les cellules, en réponse à une telle mutation, entrent en sénescence pour empêcher l'hyperprolifération. Ces résultats ont été reproduits avec d'autres gènes faisant partie de la même voie de signalisation que Ras ou faisant partie de gènes pro-prolifératifs avec par exemple les gènes N-myc, c-myc ou erb2. On parle dans ce cas de Sénescence induite par les oncogènes (Oncogene-induced senescence ou OIS) (MDuff and Turner, 2011).

### 1.3.4 La sénescence induite prématurément par des stress (SIPS)

La sénescence peut être induite par différents types de stress générés par des agents induisant un stress oxydatif et/ou des dommages à l'ADN. Ces stress, uniques ou répétés, peuvent être appliqués de manière chronique ou aiguë. Il s'agit de la sénescence induite prématurément par les stress ou SIPS. Les cellules en SIPS (sénescence induite par les stress) présentent des marqueurs de la sénescence répllicative. L'apparition de ces marqueurs semble être due à l'accumulation de ROS (reactive oxygen species) (Toussaint, 2000). La sénescence induite prématurément par les stress sera caractérisée dans les sections suivantes.

## 1.4 Le stress oxydatif et les réponses antioxydantes

La théorie radicalaire est une théorie majeure du vieillissement. Elle se base sur le rôle des radicaux libres<sup>12</sup> et de leur accumulation lors du vieillissement. Les sources des molécules oxydantes, comme les ROS, peuvent être endogènes ou exogènes. Les sources endogènes sont majoritairement représentées par les réactions chimiques localisées dans les mitochondries, les peroxysomes, au niveau du cytochrome p450 et des NAD(P)H oxydases. En 1972, il a même été proposé que les mitochondries représentaient de véritables horloges biologiques. 90% de la réduction de l'oxygène se produit au niveau des mitochondries, celles-ci génèrent donc la plupart des ROS. Il a également été démontré que des perturbations au niveau du fonctionnement des mitochondries pouvaient jouer un rôle important dans le vieillissement et provoquer une augmentation de la production de ROS. Les sources exogènes sont par exemple une exposition aux UV, aux radiations ionisantes, à la pollution, à la fumée, etc.

### 1.4.1 Le stress oxydatif

Un stress oxydatif apparaît au sein d'une cellule suite à une perte d'équilibre entre plusieurs processus dynamiques présents au sein de la cellule. Un débat existe quant à l'utilisation de ce terme ; certains scientifiques préférant utiliser celui de déséquilibre redox (Halliwell, 2012). Les processus en question sont la production systémique de molécules réactives de type ROS ou autre et l'efficacité des mécanismes de neutralisation (utilisation) et d'élimination de ces molécules réactives. Les mécanismes de réparation des dommages générés par ces molécules peuvent aussi influencer l'équilibre. De faibles concentrations de ce type de molécules sont essentielles pour la cellule, car elles constituent des messagers moléculaires dans la signalisation cellulaire et jouent un rôle clé dans le fonctionnement de processus tel que la réponse inflammatoire. Toutefois, à de plus fortes concentrations, elles peuvent devenir délétères en endommageant les constituants cellulaires et en perturbant la signalisation cellulaire. Notons que l'importance du rôle d'une molécule réactive particulière dans l'apparition de stress oxydatif dépend bien sûr de son abondance mais aussi de sa réactivité. Plusieurs études ont montré que

12. Les radicaux libres représentent des molécules qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, ce qui engendre une instabilité et une forte réactivité. En biologie, le terme de « radical libre » est souvent utilisé pour désigner les ROS, ces derniers représentant une classe spécifique de radicaux.

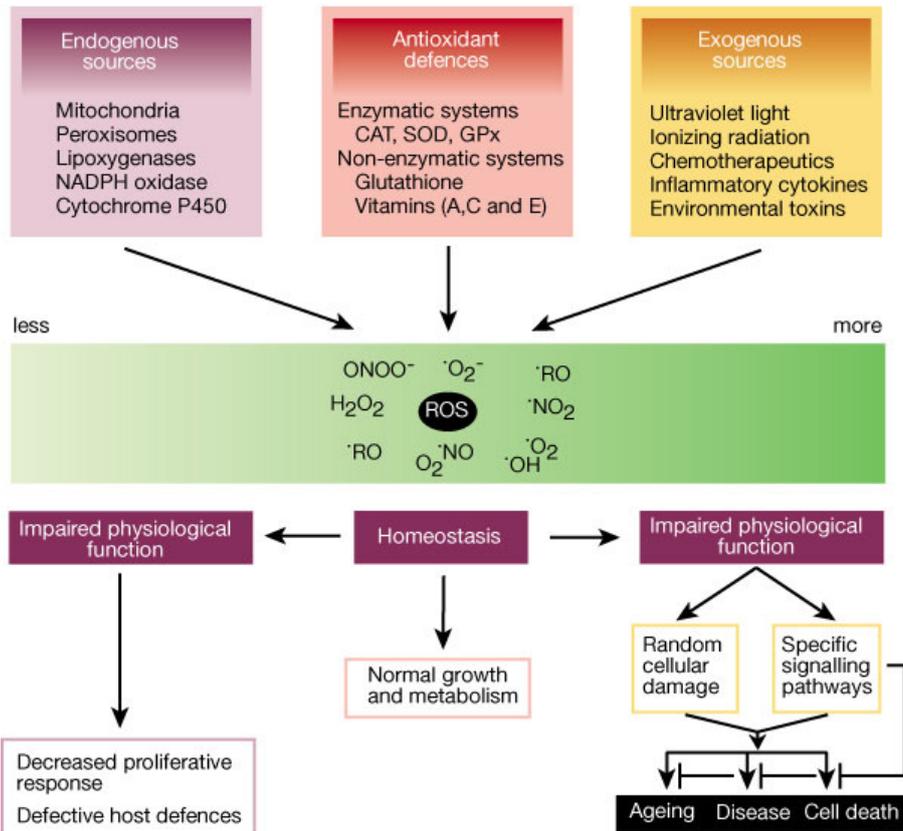


FIGURE 1.11 – Schéma général sur l'homéostasie des molécules oxydantes. Les molécules oxydantes sont générées par le métabolisme intracellulaire normal dans les mitochondries et dans les peroxyosomes mais aussi par des agents externes qui peuvent déclencher la production de ROS. Il existe des systèmes antioxydants de défense composés d'enzymes (ex. : la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx)) et de molécules non-enzymatiques. Ces systèmes maintiennent l'homéostasie physiologique. Trop peu de molécules oxydantes peut perturber leur rôle physiologique dans la prolifération cellulaire et dans la défense de l'organisme. Trop de molécules oxydantes peut engendrer des dommages aux constituants cellulaires et conduire à la mort cellulaire ou à une accélération des maladies et du vieillissement.

Source : (Finkel et al., 2000)

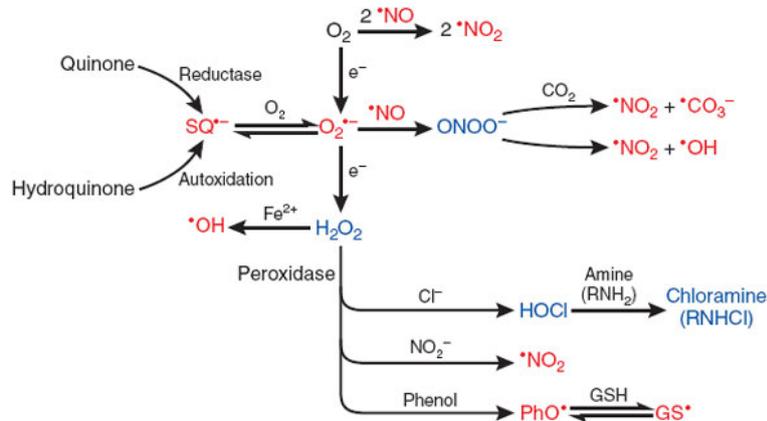


FIGURE 1.12 – Schéma représentant la plupart des molécules réactives oxydantes. Les molécules oxydantes avec un électron libre (radicaux) sont indiquées en rouge ; celles possédant deux électrons sont indiqués en bleu.

Source : (Winterbourn, 2008)

le stress oxydatif était impliqué dans de nombreuses maladies telles que le cancer (Trachootham et al., 2009), les maladies neurodégénératives (Shukla et al., 2011), le diabète, l'athérosclérose (Paravicini and Touyz, 2006) et le vieillissement (Haigis and Yankner, 2010).

Un stress oxydatif peut participer et réguler différentes voies de signalisation. Cette régulation dépend à la fois de l'importance du stress oxydatif, du type de molécules réactives ainsi que de l'état de la cellule au moment du stress. Il est largement accepté qu'un stress oxydatif selon son intensité, sa durée et sa fréquence enclenche différents mécanismes cellulaires pouvant être positifs avec par exemple la prolifération cellulaire et la survie ou négatifs avec par exemple des dommages à l'ADN et la mort cellulaire (Ray et al., 2012). Un schéma général représentant l'homéostasie des molécules oxydantes est présenté à la Figure 1.11.

### 1.4.2 Les molécules réactives impliquées dans le stress oxydatif

Les molécules réactives impliquées dans le stress oxydatif incluent principalement des molécules réactives dérivées de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). Ce groupe de molécules réactives est composé de radicaux libres et de peroxydes (voir Figure 1.12). Certaines de ces molécules sont très réactives et d'autres moins. Cependant, les molécules les moins réactives peuvent être converties par des réactions d'oxydo-réduction en des molécules hautement réactives (Valko et al., 2005). Par exemple, la présence de métaux de transition tels que le cuivre peut catalyser la réaction de Haber-Weiss et permettre la production de radicaux hydroxyles à partir d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène. Il est clairement établi que les radicaux hydroxyles et les anions superoxydes, hautement réactifs, jouent un rôle majeur dans l'apparition des dommages oxydatifs *in vivo* (Ray et al., 2012).

L'origine des ROS ou RNS (reactive nitrogen species) peut être endogène ou exogène (Mangialasche et al., 2009). La production de ces molécules ne représente pas à elle seule un stress oxydatif car la cellule dispose de systèmes de détoxification pour limiter leur accumulation ainsi que leurs interactions avec les constituants cellulaires.

### 1.4.3 Les systèmes antioxydants

Les systèmes antioxydants sont composés de molécules capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat même avec une concentration inférieure à celle du substrat (Beckman and Ames, 1998). Ces molécules peuvent agir comme réducteur et donc réagir avec une molécule réactive et la neutraliser, soit agir plus en amont et empêcher la formation de molécules réactives. On peut diviser les molécules antioxydantes en deux classes : les molécules antioxydantes non-enzymatiques qui peuvent être hydrosolubles ou liposolubles (ex. : le glutathion ou les vitamines), et les enzymes antioxydantes qui possèdent un site catalytique spécifique avec des propriétés antioxydantes (ex. : la superoxyde dismutase, la catalase ou la glutathion peroxydase) (Ray et al., 2012).

#### Les molécules antioxydantes non-enzymatiques

Les antioxydants non-enzymatiques représentent une grande famille de molécules incluant des peptides, des vitamines ainsi que leurs dérivés. Le glutathion, un tripeptide formé de la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine, existe sous la forme de GSSG (glutathion oxydé), et sous la forme de GSH (glutathion réduit). Ce couple d'oxydoréduction peut passer d'une forme à l'autre grâce à la glutathion peroxydase et à la glutathion reductase. Cette petite molécule intervient dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme de la cellule et dans des réactions de détoxification et d'élimination de molécules réactives de l'oxygène. Ces propriétés antioxydantes lui sont conférées par la fonction thiol. Le groupement thiol peut réagir avec des sels de métaux

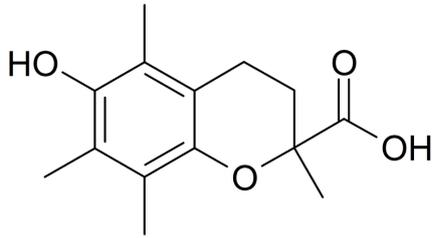


FIGURE 1.13 – Structure du trolox.

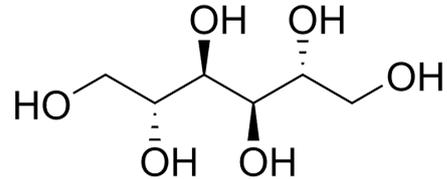


FIGURE 1.14 – Structure du mannitol.

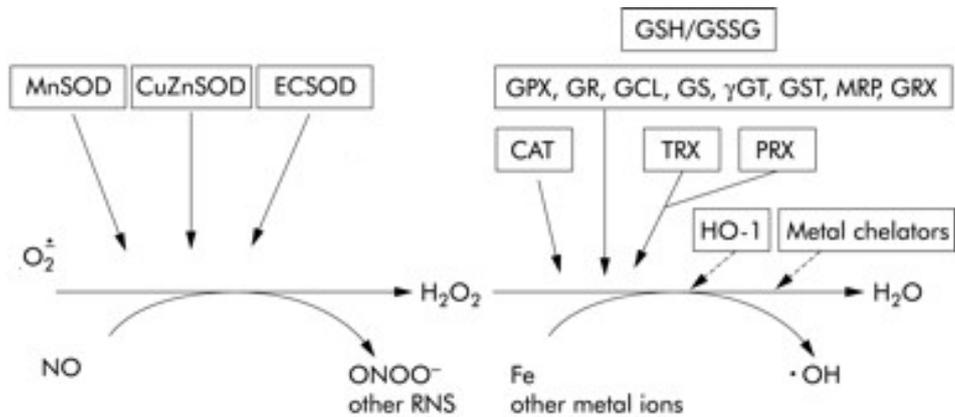


FIGURE 1.15 – Exemples de systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. Ce schéma reprend les principaux systèmes antioxydants de défense.  $O_2^{\cdot(-)}$  : le superoxyde,  $H_2O_2$  : le peroxyde d'hydrogène,  $OH^{\cdot}$  : le radical hydroxyle, NO : l'oxyde nitrique, HOCl : l'acide hypochloreux,  $ONOO^{\cdot(-)}$  : le peroxynitrite, RNS : espèces réactives dérivées de l'azote, ROS : espèces réactives dérivées de l'oxygène, SOD : superoxyde dismutase, CuZnSOD : la SOD à cuivre et zinc, MnSOD : la SOD à manganèse, ECSOD : la SOD extracellulaire, GPX : la glutathion peroxydase, GR : la glutathion réductase, GSH : le glutathion réduit, GCL : la glutamate-cystéine ligase, TRX : la thiorédoxine, PRX : la peroxyrédoxine, GRX : la glutarédoxine, CAT : la catalase, HO-1 : l'hème oxygénase-1.

Source : (Kinnula, 2005)

lourds et créer une liaison soufre-métal très forte. Cette liaison permet l'excrétion de ceux-ci les empêchant de causer des dommages.

Il a été montré que des vitamines telles que la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) ou la vitamine C (acide ascorbique) agissent comme molécules antioxydantes. Cette propriété provient de leur capacité à céder un de leurs électrons, ce qui permet d'arrêter la propagation radicalaire. Ensuite, la molécule peut soit céder un deuxième électron lors d'une réaction d'oxydation, soit remplacer celui manquant (Bors et al., 1990). D'autres molécules ont également des propriétés antioxydantes comme l'ubiquinone (coenzyme Q), les caroténoïdes, l'acide lipoïque et l'acide urique, etc.

Dans notre projet, nous avons utilisé deux molécules antioxydantes : le trolox et le mannitol. Le trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique) est une molécule dérivée de la vitamine E, capable de traverser les membranes cellulaires et hydrosoluble (Figure 1.13) (Benedetti et al., 2008). L'autre molécule utilisée est le D-mannitol (1,2,3,4,5,6-hexanehexol) qui est une molécule de type polyol (sucre-alcool) dérivée du mannose (Figure 1.14). Sa propriété antioxydante vient de sa capacité à interagir et à neutraliser les radicaux hydroxyles (Borel et al., 1997, Shen et al., 1997).

### Les enzymes antioxydantes

Différentes protéines possèdent des propriétés antioxydantes et parmi elles, les superoxydes dismutases (SOD), la catalase, la GPX (glutathion peroxydase) et les PRDX (peroxyredoxine) (Figure 1.15).

Les enzymes de type SOD, qui sont très conservées dans les organismes aérobies, font partie des métalloprotéines. Celles-ci peuvent être classées en trois catégories : la Cu/Zn-SOD cytosolique (SOD1), la Mn-SOD mitochondriale (SOD2), et la extracellular-SOD (EC-SOD ou SOD3). Ces enzymes catalysent la réaction de dismutation du superoxyde en oxygène et  $H_2O_2$ . Ce dernier, qui est beaucoup moins réactif et oxydant que le superoxyde, peut être pris en charge par d'autres enzymes telles que la catalase, la GPX ou les PRDX.

La catalase catalyse la réaction de dismutation de l' $H_2O_2$  en oxygène et en eau grâce à la présence du fer dans ces groupements hèmes.

La GPX, dont l'activité dépend du sélénium et du glutathion, assure la transformation des hydroperoxydes organiques de type ROOH en ROH. Pour ce faire, elle favorise et accélère la réaction entre le GSH et l' $H_2O_2$ , ce qui forme du GSSG et de l'eau.

Les PRDX représentent une famille d'enzymes qui possèdent une activité peroxydase. Celles-ci sont régulées par des interactions entre-elles (oligomérisation), des phosphorylations et la présence de molécules réactives et ont pour substrat, l' $H_2O_2$ . Ces enzymes principales sont rarement localisées dans un seul compartiment cellulaire et peuvent être mobiles à l'intérieur de la cellule et pour certaines, dans le milieu extracellulaire. Il existe également d'autres enzymes ayant des propriétés antioxydantes qui participent au maintien de l'équilibre redox. Lorsque la cellule est soumise à des conditions de stress oxydatif, des gènes codant pour des enzymes antioxydantes telles que la HO-1 (hème oxygenase-1) et la NQO1 (NAD(P)H déshydrogénase quinone-1) sont exprimés et les protéines sont produites. La HO-1 est une des isoformes de la hème oxygénase qui permet la dégradation de l'hème en biliverdine, monoxyde de carbone et de fer. Son expression est induite suite à des stress oxydatifs et représente un bon indicateur de l'état redox de la cellule. Elle joue un rôle d'antioxydant car elle est capable de diminuer l'activité de la NAD(P)H oxydase, un complexe enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale qui génère des anions superoxydes (Ryter and Choi, 2005). La NQO1 catalyse la réduction et la détoxification des quinones qui peuvent provoquer un cycle redox et générer un stress oxydatif (Venugopal and Jaiswal, 1996).

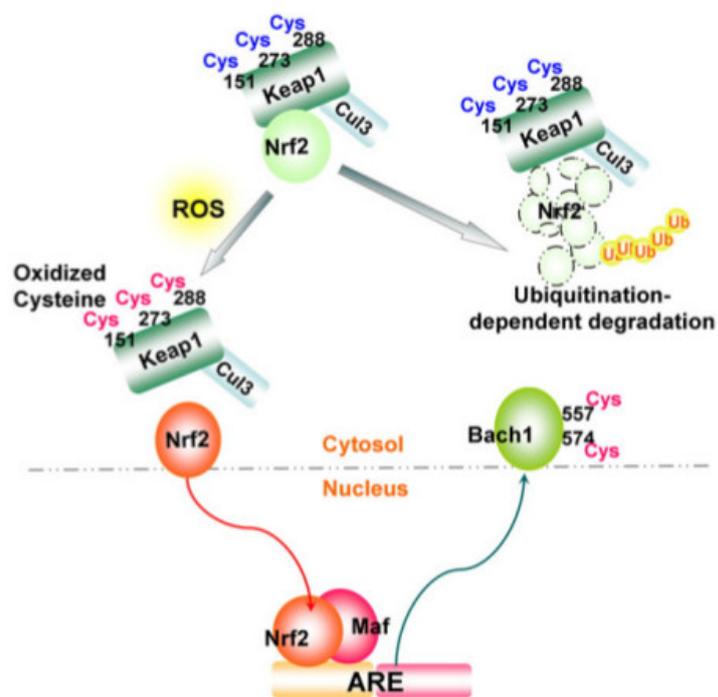


FIGURE 1.16 – Activation de la voie de Nrf2 par le stress oxydatif. L'oxydation des cystéines de Nrf2 par les ROS mène à la libération de Nrf2, ce qui empêche la dégradation de celui-ci. Après sa translocation nucléaire, Nrf2 forme un hétérodimère avec des protéines Maf (CRG-F, Maf-G, et Maf-K) et lie l'élément antioxydant sensible (ARE). L'oxydation des cystéines de BACH1 mène à sa translocation cytoplasmique. Ces deux phénomènes conduisent à l'activation de l'ARE.

Source : (Ray et al., 2012)

#### 1.4.4 La voie de signalisation de Nrf2

Comme nous l'avons décrit précédemment, la cellule réagit face à la production de molécules réactives en activant ses systèmes antioxydants ainsi que plusieurs voies de signalisation impliquées dans la réponse aux stress oxydatifs. Brièvement, ces voies de signalisation/régulation sont : la voie de MAPK (mitogen-activated protein kinase)<sup>13</sup>, la voie des PI3K (phosphoinositide 3-kinase)<sup>14</sup>, la voie de Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2), la voie de Ref1 (redox factor-1)<sup>15</sup>, la voie de p66Shc (SHC adaptor protein)<sup>16</sup>, etc (Ray et al., 2012).

La transcription de gènes codant pour certaines enzymes antioxydantes telles que HO-1 et NQO1 est régulée par une séquence nucléotidique d'amplification nommée ARE (antioxidant response element) située en amont des sites d'initiation de la transcription de ces gènes. Il a été montré que plusieurs phénomènes endogènes ou exogènes qui génèrent des molécules réactives, par exemple une incubation avec de l' $H_2O_2$  (MacKenzie et al., 2008) ou de l'arsenic (Reichard et al., 2007), activent la transcription de gènes antioxydants *via* la séquence ARE. Le facteur de transcription impliqué dans l'activation de la séquence ARE sous des conditions de stress oxydatif est le facteur de transcription Nrf2.

En conditions normales, le facteur de transcription Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme grâce à sa liaison avec la protéine Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein-1) (Itoh et al., 1999). La protéine Keap1 interagit également avec une E3-ubiquitine ligase, la Cul3 (culline-3), ce qui permet l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de Nrf2. Un stress oxydatif peut provoquer la dissociation du complexe Nrf2-Keap1 à cause de résidus de cystéines sensibles à l'oxydation présents sur la protéine Keap1, permettant l'ubiquitination de celle-ci ainsi que la stabilisation et la translocation nucléaire de Nrf2. Dans le noyau, la protéine Nrf2 forme un dimère avec une protéine Maf (Maf-F, Maf-G et Maf-K). Ce dimère se lie ensuite aux séquences ARE présentes dans les promoteurs de gènes codant des enzymes antioxydantes et permet leur expression (Itoh et al., 1999). La liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de Nrf2 semblent dépendantes d'une cystéine présente dans son domaine de liaison à l'ADN ainsi que de la sortie du noyau de la protéine Bach1 (BTB and CTC homolog 1). La protéine Bach1 bloque l'accès à la séquence ARE en s'y liant. Cette liaison est régulée par deux cystéines sensibles à l'état redox. Les cystéines sont en effet sensibles à l'oxydation et une fois oxydées, peuvent engendrer un changement structural de la protéine (Figure 1.16).

Plusieurs recherches ont mis en évidence que l'activité transcriptionnelle de Nrf2 était dépendante de  $p38^{MAPK}$  mais aussi de PKC (protéine kinase C).  $p38^{MAPK}$  est capable de phosphoryler Nrf2, ce qui permet sa translocation nucléaire. Nrf2 semble impliqué dans la sénescence (Kapeta et al., 2010) car il est un facteur de transcription important dans la réponse antioxydante mais il joue également un rôle dans la régulation de plusieurs sous-unités du protéasome chez la souris. Il a été montré que l'activité de Nrf2 diminue au cours de la sénescence et que l'inactivation de l'expression de cette protéine engendre à une sénescence prématurée. De plus, il a été montré qu'un traitement continu induisant l'activité de Nrf2 permet d'accroître la survie ainsi que la durée de vie des fibroblastes humains (Kapeta et al., 2010).

13. La voie des Mitogen Activated Protein Kinase est décrite plus loin dans le manuscrit.

14. La voie des PI3K joue un rôle important dans la prolifération cellulaire et la survie en réponse à des facteurs de croissance, des hormones, des cytokines etc.

15. Le Redox facteur-1 (Ref-1) est une protéine de 37 kDa qui facilite l'activité de liaison de Fos-jun à l'ADN. Cette protéine joue le rôle de facteur de transcription et permet la réparation de l'ADN.

16. Les protéines p66Shc font partie de la famille des protéines adaptatrices Shc. Plusieurs isoformes existent, p66Shc, p52Shc et p46Shc. Ces protéines sont de plus en plus étudiées dans le cadre du vieillissement.



## 1.5 De la théorie des radicaux libres au concept de SIPS

En 1956, D. Harman formulait la théorie des radicaux libres qui stipule que le vieillissement – et les maladies associées - est dû à l'accumulation de dégâts causés par les ROS, ceux-ci étant à l'origine du « stress oxydatif » (Gilca et al., 2007). Comme décrit précédemment, un certain nombre de facteurs, dont le stress oxydatif, peuvent accélérer et/ou déclencher une sénescence prématurée. Ainsi, il a été montré que les FDHs cultivés dans des conditions de culture cellulaire habituelles, c'est-à-dire sous 21 % d'oxygène ( $O_2$ ), pouvaient réaliser 50 doublements de population cumulés (CPD (cumulative population doubling)). Cultivés sous 3 % d' $O_2$ , ce qui représente des conditions de culture plus proches des conditions physiologiques, les FDHs peuvent réaliser 20 CPD supplémentaires (Chen et al., 1995). À l'inverse, en hyperoxie (au delà de 20 % d' $O_2$ ), différents types cellulaires montrent une prolifération fortement réduite et réalisent moins de CPD (Horikoshi et al., 1986, Horikoshi et al., 1991, von Zglinicki et al., 1995). Au delà de 50 % d' $O_2$ , une mortalité cellulaire apparaît (Horikoshi et al., 1991).

Les cellules en sénescence répliquative présentent une augmentation de la production en ROS ou une augmentation des dommages liés aux ROS. De plus, les systèmes antioxydants deviennent moins efficaces au fil du temps, ce qui perturbe l'homéostasie entre les mécanismes générant des ROS et ceux permettant leur élimination. Les ROS risquent alors d'endommager différents constituants cellulaires (protéines, acides nucléiques et lipides) (Lu and Finkel, 2008). Il a été montré que l'exposition de différents types cellulaires à des stress oxydants d'intensité sub-létale pouvait induire une sénescence prématurée, engendrant le concept de SIPS (Toussaint, 2000, Brack et al., 2000).

### 1.5.1 La sénescence induite prématurément par les stress oxydatifs

Les modèles de SIPS utilisent des stress sub-létaux qui n'engendrent pas la mort cellulaire. Les stress oxydatifs engendrant l'apparition de la sénescence peuvent être de plusieurs types : aigus, répétés ou chroniques.

Les premières observations à ce sujet ont été faites par l'équipe de T. Von Zglinicki en 1995, qui a découvert que des fibroblastes humains WI-38 cultivés en hyperoxie (40 % d' $O_2$ ) présentaient un phénotype sénescents après seulement quatre doublements de population (von Zglinicki et al., 1995).

Ensuite, il a été montré que des fibroblastes humains incubés une fois avec une concentration sub-létale d' $H_2O_2$  (Chen et al., 2000) ou de façon répétée avec du *t*-BHP (*tert*-butylhydroperoxyde) (Dumont et al., 2000) entraient en sénescence prématurée. Plusieurs biomarqueurs de la sénescence étaient détectés à trois jours après le dernier stress : un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire, une morphologie étalée caractéristique de la sénescence, une augmentation de l'expression de  $p21^{WAF1}$ , une augmentation de la proportion de cellules présentant une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence, la délétion « commune » de l'ADNmt et des modifications dans l'expression de certains gènes associés à la sénescence. Il a été établi notamment grâce à des études transcriptomiques et protéomiques réalisées chez des fibroblastes humains WI-38 en sénescence répliquative et en sénescence induite par le *t*-BHP ou l'éthanol que la sénescence répliquative et la SIPS présentaient des caractéristiques communes mais également des différences (Pascal et al., 2005, Dierick et al., 2002). Depuis, l'apparition de marqueurs suite à un stress oxydatif a été mis en évidence dans d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales pigmentaires de la rétine (Yu et al 2009), les cellules endothéliales (Kurz et al., 2004) ou les mélanocytes (Toussaint et al., 2000b).

De plus, la SIPS semble indépendante de la longueur des télomères. En effet, les stress ne sont pas associés à un raccourcissement « critique » des télomères (Dumont et al., 2001) et les cellules exprimant la télomérase entrent en SIPS (de Magalhães and Toussaint, 2004).

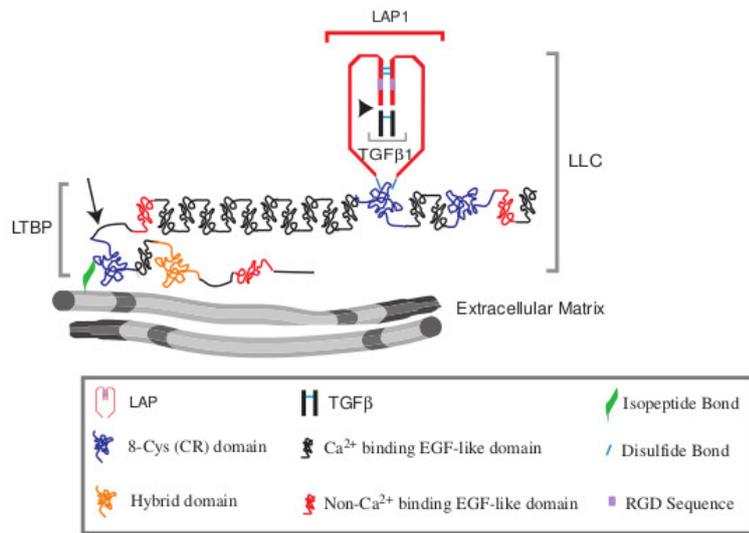


FIGURE 1.17 – Schéma représentant la forme immature du TGF- $\beta$ 1. Le TGF- $\beta$ 1 est synthétisé sous une forme immature, liée de façon covalente à une protéine nommée LAP. Cette liaison sera clivée lors de la maturation du TGF- $\beta$ 1 et ces protéines resteront faiblement reliées par des ponts disulfures entre résidus cystéines. Une autre protéine, nommée LTBP interagit avec celles-ci, ce qui forme un complexe nommé « Latent large complex » ou LLC, lié à la MEC. Ce complexe permet de garder le TGF- $\beta$ 1 sous une forme latente et inactive, l'empêchant ainsi d'interagir avec son récepteur.

Source : (Annes et al., 2003)

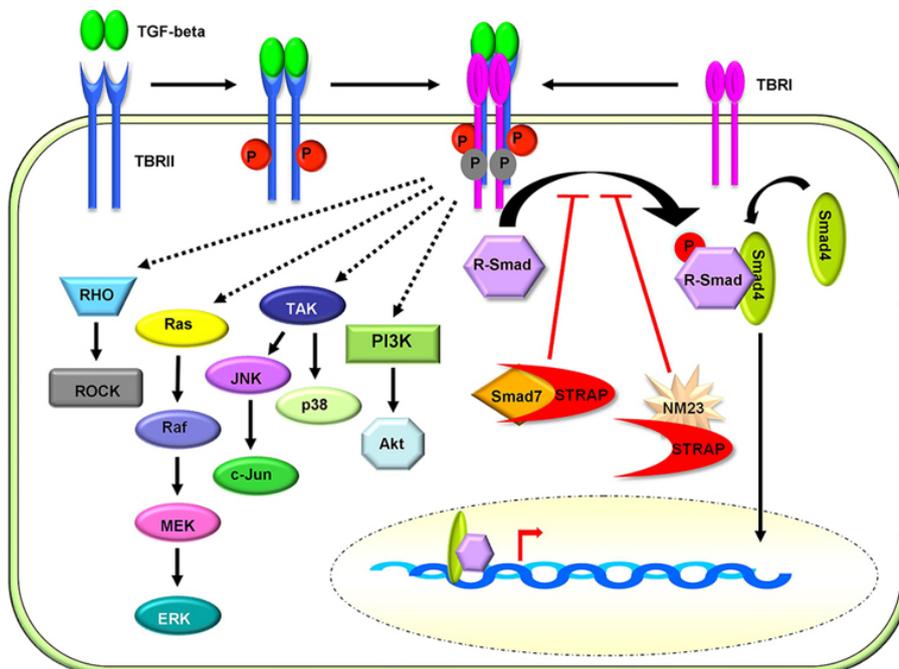


FIGURE 1.18 – Schéma représentant différentes voies en aval du TGF- $\beta$ 1. Les voies de signalisation en aval du TGF- $\beta$ 1 peuvent être les voies des Smads, des Phosphatidylinositol-3-Kinases ou des Mitogen-Activated Protein Kinases.

Source : (Reiner, 2011)

### 1.5.2 Transduction du signal impliquée dans la SIPS

Pour étudier la voie de signalisation impliquée dans l'établissement de la SIPS, deux modèles de SIPS ont été plus largement utilisés : le modèle de SIPS induit par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et celui induit par les ultraviolets de type B (UVB). Ces études ont permis de mettre en évidence une voie de signalisation générale dans laquelle le Transforming Growth Factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) et p38<sup>MAPK</sup> sont des acteurs clés.

#### L'implication du Transforming Growth Factor- $\beta 1$ dans la SIPS

**Qu'est-ce que le TGF- $\beta 1$  ?** Le TGF- $\beta 1$  a été décrit comme étant une protéine qui favorise la transformation cellulaire (Souchelnytskyi, 2005). Le TGF- $\beta 1$  est une cytokine qui joue un rôle important dans le développement et l'homéostasie des tissus. Il intervient dans la prolifération, dans la différenciation, la migration et l'apoptose (Dijke and Hill, 2004).

Le TGF- $\beta 1$  est tout d'abord synthétisé sous une forme immature, liée de façon covalente à une protéine nommée LAP (Annes et al., 2003). La liaison entre ces deux protéines sera clivée lors de la maturation du TGF- $\beta 1$  dans l'appareil de Golgi mais elles resteront faiblement reliées par des ponts disulfures entre résidus cystéines. Une autre protéine, nommée LTBP interagit avec celles-ci, ce qui forme un complexe nommé « Latent large complex » lié à la MEC. Ce complexe permet de garder le TGF- $\beta 1$  sous une forme latente et inactive, l'empêchant ainsi d'interagir avec son récepteur (Annes et al., 2003). Le TGF- $\beta 1$  est représenté à la Figure 1.17.

Le TGF- $\beta 1$  peut être activé par différents mécanismes qui impliquent des protéines ou un stress (ROS). Ainsi, les MMP 2 et 9 activent et libèrent le TGF- $\beta 1$  de son complexe en induisant la protéolyse de la forme latente (Yu and Stamenkovic, 2000). Les ROS en modifiant les acides aminés du LAP engendrent également la libération et l'activation du TGF- $\beta 1$  (Annes et al., 2003). Une fois activé et libéré de son complexe, le TGF- $\beta 1$  peut interagir avec des récepteurs spécifiques en membrane plasmique et initier des voies de signalisation.

Les récepteurs au TGF- $\beta 1$  sont transmembranaires, contiennent des domaines sérine/thréonine et peuvent être de type I (T $\beta$ R-I) ou de type II (T $\beta$ R-II). En condition normale, les récepteurs sont regroupés sous forme de dimères de même type à la surface de la cellule. Lorsqu'un ligand potentiel se présente, il se lie à un dimère de T $\beta$ R-II, qui recrute et se combine à un dimère de T $\beta$ R-I pour permettre l'initiation de voies de signalisation. Cette combinaison est variable et dépend du ligand.

Les voies de signalisation initiées peuvent être, par exemple, les voies de signalisation des Smads, des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ou des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) (Annes et al., 2003). La voie de transduction du signal majoritairement activée par le TGF- $\beta 1$  est la voie dite « des Smads ». Suite à l'activation des récepteurs, les Smads 2 et 3 (R-Smads) sont phosphorylées par le T $\beta$ R-I et s'associent ensuite avec Smad4 (Co-Smads). Le complexe Smad 2 ou 3/Smad 4 peut ensuite migrer dans le noyau où il peut interagir avec des facteurs de transcription ou lui-même agir comme facteur de transcription. Les différentes voies en aval du TGF- $\beta 1$  sont représentées à la Figure 1.18.

**L'expression du TGF- $\beta 1$  dans les cellules sénescences** Des perturbations dans l'expression du TGF- $\beta 1$  ou dans les voies de signalisation qui sont en aval de celui-ci ont été rapportées dans différentes pathologies comme le cancer ou la maladie d'Alzheimer (Das et al., 2006) et semblent jouer un rôle important dans la sénescence.

Il a été montré que l'abondance en ARNm du TGF- $\beta 1$  était augmentée dans les FDHs en sénescence répllicative ou en sénescence prématurée induite par du *t*-BHP ou de l'éthanol dans les FDHs WI-38, par l' $H_2O_2$  dans les FDHs IMR-90, par les UVB dans les FDHs dermiques (Pascal et al., 2005, Fripiat et al., 2001, Chainiaux et al., 2002). Il a également été mis en évidence, par immunofluorescence, une augmentation de l'abondance des

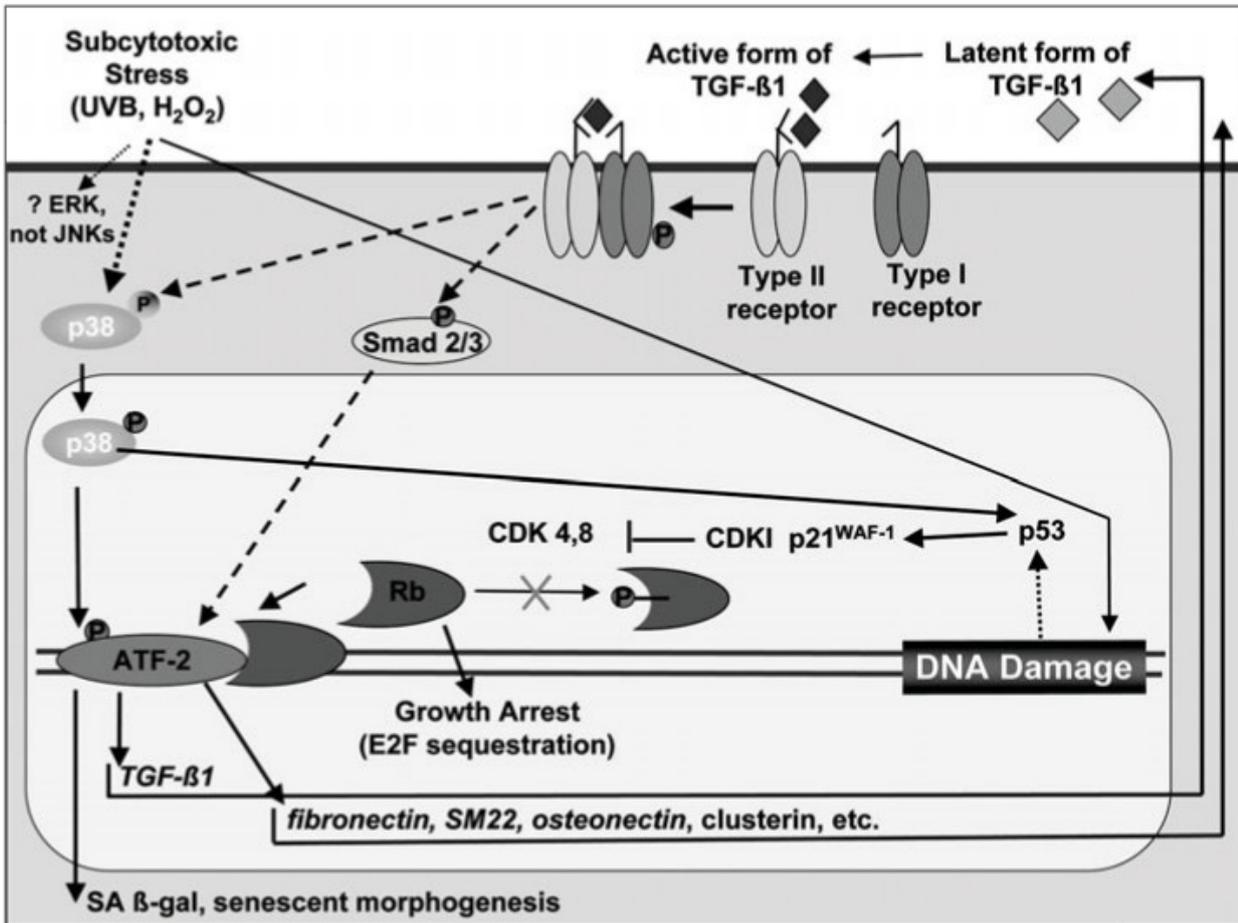


FIGURE 1.19 – Implication de la voie du TGF- $\beta$ 1 dans l'établissement du phénotype sénescence mise en évidence grâce aux modèles de sénescence induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou les UVB chez les FDHs.

Ces stress peuvent activer la p38<sup>MAPK</sup> qui va alors activer le facteur de transcription ATF-2, ce qui va engendrer l'expression du TGF- $\beta$ 1. Le TGF- $\beta$ 1 sera alors sécrété sous sa forme latente. Ces stress peuvent engendrer le passage du TGF- $\beta$ 1 de sa forme latente en sa forme active. Le TGF- $\beta$ 1 actif se lie aux récepteurs de type II, ce qui permet le recrutement des récepteurs de type I et l'initiation des voies de signalisation.

Le TGF- $\beta$ 1 est responsable de l'activation prolongée de p38<sup>MAPK</sup>, visible 72 heures après la fin du stress. L'expression d'autres gènes impliqués dans la sénescence et l'apparition de marqueurs de la sénescence sont également dépendant de cette voie.

Le facteur de transcription p53 peut être activé par la présence de dommages à l'ADN et/ou par p38<sup>MAPK</sup>. p53 actif induit l'expression de p21<sup>WAF1</sup>, qui va inhiber l'activité de complexes CDK-cycline. Cette inhibition engendre une hypophosphorylation de pRb et un arrêt du cycle cellulaire à travers la séquestration du facteur de transcription E2F. Les protéines Smad et les protéines ERK pourraient également participer à ce processus.

Source : (Debacq-Chainiaux et al., 2010b)

formes latente et active du TGF- $\beta$ 1 dans les cellules en sénescence prématurée induite par les UVB, le *t*-BHP ou l'éthanol (Debacq-Chainiaux et al., 2005, Debacq-Chainiaux et al., 2008).

**La voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 impliquée dans la SIPS** Une étude plus approfondie des voies de transduction du signal activées lors de la sénescence prématurée induite par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  chez les FDHs IMR-90 a permis de mettre en évidence l'implication du TGF- $\beta$ 1 dans l'établissement du phénotype sénescence. Un schéma décrivant cette voie est présenté à la Figure 1.19. Dans ce modèle de sénescence prématurée induite par les stress, il a été montré que suite à un stress unique avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , p38<sup>MAPK</sup> était phosphorylé et activé. Ceci provoque l'activation du facteur de transcription ATF-2 (activating transcription factor-2), régulant l'expression du TGF- $\beta$ 1 et menant ainsi à une autre boucle de rétroaction positive. En effet, une fois secrété, le TGF- $\beta$ 1 pourra se lier et activer ses récepteurs, ce qui permettra de maintenir p38<sup>MAPK</sup> et ATF-2 actifs. Une boucle de rétroaction positive existe donc entre l'expression de TGF- $\beta$ 1 et p38<sup>MAPK</sup> (Fripiat et al., 2002). Le facteur de transcription ATF-2 actif intervient dans l'apparition de marqueurs de la sénescence. Lorsque ATF-2 est phosphorylé (actif), il interagit avec pRb, qui devient alors hypophosphorylée, ce qui engendre une diminution de l'activité kinase de CDK2 (Fripiat et al., 2001, Fripiat et al., 2003). ATF-2 et pRb sont nécessaires pour l'apparition des marqueurs biologiques de la sénescence comme la morphologie caractéristique des cellules sénescence, l'activité SA  $\beta$ -gal et l'expression de gènes associés à la sénescence. En effet, le facteur de transcription ATF-2 permet également l'expression de gènes associés à la sénescence tels que les gènes codant pour la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J, etc. (Debacq-Chainiaux et al., 2010b). Il a été montré que l'inhibition de p38<sup>MAPK</sup> ou d'ATF-2 par un inhibiteur chimique ou par des siRNA (small interfering RNA) empêche la surexpression du TGF- $\beta$ 1 et bloque l'apparition de la sénescence prématurée induite par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fripiat et al., 2002).

Le TGF- $\beta$ 1 joue un rôle « actif » dans l'établissement du phénotype sénescence. En effet, il a été montré que les FDHs IMR-90 ou dermiques incubés avec du TGF- $\beta$ 1 entraînent en sénescence prématurée caractérisée par l'apparition de marqueurs de la sénescence tels qu'une morphologie caractéristique, une augmentation de la proportion de cellules présentant une activité SA  $\beta$ -gal et une augmentation de l'expression de gènes associés à la sénescence, notamment les gènes codant pour la fibronectine, l'apolipoprotéine J et l'ostéonectine (Fripiat et al., 2002, Debacq-Chainiaux et al., 2005).

De plus, lorsque le TGF- $\beta$ 1 ou son récepteur de type I sont inhibés par des anticorps neutralisants après un stress avec du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , certains marqueurs de la sénescence n'apparaissent plus chez les FDHs. Il a été observé que les protéines p38<sup>MAPK</sup> et ATF-2, qui restent normalement actives pendant au moins 72 heures suivant le stress et qui permettent l'apparition de marqueurs de la sénescence, ne sont plus phosphorylées après les 72 heures d'incubation avec les anticorps neutralisants. L'activation à court terme de p38<sup>MAPK</sup> est indépendante du TGF- $\beta$ 1 mais celle à long terme, permettant l'apparition des marqueurs de la sénescence, en est dépendante (Fripiat et al., 2002). Des résultats similaires ont été obtenus dans les fibroblastes du derme exposés de façon répétée aux UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

L'effet des anticorps neutralisants le TGF- $\beta$ 1 sur l'apparition des marqueurs de la sénescence n'est pas total, ainsi l'arrêt de prolifération ne semble pas liée au TGF- $\beta$ 1. D'autres effecteurs jouent donc un rôle dans l'apparition du phénotype sénescence après le stress.

### L'implication des MAPK : rôle de p38<sup>MAPK</sup>

Comme nous l'avons déjà expliqué brièvement, p38<sup>MAPK</sup> est impliquée dans l'établissement du phénotype sénescence. Cette protéine semble jouer un rôle fondamental dans la sénescence et cela à plusieurs niveaux (Debacq-Chainiaux et al., 2010b).

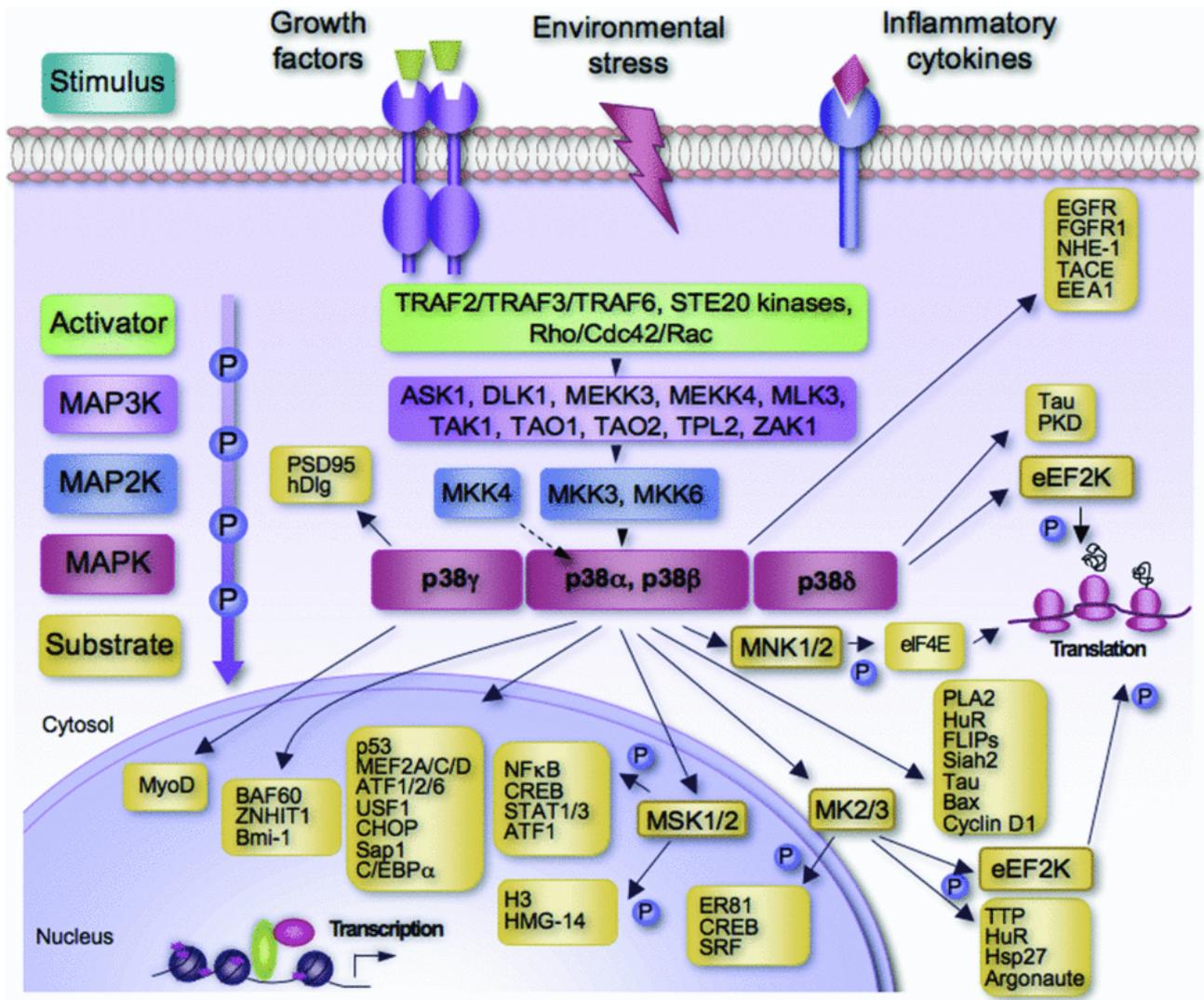


FIGURE 1.20 – Schéma de la voie de signalisation de  $p38^{MAPK}$ . Une variété de stimuli peut activer une cascade de MAPK jusqu'à l'activation de  $p38^{MAPK}$ . Cette cascade se compose de kinases avec des protéines activatrices (ex. : GTPases), des MAPKKK (MAP3K) et des MAPKK (MAP2K). Cette cascade est une suite de phosphorylations avec une MAP3K qui phosphoryle une MAP2K qui, à son tour, phosphoryle  $p38^{MAPK}$ . Un certain nombre de substrats ciblés par  $p38^{MAPK}$  sont des protéines kinases, des substrats cytosoliques, des facteurs de transcription et des protéines de remodelage de la chromatine.

Source : (Cuadrado and Nebreda, 2010)

**Qu'est-ce que les protéines « Mitogen Activated Protein Kinase » ?** p38<sup>MAPK</sup>, ERK (extracellular signal regulated kinase) et JNK (c-Jun-N-terminal kinase) font partie du groupe de protéines kinases nommées « Mitogen Activated Protein Kinase » ou MAPK. Ces protéines sont des sérine/thréonine kinases qui participent à la régulation de nombreux mécanismes biologiques tels la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose etc.

Cette régulation se fait à travers des cascades de phosphorylation. Les trois principaux types de kinases impliquées dans cette cascade sont les MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase), les MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase) et les MAPK. Ces kinases, initialement inactives, ont besoin de une ou plusieurs phosphorylations pour devenir actives. Typiquement, l'activation se fait grâce à un motif de résidus de type thréonine-x-tyrosine avec x qui peut être un acide glutamique dans le cas des ERK, un acide aspartique pour les BMK1 (big MAPK 1), une proline pour les JNK et une glycine pour p38<sup>MAPK</sup>. Pour être actives, les kinases doivent être phosphorylées à la fois sur la thréonine et la tyrosine afin de stabiliser le domaine kinase et de permettre son activité. Il a été mis en évidence que la phosphorylation de la tyrosine précède celle de la thréonine *in vivo* et *in vitro*. Les MAPK sont activées par phosphorylation par des MAPKK qui sont elles-mêmes activées par phosphorylation par des MAPKKK. Les MAPK sont des kinases qui possèdent de nombreux substrats dont des facteurs de transcription, d'autres kinases, etc. et ont été décrites au niveau de la membrane plasmique, dans le cytoplasme et dans le noyau (Pearson et al., 2001, Cuadrado and Nebreda, 2010).

Alors que les protéines ERK représentent les protéines clés dans la transduction du signal induite par des facteurs de prolifération, p38<sup>MAPK</sup> et les protéines JNK semblent plutôt impliquées dans la réponse cellulaire aux stress (stress oxydatif, UV, etc.).

**p38<sup>MAPK</sup>** Il a été montré que p38<sup>MAPK</sup> était impliquée dans la réponse au stress oxydatif, ce qui lui confère un rôle important dans la cellule. p38<sup>MAPK</sup> peut également être activée par des facteurs de croissance, des cytokines, des dommages à l'ADN, etc. La cascade de kinases menant à l'activation de p38<sup>MAPK</sup> est initiée par de multiples acteurs tels que les protéines Rho GTPases, la protéine Rap, les protéines associées au récepteur du TNF (TRAF (TNF receptor associated factors)) ou la protéine GADD45A (Cuadrado and Nebreda, 2010). Ces protéines activent par phosphorylation des protéines de type MAPKKK telles que MEKK1, MLK3, ASK1, TAK1 ou MEKK4. Ces kinases vont à leur tour phosphoryler des protéines de type MAPKK comme MKK6, MKK3 ou MKK4. Ces dernières vont alors activer spécifiquement une isoforme de p38<sup>MAPK</sup> (isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ). Les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  sont exprimées de façon ubiquitaires contrairement aux autres isoformes qui sont caractéristiques de certains tissus. La protéine p38<sup>MAPK</sup>, une fois phosphorylée, devient active et est capable à son tour de phosphoryler de nombreux substrats (Cuadrado and Nebreda, 2010). Parmi les substrats, on retrouve majoritairement des protéines kinases et des facteurs de transcription. Un schéma des voies de signalisation de p38<sup>MAPK</sup> est représenté à la Figure 1.20.

**Rôle de p38<sup>MAPK</sup> dans la sénescence** Il a été montré que p38<sup>MAPK</sup> est activée dans la sénescence répllicative et dans la sénescence prématurée induite par l'oncogène ras ou par un stress oxydatif (Iwasa et al., 2003). Plusieurs substrats (directs ou indirects) de p38<sup>MAPK</sup> ont été décrits comme étant impliqués dans la sénescence avec, par exemple, les protéines de choc thermique, Hsp-27 et Hsp-70 qui peuvent notamment jouer un rôle dans les changements morphologiques. En plus de son implication dans l'induction de la voie du TGF- $\beta 1$ , p38<sup>MAPK</sup> est également impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire de manière indépendante du TGF- $\beta 1$ . En effet, p53 peut être phosphorylé par p38<sup>MAPK</sup>, ce qui va engendrer l'expression de p21<sup>WAF1</sup>. Cette dernière va à son tour inhiber les complexes cycline/CDK(1 ou 2) et permettre l'activation de la protéine de rétinoblastome, pRb, qui séquestre le facteur de transcription E2F, empêchant ainsi la synthèse de protéines de la phase S et bloquant le



cycle en phase G1.

### 1.5.3 La SIPS *in vivo* ?

*In vivo*, les cellules sénescents s'accumulent avec l'âge dans les tissus (Dimri et al., 1995). Comme les organismes sont constamment exposés à des stress, il est possible que ces cellules soient apparues *in vivo* non seulement suite à un nombre élevé de divisions cellulaires mais également suite aux stress. Un argument dans ce sens est la présence prématurée de cellules sénescents dans certaines pathologies ou lors d'inflammation chronique (Campisi, 2005, Jeyapalan and Sedivy, 2008). Ceci a été observé lors d'athérosclérose (Minamino and Komuro, 2002) et d'hyperplasie bénigne de la prostate (Castro et al., 2003) et d'ulcère veineux (Mendez et al., 1998). Bien que les cellules sénescents ne représentent qu'une minorité de cellules *in vivo*, elles semblent impliquées dans le vieillissement tissulaire (Shay et al., 2000, Martin and Buckwalter, 2001). Récemment, il a été montré chez la souris que la présence de cellules sénescents était liée à l'apparition de désordres liés à l'âge tels que la sarcopénie, la cataracte et la perte de tissu adipeux (Baker et al., 2011). Il est proposé que cette interaction entre les cellules sénescents et le vieillissement des tissus et organes provient de la capacité sécrétoire spécifique des cellules sénescents qui sécrètent entre autres des cytokines pro-inflammatoires (Coppé et al., 2008).



# Chapitre 2

## Les métaux

### 2.1 Les métaux et la biologie

En biochimie, les recherches ont montré que pas moins de 25 éléments chimiques essentiels sont indispensables au métabolisme d'un être vivant. A côté des éléments organiques, représentés par le carbone, l'hydrogène, l'azote et l'oxygène, une vingtaine d'éléments, dont 14 éléments métalliques, sont requis pour la vie, que ce soit chez les unicellulaires ou les pluricellulaires, les végétaux ou les animaux. On estime qu'environ un tiers des protéines lie un élément métallique qui sera essentiel à la fonction de celle-ci pour un rôle catalytique, régulateur ou structural. La recherche sur les métaux en biologie s'est considérablement étendue dans les années 80 avec la première conférence internationale sur la chimie bio-inorganique<sup>1</sup>. Depuis, de nombreuses découvertes ont permis de comprendre certains mécanismes et certaines fonctions des métaux dans les systèmes biologiques, ce qui a engendré un intérêt de plus en plus important de la part des biologistes pour la chimie bio-inorganique dans la compréhension du vivant (Bleackley and Macgillivray, 2011).

### 2.2 Le classement des métaux

Le tableau périodique proche de celui utilisé de nos jours a été présenté pour la première fois par le chimiste russe Dimitri I. Mendeleïev en 1869. Ce tableau classe les éléments chimiques en fonction de leur masse atomique, de leur configuration électronique et donc en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

Actuellement, le tableau périodique standard comporte 118 éléments chimiques naturels et artificiels. Ces éléments sont définis par un symbole, un numéro atomique ( $Z$ ) et leur masse atomique.

L'organisation des éléments chimiques dans le tableau périodique est répartie en sept lignes nommées périodes et correspondant à une couche électronique et divisée en 18 colonnes nommées groupes ou familles. Chacune de ces 18 familles représente un ensemble d'éléments qui possèdent des propriétés spécifiques. Les éléments d'une même famille ont comme point commun le même nombre d'électrons de valence c'est-à-dire les électrons présents sur la dernière couche électronique (ou couche de valence) qui interviennent dans les liaisons chimiques.

Les éléments sont également classés selon leurs propriétés chimiques en dix séries. Ces séries sont les métaux alcalins sans l'hydrogène, les métaux alcalino-terreux, les métaux de transition, les métaux pauvres, les métalloïdes, les non-métaux, les halogènes, les gaz nobles, les lanthanides et les actinides (source : International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)).

Enfin, les 103 éléments chimiques naturels peuvent également être subdivisés en deux catégories distinctes, à savoir : la catégorie des métaux qui représente la majorité des éléments et la catégorie des non-métaux qui sont fortement minoritaires. Selon les ouvrages, une troisième catégorie, appelée les métalloïdes regroupant des éléments qui possèdent des propriétés intermédiaires, est parfois signalée<sup>2</sup> (Appenroth, 2010).

---

1. La chimie bio-inorganique a été créée en 1962 pour faire le lien entre la biologie et la chimie inorganique et a ensuite fortement évolué dans les années 80 (met, 2008)

2. L'International Union of Pure and Applied Chemistry ou IUPAC ne reconnaît que les termes de métal et non-métal.

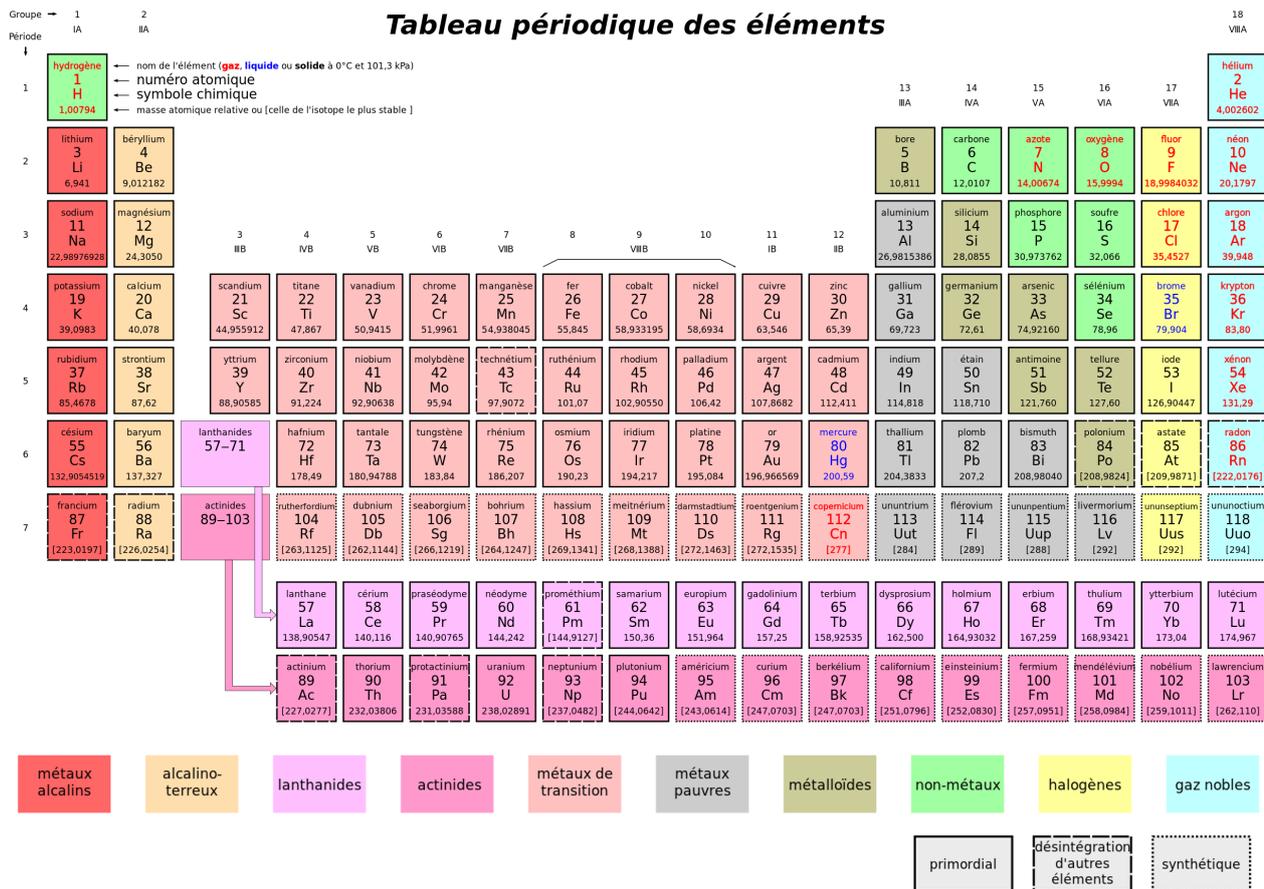


FIGURE 2.1 – Tableau périodique avec les différentes classes de métaux. Les éléments chimiques dans le tableau périodique s'organisent en sept lignes (périodes) correspondant à une couche électronique, et en 18 colonnes (groupes ou familles). Chacune de ces 18 familles représente un ensemble d'éléments qui possèdent des propriétés spécifiques. Les éléments sont classés selon leurs propriétés chimiques en dix séries (voir cadres en couleur) : les métaux alcalins sans l'hydrogène, les métaux alcalino-terreux, les métaux de transition, les métaux pauvres, les métalloïdes, les non-métaux, les halogènes, les gaz nobles, les lanthanides et les actinides.

Source : (Scaler and Michka, 2012)

Par définition, un élément métallique est un élément chimique capable de perdre des électrons pour former des cations et former des liaisons de coordination ou, dans le cas des métaux alcalins, des liaisons ioniques. Cette capacité confère à ces éléments des propriétés telles qu'une habileté à conduire la chaleur, une résistance électrique proportionnelle à la température, une certaine malléabilité, une capacité à se déformer sans rompre (ductilité), etc. Il est possible que la transformation du métal en un complexe chimique tel que ceux retrouvés au sein des organismes engendre une perte partielle ou totale de ces propriétés (Appenroth, 2010). Les métaux sont généralement classés en quatre classes différentes mais peuvent être regroupés sous différentes appellations. Un tableau périodique reprenant les différentes classes de métaux est présenté à la Figure 2.1.

**Les métaux alcalins** regroupent les éléments de la première famille (famille Ia) qui ne possèdent qu'un seul électron de valence, à savoir : le Lithium, le Sodium, le Potassium, le Rubidium, le Césium et le Francium. Ces éléments peuvent perdre facilement cet électron et former un cation avec une charge positive. Comme ils sont très réactifs, ils interagissent très vite avec de nombreux non-métaux. Le Sodium et le Potassium jouent des rôles importants dans les organismes vivants, notamment avec les pompes à sodium/potassium ou  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPases}$ .

**Les métaux alcalino-terreux** regroupent les éléments de la deuxième famille (famille IIa) qui possèdent deux électrons de valence, à savoir : le Béryllium, le Magnésium, le Calcium, le Strontium, le Baryum et le Radium. Ces éléments peuvent perdre facilement deux électrons et former un cation avec une double charge positive. Comme les éléments alcalins, ces éléments sont très réactifs et interagissent facilement avec de nombreux non-métaux. Le Magnésium et le Calcium jouent des rôles importants dans les organismes vivants tels que des rôles structurels ou de cofacteur d'enzymes. Les pompes ioniques au niveau de la membrane plasmique ou au niveau des membranes intracellulaires permettent la régulation des concentrations en ions  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces mécanismes sont très importants pour le bon déroulement de certains processus cellulaires.

**Les métaux pauvres** regroupent l'Aluminium, le Gallium, l'Indium, l'Étain, le Thallium, le Plomb et le Bismuth. Ces éléments peuvent perdre plusieurs électrons et former des cations avec des charges positives multiples. Ils se distinguent des métaux de transition par une température de fusion et d'ébullition inférieures et une électronégativité plus élevée. Ils sont cependant différents des éléments de la catégorie des métalloïdes car ils ont une température d'ébullition plus élevée que ces derniers. Toutefois, la classe des « métaux pauvres » n'est pas reconnue par l'IUPAC (source : IUPAC).

**Les métaux de transition**<sup>3</sup> regroupent les 38 éléments des familles Ib à VIIIb ou groupes 3 à 12 et sont caractérisés par leur capacité à adopter de nombreux états d'oxydation. Ces éléments peuvent perdre facilement un ou plusieurs électrons et former différents cations avec une ou plusieurs charges positives. La plupart des métaux incorporés dans les protéines sont des métaux de transition pour assurer leur rôle catalytique. Les principaux sont le fer, le zinc et le cuivre (Duffus, 2002).

---

3. Les métaux de transition sont parfois confondus avec la notion de « métaux lourds », également dénommés « traces métalliques », et qui n'est pas clairement définie. Ceux-ci, souvent associés à l'environnement et à leur toxicité potentielle, regroupent en effet certains métaux de transition comme le fer, le cuivre, le zinc, le nickel, le mercure, le chrome, le cadmium, l'argent, l'or et le titane, mais également d'autres éléments comme le plomb et l'uranium.

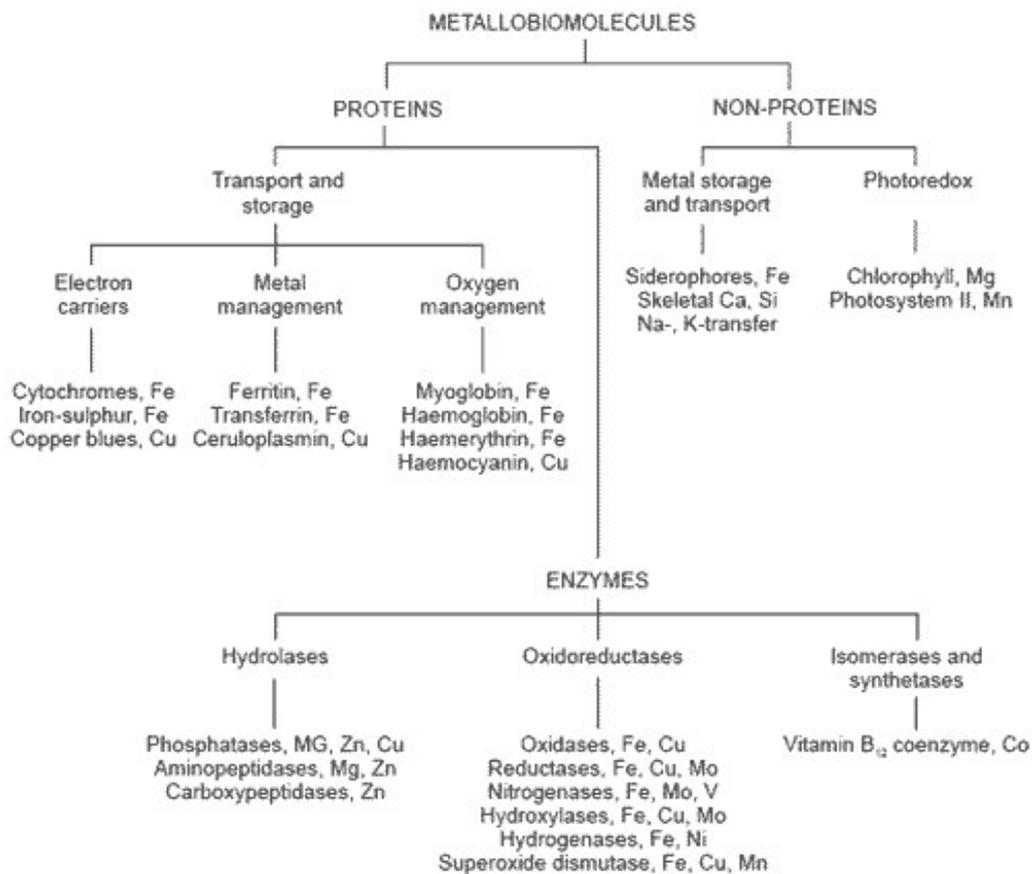


FIGURE 2.2 – Schéma représentant la classification des métallobiomolécules. Ces molécules sont divisées en deux grandes familles : les protéines et les non-protéines. Ensuite, la classification à l'intérieur de ces familles se fait en fonction des rôles de ces molécules.

Source : (Power and Horgan, 2000)

## 2.3 Les métaux de transition

Les métaux de transition représentent des éléments importants pour les fonctions biologiques car ceux-ci possèdent une caractéristique majeure contrairement aux autres types de métaux, à savoir la capacité d'adopter de nombreux états d'oxydation. Cette caractéristique permet à ces métaux d'une part de former des complexes avec de nombreux ligands en formant plusieurs types de liaison<sup>4</sup> telles que des liaisons métalliques, des liaisons ioniques et des liaisons de coordination, et d'autre part, de participer à la génération d'un stress oxydatif.

Les métaux de transition peuvent jouer un rôle à plusieurs niveaux dans l'apparition d'un stress oxydatif. Une forte concentration en un métal de transition peut directement perturber le transport d'électrons au niveau des mitochondries, engendrant un dysfonctionnement mitochondrial et une augmentation de la production de ROS. Les métaux de transition peuvent également participer activement à la production de radicaux hydroxyles par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss (Shaw et al., 2004). Une perturbation dans l'homéostasie des métaux de transition peut engendrer une inactivation ou une diminution de l'expression d'enzymes importantes dans la défense antioxydante ou au niveau de substrats antioxydants (ex. glutathion), ce qui peut, à terme, générer un stress oxydatif. Il a également été montré que les métaux de transition peuvent engendrer des dommages directs aux acides nucléiques, aux lipides, aux protéines, etc.

## 2.4 Rôles des métaux en biochimie

Les éléments métalliques, de types alcalin, alcalino-terreux ou de transition, en se liant à d'autres molécules, forment des métallomolécules (Voir la Figure 2.2). Ils jouent de nombreux rôles biochimiques, avec par exemple :

**Un rôle structural :** la présence d'ions métalliques peut s'avérer essentielle pour fixer la structure de certaines protéines. Ces ions permettent de tenir ensemble certaines parties de la protéine en interagissant et en formant des liaisons ioniques ou de coordination avec certains acides aminés. Ceci est valable pour des complexes protéiques ou des liaisons avec des acides nucléiques (ex. doigts de zinc). L'élaboration de structures comme les dents et les os est ainsi dépendante de la présence et de la concentration en calcium.

**Un rôle régulateur et de signal :** la présence/absence, les concentrations ou le flux à travers une membrane d'ions métalliques tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , peuvent constituer des signaux cellulaires et même représenter une étape importante dans le déroulement ou l'arrêt d'un processus biochimique (apoptose, réponse à un stimulus/stress, etc.). Par exemple, le RE (réticulum endoplasmique) peut mobiliser les stocks d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et déclencher l'apoptose à travers l'élévation transitoire de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire.

**Un rôle de transfert d'électrons :** un grand nombre de protéines ou de complexes protéiques contiennent un ou plusieurs éléments métalliques qui grâce à leurs propriétés physico-chimiques peuvent transférer un ou plusieurs électrons au sein par exemple d'une cascade de réactions d'oxydo-réduction. Ce type de cascade est largement utilisée dans les processus biologiques notamment lors de la respiration mitochondriale.

---

4. Les liaisons ioniques : cas des métaux alcalins ou alcalino-terreux chargés positivement. Ceux-ci forment des protéinates par liaison ionique, très facilement dissociables avec les groupements acides de la protéine chargés négativement. Les liaisons de coordination : proches des liaisons covalentes, cas de tous les oligo-éléments métalliques qui forment des complexes avec les protéines. Ces complexes peuvent être difficilement dissociables et constituer des métalloprotéines.

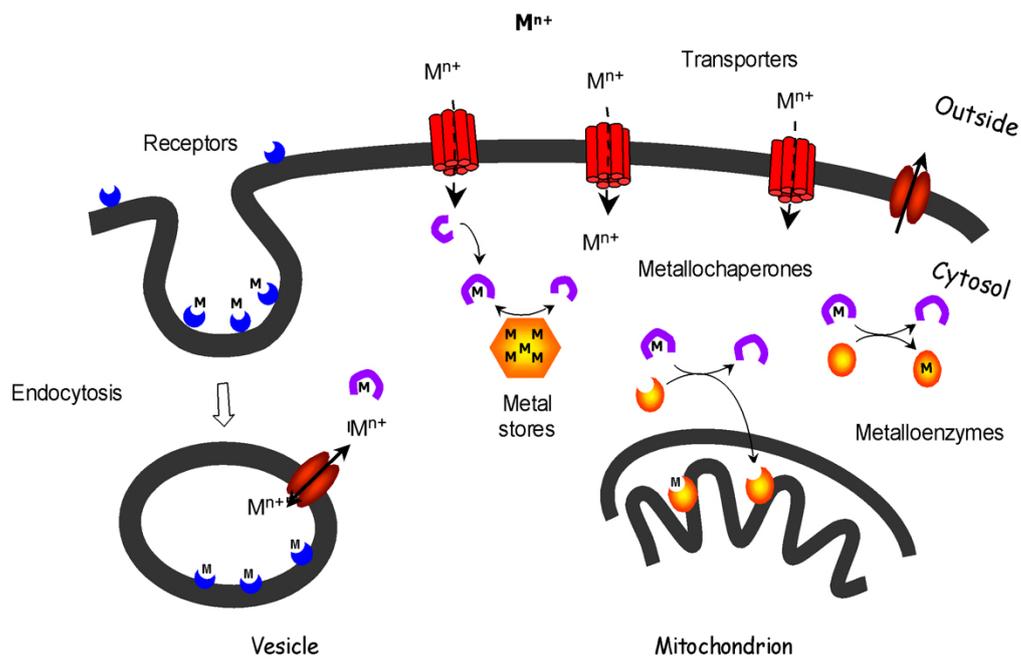


FIGURE 2.3 – Modèle général du transport intracellulaire et de la distribution d'ions métalliques tels que le cuivre, le fer et le zinc. Les ions métalliques sont définis par le symbole  $M^{n+}$ . Ces ions métalliques sont rarement libres et sont généralement liés par des protéines. Ces protéines permettent le transport, la neutralisation et le stockage. Ces ions peuvent également être stockés dans des organites tels que l'appareil de Golgi, des vacuoles ou des mitochondries.

Source : (Cammack and Hughes, 2007)

**Un rôle de cofacteur :** la présence d'ions métalliques peut s'avérer essentielle pour assurer la fonction enzymatique de certaines protéines ; leurs réactions enzymatiques requérant la présence d'un métal. Par exemple, les enzymes de type SOD (superoxyde dismutase) catalyse la dimutation du superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène en utilisant le cuivre ou le manganèse pour la réaction.

**Un rôle de transport d'oxygène :** la présence d'éléments métalliques au sein de protéines qui transportent l'oxygène est indispensable pour interagir avec l'oxygène, le fixer et permettre son transport dans l'organisme. Ces protéines peuvent contenir du fer sous forme de hème (Hémoglobine chez les mammifères) ou du cuivre (Hémocyanine chez les arthropodes et mollusques).

## 2.5 Homéostasie et toxicité des métaux

Si de faibles concentrations en ions métalliques sont indispensables pour le métabolisme cellulaire, lorsque ces concentrations dépassent un certain seuil, ils peuvent devenir toxiques. La toxicité d'un ion métallique dépend de ses propriétés physico-chimiques, de l'organisme étudié, de l'homéostasie de ce métal mais aussi des autres métaux (risque de synergie). De fortes concentrations en métaux peuvent augmenter la mortalité, inhiber la croissance, déranger la machinerie transcriptionnelle, perturber l'homéostasie de différents éléments métalliques et non métalliques, engendrer un stress oxydatif, etc.

Les organismes vivants ont donc dû développer des systèmes de contrôle régulant l'homéostasie<sup>5</sup> des métaux. La concentration interne en ions métalliques est donc finement régulée par de multiples mécanismes. La régulation peut se faire au niveau de la biodisponibilité du métal grâce à sa circulation extracellulaire avec l'aide de protéines de transport spécifiques. Elle peut se faire au niveau de l'entrée du métal dans la cellule grâce la présence de récepteurs spécifiques, à la régulation de l'endocytose et à la présence de zones d'absorption bien définies. Le trafic intracellulaire du métal en question peut également influencer son homéostasie au sein de la cellule puisque ce trafic le rend mobile au sein de la cellule et donc utilisable en différents endroits. Le stockage des éléments métalliques, qui se fait sous la forme inerte grâce à des protéines chaperonnes ou condensé à l'intérieur de compartiments spécifiques, peut être considéré comme un signal pour favoriser l'entrée si les stocks sont peu satisfaisants ou la sortie si au contraire, les stocks sont trop importants. Les mécanismes d'export des métaux sont également importants dans le maintien de l'homéostasie des métaux au sein de la cellule. Ces mécanismes dépendent de la présence de protéines d'export spécifiques.

En résumé (voir la Figure 2.3), la biodisponibilité, le trafic extracellulaire, l'entrée, le trafic intracellulaire, le stockage, l'utilisation et la sortie des éléments métalliques représentent des mécanismes complexes, très souvent conservés au sein des espèces. Ceux-ci permettent de maintenir l'homéostasie. L'état d'oxydation d'un ion métallique peut varier au cours du temps et/ou selon les besoins de la cellule/organisme, à l'intérieur ou à l'extérieur, et notamment suite à son interaction avec des protéines nommées métalloréductases (Zhang et al., 2012).

Dans ce projet, nous nous sommes particulièrement intéressés au cuivre, étudié pour sa toxicité en tant que métal lourd dans un contexte de pollution ou dans un contexte génétique avec les recherches sur les maladies de Wilson et de Menkès. Plus récemment, les études portent sur l'implication du cuivre dans les maladies neurodégénératives au niveau du cerveau ou des neurones. Cependant, très peu de recherches sur le cuivre dans un cadre mécanistique, dans d'autres types cellulaires et en lien avec le vieillissement normal, ont été réalisées.

---

5. La notion d'homéostasie, élaborée et définie en 1865 par Claude Bernard, représente la capacité que possède un système ouvert ou fermé à maintenir son équilibre de fonctionnement malgré les contraintes extérieures.



# Chapitre 3

## Le cuivre

### 3.1 En bref

Des métaux comme le fer et le cuivre jouent un rôle important dans le monde du vivant car ils sont impliqués dans de nombreuses réactions biochimiques et dans la structure ou la fonction de protéines. Le cuivre est un élément indispensable pour la survie des organismes aérobies<sup>1</sup> (Kaplan and Lutsenko, 2009). Le cuivre joue un rôle central dans certains changements de structure protéique, d'activités catalytiques et d'interaction protéine-protéine. De nombreux processus biochimiques impliquant le cuivre ont bien été conservés au cours de l'évolution (Crichton and Pierre, 2001, Puig et al., 2002).

A côté de son rôle d'élément essentiel, le cuivre peut se révéler être pro-oxydant. Dans les systèmes biologiques, les ions de cuivre existent sous deux états d'oxydation : réduit,  $\text{Cu}^{1+}$  ou  $\text{Cu(I)}$  et oxydé,  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Cu(II)}$ . Lorsque le cuivre se trouve à l'état « libre » et réduit dans la cellule, il peut catalyser la formation de ROS par la réaction de Fenton. Ces derniers peuvent endommager les constituants cellulaires tels que les protéines, l'ADN et les organites, perturbant ainsi le bon fonctionnement cellulaire. Pour faire face à la toxicité potentielle du cuivre, les organismes ont développé des mécanismes sophistiqués permettant l'absorption, le stockage et le trafic de cet élément au sein de l'organisme mais aussi au niveau de la cellule (Field et al., 2002, Arnesano et al., 2004, Puig et al., 2002).

Certaines maladies génétiques, telles que les maladies de Menkès et de Wilson ont permis de comprendre l'importance du fonctionnement des mécanismes de régulation de l'homéostasie du cuivre sur la santé humaine.

### 3.2 Le cuivre dans l'environnement et la pollution

#### 3.2.1 Dans les sols, l'eau et l'air

La présence de cuivre dans le sol est très importante. D'une part, des concentrations insuffisantes en cuivre dans le sol influencent négativement la qualité et la quantité des récoltes (ex. : le riz et le blé). Environ 19 % des terres arables, soit 18 millions d'hectares de terres cultivées sont déficientes en cuivre biodisponible en Europe. L'agriculture a développé différentes techniques pour enrichir les sols en cuivre telles que l'utilisation d'engrais enrichis en cuivre et des traitements à base de sulfate de cuivre. D'autre part, des concentrations élevées en cuivre dans le sol peuvent devenir toxiques et engendrer une pollution (source : eurocopper.org).

#### 3.2.2 La pollution au cuivre

L'utilisation industrielle du cuivre s'est fortement accrue ces dernières décennies, ce qui engendre une augmentation de la production du cuivre et donc une consommation mondiale toujours plus importante. Cette production

---

1. Le cuivre est indispensable avec comme exception, certaines bactéries Gram + qui y sont sensibles mais n'en ont pas besoin pour vivre (Culotta, 2010)



et cette utilisation intensive ont provoqué une augmentation de la présence du cuivre dans l'environnement et ont donc participé au développement de la pollution au cuivre. Les principales sources de pollution au cuivre sont : l'industrie du cuivre (minerais de cuivre et usines de raffinage), l'incinération des ordures ménagères, les boues d'épuration, et l'agriculture (épandage et traitements d'enrichissement au cuivre)(source : icsg.org).

Ces sources de pollution ont favorisé une accumulation du cuivre dans l'environnement car il ne peut être ni décomposé ni détruit. L'impact de concentrations élevées en cuivre sur les plantes et les animaux est multiple : de la simple intoxication avec par exemple un arrêt de la croissance pour la plante ou une indigestion et atteinte au foie pour les animaux, en passant par le développement de maladies liées au cuivre avec par exemple l'apparition de « la maladie bleue » pour les plantes et de maladies neurologiques pour les animaux, et jusqu'à la mort.

### 3.3 Le cuivre et ses propriétés chimiques

Le cuivre fait partie des métaux dits « lourds » car sa densité est supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$ . Sous sa forme métallique, le cuivre a une couleur rougeâtre, s'oxyde au contact de l'oxygène de l'air mais ne réagit pas avec l'eau et forme une couche vert-gris d'oxyde de cuivre. Il fait également partie des métaux de transition car il possède des orbitales électroniques incomplètes et est capable de former des ions avec différents états d'oxydation. Ces propriétés chimiques font que le cuivre ne se retrouve jamais à l'état libre dans un organisme ; il se lie faiblement ou fortement selon le composé.

#### 3.3.1 Les propriétés d'oxydoréduction du cuivre, le double jeu du cuivre

Le cuivre peut se présenter sous quatre états d'oxydation différents, Cu(I), Cu(II), Cu(III) et Cu(IV). Dans les systèmes biologiques, où il est le plus souvent en solution, on le retrouve sous deux états d'oxydation, le Cu(I) ou ions cuivreux, et le Cu(II) ou ions cuivriques. Ces deux formes peuvent se lier à des molécules organiques et former des complexes qui possèdent alors une activité d'oxydoréduction, ce qui est largement utilisé dans les réactions biologiques.

De ses deux états d'oxydation, le cuivre se trouve principalement sous la forme Cu(II) puisqu'en présence d'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons, Cu(I) est facilement oxydé en Cu(II). Cette oxydation est réversible car Cu(II) peut accepter un électron de réducteurs forts tels que l'acide ascorbique, vitamine C ou le glutathion réduit (Galhardi et al., 2004, Arredondo and Núñez, 2005).

Les propriétés d'oxydoréduction du cuivre sous sa forme Cu(I) sont largement utilisées dans les réactions biologiques et rendent le cuivre totalement indispensable pour les organismes vivants. Cependant, Cu(I) peut participer à la production de ROS. Le cuivre peut donc jouer un double-jeu au sein de la cellule.

Des ROS peuvent être générés à travers la chaîne de réaction de Haber-Weiss au sein de la cellule (Figure 3.1). Cette réaction en chaîne génère des radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ) à partir de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et de superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ). Cette double-réaction est lente mais peut être catalysée par des métaux de transition tels que le cuivre. Elle engendre un cycle de production de radicaux hydroxyles pouvant endommager les constituants cellulaires et provoquer l'induction et la propagation de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires (Strain et al., 1994, Evans et al., 2001).



### 3.3.2 Les propriétés de liaison du cuivre

#### La chimie de coordination du cuivre

Les ions Cu(I) et Cu(II) sont peu chargés et sont entourés d'un important nuage électronique qui les rend volumineux. La structure incomplète et le caractère polarisable des orbitales du cuivre permettent à celui-ci de former aisément des liaisons de coordination avec toutes sortes de ligands. Dans les systèmes biologiques, le cuivre se lie principalement aux atomes d'oxygène, de soufre et d'azote, ce qui engendre un nombre de ligands impressionnant. Ces liaisons sont dépendantes de l'état d'oxydation du cuivre. En effet, la forme réduite, Cu(I) se liera à des molécules donneuses de soufre comme les cystéines et les méthionines alors que la forme oxydée, Cu(II) se liera à des molécules donneuses d'oxygène comme les glutamates et les aspartates ou à des molécules donneuses d'azote comme les histidines (Kim et al., 2008).

**Liaison avec un atome de soufre, Cu(I)** La liaison entre l'atome de cuivre et le soufre se fait généralement avec un groupement thiol ou thioéther. Le thiol est un composé organique comportant un groupement sulfhydryle (-SH) et le thioéther est un composé organique dans lequel deux groupes alkyles sont reliés par un atome de soufre (R-S-R). Les ions de cuivre peuvent se lier aux acides aminés méthionines et cystéines car ceux-ci renferment ces groupements, thiol pour les cystéines et thioéther pour les méthionines. Ces deux acides aminés se retrouvent dans de nombreuses protéines capables d'interagir avec le cuivre ou avec d'autres métaux. Les protéines qui contiennent des groupement thiols sont nommées thioprotéines et jouent un rôle dans les défenses antioxydantes. Dans les systèmes biologiques, la cystéine est un ligand important qui joue un rôle dans la fonction des protéines de cuivre. 35 % des ligands du cuivre ont des résidus cystéine. Par exemple, les métallothionéines sont des petites protéines riches en résidus cystéines capables de lier plusieurs ions de cuivre et qui sont indispensables pour stocker et neutraliser le cuivre (Rubino et al., 2011, Arnesano et al., 2005, Fujiwara et al., 2007).

**Liaison avec un atome d'oxygène, Cu(II)** La liaison de coordination entre le cuivre et l'oxygène se fait au niveau du doublet électronique libre. De tels doublets se retrouvent dans des groupements tels qu'un groupement carbonyle de type aldéhyde (RCHO) ou cétone (RCOR). L'oxygène du carbonyle porte 2 doublets libres et possèdent donc un caractère légèrement basique. Les groupements carbonyles se lient à des éléments métalliques pour former, par exemple, des catalyseurs. Les groupements carboxyles (RCOOH) peuvent également interagir avec le cuivre.

**Liaison avec un atome d'azote, Cu(II)** La liaison entre l'atome de cuivre et l'azote peut se faire avec n'importe quel atome d'azote. Il peut se situer dans une chaîne peptidique ou dans une chaîne latérale. Cependant, il ne doit pas déjà être impliqué dans un groupe tel que l'ammonium. Les atomes d'azote situés en bout de chaîne sont très souvent sous la forme de groupes amino-NH<sub>2</sub>. Et les acides aminés NH<sub>2</sub>-CHR-COOH se présentent alors sous la forme de  $^+NH_3 - CHR - COO^-$  et ne peuvent donc pas se lier à un ion cuivre.

Les ions de cuivre se lient généralement à un atome d'azote d'un composé organique aromatique nommé imidazole. Ces composés possèdent un cycle avec trois atomes de carbone et deux atomes d'azote en position 1 et 3. Le cuivre peut facilement former une liaison de coordination avec l'atome d'azote en position 1. Les dérivés de l'imidazole tels que la biotine, l'histidine, l'histamine, etc. peuvent donc théoriquement se lier au cuivre. L'histidine est un acide aminé qui est très souvent présent dans les sites de liaison au cuivre d'enzymes utilisant le cuivre pour leur fonction. Par exemple, la tyrosinase, une glycoenzyme qui joue un rôle clé dans la synthèse de mélanine, possèdent des sites liaisons contenant des histidines capables de lier des ions de cuivre (Rubino et al., 2011).

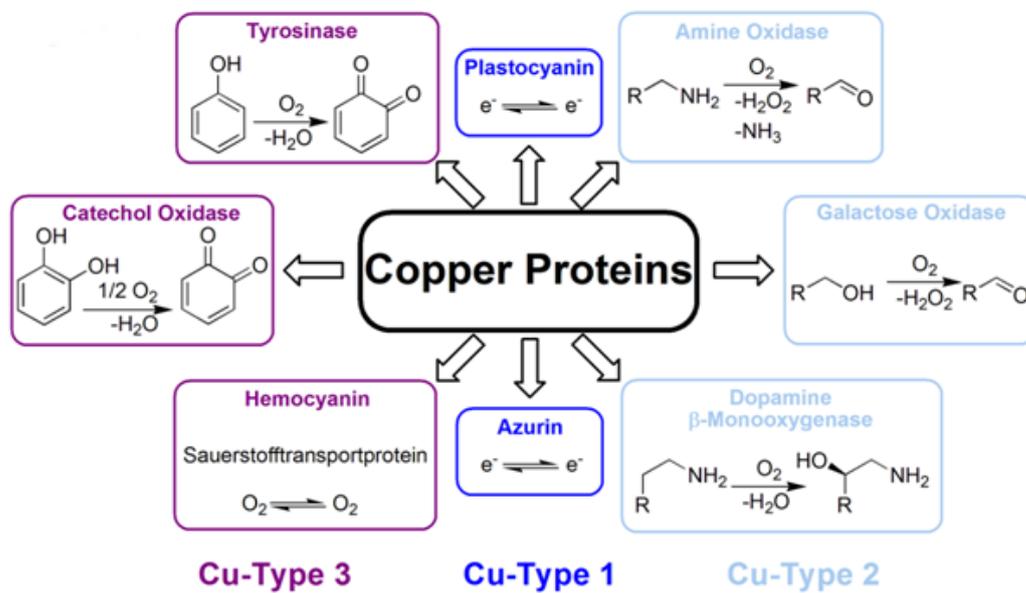


FIGURE 3.2 – Schéma représentant des exemples de protéines classées en fonction de leur(s) centre(s). Ce classement, fait sur base de propriétés structurales, reflète également une différenciation de la fonction. Alors que les centres de type 1 ne sont impliqués que dans les processus de transfert d'électrons, les protéines de types 2 et 3 sont souvent responsables de l'activation ou du transport de l'O<sub>2</sub>.

Source : (Rolf et al., 2011)

### Les fonctions de ces liaisons

Les propriétés de liaison permettent au cuivre de se lier aux protéines et d'induire des changements de structure, de jouer un rôle catalytique et de permettre des interactions entre protéines. Ces propriétés permettent au cuivre de contrôler de nombreuses réactions biochimiques et régulateurs (Thiele and Gitlin, 2008). Le fait que le cuivre se lie à des molécules peut conférer à celles-ci des propriétés d'oxydoréduction et les rendre alors très réactives. Des protéines ou des peptides capables de se lier au cuivre et de neutraliser ces propriétés de liaisons (chélateurs) permettent de réguler ces interactions. Les affinités entre le cuivre et ses chélateurs peuvent changer suivant différents paramètres tels que le pH, la température, la concentration en cuivre ou en d'autres métaux, etc.

### Les cuproprotéines et autres ligands capables de lier le cuivre

Il existe une gamme assez large de types de molécules capables d'interagir avec le cuivre. Des ligands tels que les cuproprotéines, c'est-à-dire des protéines capables de lier un ou plusieurs atomes de cuivre, lient le cuivre comme cofacteur pour utiliser le potentiel d'oxydo-réduction du couple Cu(I)/Cu(II) afin d'assurer leurs fonctions. Ces liaisons sont assurées généralement par des liaisons de coordination entre le cuivre et des acides aminés. Les métaux dans les protéines se présentent sous la forme de groupes prosthétiques. Ces structures sont des molécules non protéiques avec un centre composé d'un ou plusieurs métaux et sont maintenues au sein des protéines par des liaisons covalentes, ioniques ou hydrogènes.

Au sein des cuproprotéines, il existe trois grands types de centres métalliques composés de cuivre. Ceux-ci se différencient en fonction de leurs propriétés spectroscopiques. Une protéine peut posséder un ou plusieurs centres de types différents. (Figure 3.2)

- Les centres de cuivre de type 1 sont caractérisés par la présence d'un unique atome de cuivre. Celui-ci est « fixé » par des liaisons de coordination entre le cuivre, deux résidus histidine et un résidu cystéine sans séquence consensus pour définir le site de liaison. Ces liaisons créent une structure trigonale plane. Le cuivre peut en plus de ces résidus se lier à un ou plusieurs ligands (méthionine ou glutamine) et former alors une structure tétraédrique. Ces protéines possèdent une bande d'absorbance à 600 nm ou à 460 nm, donnant respectivement à la protéine une couleur bleue ou verte. Ces colorations sont dues au transfert de charge entre le soufre de la cystéine et le cuivre (Solomon et al., 1976). Le rôle des centres de cuivre de type 1 est le transfert d'un électrons vers un autre élément. Deux sortes de protéines en possèdent : les cuprédoxines, dont le rôle est le transfert d'électrons à d'autres protéines et qui interviennent par exemple dans la photosynthèse, et des protéines ou complexes protéiques possédant plusieurs centres (oxydases « multicuivre »), dont les enzymes oxydoréductases (ex. : céruloplasmine).
- Les centres de cuivre de type 2 sont caractérisés par la présence de cuivre « fixé » par des liaisons de coordination entre le cuivre et trois acides aminés ou plus. Ces acides aminés sont en majorité des histidines et plus rarement des méthionines, des glutamates, des glutamines ou des tyrosines, et aucune séquence consensus caractérisant le site de fixation du cuivre n'a été mise en évidence. Aucune géométrie particulière ne semble caractériser les centres de cuivre de type 2 dans ces conditions de fixation. Les protéines qui possèdent des centres de cuivre de type 2 ont une bande d'absorption moins large comprise entre 600 et 700 nm. Le fait que le cuivre n'interagit pas avec un atome de soufre provenant d'un résidu cystéine engendre l'absence de coloration de ces protéines. Comme le cuivre présent dans les centres de cuivre de type 2 peut interagir avec un substrat, ce type de centre est présent dans des enzymes dont le rôle est d'oxyder un substrat, nommées oxydases (Klinman, 1996).

Proteins	Functions
Amyloid precursor protein (APP)	Protein involved in neuronal development and potentially Cu metabolism ; cleavage leads to generation of Abeta peptide that aggregates in senile plaque associated with Alzheimer's disease
Atox1	Metallochaperone that delivers Cu to ATP7A and ATP7B Cu <sup>1+</sup> transporters
ATP7A	Cu <sup>1+</sup> -transporting P-type ATPase expressed in all tissues except liver
ATP7B	Cu <sup>1+</sup> -transporting P-type ATPase expressed primarily in the liver
Carbon monoxide dehydrogenase to acetyl-CoA synthase	Moorella thermoacetica bifunctional enzyme ; reduces CO <sub>2</sub> to CO with subsequent assembly of acetyl-CoA
Ceruloplasmin	Sérum ferroxidase that functions in Fe <sup>3+</sup> loading onto transferrin Coagulation factors V and VIII Homologous pro-coagulants present on the surface of platelets, where they nucleate the assembly of multiprotein proteolytic complexes involved in blood coagulation
CCS	Metallochaperone that delivers Cu to Cu/Zn SOD
CopZ	Archaeoglobus fulgidus [2Fe-2S] and Zn <sup>2+</sup> -containing Cu chaperone
Cox17	Metallochaperone that transfers Cu to Sco1 and Cox11 for cytochrome oxidase Cu loading in mitochondria
Ctr1	High-affinity Cu <sup>1+</sup> transporter involved in cellular Cu uptake
Cu/Zn SOD (SOD1)	Antioxidant enzyme, catalyzes the disproportionation of superoxide to hydrogen peroxide and dioxygen
Cytochrome c oxidase	Terminal enzyme in the mitochondrial respiratory chain, catalyzes the reduction of dioxygen to water
Dopamine beta-hydroxylase (DBH)	Oxygenase, converts dopamine to norepinephrine
Ethylene receptor (ETR1)	Member of a plant receptor family that uses a Cu cofactor for ethylene binding and signaling
Hemocyanin	Oxygen transport protein found in the hemolymph of many invertebrates such as arthropods and molluscs
Hephaestin	Transmembrane multi-Cu ferroxidase ; involved in iron efflux from enterocytes and macrophages
Glucose oxidase	Pentose phosphate pathway oxidoreductase that catalyzes the oxidation of d-glucose into d-glucono-1,5-lactone and hydrogen peroxide
Laccase	Phenol oxidase involved in melanin production
Lysyl oxidase	Catalyzes formation of aldehydes from lysine in collagen and elastin precursors for connective tissue maturation
Metallothionein	Cysteine-rich small-molecular-weight metal-binding and detoxification protein
Peptidylglycine-alpha-amidating mono-oxygenase (PAM)	Catalyzes conversion of peptidylglycine substrates into alpha-amidated products ; neuropeptide maturation
Prion protein (PrP)	Protein whose function is unclear but binds Cu via the N-terminal octapeptide repeats
Steap proteins/Fre1/Fre2	Family of metalloreductases involved in Fe <sup>3+</sup> and Cu <sup>2+</sup> reduction
Tyrosinase	Monophenol mono-oxygenase ; melanin synthesis
XIAP	Inhibitor of apoptosis through binding and catalytic inhibition of several caspases

TABLEAU 3.1 – Les protéines liant le cuivre ou impliquées dans l'homéostasie du cuivre

Source : (Kim et al., 2008)

- Les centres de cuivre de type 3 sont caractérisés par la présence de deux atomes de cuivre liés entre eux par une molécule d'oxygène. Chaque atome de cuivre est maintenu dans la structure protéique par des liaisons de coordination avec trois histidines. La géométrie de ce site est plane permettant ainsi au substrat de se présenter de façon perpendiculaire au site. Les protéines qui possèdent des centres de cuivre de type 3 possèdent deux bandes d'absorption, l'une comprise entre 600 et 700 nm et l'autre, très caractéristique, à 345 nm (Decker et al., 2007). Les protéines qui possèdent des centres de cuivre de type 3 sont des enzymes de type oxydase et des protéine de transport de l'oxygène (Lewis and Tolman, 2004).

D'autres structures ont également été mises en évidence et sont nommées centres de cuivre A ( $\text{Cu}_A$ ) et B ( $\text{Cu}_B$ ). Ceux-ci se retrouvent par exemple dans la cytochrome c oxydase, une protéine de type « multicopper oxidase ». Pour  $\text{Cu}_A$ , deux atomes de cuivre sont « fixés » par des liaisons de coordination avec deux histidines, une méthionine, un oxygène, et « ponté » avec deux cystéines. Pour  $\text{Cu}_B$ , un atome de cuivre est « fixé » par des liaisons de coordination par trois histidines. Il existe également des centres de cuivre de type Z comprenant quatre atomes de cuivre « fixés » par des liaisons de coordination avec sept résidus histidine et pontés par un atome de soufre. Des centres dits « trinuéclaire » avec une combinaison d'un centre de type 2 et d'un de type 3.

Les cuproprotéines, détaillées dans le Tableau 3.1, peuvent être classées en fonction du type de centre de cuivre (décrit ci-dessus), de leurs rôles biologiques, du type et du nombre de centres prosthétiques ou par similarité de séquence. A côté des acides aminés, des peptides et des protéines, de nombreux ligands non-protéiques, comme avec des acides gras, des acides nucléiques et des sucres, peuvent également interagir avec le cuivre et former des complexes.

### 3.4 Les rôles du cuivre dans les systèmes biologiques

Le fait que le cuivre est un élément essentiel a été découvert en 1928, lorsqu'il a été démontré que des rats qui suivent un régime pauvre en cuivre étaient incapables de produire suffisamment de globules rouges, ceci étant corrigé par un ajout de cuivre (Hart et al., 2002).

En tant que composant de nombreuses métalloenzymes, le cuivre est impliqué dans des réactions d'oxydo-réduction clés présentes dans des processus métaboliques essentiels tels que la respiration mitochondriale, la synthèse de la mélanine et la réticulation du collagène (Crichton and Pierre, 2001). Ces métalloenzymes sont aussi impliquées dans la protection contre les stress oxydatifs, la transmission nerveuse, la coagulation du sang, le transport de l'oxygène, etc. La présence du cuivre est également indispensable pour la croissance et le développement de l'organisme, la formation des globules rouges, l'absorption et l'utilisation de fer, le métabolisme du cholestérol et du glucose, les défenses immunitaires et l'olfaction (Stern et al., 2007).

#### 3.4.1 Description des rôles joués par le cuivre au niveau moléculaire

##### Rôle structural

Environ 30 % des protéines réalisent des liaisons de coordination avec un métal de transition. Ces métaux, dont fait partie le cuivre, jouent un rôle structural et permettent à la protéine de se replier ou de changer de conformation. L'incorporation de cuivre au sein des protéines semble se réaliser dans le réseau trans-Golgi. Cependant, de nombreuses questions demeurent sans réponse quant aux mécanismes d'incorporation des métaux dans les protéines et à la présence de ceux-ci à différentes étapes du repliement des protéines.



Il a été montré *in vitro* que la plupart des métalloprotéines conservaient leur capacité d'interaction avec un métal spécifique même après le non repliement de polypeptides (Wittung-Stafshede, 2002, Wittung-Stafshede, 2004). Les scientifiques spéculent sur le fait que les métaux peuvent interagir avec leurs protéines correspondantes avant ou pendant le repliement de la protéine et que l'interaction avec un métal peut avoir un impact (sur la vitesse de repliement par exemple) voire guider le repliement tout entier de la protéine en question. La concentration et la disponibilité des métaux peuvent donc représenter de nouveaux paramètres capables d'influencer le repliement des protéines.

Le cuivre, grâce à ses propriétés de liaison, peut jouer un rôle important dans la structure en favorisant des liaisons de coordination avec des acides aminés présents dans les protéines ou avec un éventail diversifié d'autres ligands chimiques, y compris le soufre, l'oxygène et l'azote. Ces liaisons peuvent engendrer des changements dans la structure de protéines déjà repliées et altérer l'activité catalytique de l'enzyme ainsi que les interactions protéine-protéine. Ces propriétés de liaison peuvent donc intervenir dans le contrôle d'une série de réactions biochimiques (Kim et al., 2008) ou donner un avantage structural à la protéine. En effet, il a été mis en évidence que la protéine Atox1 (antioxydant protein 1) qui lie un ion Cu(I) est plus stable chimiquement et thermiquement que la protéine seule. Ceci suggère que la liaison avec le cuivre engendre un réarrangement de la structure de la protéine qui améliore sa stabilité (Hussain and Wittung-Stafshede, 2007).

### Rôle d'interaction

Il a été montré que certaines protéines présentent des domaines de liaison avec des sites multiples capables de lier des métaux, formant des structures en forme de chaînes. Ces structures pourraient jouer un rôle d'appât pour d'autres protéines qui transporteraient un métal spécifique. Une protéine de transport de cuivre en se rapprochant des sites de liaison des métaux, engendrerait une interaction, voire une liaison transitoire entre les chaînes de site de liaison des métaux et le métal qu'elle transporte. La ATP7A (ATPase 7A) et la ATP7B (ATPase 7B) présentent de telles structures et possèdent six domaines de liaison au cuivre. Un ion de cuivre transporté par l'Atox1 peut interagir avec un des sites de liaisons de ces ATPases et former un complexe Atox1-cuivre (I)-ATPase transitoire ou assez stable selon le domaine de liaison (Palm-Espling et al., 2012). Cette interaction peut aboutir au passage de l'ion de cuivre d'Atox1 sur l'ATPase.

### Rôle de cofacteur

Pour plusieurs enzymes catalysant de nombreuses réactions biochimiques, le cuivre est un cofacteur essentiel car il est capable d'accepter ou de donner des électrons. Grâce à la chimie de Fenton, cette capacité permet également de catalyser la formation de ROS lorsqu'il se trouve à l'état libre au sein de la cellule (Leary and Winge, 2007). Les enzymes qui utilisent le cuivre comme cofacteur sont impliquées dans la chaîne respiratoire, la synthèse de neurotransmetteurs et dans la formation du tissu conjonctif. Le cuivre est indispensable pour assurer la fonction de plus de trente protéines dont la superoxyde dismutase, la céruloplasmine, la lysyl oxydase, la cytochrome c oxydase, la tyrosinase et la dopamine- $\beta$ -hydroxylase.

## 3.4.2 Description de rôles joués par le cuivre dans différents mécanismes biologiques

### Rôle dans la chaîne respiratoire – les « multicopper oxidases »

La chaîne respiratoire, localisée dans la membrane interne des mitochondries, est constituée d'un ensemble de complexes protéiques, à savoir, la NADH-ubiquinone oxydoréductase (complexe I), la succinate-ubiquinone



oxydoréductase (complexe II), la ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase (complexe III), la cytochrome c oxydase (complexe IV) et l'ATP synthase (complexe V). L'ubiquinone (ou coenzyme Q) permet la transition d'électrons entre les complexes I ou II et le complexe III mais peut aussi accepter des électrons provenant du cytoplasme. Le cytochrome c permet la transition entre les complexes III et IV. L'ubiquinone et le cytochrome c représentent des transporteurs mobiles d'électrons. Au niveau moléculaire, la majorité de l'énergie produite par la cellule se retrouve contenue dans le NADH et le FADH<sub>2</sub>, et sera convertie en ATP grâce à une cascade de réactions d'oxydo-réduction entre les différents complexes.

Le cuivre joue un rôle très important dans la respiration cellulaire et notamment dans l'activité de la cytochrome c oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui fait partie des complexes protéiques de type « multi-copper oxidase ». La cytochrome c oxydase est un complexe protéique composé de treize sous-unités. Certaines de ces sous-unités protéiques sont codées à partir de l'ADN nucléaire et d'autres à partir de l'ADNmt (ADN mitochondrial). Une partie de ces protéines contiennent des ions métalliques de fer ou de cuivre qui peuvent former un cycle entre leurs formes oxydée (Fe(III), Cu(II)) et réduite (Fe(II), Cu(I)). La cytochrome c oxydase contient des hèmes et des noyaux de cuivre (Cu<sub>A</sub> et Cu<sub>B</sub>). Il a été montré que le cuivre était indispensable pour l'assemblage, la structure et l'activité de la cytochrome c oxydase. La cytochrome c oxydase contient trois atomes de cuivre par molécule. Deux atomes de cuivre sur une des sous-unité de l'enzyme, permet le transfert d'électrons, l'atome restant, présent sur une autre sous-unité permet la réduction de l'oxygène moléculaire. Le rôle de la cytochrome c oxydase est de transférer des électrons de telle sorte que l'O<sub>2</sub> soit réduit pour former des molécules d'eau et générer de l'énergie pour permettre la production d'ATP. Une carence sévère en cuivre peut donc altérer cette activité enzymatique (Solomon et al., 1996).

### Rôle dans la protection contre le stress oxydatif

Le cuivre joue un rôle dans la protection contre le stress oxydatif car il est indispensable pour la structure et l'activité enzymatique de la SOD1 (Cu/Zn SOD), qui catalyse la dismutation des radicaux superoxydes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Prohaska, 1990, Underwood and Suttle, 1999) et joue ainsi un rôle d'antioxydant. Dans des conditions physiologiques, la dismutation des radicaux superoxydes se fait spontanément en molécule d'O<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cependant, la vitesse de cette réaction est faible et le temps de vie du radical superoxyde est suffisamment long pour oxyder et générer d'autres ROS encore plus toxiques telles que du peroxydant ou des radicaux hydroxyles. Au sein de la SOD1, le cuivre et le zinc sont liés ensemble grâce à un groupe imidazole, et liés à la protéine par des résidus histidine et aspartate. Le cuivre, sous forme Cu(II), est présent sur le site actif de l'enzyme, c'est-à-dire à l'endroit où le superoxyde interagit avec l'enzyme. Différents liens entre l'homéostasie du cuivre et l'activité de cette enzyme ont été établis<sup>2</sup>.

De plus, d'autres défenses antioxydantes semblent être influencées par l'homéostasie du cuivre. Il a été montré que les rats déficients en cuivre développent une activité altérée de la glutathion peroxydase et de la catalase. La synthèse et/ou l'activité de ces enzymes seraient dépendantes du cuivre (Strain et al., 1994).

### Rôle dans le métabolisme du fer

La céruloplasmine est synthétisée principalement dans le foie et de façon plus succincte dans les cellules des glandes mammaires. 90 % du cuivre circulant dans le plasma se retrouvent liés à la céruloplasmine qui peut contenir jusqu'à huit atomes de cuivre.

Un des rôles joués par la céruloplasmine est d'assurer le transport du cuivre vers les organes et certaines études

<sup>2</sup>. Il a été montré qu'une carence en cuivre pouvait engendrer une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase dans le cytosol. Ce qui n'est pas le cas lorsqu'une carence en zinc est provoquée.



ont également montré qu'elle permettrait le passage du cuivre de la mère à l'enfant lors de la grossesse et de l'allaitement (Richards, 1999). La céruloplasmine ne joue pas uniquement un rôle de transport du cuivre mais intervient aussi dans l'érythropoïèse en permettant de catalyser l'oxydation du Fe(II), présent dans les hépatocytes, en Fe(III). Fe(III) est l'état d'oxydation du fer qui permet son intégration dans la transferrine (Miyajima et al., 2003). La céruloplasmine semble donc favoriser l'incorporation du fer dans la ferritine, cette dernière permettant de constituer des réserves de fer pour l'organisme (Underwood and Suttle, 1999). Dans le milieu médical, il est connu qu'une anémie peut avoir comme origine un manque de cuivre dans l'alimentation ou une absorption intestinale du cuivre insuffisante.

### Rôle dans le développement du fœtus

Différentes études qui portent sur la gestation des animaux ont montré l'importance du cuivre pour le développement embryonnaire. Chez l'homme, il a été découvert que le fœtus accumule du cuivre jusqu'à environ 15 mg principalement pendant le dernier trimestre. Ce cuivre, stocké dans le cerveau et le foie, semble constituer une réserve à utiliser pendant la petite enfance si l'apport en cuivre est insuffisant (Richards, 1999, Gambling et al., 2011). Des carences en cuivre au niveau du fœtus peuvent avoir des conséquences dramatiques allant du retard de croissance, à la malformation ou à la mort *in utero*. De récentes études ont mis en évidence que des faibles taux en zinc et de cuivre étaient associés avec un risque accru d'avortements spontanés.

L'importance du cuivre dans le développement et le maintien du fœtus peut s'expliquer par l'influence directe ou indirecte du cuivre sur plusieurs mécanismes essentiels décrit précédemment (activités enzymatiques, respiration cellulaire etc.).

### Rôle dans l'immunité et la pathogénicité

Le fait qu'un ion cuivre soit capable de catalyser la formation de ROS est souvent considéré comme néfaste. De récentes études ont mis en évidence qu'en exploitant le potentiel toxique des ions de cuivre, les organismes pouvaient se débarrasser des agents pathogènes. Lors d'une réponse immunitaire immédiate, les macrophages activés et les neutrophiles détruisent les agents infectieux par le processus du « burst » oxydatif et la production de ROS dans les phagosomes. L'activation du complexe NADPH oxydase mène à la production d'anions superoxydes qui contribuent à l'accumulation de ROS toxiques dans le phagosome. Jusque maintenant, la production de ROS était décrite comme dépendante de l'ion métallique Fe(II). De nouvelles preuves indiscutables indiquent que les ions Cu(I) peuvent également jouer un rôle important dans cette réaction. Les ions de cuivre peuvent donc être impliqués dans la réponse immunitaire innée.

Certaines études ont montré que des pompes d'efflux du cuivre sont importantes pour la résistance bactérienne face au cuivre et représentent des facteurs de virulence. En effet, ces pompes font partie intégrante de la résistance des bactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis* (Richards, 1999, Wolschendorf et al., 2011, Leary and Winge, 2007).

### Rôle dans l'odorat et le goût

L'odorat permet de détecter des substances chimiques en suspension dans l'air. L'inhalation de certaines poussières métalliques peut provoquer une perte de l'acuité olfactive, une atrophie de la muqueuse nasale, des ulcères des muqueuses, une perforation de la cloison nasale ou un cancer naso-sinusienne. Il est possible que les métaux inhalés, dont le cuivre, se retrouvent dans le bulbe olfactif, s'y accumulent et interfèrent alors directement avec les récepteurs olfactifs (Winberg et al., 1992).

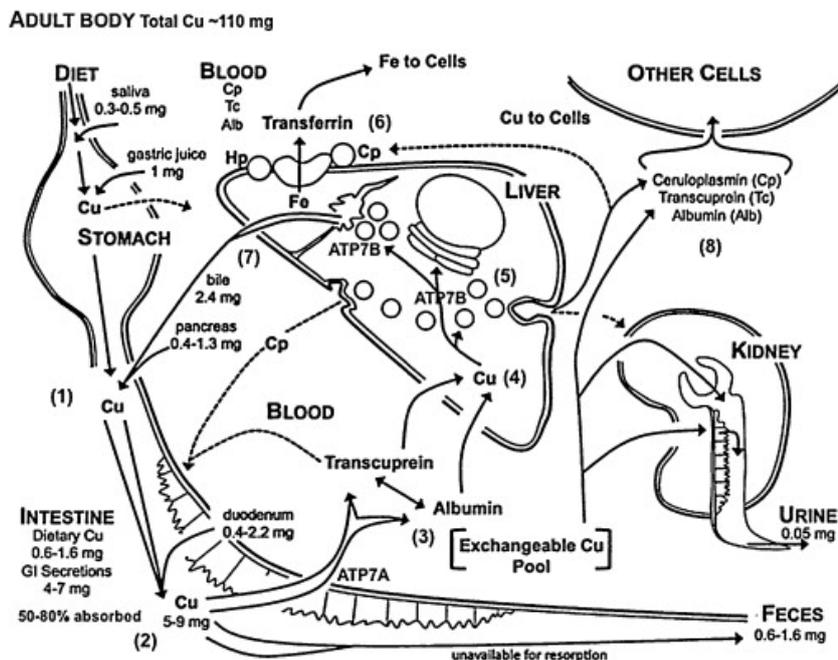


FIGURE 3.3 – Schéma général du métabolisme du cuivre. (1) Environ 1 mg de cuivre entre dans le tube digestif quotidiennement. Viennent s'ajouter le cuivre sécrété dans la salive et le suc gastrique, la bile et les sécrétions duodénales. (2) Environ 5-9 mg de cuivre se retrouve dans la lumière intestinale tous les jours. Seulement 1 mg est absorbé par les transporteurs présent au pôle apical des entérocytes. La sortie du cuivre à partir de ces cellules vers le sang est réalisée à l'aide des ATP7A et de l'exocytose. (3) Les ions de cuivre libérés dans le sang vont immédiatement lier l'albumine et la transcupréine, et constituer le « pool » échangeable. Ces protéines amènent le cuivre dans le foie et dans les reins à travers des transporteurs en membrane. (4) Une fois dans les hépatocytes, les ions de cuivre sont transportés par des protéines. (5) Les ions de cuivre se retrouvent dans des vésicules grâce à l'ATP7B jusqu'à la céruloplasmine (Cp), qui sera ensuite sécrétée dans le plasma sanguin. (6) La Cp joue un rôle dans le métabolisme du fer. (7) Le reste de cuivre sera excrété dans la bile sous une forme non-réabsorbable, puis la bile sera déversée dans le système digestif. (8) L'albumine, la transcupréine et la Cp fournissent le cuivre aux différents organes.

Source : (Linder, 2012)

Aliment/Groupe d'aliments	Cuivre (mg/100g)	Aliment/Groupe d'aliments	Cuivre (mg/100g)
<b>Fruits de mer</b>		<b>Viande et volaille</b>	
Huître	4,40	Foie	4,48
Crabe	0,64	Poulet	0,06
Crevette	0,30	Bœuf	0,15
Homard	1,94	Porc	0,09
<b>Œufs et produits laitiers</b>		<b>Légumes (cuits)</b>	
Œufs	0,02	Noix	1,10-2,22
Lait	0,009	<b>Fruits</b>	
Fromage	0,03	Frais	0,04-1,11
<b>Féculents et céréales</b>		Séchés	0,19-0,34
Riz et pâtes (cuits)	0,02 - 0,10	<b>Crudités</b>	
Pain blanc/gris	0,13/0,29	<b>Pomme de terre</b>	
		Autre, noix de coco	
		1,79	

TABLEAU 3.2 – Le cuivre dans les aliments

Source : (Gropper et al., 2008)

Un premier lien entre l'odorat et le cuivre avait été émis lorsqu'une perte de la réactivité olfactive avait été observée chez des truites ou saumons exposés à de fortes concentrations en cuivre provenant d'une pollution environnementale ou de traitements de pisciculture (Sandahl et al., 2007, Baldwin et al., 2011).

Chez la souris, un récepteur olfactif dans les neurones sensoriels de l'odorat, le MOR3244-3, a besoin d'ions de cuivre pour détecter le (methylthio)methanethiol (MeSCH(2)SH ou MTMT). Ce composé est un composé soufré extrêmement odorant, présent dans l'urine des souris mâles et qui attire les souris femelles. La présence d'ions de cuivre est requise pour l'activation de ces récepteurs olfactifs face au MTMT. L'ajout d'un chélateur du cuivre, le tétraéthylène-pentamine ou TEPA, abolit la réponse de MOR244-3 au MTMT et modifie le comportement de la souris femelle en la rendant insensible à cette odeur (Duan et al., 2012).

Le goût permet de détecter des substances chimiques en solution. Depuis l'Antiquité, les sels de cuivre sont utilisés comme exhausteur de goût dans les préparations culinaires. Il peut réagir avec par exemple de nombreux composés soufrés, présents dans les vins et dans les aliments, en modifier la structure et en changer le goût. Il a été montré que le développement normal des cellules gustatives était notamment dépendant des taux de cuivre. Des carences en cuivre ou la prise de chélateurs de cuivre (par exemple, le médicament contre les rhumatismes D-Penicillamine) peuvent être responsables d'hypoguesies<sup>3</sup> ou d'agueusie<sup>4</sup>.

## 3.5 Le métabolisme du cuivre

### 3.5.1 Le métabolisme du cuivre au niveau de l'organisme

#### Le métabolisme général

Un corps humain en bonne santé contient normalement du cuivre à une concentration d'environ 1,4 à 2,1 mg par kg, réparti inégalement dans les tissus. Les organes les plus riches en cuivre sont le foie, le cerveau et le rein. Les apports journaliers recommandés sont de 1,5 mg à 2 mg pour les adultes et de 1 mg pour les enfants. Environ 30 à 50 % du cuivre ingéré sera réellement absorbé. L'approvisionnement en cuivre doit être constant et suffisant, tout en évitant des niveaux excessifs pour ne pas engendrer de toxicité. Pour cela, le cuivre ingéré est donc absorbé, transporté, distribué, stocké, et excrété selon des processus complexes et finement régulés.

Le maintien de l'homéostasie du cuivre est généralement assuré presque exclusivement par l'absorption gastro-intestinale et l'excrétion biliaire. Le cuivre ingéré est tout d'abord absorbé au niveau de l'estomac et de l'intestin puis passe dans le foie via la veine porte. Une partie du cuivre reste stocké dans le foie tandis qu'une autre partie passe dans la circulation périphérique pour être distribuée à d'autres organes (cerveau, rein etc.). Le reste est excrété dans la bile puis rejeté dans les fèces (Figure 3.3).

#### L'ingestion

Incapable de synthétiser du cuivre, l'homme doit trouver suffisamment d'apports en cuivre dans son alimentation. Dans celle-ci, le cuivre est lié à des protéines ou complexé à des composés soufrés, principalement l'histidine. Certaines liaisons et certains complexes diminuent fortement la biodisponibilité du cuivre. L'eau potable représente une grande source de cuivre pour l'homme car celui-ci, dissout dans l'eau sous forme d'ions, est plus facilement assimilable (Brewer et al., 2010). Les teneurs en cuivre de certains aliments sont décrits dans le Tableau 3.2.

3. Le terme d'hypoguesie signifie une diminution du sens du goût

4. Le terme d'agueusie signifie l'absence du sens du goût

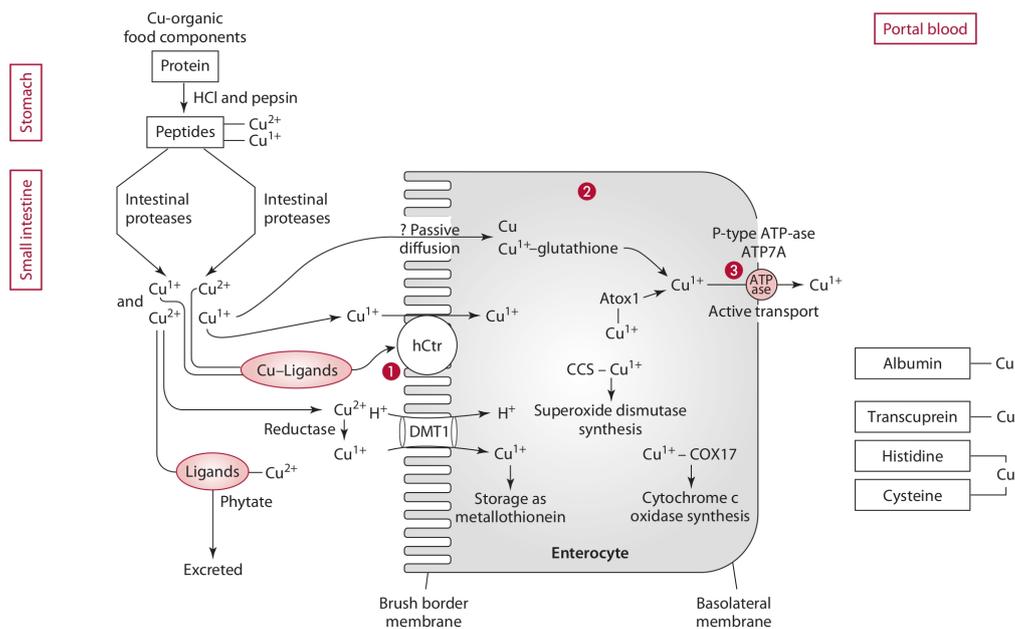


FIGURE 3.4 – Schéma de l'entrée du cuivre au niveau de l'intestin. Après tout un cheminement dans l'estomac et le petit intestin, les ions de cuivre liés à divers ligands vont soit continuer leur chemin et être excrétés, soit entrer dans les entérocytes de différentes manières. Dans les entérocytes, le cuivre est très peu stocké (méthallothionéine), il est utilisé pour le fonctionnement de la cellule (synthèse de la cytochrome c oxydase) et majoritairement transporté du pôle apical au pôle basolatéral. Les ions de cuivre traversent ainsi les entérocytes grâce à des molécules comme le glutathion ou des protéines comme l'Atox1 qui les transportent vers l'appareil de Golgi et les transfèrent à l'ATP7A. Des vésicules d'exocytose contenant l'ATP7A en membrane se déplacent et se retrouvent au niveau du pôle basolatéral où elles relarguent le cuivre dans le milieu extracellulaire. Les ions de cuivre se lient ensuite à des protéines (l'albumine et la transcupréine) ou des acides aminés (l'histidine et la cystéine) dans la circulation sanguine.

Source : (Gropper et al., 2008)

Dans l'estomac, le cuivre lié à des protéines se retrouve en contact avec un milieu très acide et avec des enzymes tels que la pepsine. Ces conditions découpent les protéines sous forme de peptides. Les ions de cuivre peuvent donc rester liés à ces divers peptides. Les protéases du petit intestin peuvent ensuite dégrader ces peptides. Le cuivre qui arrive alors dans la lumière de l'intestin se présente sous la forme d'ions Cu(I) ou Cu(II) liés à des ligands solubles d'origine alimentaire ou endogène (Powell et al., 1999b).

### **L'absorption au niveau de l'intestin**

Les ions de cuivre se retrouvent en très petite quantité dans l'alimentation et sont absorbés par les entérocytes, cellules majoritaires de l'épithélium intestinal. Les entérocytes, entièrement renouvelés en 3 à 4 jours, sont polarisés avec un pôle apical en contact avec la lumière intestinale et un pôle basolatéral en contact avec le tissu conjonctif sous-jacent richement vascularisé. système veineux. Ces cellules représentent une interface qui permet le passage de nombreux nutriments (eau, électrolytes, glucides, lipides, protéines et vitamines liposolubles) du bol alimentaire prédigéré (le chyme), vers le système veineux porte. L'absorption se fait via les microvillosités présentés majoritairement au niveau du pôle apical des cellules épithéliales de l'intestin. Le cuivre passe à travers la membrane plasmique des entérocytes majoritairement grâce aux transporteurs Ctr1 (copper transporter 1). Dans les entérocytes, le cuivre est très peu stocké, il est utilisé pour le fonctionnement de la cellule et majoritairement transporté du pôle apical au pôle basolatéral. Les ions de cuivre traversent ainsi les entérocytes grâce à des protéines comme l'Atox1 qui les transportent vers l'appareil de Golgi et les transfèrent à l'ATP7A. Des vésicules d'exocytose contenant l'ATP7A en membrane se déplacent et se retrouvent au niveau du pôle basolatéral où elles relarguent le cuivre dans le milieu intercellulaire. Les ions de cuivre vont ensuite être complexés avec des transporteurs (albumine, transcupréine, etc.) et se retrouver dans le système veineux porte afin d'être transportés vers le foie (Gropper et al., 2008). Un schéma représentant l'entrée du cuivre au niveau d'un entérocyte est présenté à la Figure 3.4.

### **De la veine porte au foie**

Le cuivre libéré par les cellules intestinales rejoint le sang de la veine porte où il se lie à de nombreux partenaires. Ces partenaires sont majoritairement de type protéique comme l'albumine et la transcupréine, et peuvent être pour une part moins importante non protéique avec par exemple le glutathion et des acides aminés comme l'histidine (Linder, 2012).

L'albumine est une protéine très soluble de 69 kDa, synthétisée dans le foie et relarguée ensuite dans la circulation sanguine. Cette protéine, très conservée, possède de nombreuses fonctions au sein des organismes. Elle intervient dans le maintien du pH du sang et peut se lier à des espèces moléculaires anioniques, cationiques ou neutres. Elle est capable de lier plus particulièrement différents types d'ions, du glutathion et des résidus cystéines. Grâce à ses propriétés de liaison, elle joue un rôle important dans le transport de nombreuses molécules : des hormones, des acides gras libres, de la bilirubine non-conjuguée, du cuivre etc. Il arrive fréquemment que le cuivre se présente sous la forme d'un complexe albumine-cuivre-histidine.

La transcupréine, semble être une source de cuivre encore plus importante que l'albumine pour les cellules de foie et de rein. En général, il a été démontré que la transcupréine et l'albumine participent à la distribution de cuivre dans les tissus et que le cuivre est en premier lieu transporté dans le foie et les reins. On parle dans ce cas de distribution initiale du cuivre (Linder and Hazegh-Azam, 1996) (Linder et al., 1998). Le cuivre absorbé dans le foie peut réapparaître dans le plasma lié à la céruloplasmine, qui peut délivrer le cuivre aux autres tissus.

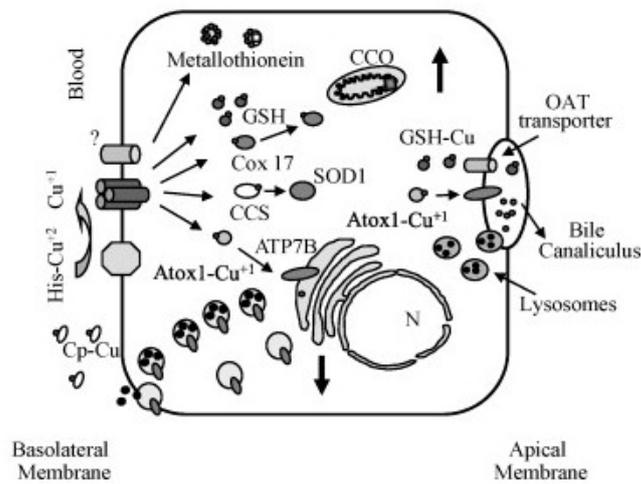


FIGURE 3.5 – Schéma de la gestion du cuivre au niveau du foie. Dans les hépatocytes, le cuivre peut être stocké dans les mitochondries ou dans le cytoplasme (les métallothionéines et le glutathion), incorporé dans la céruloplasmine, ou sécrété dans l'intestin grêle via la bile. Dans ces cellules, chacune de ces trois voies est particulièrement bien développée car le foie représente l'organe central dans l'homéostasie du cuivre. Le foie synthétise la céruloplasmine (Cp) qui sera libérée dans le sang par le foie grâce à des vésicules d'exocytose générées à partir de l'appareil de Golgi

Source : (de Romaña et al., 2011)

### Dans le foie

Un schéma représentant la gestion du cuivre par un hépatocyte est présenté à la Figure 3.5. Il a été montré que le foie était capable de capter le cuivre quelle que soit sa forme de présentation, c'est-à-dire sous formes de complexes de cuivre avec différents ligands, lié à l'albumine ou à la transcupréine ou encore à la céruloplasmine. Lorsque le cuivre arrive au foie, il est rapidement pris en charge par la protéine Ctr1 pour entrer dans l'hépatocyte. Il a été proposé que le cuivre qui passe par cette voie ait tout d'abord été réduit par une métalloréductase située en membrane plasmique. Cette métalloréductase ferait partie des protéines STEAP (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate) (Ohgami et al., 2006).

Dans les hépatocytes, le cuivre peut être stocké dans les mitochondries ou dans le cytoplasme en se liant aux métallothionéines et au glutathion, incorporé dans des protéines utilisant le cuivre comme la céruloplasmine, ou sécrété dans l'intestin grêle via la bile (Gropper et al., 2008). Dans ces cellules, chacune de ces trois voies est particulièrement bien développée car le foie représente l'organe central dans l'homéostasie du cuivre. Le foie joue également un rôle important pour la circulation du cuivre dans l'organisme entier en synthétisant l'apocéruloplasmine et en y incorporant jusqu'à six ions de cuivre, sous les formes Cu(I) ou Cu(II) pour former la céruloplasmine. Parmi ces six ions, trois sont impliqués dans le transfert d'électrons et trois forment le site catalytique, engendrant un aspect bleuté de la protéine. La céruloplasmine est libérée dans le sang par le foie grâce à des vésicules d'exocytose générées à partir de l'appareil de Golgi. Environ 60 % et parfois même jusqu'à 95 % du cuivre présent dans la circulation sanguine est incorporé dans la céruloplasmine (Gropper et al., 2008).

### La distribution vers d'autres organes

La distribution du cuivre aux autres tissus se fait majoritairement par la céruloplasmine. L'absorption de cuivre par des cellules autres que des hépatocytes implique la liaison de la céruloplasmine à des récepteurs spécifiques (Percival and Harris, 1990). Dans la circulation, il a été montré que la céruloplasmine n'échange pas son cuivre avec d'autres molécules comme l'albumine ou la transcupréine le font.

### L'excrétion

L'excrétion biliaire représente le processus majoritaire des voies de sortie du cuivre. La quantité de cuivre excrété par la bile dépend directement de celle qui se trouve dans la nourriture ingérée et peut représenter jusqu'à 95 % du cuivre excrété. L'excès de cuivre peut également être évacué via les urines, la peau ou les phanères (Buckley, 2000) ou via les desquamations cellulaires dans l'intestin (Powell et al., 1999a).

L'ATP7B participe à l'excrétion biliaire du cuivre. En effet, en cas d'excès de cuivre dans l'hépatocyte, l'ATP7B, localisée au niveau du réseau trans-Golgi et des vésicules cytoplasmiques, permet le transfert du cuivre vers les vésicules pour l'excrétion biliaire. Ces vésicules contenant le cuivre déversent celui-ci par exocytose dans les canalicules biliaires du foie qui fusionnent pour former le canal hépatique commun et permettre la récolte de la bile par la vésicule biliaire.

Le cuivre présent dans la bile, se présente sous la forme de complexes avec des protéines, des sels biliaires, des peptides et des acides aminés. Notons que la bile entre dans la composition de la matière fécale.

## 3.5.2 Le métabolisme du cuivre au niveau cellulaire

Le métabolisme du cuivre à un niveau cellulaire est composé de différentes étapes qui sont : (1) l'adsorption à la surface de la cellule, (2) le passage à travers la membrane plasmique, (3) le trafic intracellulaire, (4) le stockage et (5) l'exportation du cuivre.

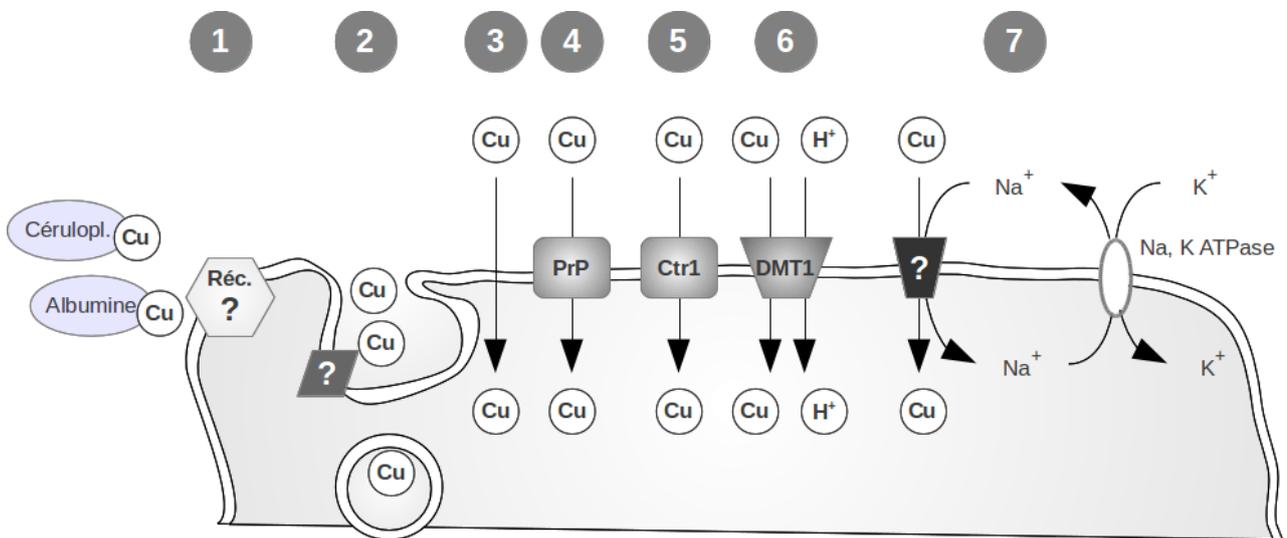


FIGURE 3.6 – Schéma des différentes voies de passage du cuivre à travers la membrane plasmique. Les mécanismes de transport du cuivre à travers la membrane plasmique sont : la présence de récepteurs spécifiques à des protéines de transport de cuivre (1), l'endocytose (2), la diffusion simple (3), la protéine Prion (PrP) (4), la protéine de transport Ctr1 (5), un transporteur de métaux divalents couplé aux protons DMT1 (6) ou la diffusion facilitée (7).

**(1) L'adsorption à la surface de la cellule**

L'adsorption est définie comme l'adhérence d'atomes, d'ions, de molécules, de liquides ou de solides dissous à une surface (Stumm et al., 1992). Ce phénomène représente un mécanisme important pour permettre l'entrée des ions de cuivre dans la cellule. Les propriétés de liaison des ions de cuivre font qu'ils sont capables d'interagir avec de nombreuses molécules, par exemple la partie extracellulaire de la protéine de transport Ctr1 ou des protéines de la matrice extracellulaire telles que l'ostéonectine, qui peuvent se être proches de la surface ou à la surface de la membrane. Ces liaisons peuvent faciliter ou au contraire empêcher l'interaction des ions du cuivre avec la surface de la cellule et leur entrée dans la cellule (Gropper et al., 2008).

**(2) Les différentes voies de passage du cuivre à travers la membrane plasmique**

Plusieurs mécanismes de transport du cuivre à travers la membrane plasmique et plusieurs transporteurs potentiels ont été décrits. Ceux-ci sont représentés dans un schéma à la Figure 3.6. La présence de récepteurs spécifiques à des protéines de transport de cuivre (1), l'endocytose (2), la diffusion simple (3), la protéine Prion (PrP) (4), la protéine de transport Ctr1 (5), un transporteur de métaux divalents couplé aux protons DMT1 (6) ou la diffusion facilitée (7), représentent ces différents mécanismes. Le transport du cuivre à travers la membrane plasmique semble se faire majoritairement à travers la protéine Ctr1 pour de nombreux types cellulaires.

**Des récepteurs de protéines de transport du cuivre** Grâce à leurs propriétés de liaison, les ions de cuivre se lient à différents ligands tels que l'albumine et la céruloplasmine. Des récepteurs de protéines de transport du cuivre ont été mis en évidence à la surface des cellules tels que les récepteurs de l'albumine et de la céruloplasmine. Les phénomènes qui suivent la liaison de l'albumine ou de la céruloplasmine à leurs récepteurs respectifs ne sont pas encore élucidés à ce jour. Les récepteurs de l'albumine semblent localisés au niveau de la membrane apicale des cellules du tube proximal du rein, un lieu de réabsorption spécifique de l'albumine. Il a été montré qu'une modification de l'albumine par glycation<sup>5</sup> apparaît au cours du vieillissement chez le rat. Cette modification change la structure de l'albumine et altère sa reconnaissance par son récepteur (Cessac-Guillemet, 1995). Les CPR (Cp receptor) se trouvent à la surface des hépatocytes mais également à la surface d'autres types cellulaires. Il semblerait qu'après la liaison avec la céruloplasmine, le récepteur est hydrolysé et donne plusieurs peptides de poids moléculaires de 20 à 60 kD (Sasina et al., 2000).

**Les protéines transmembranaires de transport du cuivre** Deux types de protéines transmembranaires capables de transporter les ions de cuivre à travers la membrane (vers l'intérieur de la cellule) ont été identifiés. Les protéines de transport de cuivre, en anglais les « Copper transporter » (Ctr1 et Ctr2) et la protéine de transport de métaux divalents, en anglais « Divalent Metal Transporter » ou DMT1.

- Les protéines de transport Ctr1 et Ctr2. La protéine Ctr1, exprimée dans tous les types cellulaires, comporte trois domaines transmembranaires, une extrémité N-terminale riche en méthionine qui n'est pas indispensable sauf dans des conditions pauvres en cuivre, une extrémité C-terminale avec un groupe cystéine-histidine et un motif en MX3M dans le deuxième domaine transmembranaire essentiel pour la fonction d'absorption de cuivre (Puig et al., 2002). La Ctr1 se présente dans la membrane plasmique sous la forme d'un homotrimer formant un pore à travers lequel le cuivre est susceptible de passer. Elle permet le transport du cuivre à travers la membrane cellulaire uniquement sous la forme de Cu(I) et de manière très spécifique. L'identification récente

5. La glycation, parfois nommée glycosylation non enzymatique, est le résultat d'une liaison covalente entre une protéine ou une molécule lipidique et une molécule de sucre (fructose ou glucose), sans l'intervention d'enzyme.



d'une famille de métalloréductases chez les êtres humains, les protéines STEAP, localisés à la fois en membrane plasmique et dans les membranes intracellulaires, suggère que celles-ci pourraient fonctionner en partenariat avec Ctr1 mais cela n'a pas encore été clairement établi (Ohgami et al., 2006). Il a été montré qu'une forte concentration en cuivre dans le milieu extracellulaire stimule l'endocytose et la dégradation de la protéine Ctr1 via le motif MX3M transmembranaire. L'endocytose de la protéine Ctr1 à de faibles concentrations est également possible et nécessite la présence de l'extrémité N-terminale riche en méthionine. Il existe donc une différence dans la signalisation intracellulaire selon que les concentrations en cuivre soient basses ou élevées (Guo et al., 2004). Comme la protéine Ctr1 est présente sur la membrane plasmique et au niveau des vésicules intracellulaires, il est possible qu'elle intervienne directement dans le transport du Cu(I) au niveau de la membrane plasmique mais également au niveau des vésicules intracellulaires. En effet, Ctr1 pourrait permettre la sortie de Cu(I) des endosomes vers le cytoplasme rendant ces ions de cuivre disponibles pour les protéines chaperonnes du cuivre.

Une protéine de transport du cuivre proche de Ctr1, Ctr2 (copper transporter 2), découverte tout d'abord chez la levure *S. cerevisiae*, a été mise en évidence chez la souris. Sa fonction est encore inconnue mais la protéine a été localisée en membrane d'endosomes tardifs et de lysosomes (Rees et al., 2004).

- La protéine de transport DMT1. La protéine Ctr1 a longtemps été considérée comme la seule protéine transmembranaire responsable de l'entrée du cuivre dans la cellule. De récentes données ont permis de montrer que le cuivre peut entrer dans la cellule à travers un transporteur protéique spécifique des métaux divalents, nommé Divalent Metal transporter 1 ou DMT1 (Arredondo et al., 2003). Cette protéine est connue pour permettre le transport du fer à travers la membrane plasmique et est localisée à la membrane du pôle apical des enterocytes. DMT1 est une protéine membranaire intégrale qui possède douze domaines transmembranaires (Wang et al., 2011). Le passage d'un métal divalent par cette protéine de transport est couplé avec un proton. Certaines études suggèrent que le DMT1 peut transporter de nombreux métaux avec une spécificité pour les ions métalliques divalents et ce, de manière conservée puisqu'on le retrouve de la bactérie à l'homme (Arredondo et al., 2003), (Gunshin et al., 1997).

**La diffusion facilité et un transport dépendant des ions de sodium** Les ENaC (epithelial sodium channel) permettent le maintien de l'homéostasie ionique des cellules. Il a été montré que le cuivre pouvait inhiber l'absorption des ions  $\text{Na}^+$  par ces canaux (Handy, 2002) et aussi que l'ajout d'amiloride, une molécule qui empêche l'absorption de sodium par les ENaCs, réduisait également l'absorption de cuivre par la cellule. Ces résultats suggèrent que les ions Cu(II) se lient au site de liaison de l'amiloride à l'ENaCs ou que la protéine de transport de cuivre, par exemple Ctr1, a besoin d'ions  $\text{Na}^+$ . Des résultats similaires ont été obtenus chez les humains<sup>6</sup> (Chen et al., 2011).

### (3) Le trafic intracellulaire du cuivre

Lorsque le cuivre entre dans la cellule, plusieurs voies sont possibles et seront privilégiées en fonction du type cellulaire. Premièrement, le cuivre peut être transporté à l'aide de différents composés moléculaires protéiques ou non. Il peut, dans ce cas, traverser entièrement une cellule polarisée ou être livré dans un compartiment cellulaire dans lequel il sera soit stocké, soit utilisé. Deuxièmement, le cuivre peut être stocké sous différentes formes dans la cellule, ce qui permet à celle-ci de faire face aux fluctuations des concentrations en cuivre extracellulaire.

6. Un conflit important au sujet des interactions entre les ions  $\text{Na}^+$ , les ions de cuivre et les mécanismes d'absorption de ces ions demeure dans la recherche scientifique. Plusieurs hypothèses existent : le partage d'une voie d'entrée commune (les ENaCs), des voies de transport spécifiques aux ions de cuivre modulées par la présence des ions  $\text{Na}^+$  ou des interférences non pas avec les ENaCs mais avec les  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPases, ces dernières permettant la sortie du  $\text{Na}^+$  et contribuant au maintien du potentiel de membrane.

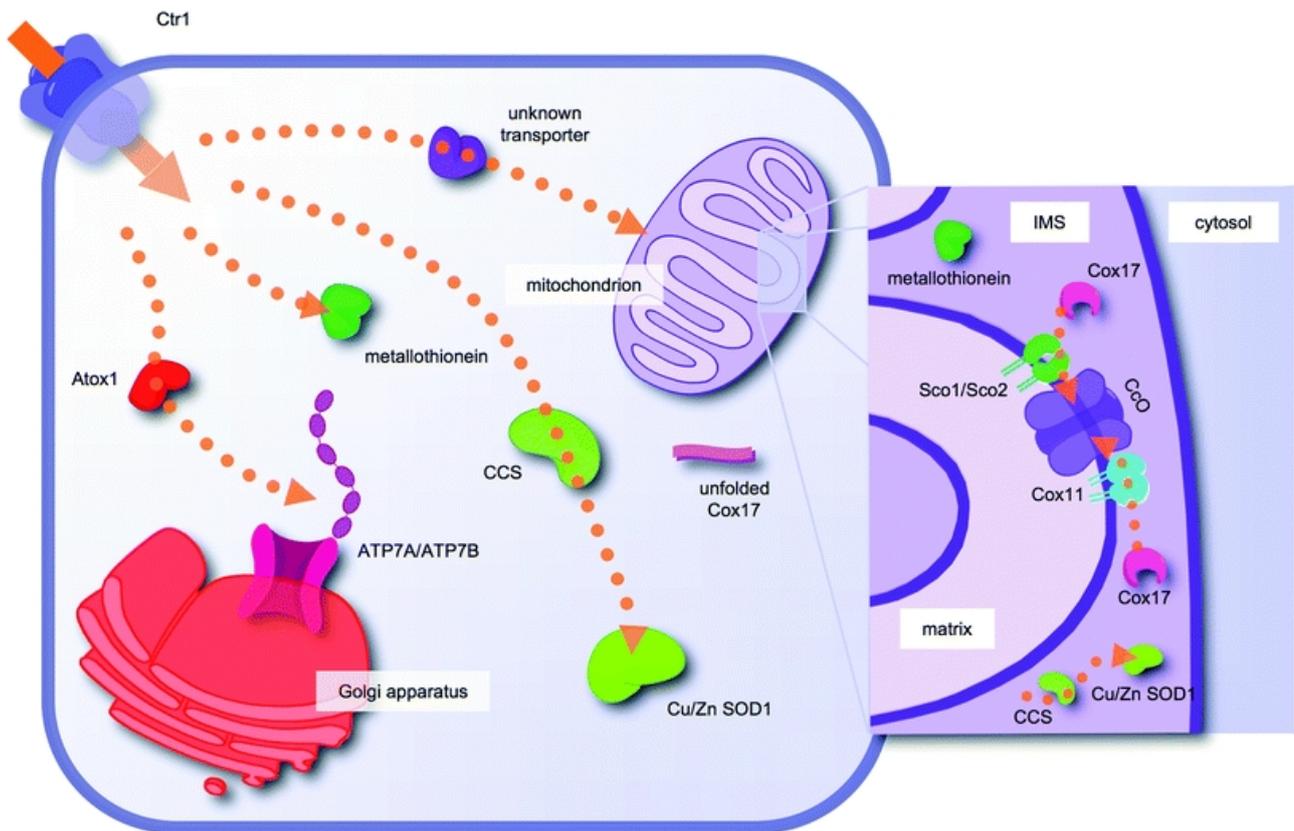


FIGURE 3.7 – Schéma du trafic intracellulaire du cuivre. Premièrement, le cuivre peut être transporté à l'aide de différents composés moléculaires protéiques (Atox1, CCS, métallothionéines) ou non (glutathion). Il peut, dans ce cas, traverser entièrement une cellule polarisée ou être livré dans un compartiment cellulaire (mitochondrie et appareil de Golgi) dans lequel il sera soit stocké, soit utilisé. Deuxièmement, le cuivre peut être stocké sous différentes formes dans la cellule (métallothionéines), ce qui permet à celle-ci de faire face aux fluctuations des concentrations en cuivre extracellulaire. Troisièmement, le cuivre peut être utilisé par de nombreuses protéines pour assurer leurs fonctions au sein de mécanismes biochimiques essentiels et dans différents compartiments de la cellule (ex. : synthèse de la cytochrome c oxydase).

Source : (Banci et al., 2010)

Troisièmement, le cuivre peut être utilisé par de nombreuses protéines pour assurer leurs fonctions au sein de mécanismes biochimiques essentiels et dans différents compartiments de la cellule. Le trafic intracellulaire est décrit à la Figure 3.7.

**La mobilité du cuivre** Par des mécanismes encore flous, le cuivre peut être transféré d'un composé moléculaire non protéique à un autre, d'un composé non protéique à une protéine ou d'une protéine à une autre, et donc être transporté et distribué au sein de la cellule. Plusieurs composés moléculaires non protéiques et plusieurs protéines capables de lier et de transporter le cuivre dans la cellule ont été mis en évidence. Ces protéines ont été regroupées sous la dénomination de cuproprotéines, aussi nommées « protéines chaperonnes du cuivre » et font partie du protéome du cuivre, nommé « cuprotéome ».

**Les composés moléculaires non protéiques** Le cuivre intracellulaire semble le plus souvent être lié à des composés de faible poids moléculaire tels que le glutathion. Ce dernier est capable de transférer le cuivre à des métallothionéines et à des enzymes cuivre-dépendantes (Carroll et al., 2004). Certains acides aminés, comme l'histidine, ou certains peptides, contenant des cystéines, des méthionines ou autres, peuvent également interagir avec des ions de cuivre, les séquestrer et/ou les transférer à d'autres partenaires.

**Les protéines capables de transporter le cuivre à l'intérieur de la cellule** La protéine chaperonne CCS (copper chaperone for superoxide dismutase), transporte le cuivre jusqu'à la SOD1. CCS active la SOD1 en introduisant l'ion de cuivre directement dans la protéine permettant ainsi la réaction de dismutation du superoxyde en  $O_2$  et en  $H_2O_2$  (Stasser et al., 2007).

La Cox17 (cytochrome c oxydase 17), présente dans le cytoplasme, peut lier le cuivre et interagir avec d'autres protéines indispensables pour la formation et l'activité de la cytochrome c oxydase dans la mitochondrie. Il a été montré que Cox17 délivre le cuivre directement aux protéines mitochondriales Cox11 (cytochrome c oxydase 11), SCO1 (synthesis of cytochrome c oxydase 1) et aussi SCO2 (synthesis of cytochrome c oxydase 2) au niveau de l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Ensuite, les protéines Cox11, SCO1 et SCO2 le délivrent respectivement aux sites  $Cu_A$  et  $Cu_B$  de la cytochrome c oxydase pour permettre la respiration cellulaire (Banci et al., 2010).

La protéine Atox1, nommée également HAH1, est une protéine chaperonne qui lie le cuivre. Cette protéine joue un rôle dans l'homéostasie du cuivre car elle participe indirectement à la voie sécrétoire du cuivre par les ATPases. En effet, celle-ci est capable de transporter le cuivre à l'intérieur du cytoplasme et de le transférer soit à l'ATP7A au niveau des entérocytes ou dans d'autres types cellulaires, soit à l'ATP7B dans les hépatocytes ; ces ATPases participant aux mécanismes d'efflux du cuivre (Prohaska, 2008). La protéine Atox1 est une protéine très particulière puisque celle-ci cumule les rôles liés au cuivre. À côté de ses rôles de chaperonne et de transport, cette protéine agit également comme un antioxydant contre le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Prohaska, 2008). Plus récemment, cette protéine a été décrite comme pouvant se comporter comme un facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes cuivre-dépendants (Muller and Klomp, 2009). Un de ces gènes cibles est le gène codant pour la protéine Prion (Wright et al., 2009).

D'autres protéines chaperonnes de cuivre, incluant des métallothionéines, la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) ou la protéine Prion, pourraient également prendre en charge le cuivre et le transférer à d'autres protéines.



#### (4) Le stockage du cuivre

**Les métallothionéines** Le stockage du cuivre est possible grâce aux métallothionéines (MTs). Les métallothionéines sont des protéines avec un petit poids moléculaire, entre 0,5 et 14 kDa, et très riches en résidus cystéines, près de 30 % des acides aminés. Les fonctions de ces protéines ne sont pas claires, mais il semble qu'elles soient impliquées dans la régulation des métaux, qu'elles jouent un rôle protecteur contre la toxicité de ceux-ci et contre le stress oxydatif. Il existe quatre isoformes majeures exprimées chez les humains : MT1 (sous-types A, B, E, F, G, H, L, M et X), MT2, MT3 et MT4. Chez l'homme, les MT sont synthétisées principalement dans le foie et les reins. Leur production dépend de la disponibilité en minéraux alimentaires, comme le zinc, le cuivre et le sélénium et acides aminés tels que l'histidine et la cystéine (Nordberg et al., 2009). Ces protéines, ubiquistes et très conservées, peuvent lier jusqu'à sept atomes de zinc et douze atomes de cuivre et leur temps de vie serait sous l'influence de ces deux oligo-éléments (Palacios et al., 2011). En plus du zinc et du cuivre, ces protéines peuvent lier de manière physiologique le sélénium mais également des xénobiotiques tels que le cadmium, le mercure, l'argent et l'arsenic. La liaison avec ces ions métalliques se fait grâce aux groupes thiol des résidus cystéines. En liant le cuivre, les métallothionéines peuvent le transporter et jouer un rôle dans la détoxification en le séquestrant lorsqu'il est en surcharge dans la cellule. En effet, lorsque la concentration en cuivre augmente, l'expression des métallothionéines augmente et celles-ci séquestrent les ions de cuivre présents en excès. L'abondance protéique des métallothionéines peut donc donner une idée du nombre d'ions métalliques présents dans certains tissus (Nordberg et al., 2009).

**Le glutathion** Le glutathion permet également la détoxification de métaux tels que le cuivre, le mercure, le plomb, le cadmium, etc. Le groupement thiol présent sur la cystéine du glutathion réagit avec les sels des métaux en créant une forte liaison soufre-métal. Cette liaison permet par exemple au cuivre d'être excrété sans causer de dommages. Il a été montré que le cuivre qui interagit avec le glutathion peut également ensuite interagir avec les métallothionéines. Le renouvellement du cuivre lié au glutathion est plus rapide que celui du cuivre lié aux métallothionéines (de Romaña et al., 2011).

**Un stockage vésiculaire et lysosomal** Un autre mécanisme de stockage du cuivre a été mis évidence chez *S. cerevisiae*. En 2001, Portnoy et al. ont montré que la levure pouvait stocker temporairement le cuivre dans sa vacuole, à partir de laquelle elle a la possibilité de mobiliser ces stocks grâce à la protéine de transport du cuivre, Ctr2 (Portnoy et al., 2001, Rees et al., 2004). La protéine Ctr2 est localisée au niveau des membranes de la vacuole ou de vésicules. La vacuole de la levure est un organite important et dynamique, semblable aux lysosomes des cellules de mammifères. La fonction de la vacuole est de maintenir le pH intracellulaire et de stocker des acides aminés, des ions métalliques et d'autres molécules (Klionsky et al., 1990).

Par la suite, cette protéine Ctr2 a été mise en évidence chez les humains. En transfectant des cellules humaines avec une construction codant pour une protéine hCTR2-eGFP (enhanced green fluorescent protein), hCtr2 a été localisée exclusivement au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes, et n'a pas été détectée à la membrane plasmique. hCtr2, localisée dans les lysosomes, stimule la livraison du cuivre vers le cytosol lorsque des cellules humaines sont exposées à des concentrations relativement élevées de cuivre. Ceci suggère que les endosomes et les lysosomes peuvent jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire du cuivre (Folmer et al., 2007). Il a également été montré que le fait que des lysosomes soient chargés de cuivre pouvait engendrer une réaction de Fenton au sein de ceux-ci, déstabiliser leur membrane et favoriser la formation de lipofuscine (Kurz et al., 2010).



**Les mitochondries** Une partie du cuivre cellulaire se trouve dans les mitochondries car le cuivre est indispensable pour le fonctionnement d'enzymes mitochondriales (ex. la cytochrome c oxydase). Les mitochondries représentent des réservoirs importants de cuivre et ceci semble conservé chez les cellules eucaryotes, de la levure à l'humain (Leary et al., 2009). De plus, la cellule maintient prioritairement l'homéostasie du cuivre dans les mitochondries, même dans des situations de carence en cuivre, illustrant l'importance de conserver les stocks de cuivre dans cet organite afin de garantir une production d'énergie suffisante (Dodani et al., 2011).

Dans la matrice mitochondriale, les ions de cuivre sont liés à un ligand de faible poids moléculaire. La structure de ce ligand n'a pas encore été définie mais il a été établi que c'est un complexe anionique capable de lier Cu(I) de façon stable (Cobine et al., 2006). Il a été montré chez la levure que ces ligands sont également présents dans le cytoplasme mais le plus souvent sous forme libre. Il a été proposé que les ligands anioniques lient les ions de cuivre dans le cytoplasme et traversent ensuite la membrane externe de la mitochondrie par diffusion simple ou facilitée pour se retrouver dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Ensuite, les complexes traverseraient la membrane interne de la mitochondrie à travers une protéine ou un complexe protéique et se retrouveraient dans la matrice pour y être stockés. Les ions de cuivre sous cette forme peuvent ensuite être rapatriés vers l'espace intermembranaire pour être par exemple incorporés dans la cytochrome c oxydase.

Les mécanismes du trafic du cuivre dans la mitochondrie ne sont pas clairement établis mais il semblerait que l'état redox des protéines mitochondriales présentes joue un rôle dans l'import et l'export du cuivre de la matrice (Cobine et al., 2004).

**L'existence d'autres structures** Il n'est pas impossible qu'il existe d'autres compartiments cellulaires ou d'autres structures capables de stocker et/ou de rendre biodisponible le cuivre dans la cellule. A l'extérieur de la cellule, il a été montré que des agrégats de peptides beta-amyloïd pouvaient lier des ions de cuivre et que celui-ci pouvait même participer activement à la formation des plaques amyloïdes.

### (5) Les différentes voies de sortie du cuivre d'une cellule ou mécanismes de l'efflux

Les mécanismes de sortie du cuivre, nommés également mécanismes d'efflux, nécessitent la consommation d'ATP. La protéine ATP7A, présente dans la majorité des tissus dont les cellules épithéliales intestinales mais pas dans le foie, peut jouer un double rôle dans la cellule. D'une part, elle est requise pour le transport du cuivre au niveau du réseau trans-Golgi pour permettre la biosynthèse de cuproprotéines sécrétées et d'autre part, lorsque la concentration intracellulaire en cuivre est élevée, elle joue un rôle dans l'efflux de cuivre par des vésicules d'exocytose. La protéine ATP7B, présente dans les hépatocytes mais aussi dans le placenta, les tissus mammaires, etc., a une structure similaire à l'ATP7A et est également impliquée dans l'homéostasie du cuivre. Elle participe à l'efflux du cuivre et joue un rôle important dans le réseau trans-Golgi pour le transfert du cuivre à la céruloplasmine. Lorsqu'il y a un excès de cuivre dans un hépatocyte, l'ATP7B translocalise et se retrouve au niveau de la membrane d'une vésicule d'exocytose. Ces vésicules se déplacent jusqu'à la membrane plasmique pour permettre l'efflux du cuivre vers la bile (Prohaska, 2008). Il a été montré que ces deux ATPases pouvaient être exprimées dans les mêmes tissus et pourtant jouer des rôles distincts mais complémentaires (Veldhuis et al., 2009). La fonction de l'ATP7B dans le métabolisme du cuivre dépend de nombreuses particularités dans sa séquence protéique. Par exemple, elle possède huit domaines transmembranaires permettant son ancrage et assurant le transfert du cuivre de part et d'autre de la membrane. Un de ces domaines indispensable pour sa fonction présente une séquence CPC (cystéine-proline-cystéine) capable de lier le cuivre. Cette protéine possède également un site de liaison à l'ATP nécessaire à son activité. Son extrémité N-terminale est composée de six domaines homologues contenant chacun une séquence qui permet la liaison au cuivre. Ces domaines permettent



à l'ATP7B d'interagir avec la chaperonne Atox1. Une mutation dans le gène codant l'ATP7B perturbe ces domaines, ce qui empêche l'interaction entre l'Atox1 et l'ATP7B, et donc le transport du cuivre.

D'autres protéines peuvent être impliquées dans l'efflux de cuivre chez les hépatocytes. Par exemple, la clusterin ou apolipoprotéine J et la protéine COMMD1 (copper metabolism MURR1 domain-containing protein 1), sont deux protéines qui peuvent interagir avec ATP7A ou ATP7B et influencer leur dégradation et par conséquent, jouer un rôle dans l'efflux du cuivre (Materia et al., 2012).

Au niveau des mitochondries, il semblerait que des senseurs protéiques dans l'espace intermembranaire existent et envoient des signaux qui permettent de contrôler l'efflux de cuivre à partir de la matrice vers les autres compartiments cellulaires. Une communication entre les mitochondries et le reste de la cellule serait donc nécessaire pour maintenir l'homéostasie du cuivre (Leary et al., 2009).

### 3.5.3 L'homéostasie du cuivre

La protéine Ctr1, nommée également hCtr1 chez les humains, joue un rôle important dans l'homéostasie du cuivre. Il a été montré que l'expression de Ctr1 était augmentée dans des conditions pauvres en cuivre et était diminuée dans des conditions riches en cuivre (Song et al., 2008). Une boucle de rétroaction est également observée puisqu'une abondance protéique élevée de Ctr1 supprime son expression.

La présence de senseurs dans la cellule est indispensable et permet de maintenir l'homéostasie du cuivre. Ces senseurs qui peuvent être des facteurs de transcription ou des protéines qui jouent un rôle dans la régulation de l'activité de facteurs de transcription responsables de l'expression de cuproprotéines (comme hCtr1). Ces facteurs de transcription ont donc une activité qui dépend de la présence de cuivre intracellulaire ou extracellulaire et ceux-ci interviennent dans le maintien de l'homéostasie du cuivre en permettant l'expression de gènes codant pour des protéines régulant l'entrée, le stockage, l'utilisation ou l'export du cuivre, ainsi que l'expression de protéines chélatrices capables de neutraliser les ions de cuivre présents en excès.

Parmi ces facteurs de transcription, la protéine Atox1, décrite précédemment comme chaperonne possède également une activité de facteur de transcription (Muller and Klomp, 2009) et est responsable notamment de l'expression de la protéine Prion<sup>7</sup>, cette dernière jouant un rôle dans l'homéostasie du cuivre (Kralovicova et al., 2009). Le facteur de transcription Sp1 (specificity protein 1) est responsable de l'expression de la protéine Ctr1. L'expression de Sp1 est faible lorsque les cellules sont soumises à des conditions riches en cuivre, et élevée dans des conditions pauvres. Ces fluctuations vont réguler l'expression de Ctr1 et contrôler l'entrée du cuivre (Liang et al., 2012). Le facteur de transcription MTF1 (metal transcription factor 1) est le principal responsable de l'expression des métallothionéines<sup>8</sup>. Ce facteur de transcription joue donc un rôle important sous des conditions d'excès de cuivre (Günther et al., 2012). Les facteurs de transcription Sp1 et MTF1 ont également été décrits comme pouvant jouer un rôle dans l'expression de la protéine Prion (Bellingham et al., 2009). Il a été décrit que le cuivre pouvait influencer la liaison à l'ADN et/ou l'activité d'autres facteurs de transcription de façon directe ou indirecte.

## 3.6 Les carences, excès et maladies liées au métabolisme du cuivre

À cause des propriétés du cuivre qui le rendent à la fois essentiel et potentiellement dangereux, les situations de carence et d'excès de cuivre peuvent devenir délétères pour l'organisme.

7. Pour plus d'informations sur la protéine Prion, voir le chapitre suivant.

8. Pour rappel, les métallothionéines sont des petites protéines riches en cystéine qui peuvent neutraliser différents types de métaux ainsi que des radicaux libres, empêchant ces molécules de devenir toxiques.



### 3.6.1 Les carences en cuivre

Il a été décrit qu'une déficience en cuivre pouvait être à l'origine d'une anémie, d'une leucopénie, d'une hypopigmentation ou d'une dépigmentation de la peau et des cheveux, d'une immunité déficiente, d'anomalies au niveau des os et d'un dysfonctionnement pulmonaire et cardiovasculaire (Gropper et al., 2008).

Le cuivre est important pour l'activité de la céruloplasmine qui permet l'oxydation du fer et qui joue un rôle dans le métabolisme du fer. Une déficience en fer ou anémie est donc un effet secondaire de la déficience en cuivre. Pour combler cette anémie, un supplément en cuivre est très souvent prescrit. Une carence en cuivre induite expérimentalement chez l'homme adulte avec une alimentation pauvre en cuivre provoque le plus souvent des perturbations cardiovasculaires (crise cardiaque, grave tachycardie et battements extrasystoliques). Chez l'homme adulte, les résultats obtenus indiquent que le système cardiovasculaire est vite perturbé par une carence en cuivre.

Il est important de noter que les carences graves en cuivre dues à une insuffisance d'apport en cuivre dans l'alimentation ou dues à l'ablation chirurgicale d'une partie de l'intestin, sont assez rares dans notre pays. De telles carences ont été observées chez des enfants souffrant de malnutrition, chez des personnes âgées, chez des personnes consommant de grandes quantités de zinc, d'antiacides, de vitamine C, de sucre ou d'alcool, ou chez des personnes qui présentent une maladie empêchant une bonne absorption au niveau du tube digestif ou des reins. Certains médicaments peuvent entraîner une déficience en cuivre tels que la penicillamine et le tétrathiomolybdate (TM) utilisé lors du traitement du cancer pour limiter l'angiogenèse (Brewer, 2003).

### 3.6.2 L'excès de cuivre

Lorsque la concentration en cuivre dans l'alimentation augmente notamment via la contamination d'eau ou de liquides, l'absorption du cuivre au niveau de l'intestin diminue pour maintenir l'homéostasie du cuivre dans l'organisme. De plus, l'homéostasie du cuivre est maintenue par une augmentation de l'excrétion via la bile, ce qui évite une accumulation excessive dans le foie (Buckley 2000). Il a été montré que lorsque la capacité d'excrétion du cuivre via la bile est dépassée, le cuivre alimentaire en excès est stocké dans le foie. Lorsque ses capacités de stockage sont dépassées, le cuivre est relargué dans la circulation sanguine, ce qui mène à l'apparition soudaine d'un phénomène hémolytique. Des retards de croissance, une hémoglobulinurie et plus tardivement une jaunisse et un coma peuvent apparaître (Suttle et Underwood 1999).

Une toxicité aiguë du cuivre est rarement observée chez les mammifères, car le cuivre possède un puissant effet émétique. Une intoxication aiguë se manifeste surtout dans des cas d'ingestion accidentelle ou de suicide. Un empoisonnement au cuivre engendre des douleurs gastriques, des nausées, des vomissements et de la diarrhée. Au niveau des organes, le foie et les reins sont particulièrement touchés par cet excès de cuivre, menant respectivement à une jaunisse et à une oligurie (une production d'urine réduite) voire une anurie (absence de production d'urine). Pour l'humain, une ingestion de 15 mg de cuivre est considérée comme toxique et des quantités de l'ordre du gramme semblent mortelles. Très peu de données sur la toxicité chronique du cuivre ont été rapportées.

### 3.6.3 Les maladies liées à une dérégulation de l'homéostasie du cuivre

#### La maladie génétique de Menkès

La maladie de Menkès (voir la Figure 3.8), décrite pour la première fois en 1962 par John Hans Menkès, est une maladie génétique récessive liée au chromosome X qui engendre un trouble du métabolisme du cuivre. Ce trouble apparaît sous la forme d'une carence en cuivre généralisée dans l'organisme et est létale. Environ 1

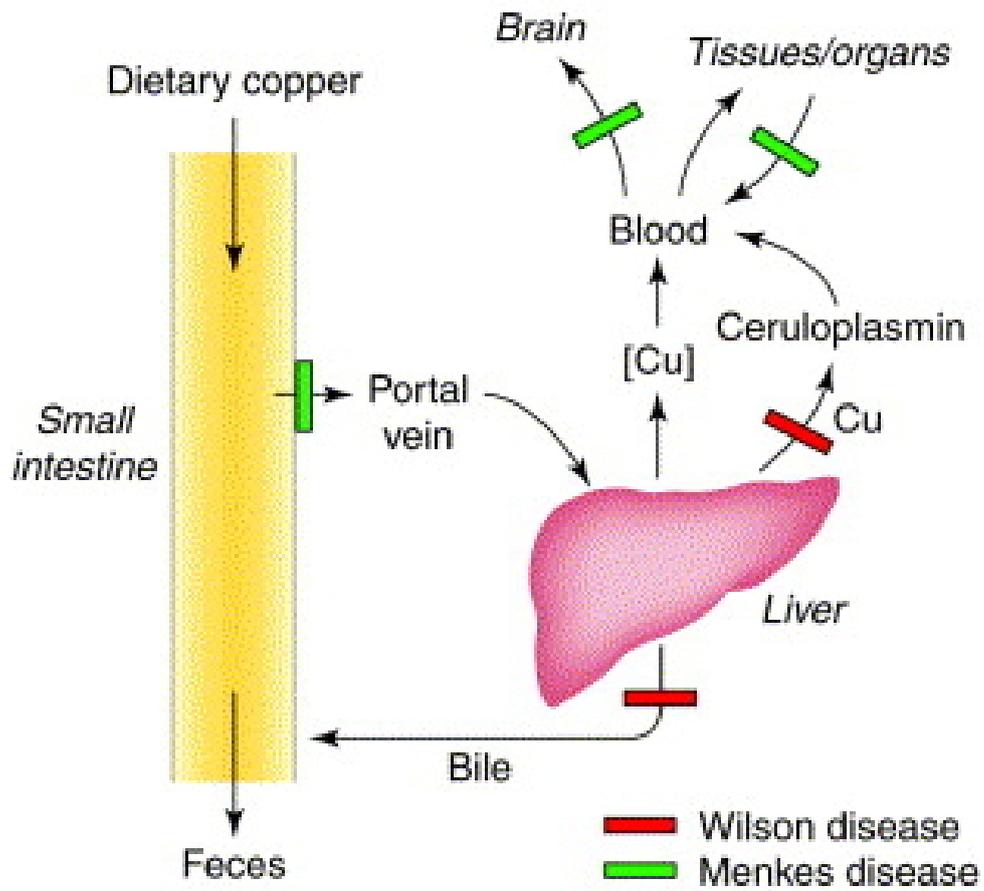


FIGURE 3.8 – Schéma du métabolisme du cuivre - Maladie de Wilson et maladie de Menkès.

Source : (Mercer et al., 2001)

enfant sur 300 000 naissances est touché par cette maladie. Généralement, les premiers symptômes apparaissent après six à huit semaines de vie par un retard de croissance et une régression de la motricité. Leur état de santé se dégrade alors assez rapidement et l'espérance de vie de ces enfants est limitée entre 6 et 10 ans.

Le symptôme principal est de type neurologique avec un retard mental accompagné d'autres symptômes tels que l'hypothermie, la dépigmentation de la peau et des cheveux, une texture caractéristique des cheveux, la déminéralisation du squelette, etc. Ces différents symptômes sont la conséquence d'une mutation ou d'une délétion dans le gène qui code pour l'ATPase de Menkès ou ATP7A. Pour rappel, cette protéine est importante pour la sortie du cuivre des entérocytes vers la circulation générale. Cette mutation induit donc une mauvaise répartition du cuivre dans le corps. Le cuivre s'accumule dans les entérocytes et les cellules rénales, alors que le cerveau et les autres tissus présentent des concentrations en cuivre anormalement basses. Au niveau cellulaire, cette faible concentration en cuivre engendre une réduction de l'activité de nombreuses enzymes qui utilisent le cuivre pour réaliser leurs fonctions. Ces enzymes possèdent des fonctions indispensables pour la structure et la fonction des os, de la peau, des cheveux, des vaisseaux sanguins et du système nerveux. Par exemple, l'activité de la dopamine-beta-hydroxylase, de la cytochrome c oxydase et de la lysyl oxydase est déficiente.

L'unique traitement prescrit de nos jours se présente sous la forme de suppléments de cuivre en injections sous-cutanées ou en intraveineuse.

### **La maladie génétique de Wilson**

La maladie de Wilson (voir la Figure 3.8), tout d'abord considérée comme une maladie neurologique et décrite comme telle en 1861 par Friedrich Theodor von Frerichs, a ensuite été décrite comme une maladie hépatique en 1912 par Kinnier Wilson, puis comme un trouble du métabolisme du cuivre en 1948 par J N Cuning. La maladie de Wilson est une maladie génétique autosomale récessive qui engendre une accumulation de cuivre surtout au niveau du foie et du cerveau, et est létale sans traitement. Le gène défectueux fut découvert et caractérisé en 1993. Environ 1 enfant sur 30 000 naissances est touché. Cette prévalence n'est pas homogène dans le monde ; elle est par exemple plus importante au Japon et en Sardaigne.

Trois types de symptômes cliniques sont observables chez les patients atteints de la maladie de Wilson : des symptômes neurologiques (dystonie, tremblements, mouvements oculaires anormaux, mobilité altérée, etc.), hépatiques (hépatite, cirrhose, etc.) et oculaires (anneau de Kayser-Fleisher). Le foie, le cerveau et la cornée sont les organes et les tissus où une accumulation de cuivre est détectée. Environ la moitié des personnes avec des symptômes hépatiques et pratiquement l'entièreté de celles avec des symptômes neurologiques présenteront un anneau de Kayser-Fleisher, accumulation caractéristique de cuivre en anneau autour de la cornée. Ces différents symptômes sont la conséquence de mutations dans le gène qui code pour l'ATPase de Wilson ou ATP7B. On connaît actuellement une quarantaine de variantes du gène ATP7B et plus de 260 mutations différentes de ce gène associés à la maladie de Wilson ont été rapportées. Les mutations du gène codant pour ATP7B peuvent conduire à l'absence de production de la protéine, à une maturation incomplète, à une incapacité à assurer le transport du cuivre, ou bien à des anomalies dans sa localisation cellulaire. Toutes ces mutations ont pour même conséquence une accumulation de cuivre dans la cellule avec la potentielle toxicité qui l'accompagne, c'est-à-dire l'apparition d'un stress oxydatif, la formation de complexes avec des protéines, la liaison à des sites actifs d'enzymes habituellement occupés par un autre métal de transition, etc. (Mercer et al., 2001).

Lorsqu'elle n'est pas traitée, la maladie de Wilson s'aggrave progressivement et est potentiellement mortelle. Différents traitements tels que des suppléments de zinc ou de chélateurs de cuivre, ainsi qu'une détection précoce par des analyses génétiques permettent à la plupart des personnes touchées de vivre une vie relativement normale malgré les dommages hépatiques et neurologiques qui ne guérissent jamais totalement (Mercer et al., 2001).



### Les maladies neuro-dégénératives

Les maladies neurodégénératives font partie des maladies dégénératives. Celles-ci affectent progressivement le fonctionnement du cerveau ou du système nerveux en fonction de leur développement. Plusieurs études menées sur l'homme ont montré qu'il existait un lien entre les métaux, et plus particulièrement le cuivre et le développement de maladies neuro-dégénératives dont font partie les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. Une étude a montré qu'une alimentation riche en cuivre pouvait avoir des effets négatifs sur les facultés cognitives (Morris et al., 2006). Cette étude a été réalisée sur environ 3700 personnes âgées aux Etats-Unis. L'alimentation et la santé mentale de celles-ci ont été analysées pendant une période de 6 ans. Les résultats de l'étude de Morris montrent qu'un régime renfermant plus de 1,6 mg de cuivre par jour et riche en acides gras saturés et trans provoquait un déclin cognitif plus important, qu'un régime riche uniquement en acides gras saturés et trans, qui multiplie les risques de développer des maladies d'Alzheimer (Morris et al., 2006). Le cuivre, indispensable pour le fonctionnement du cerveau, favorise la formation de plaques amyloïdes, nommées « plaques séniles » dans les maladies d'Alzheimer, et perturbe le fonctionnement des neurones voisins (Lovell et al., 1998). D'autres études ont montré que ce n'est pas l'accumulation de cuivre en elle-même qui déclenche l'apparition de maladies neuro-dégénératives mais plutôt son manque de disponibilité (Kaden et al., 2011). La recherche de marqueurs de maladies neuro-dégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, ainsi que l'établissement de procédures de dépistage représentent des défis importants pour pouvoir détecter le plus tôt possible ces maladies afin de limiter ou ralentir l'apparition de dommages (Dupiereux et al., 2009) (Perret-Liaudet et al., 2012).

### 3.7 Existe-t-il un lien entre le cuivre et le vieillissement ?

Le professeur George J. Brewer (University of Michigan Medical School) étudie depuis plus de 20 ans le lien entre des concentrations élevées en cuivre et en fer et les maladies liées au vieillissement telles que la maladie d'Alzheimer et les maladies cardiovasculaires (Brewer, 2007). Il propose que de hautes concentrations en cuivre et en fer favorisent la santé et la reproduction chez les personnes jeunes. Mais qu'à partir de 50 ans, ces mêmes concentrations pouvaient endommager les cellules et contribuer au développement de maladies liées au vieillissement. Il émet l'hypothèse selon laquelle les mécanismes liés à l'homéostasie du cuivre subiraient une dégénérescence au cours du vieillissement (Brewer, 2010). Une étude réalisée chez les bovins a montré que la concentration en cuivre augmentait dans le cerveau avec l'âge, ceci rendant les animaux âgés plus susceptibles de développer une maladie neurodégénérative (Zatta et al., 2008).

Il a été montré que le cuivre pouvait jouer un rôle dans le système immunitaire et il a donc été suggéré qu'il joue également un rôle dans l'immunosénescence<sup>9</sup>. Les cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-1 (interleukine 1) et IL-6 régulent la synthèse et la sécrétion de la Cp (ceruloplasmin) par le foie (Linder and Hazegh-Azam, 1996). Le vieillissement est caractérisé par une inflammation chronique, ce qui engendre une augmentation des niveaux de Cp au cours du vieillissement et dans certaines maladies liées à l'âge, telles que l'athérosclérose ou la AD (alzheimer disease) (Mocchegiani et al., 2012).

Les métallothionéines, également surexprimées au cours du vieillissement, influencent probablement le rôle joué par le cuivre au cours du vieillissement. Ces protéines chaperonnes du cuivre (Coyle et al., 2002) ont pour fonction de régler la disponibilité intracellulaire du cuivre (Maret, 2006) en stockant le cuivre dans des conditions de carence (Suzuki et al., 2002), ou de neutraliser le cuivre intracellulaire présent en excès (Tapia et al., 2004). Ces informations suggèrent que la surexpression des métallothionéines au cours du vieillissement

9. L'immunosénescence ou vieillissement du système immunitaire est caractérisée par une détérioration progressive du système immunitaire provoquée par l'âge. L'hôte âgé perd progressivement sa capacité de réponse aux infections et possède une mémoire à long terme défaillante (Ginaldi et al., 2001).



soient un marqueur de la présence de perturbations dans l'homéostasie du cuivre.

Il a été montré que le cuivre pouvait jouer un rôle dans l'odorat et le goût. Ainsi, un excès de cuivre peut induire une perte de l'odorat (anosmie) et du goût (agueusie). Ces deux phénomènes sont extrêmement courants chez les personnes âgées, plus de 80 % des personnes de plus de 80 ans. De plus, ces phénomènes peuvent être considérés comme les premiers symptômes de maladies neurodégénératives telles les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Gray et al., 2001).

La plupart des études portant sur la défectuosité des mécanismes liés à l'homéostasie du cuivre ont pour but de comprendre et de soigner la maladie de Wilson. Parmi ces études, il a été remarqué que des hépatocytes de patients atteints de cette maladie présentaient marqueurs de la sénescence tels que des délétions dans l'ADNmt (Mansouri et al., 1997), des dommages dans l'ADN nucléaire (Hayashi et al., 2006), des granules de lipofuscine (Motonishi et al., 2006, Hayashi et al., 2006) et produisaient plus de ROS (Seth et al., 2004).

Des liens entre le cuivre et la sénescence cellulaire ont déjà été suggérés chez d'autres organismes vivants. Par exemple, il a été montré chez le champignon filamenteux *Podospora anserina*, que le contrôle de l'homéostasie cellulaire du cuivre par le facteur de transcription « Grisea » a un impact important sur le phénotype et la durée de vie. Lorsque ce facteur de transcription est muté, la concentration en cuivre cellulaire diminue et l'espérance de vie augmente de 60% (Borghouts and Osiewacz, 1998). D'autres expériences sur *P. anserina* ont montré que la distribution du cuivre n'était pas la même dans les cellules sénescents par rapport aux cellules jeunes, et que certains gènes dont l'expression est modulée par le cuivre sont sur-exprimés dans les cellules fongiques sénescents (collaboration avec H. Osiewacz, Francfort, Allemagne) (Borghouts et al., 2001).

Maladie	Hôte	Mécanisme de pathogenèse
Kuru	Humains	Infection via cannibalisme rituel
MCJi	Humains	Infection via HCH contaminés par prion, greffes de la dure-mère, etc.
MCJv	Humains	Infection par des prions bovins ?
MCJf	Humains	Mutation de la lignée germinale du gène PrP
GSS	Humains	Mutation de la lignée germinale du gène PrP
IFF	Humains	Mutation de la lignée germinale du gène PrP
MCJs	Humains	Mutation ou conversion spontanée de PrPC en PrPSc ?
IFS	Humains	Mutation ou conversion spontanée de PrPC en PrPSc ?
Scrapie	Moutons	Infection de moutons génétiquement sensibles
ESB	Bétail	Infection par RVO contaminés par prion
EVT	Visons	Infection par des prions de moutons ou de bétail
MDC	Cervidés	Inconnu
ESF	Chats	Infection par tissus bovins ou RVO contaminés par prion
Encéphalopathie des ongulés exotiques	Grands koudous, nyalas, oryx	Infection par RVO contaminés par prion

**MCJ** : Maladie de Creutzfeldt-Jakob, **MCJi** : MCJ iatrogène, **MCJv** : MCJ variante, **MCJf** : MCJ familiale, **MCJs** : MCJ sporadique ; **GSS** : maladie de Gerstmann–Straussler–Sheinker, **IFF** : insomnie familiale fatale, **ISF** : insomnie sporadique fatale, **ESB** : encéphalopathie spongiforme bovine, **EVT** : encéphalopathie du vison transmissible, **MDC** : maladie débilante chronique, **ESF** : encéphalopathie spongiforme féline, **HCH** : hormone de croissance humaine, **RVO** : repas de viande et d'os.

TABLEAU 4.1 – Les maladies à prions

Source : (Prusiner et al., 1998)

# Chapitre 4

## La protéine Prion

### 4.1 Contexte

Des perturbations dans l'homéostasie du cuivre peuvent engendrer une augmentation de l'expression de certains gènes et modifier la structure et/ou l'activation de protéines. La protéine Prion (PrP) est une protéine dont le comportement peut être influencé par la présence de cuivre. Cette protéine, très conservée au sein des espèces, a tout d'abord été décrite dans le cadre de maladies à Prions telles que l'encéphalopathie spongiforme chez les bovins, la tremblante du mouton et le kuru ou la MCJ (maladie de Creutzfeldt-Jakob) chez l'homme. Il a été montré que la transmission de ces maladies se faisait à travers une forme anormale de cette protéine. L'étude des maladies dites « à Prions » a permis d'identifier un agent infectieux non conventionnel, de type protéique et qui ne contient pas d'acides nucléiques. La protéine Prion est impliquée dans de multiples mécanismes cellulaires, dans le système nerveux (transmission nerveuse et mémoire), dans le système immunitaire, dans le système olfactif, dans la prolifération et la différenciation cellulaire, dans l'adhérence cellulaire, dans l'apoptose, etc.

### 4.2 Les maladies à Prions

La description des maladies à Prions représente le point de départ de la découverte des Prions et de la protéine Prion. Les maladies à Prions sont également nommées « Encéphalopathies (Subaiguës) Spongiformes Transmissibles », ESST ou encore EST<sup>1</sup> et sont transmissibles de façons intra- et inter-spécifique. Trois principales caractéristiques définissent les ESST, à savoir une vacuolisation (spongiose) du cerveau rappelant la texture d'une éponge, une prolifération des astrocytes (gliose) et à une perte neuronale. Une liste des maladies à Prions décrites à l'heure actuelle est présentée dans le Tableau 4.1.

Chez l'humain, les maladies à Prions qui ont été décrites sont principalement représentées par quatre maladies : la maladie de Creutzfeldt-Jakob et variants, le syndrome de Gerstmann-Straussler-Sheinker, l'insomnie familiale fatale et le kuru. Ces pathologies ont en commun les symptômes d'une dégénérescence neurologique, sont incurables et fatales (Prusiner et al., 1998, Norrby, 2011).

La maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) a été découverte à la fois en 1920 par Creutzfeldt et en 1921 par Jakob comme étant de la démence pré-sénile humaine. En Papouasie-Nouvelle-Guinée en 1957, la moitié des morts enregistrés dans une peuplade anthropophage avaient contracté une maladie neurodégénérative nommée kuru. Cette maladie touchait principalement les femmes et les enfants qui mangeaient le système nerveux central et moins souvent les hommes à qui les muscles étaient destinés. En 1986, les premiers cas de la « maladie de la vache folle » ou encéphalopathie spongiforme bovine ont été décrits et les farines d'origine animale ont été suspectées puisque l'apparition de l'épidémie correspond au moment d'une modification du procédé de fabrication de celles-

---

1. Les ESST ne sont pas de nouvelles maladies car la tremblante du mouton a été décrite pour la première fois en 1732. Il a ensuite été rapporté pendant le XIX<sup>ème</sup> siècle que la tremblante du mouton était une neurodégénérescence avec la présence d'une vacuolisation des neurones dans les cerveaux des moutons atteints. Le côté transmissible de cette maladie a également été mis évidence de façon accidentel par une épidémie provoquée par des vaccins préparés à partir de cerveaux de mouton.



ci. Plus récemment, l'insomnie fatale familiale et le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) ont été rajoutés à la liste des maladies à Prions. Ces maladies peuvent survenir dans des formes héréditaires, sporadiques ou infectieuses. L'unique élément responsable de ces pathologies et mis en évidence à ce jour, est composé d'une forme particulière de la protéine Prion cellulaire naturellement exprimée chez l'hôte (Norrby, 2011).

### 4.3 Le concept de « Prion »

#### 4.3.1 Historique du concept

Avant 1967, l'agent infectieux responsable des maladies décrites ci-dessus était inconnu. Il a alors été proposé pour la première fois que l'agent infectieux responsable de la tremblante du mouton était dépourvu d'acides nucléiques et ne pouvait donc pas être de type viral, bactérien ou parasitaire. L'utilisation de rayonnements ionisants suffisamment forts pour induire des altérations au niveau des acides nucléiques<sup>2</sup> n'avait en effet aucun impact sur la transmission de la maladie. L'hypothèse « protein only » a été proposée par John S. Griffith mais à l'époque, n'a pas du tout été acceptée (Colby and Prusiner, 2011). En 1982, l'équipe de Stanley Prusiner a démontré que les traitements qui ont pour cible les acides nucléiques n'avaient aucun impact sur l'agent infectieux en question, alors que les traitements qui altèrent ou détruisent les protéines diminuaient de façon importante son activité. Par exemple, des irradiations aux UV ou aux rayons  $\gamma$ , un traitement au formaldéhyde, une exposition à des fortes températures ou l'utilisation de nucléases n'ont pas eu d'impact sur le comportement de l'agent infectieux. Par contre, des traitements avec de l'urée, des protéases, du SDS (sodium dodecyl sulfate) ou de la trypsine avaient un effet sur l'agent infectieux. Cette même équipe a isolé une protéine partiellement résistante aux protéases, nommé PrP (protéine Prion) pour « Proteases Resistant Protein » et plus tard, montra que la PrP est une protéine codée par le génome de l'hôte. Le caractère infectieux de cette protéine était la conséquence d'un changement de conformation de la forme normale de la protéine (PrPc (Prion protein cellular)-PrP cellulaire), exprimée chez l'hôte, en une forme infectieuse, (PrPsc (Prion protein scrapie)-PrP scrapie) (Colby and Prusiner, 2011).

Avec l'étude des maladies à Prions et la découverte d'une protéine capable de se comporter comme un agent infectieux sous une forme anormale, est né un concept révolutionnaire, le concept de « Prion ».

#### 4.3.2 Le concept de « Prion »

Le terme de Prion correspond aussi à un acronyme de PRoteinoaceous Infectious ONLY particule c'est-à-dire « particule protéique infectieuse ». Il faut distinguer le terme Prion, qui représente plutôt le concept, de la protéine Prion ou PrP ; ceci pouvant entraîner une ambiguïté de terminologie. Le concept « Prion » souligne l'idée que deux conformations différentes d'une protéine peuvent représenter deux informations différentes, engendrant par exemple un comportement ou une fonction différente, et qu'en plus ces informations sont transmissibles entre des individus d'une même espèce ou d'espèces distinctes. Ce concept va en l'encontre de la théorie fondamentale de la biologie moléculaire, exposé par Francis Crick en 1958, selon laquelle toute information transmissible est contenue dans des acides nucléiques (ADN ou ARN) qui doivent se répliquer pour se transmettre, et non pas dans des protéines. La transmission d'agents infectieux décrits jusqu'alors (virus, bactéries et parasites) nécessite la répllication de leur matériel génétique (Crick et al., 1970).

<sup>2</sup>. Cette technique largement utilisée à l'époque permettait de déterminer la taille d'un agent pathogène car la dose de rayons ionisants utilisée pour altérer les acides nucléique et donc inactiver l'agent en question est proportionnelle à la taille de son génome et donc à sa taille.



### 4.3.3 L'élargissement du concept de « Prion »

Depuis, le concept de Prions a été proposé pour expliquer certains processus physiologiques observés notamment chez les levures et les champignons. Chez la levure, il a été montré que des conformations différentes d'une même protéine pouvaient moduler certaines activités importantes pour l'adaptation à l'environnement, se répliquer et se transmettre aux cellules filles ou par infection à d'autres cellules. Ces protéines sont capables d'adopter des structures différentes qui les poussent à s'agrèger et à former des fibres de type amyloïde, et peuvent se répliquer et se transmettre. Ces protéines, qui possédaient déjà un nom, font alors partie d'une classe de protéines de type « Prions ». Plusieurs études semblent indiquer qu'il existe beaucoup de protéines de ce type. Celles-ci possèdent les caractéristiques qui les rendent capables de prendre différentes conformations et qui pourraient être potentiellement transmissibles. Plusieurs termes tels que « propriétés Prions », « domaines Prions » ou « activité protéique de type Prion » apparaissent depuis dans la littérature scientifique. Par exemple chez l'homme, les protéines  $\alpha$ -synucléine et tau, qui jouent un rôle dans le développement de maladies neurodégénératives telles que l'AD, semblent changer de conformation, ce qui favorise la formation d'agrégats (Polymenidou and Cleveland, 2012).

D'après l'hypothèse « protein only », lorsqu'une protéine subit un changement de conformation, sa fonction normale peut être compromise engendrant une perte de fonction ou à l'opposé, la protéine acquiert une nouvelle activité engendrant un gain de fonction (Wickner et al., 2007). Si à côté de ce changement de conformation, la perte ou le gain de fonction peut être transmis au niveau protéique, ces modifications peuvent selon l'environnement constituer un désavantage ou au contraire un avantage, et participer à la sélection des organismes les mieux adaptés et donc à l'évolution.

Le terme « Prion » est donc utilisé de plusieurs manières. Premièrement, il est un concept, deuxièmement, une protéine et troisièmement, avec l'élargissement du concept, une caractéristique ou une activité que certaines protéines possèdent.

## 4.4 La protéine Prion ou PrP

### 4.4.1 L'expression de PrP

Le gène PRNP qui code pour la PrP est localisé sur le chromosome 20 chez l'homme. Celui-ci est constitué de deux (chez l'homme) ou trois exons selon les espèces. Il a été montré que ce gène morcelé possédait une phase de lecture codant pour la protéine comprise dans un seul exon. La séquence de ce gène est hautement conservée au sein des mammifères, avec généralement une similarité de séquence de plus de 50% par rapport à l'humain (Schätzl et al., 1995) (Wopfner et al., 1999). Cette forte conservation suggère que PrP joue un rôle important. Les séquences les plus conservées de PrP sont des régions associées aux maladies à Prions ou des régions répétitives impliquées dans la liaison de métaux et dont le nombre de copies est directement impliqué dans certaines maladies à Prions chez l'humain (Goldfarb et al., 1991).

En 1986, Basler et al. ont montré que la forme normale de PrP (PrP<sup>C</sup>) et la forme anormale de PrP (PrP<sup>Sc</sup>) étaient codées par le même gène. Par la suite, les recherches ont montré que la différence entre PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup> était la conformation de la protéine (Riesner, 2003).

La région régulatrice du gène PRNP a très peu été décrite mais ce gène possède les caractéristiques d'un gène dont l'expression peut être contrôlée par plusieurs facteurs de transcription (Puckett et al., 1991), dont certains sont encore probablement inconnus (Linden et al., 2008). Il a été montré récemment que la protéine chaperonne du cuivre Atox-1 pouvait jouer un rôle de facteur de transcription dans l'expression de PrP<sup>C</sup> (Wright et al.,

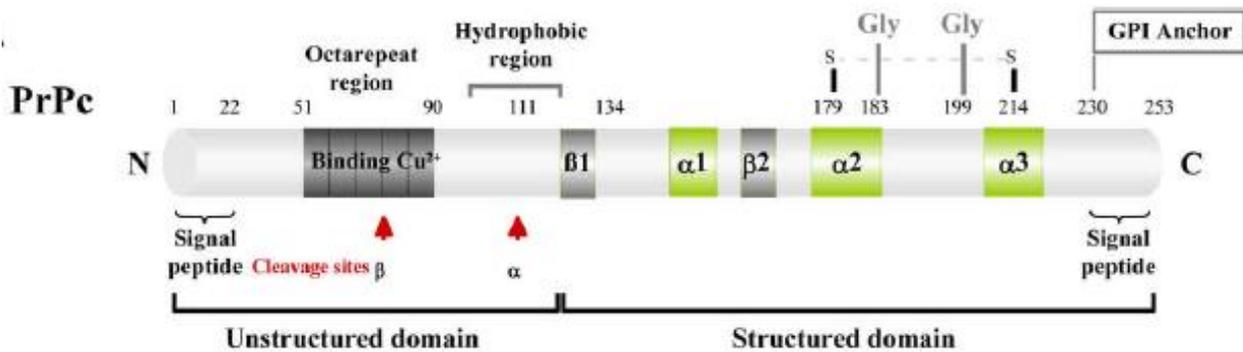


FIGURE 4.1 – Schéma représentant la structure de la protéine Prion. Avant les modifications post-traductionnelles, la séquence de PrP est composée de 253 acides aminés et donne ensuite une structure protéique composée de 209 acides aminés. Le domaine dit « non-structuré » a une extrémité NH<sub>2</sub>-terminal flexible comportant une répétition de 5 octapeptides (PHGGGWGQ). La partie centrale est constituée d'une région hydrophobe très conservée. Le domaine globulaire COOH-terminal, est constitué de trois hélices  $\alpha$  et de deux feuillets  $\beta$ . Ce dernier domaine possède une séquence hydrophobe permettant l'ajout d'une ancre GPI. Une liaison disulfure existe entre deux résidus cystéines situés sur la deuxième et la troisième hélice.

Source : (Mehrpour and Codogno, 2010)

2009), ainsi que Sp1 et MTF-1 (Bellingham et al., 2009). Ces facteurs de transcription jouent par ailleurs un rôle de senseurs de cuivre, soutenant davantage le fait que PrP puisse jouer un rôle dans l'homéostasie du cuivre. Le gène PRNP est exprimé constitutivement dans la majorité des tissus, mais principalement dans le système nerveux et plus particulièrement dans le cerveau et dans le système immunitaire (Prusiner, 2001) (Weissmann, 2004) (Zomosa-Signoret et al., 2008) (Aguzzi and Haass, 2003). Au niveau cellulaire, PrPc est présente à la surface des cellules mais d'autres localisations ont été décrites (voir la section sur la localisation de PrPc). L'existence d'une structure particulière en « pseudonoed » dans l'ARN messager de PrP serait impliquée dans la régulation de la traduction des protéines PrP (Barrette et al., 2001).

#### 4.4.2 Structures et conformations de PrP

##### La structure de PrP

Avant toute modification post-traductionnelle, PrP, initialement composée d'une séquence de 253 acides aminés, devient par la suite une structure protéique composée de 208 acides aminés. PrP subit en fait une maturation dans la cellule qui correspond à l'élimination d'une séquence signal NH<sub>2</sub>-terminale (22 acides-aminés) puis d'une séquence signal COOH-terminale (23 acides aminés) aboutissant ainsi à la PrP constituée au final de 208 acides aminés. PrP possède un domaine dit « non-structuré » avec une extrémité NH<sub>2</sub>-terminale flexible possédant une répétition de 5 octapeptides avec une séquence consensus PHGGGWGQ intervenant dans la liaison du cuivre. Une partie centrale est constituée d'une région hydrophobe très conservée. Un autre domaine, dit globulaire et à l'extrémité COOH-terminale, est constitué de trois hélices  $\alpha$  et de deux feuillets  $\beta$ . Ce dernier domaine est également hautement conservé au sein des mammifères (Linden et al., 2008) et possède une séquence hydrophobe qui permet l'ajout d'une ancre GPI. Une liaison disulfure existe entre deux résidus cystéines situées sur la deuxième et la troisième hélice. Un schéma représentant la structure et les différents domaines de PrP est présenté à la Figure 4.1.

##### Les modifications post-traductionnelles et les différentes formes de PrP

Une des grandes particularités de la protéine Prion est de pouvoir prendre de nombreuses conformations différentes suite à des modifications post-traductionnelles. Ces modifications ont généralement lieu lors du passage de la protéine dans le RE et l'appareil de Golgi. Ces modifications incluent un clivage d'un peptide signal NH<sub>2</sub>-terminal de 22 acides aminés très hydrophobe permettant sa translocation dans le RE, la formation d'une hélice interne avec stabilisation du pont disulfure entre deux cystéines, l'accrochage de chaînes de sucre au niveau NH<sub>2</sub>-terminal et le remplacement de l'extrémité COOH-terminal par une ancre GPI permettant l'ancrage de la protéine à la membrane à l'extérieur de la cellule. La PrP est donc une glycoprotéine de 33 à 35 kDa (Kupfer et al., 2009).

**L'ancrage GPI de PrP** L'ajout d'une ancre GPI sur un acide aminé en position COOH-terminal se nomme la glypiation. Ce processus est réalisé sur des protéines fixées à la membrane du réticulum endoplasmique. Pour permettre l'ajout d'une ancre GPI par l'enzyme transamidase GPI, il faut à la fois une séquence signal en NH<sub>2</sub>-terminal qui permet le transfert de la protéine vers le RE et une séquence signal en COOH-terminal qui est un site de reconnaissance par la transamidase. Après la glypiation, la protéine reste ancrée à la membrane via une partie de l'ancrage GPI et peut être exportée vers la membrane plasmique. Grâce aux phospholipides qu'elle contient, une ancre GPI peut favoriser la mobilité des protéines membranaires ainsi ancrées. Sa présence peut être indispensable pour activer et permettre la fonction de telles protéines. Celles-ci peuvent également être relarguées par un mécanisme de signalisation impliquant une phospholipase C spécifique.

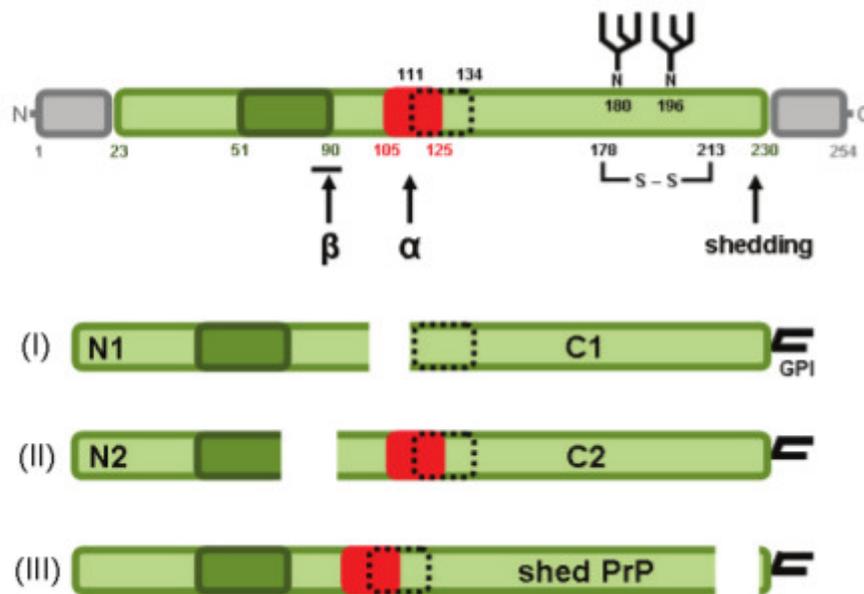


FIGURE 4.2 – Schéma représentant les sites de clivage de la protéine Prion. Le schéma représente linéairement la séquence de la PrP murine avec la séquence NH<sub>2</sub>-terminale (aa 1-22; boîte grise) éliminée par des peptidases du RE et avec la séquence COOH-terminale enlevée pour la fixation de l'ancrage GPI (aa 231-254; boîte grise). Trois types de clivage sont indiqués par des flèches. (I) clivage  $\alpha$  qui libère un fragment soluble de 11 kDa et un fragment lié à la membrane de 18 kDa. (II) clivage  $\beta$  au niveau de l'extrémité de la région de répétition octamérique produit des fragments de 9 kDa et 20 kDa. (III) clivage proche du site d'ancrage GPI qui permet la libération de presque l'entièreté de PrP dans le milieu extracellulaire.

Source : (Altmeppen et al., 2012)

L'ancre GPI ajoutée à PrP est très flexible et permet de maintenir PrP à environ 9-13 angströms de la surface de la membrane plasmique (Rudd et al., 2002). Cette caractéristique semble jouer un rôle important dans les interactions entre PrP et les autres protéines à la surface cellulaire, de type récepteur ou non (Alain and Sylvain, 2002). L'ancre GPI de PrP peut également jouer un rôle dans la sécrétion de PrP puisqu'elle permet un relargage de la protéine dans le milieu extracellulaire, favorisant sa circulation au sein d'un organisme (Caughey and Baron, 2006).

**Les formes glycosylées de PrP** Les N-glycosylations représentent des structures caractéristiques importantes des protéines de surface et influencent fortement les interactions intercellulaires. Ces structures interviennent également dans la stabilisation structurale, dans l'adressage et dans les fonctions des glycoprotéines. Ces structures varient fortement en fonction des espèces.

La protéine PrP possède deux sites de N-glycosylation permettant l'accrochage de deux chaînes de sucres de composition très variable (Rudd et al., 2001). Une cinquantaine de structures différentes ont été décrites comme pouvant être associées à PrP, ce qui engendre une grande variabilité. Le poids moléculaire de la PrP non modifiée est d'environ 25 kDa et varie entre 25 et 40 kDa après les glycosylations. Dans une cellule, PrP peut donc se retrouver sous les formes non-glycosylée, mono-glycosylée ou di-glycosylée.

Il a été montré que la conversion de PrPc en PrPsc se produit plus facilement si la protéine est non glycosylée (Taraboulos et al., 1990).

Généralement, PrPc se présente sous la forme de monomère mais peut interagir avec une autre PrPc ou PrPsc et former des dimères. Il a été supposé que la glycosylation de PrP pouvait moduler la formation de ces dimères, en permettant aux protéines en membranes de se rapprocher et d'interagir, ce qui semble indispensable pour la propagation de la maladie à Prion (Korth et al., 2000) (Priola and Lawson, 2001).

Des problèmes dans la biosynthèse de PrP peuvent engendrer un mauvais repliement de PrP et donc empêcher la glycosylation de la protéine, ce qui pourrait perturber sa structure, sa mobilité, son acheminement jusqu'à la membrane plasmique et sa conversion en PrPsc (Rudd et al., 2002). Le profil de glycosylation de PrP semble être altéré dans les organismes âgés (Goh et al., 2007).

**Les formes phosphorylées de PrP** PrP contient plusieurs sites de phosphorylation. En 2000, il a été montré que la PKC, la protéine kinase CK2 (casein kinase 2) et deux tyrosines kinases étaient capables de phosphoryler *in vitro* une rbPrP (forme recombinante de la PrP bovine). Il ont également montré qu'un traitement thermique doux de la rbPrP favorise la phosphorylation. Ceci peut être expliqué par le fait que la chaleur déstabilise la structure de la protéine et la déplie rendant accessible les sites de phosphorylation. Il a été suggéré à l'époque que la phosphorylation pouvait moduler l'activité biologique de PrP (Negro et al., 2000).

La présence de PrP dans le cytoplasme, dans lequel résident de nombreuses kinases, a été décrite. En 2009, Giannopoulos et al. ont montré chez les cellules neuronales que la phosphorylation de la PrP sur sa serine 43 pouvait induire un changement de conformation, rendre la protéine résistante à la protéinase K et favoriser la formation d'agrégats. Cette forme phosphorylée de PrP, également sensible aux phosphatases alcalines, a été décrite dans les souris infectées par une maladie à Prions. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de PrP pourrait représenter un des mécanismes de conversion de PrPc en PrPsc *in vivo* (Giannopoulos et al., 2009).

**Les formes clivées de PrP** PrP peut exister sous la forme de fragments générés par un clivage (Altmeyen et al., 2012). Trois sites de clivage ont été jusqu'à présent décrits et parmi ceux-ci, deux sites sont principalement décrits. Un site de clivage se trouve au niveau du domaine central hydrophobe et produit un fragment NH<sub>2</sub>-terminal soluble et non glycosylé ainsi qu'un fragment COOH-terminal qui reste ancré en membrane (clivage  $\alpha$ ).

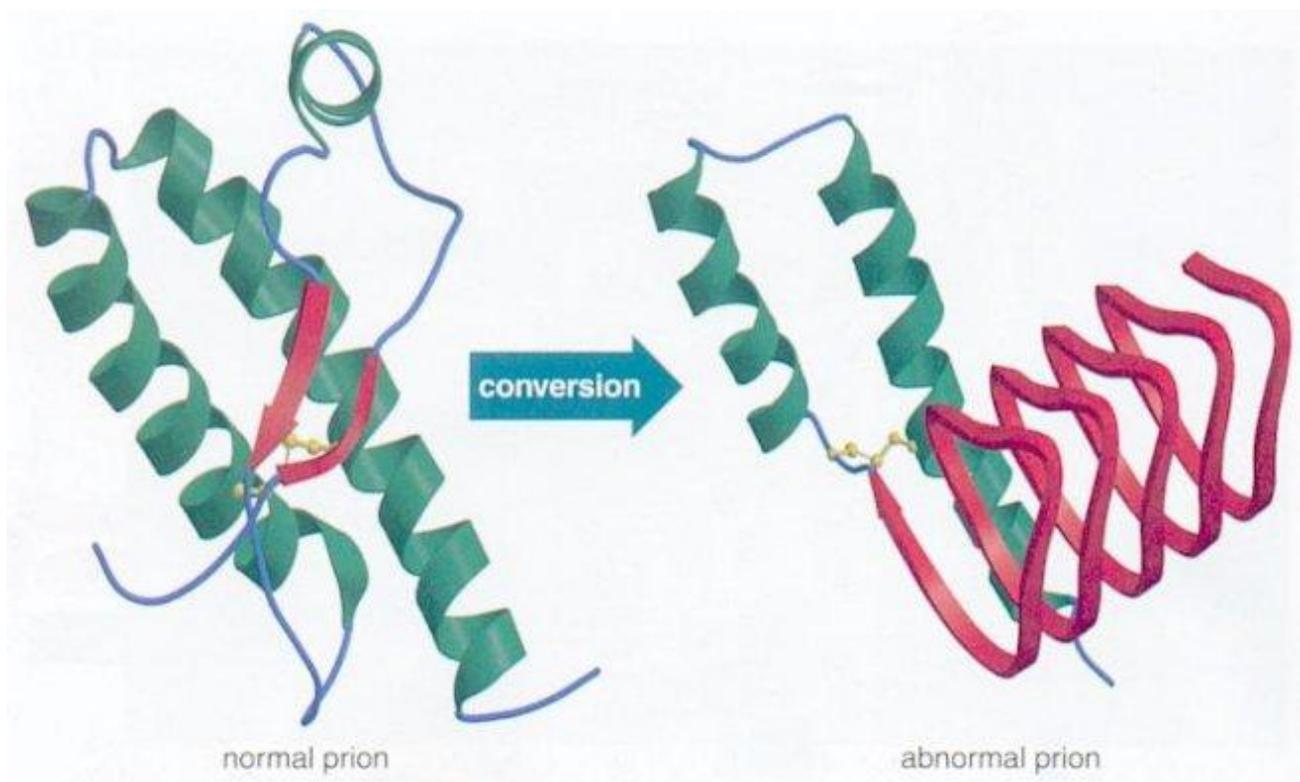


FIGURE 4.3 – Schéma représentant les formes normale (PrPc) et anormale (PrPsc) de la protéine Prion. Au niveau de la structure secondaire, il a été montré que la forme PrPc est principalement composée d'hélices  $\alpha$  (40 % d'hélices  $\alpha$  et 3 % de feuillets  $\beta$ ) alors que la forme PrPsc est composée majoritairement de feuillets  $\beta$  (30 % d'hélices  $\alpha$  et 45 % de feuillets  $\beta$ )

Source : (Mays and Ryou, 2010)

Ce dernier peut se retrouver sous une forme non-, mono- ou di-glycosylée. Ce type de clivage se fait spontanément dans la cellule. Un autre, le clivage  $\beta$ , se situe au niveau de l'extrémité de la région de répétition octamérique et produit des fragments de 9 kDa et 20 kDa. Un troisième site de clivage, situé en amont de l'ancre GPI, engendre la libération d'une forme entière de PrP sécrétée dans le milieu extracellulaire. Ces trois sites de clivage sont représentés à la Figure 4.2.

Il semblerait que le clivage dans le domaine central hydrophobe de PrP ne soit possible que chez la forme normale de PrP et non chez la forme anormale, PrP<sup>Sc</sup>. Le changement de conformation doit impliquer ce domaine qui se retrouve sous une forme inaccessible pour le clivage dans PrP<sup>Sc</sup>. Ce mécanisme de clivage pourrait être protecteur vis-à-vis de la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (Linden et al., 2008).

De nombreuses recherches essayent de mettre en évidence les protéases responsables des différents clivages. Parmi les protéases supposées responsables du clivage  $\alpha$  et parfois du clivage  $\beta$ , on retrouve la famille des ADAM (A disintegrin and metalloprotease) et les protéases lysosomales à sérine (Altmeyen et al., 2012). Il a également été proposé que le clivage de PrP pouvait être dépendant d'un stress oxydatif ou le résultat d'une dégradation partielle de la protéine (Altmeyen et al., 2012).

**Autres conformations de PrP** Il a été montré que PrP<sup>C</sup> peut apparaître sous deux formes transmembranaires différentes grâce à la présence de deux séquences, à savoir une séquence « Stop Transfer Effector (STE) » et un domaine hydrophobe nommé « TransMembrane Domain (TMD) ». Les deux formes transmembranaires de PrP sont ctmPrP (COOH-terminale transmembrane) dont l'extrémité COOH-terminale est située dans la lumière du RE et ntmPrP (NH<sub>2</sub>-terminale transmembrane) dont l'orientation est inverse. La ctmPrP qui possède une ancre GPI ancrée dans la membrane est une forme particulière de PrP puisque son peptide signal NH<sub>2</sub>-terminal n'a pas été clivé et ses N-glycosylations sont immatures. La ntmPrP, décrite uniquement *in vitro*, est également une forme particulière dépourvue d'ancre GPI et avec ses sites de glycosylation non-utilisés *in vitro* (Alain and Sylvain, 2002).

Il a été montré que ctmPrP pouvait être considéré comme une forme neurotoxique intermédiaire qui s'accumule dans le RE et y crée un stress (Shi and Dong, 2011).

### 4.4.3 Les formes PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup>

#### Les origines de la conversion en PrP<sup>Sc</sup> – Gain et perte de fonction

Grâce à l'utilisation de protocoles d'extraction protéique qui associent différents détergents, des centrifugations différentielles et une phase de sédimentation sur gradient de sucrose, PrP<sup>Sc</sup> a été isolée de façon reproductible dans les fractions infectieuses. Cette protéine, insoluble dans les détergents et résistante aux protéases - caractéristique à l'origine de son nom - (Prusiner et al., 1982) apparaît sous la forme de structures fibrillaires. PrP<sup>Sc</sup> est une conformation anormale de PrP<sup>C</sup>.

Il a été montré que des souris dont le gène PRNP a été invalidé développaient une résistance aux maladies à Prions mais aussi une résistance aux infections artificielles avec PrP<sup>Sc</sup>. Ces observations suggèrent que la présence de PrP<sup>C</sup> de l'hôte est indispensable pour le développement de la maladie et qu'une conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> est à l'origine de la propagation de la maladie (Prusiner et al., 1982).

La présence de PrP<sup>Sc</sup> dans la cellule peut être engendrée par une conversion spontanée de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (forme sporadique), une infection avec une PrP<sup>Sc</sup> étrangère à l'hôte (forme infectieuse), une mutation dans le gène codant pour PrP<sup>C</sup> (forme génétique), une anomalie au niveau des modifications post-traductionnelles de la PrP<sup>C</sup> ou à cause de la présence d'autres partenaires qui favorisent la conversion (Linden et al., 2008).

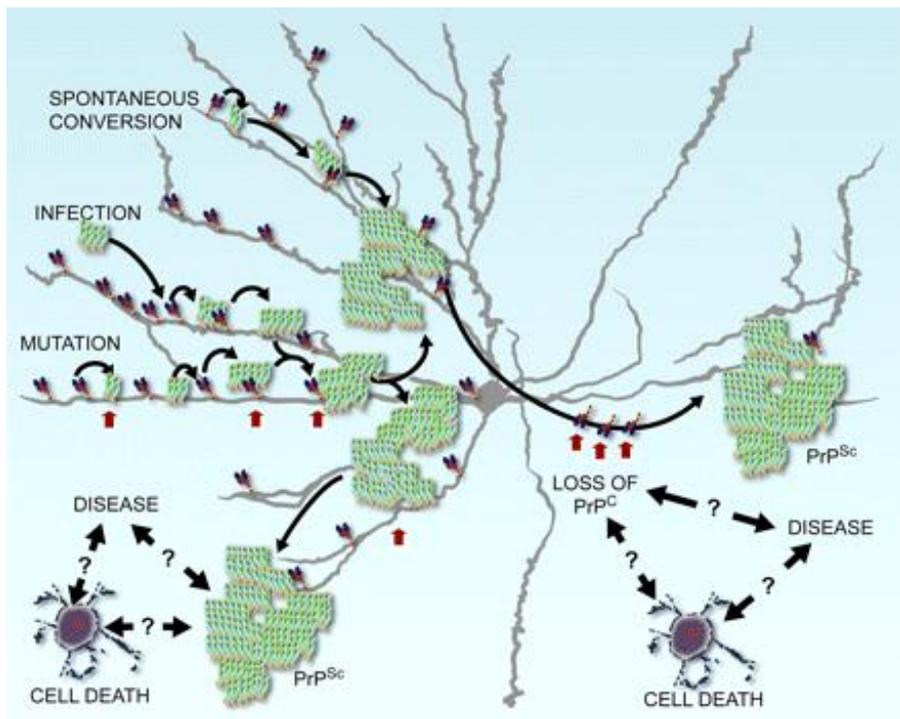


FIGURE 4.4 – Schéma représentant les causes de la conversion de PrPc en PrPsc. Le changement de conformation peut avoir lieu spontanément, par infection, à cause de mutations, suite à des perturbations engendrant une perte de fonction, etc.

Source : (Linden et al., 2008)

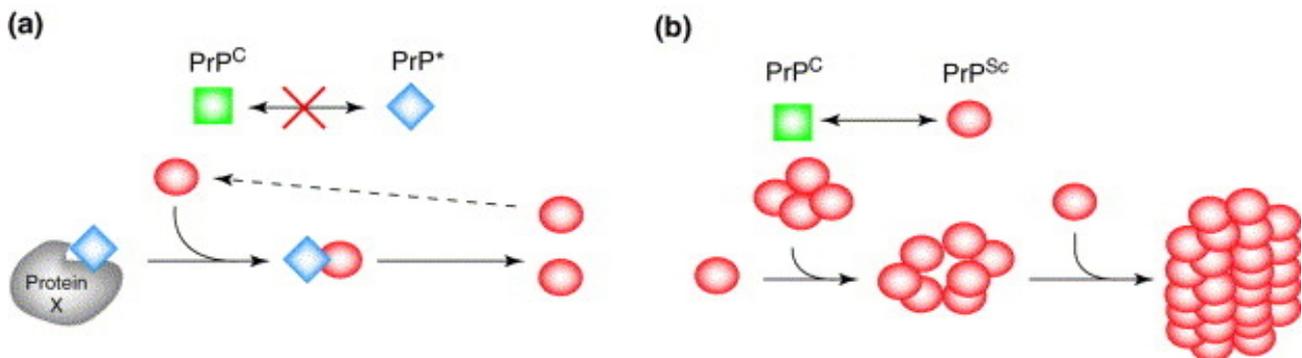


FIGURE 4.5 – Schéma représentant les modèles de changement de conformation. (a) modèle de polymérisation assistée par une amorce. La PrPsc serait plus stable que la PrPc, rendant la conversion irréversible. PrPc pourrait soit spontanément prendre une forme intermédiaire (PrP\*), soit interagir avec un partenaire et former une molécule intermédiaire. Cette forme ou cette molécule intermédiaire favoriserait la rencontre entre PrPc et PrPsc. PrPsc agirait alors comme une « amorce » et convertirait PrPc en PrPsc, ou en une autre forme intermédiaire. (b) modèle de nucléation-polymérisation dans lequel PrPsc se présente comme un noyau qui va initier une polymérisation. Le changement de PrPc en PrPsc serait réversible tant que la protéine reste seule et ne forme pas d'agrégat. PrPsc étant moins stable que PrPc, l'agrégation de la PrPsc permettrait alors sa stabilisation et formerait un noyau auquel des PrPc ou d'autres PrPsc se lieraient. Cette interaction aurait pour conséquence la conversion de PrPc en PrPsc et cette fois-ci de façon stable et non réversible puisque déjà sous la forme d'agrégats.

Source : (Soto and Saborío, 2001)

### Description de PrPc et PrPsc

Au niveau de la structure primaire, il ne semble pas y avoir de différence entre la forme normale (PrPc) et la forme anormale (PrPsc) de la protéine Prion. Au niveau de la structure secondaire, il a été montré que la forme PrPc est principalement composée d'hélices  $\alpha$  (40 % d'hélices  $\alpha$  et 3 % de feuillets  $\beta$ ) alors que la forme PrPsc est composée majoritairement de feuillets  $\beta$  (30 % d'hélices  $\alpha$  et 45 % de feuillets  $\beta$ ) (Figure 4.3). Suite à ces observations, il a été proposé que la conversion de PrPc en PrPsc est la conséquence d'un réel changement de conformation de la protéine. Cependant, cette proposition est remise en question par la communauté scientifique. En effet, elle repose sur des comparaisons entre des PrP recombinantes solubles, sans modification post-traductionnelle, et des particules infectieuses composées à la fois d'agrégats de PrPsc avec des modifications post-traductionnelles, et de protéines associées dont l'identité est partiellement connue à ce jour.

Il faut cependant noter qu'une augmentation de la proportion de feuillets  $\beta$  tend à donner des formes compactes (agrégats protéiques) résistantes aux protéases. Dans le cas de PrPsc, ces agrégats semblent impossibles à éliminer et s'accumulent dans l'espace extracellulaire et parfois dans la cellule elle-même. Des changements de conformation peuvent être dus à un repliement partiel ou à un repliement alternatif de l'entièreté de la protéine (souvent décrits chez la levure et le champignon *Podospora anserina*); ceci n'est toujours pas élucidé de nos jours. Plusieurs sites sur la protéine où des changements de conformation peuvent avoir lieu ont été décrits.

La digestion par la protéinase K est la technique la plus utilisée pour faire la différence entre les deux conformations, la forme PrPsc étant résistante à cette digestion. L'utilisation de la protéinase K conduit à l'élimination totale de PrPc et seulement de la portion NH<sub>2</sub>-terminale de la PrPsc, le reste de PrPsc reste insoluble et peut toujours être détectée par western blot (Kupfer et al., 2009).

Certaines études ont montré que le profil de glycosylation de PrPsc est le même que celui de PrPc et qu'aucune différence au niveau de l'ancre GPI ne permettait de distinguer ces deux conformations. Cependant, d'autres études suggèrent qu'une complexification de la structure des glycosylations soit caractéristique de PrPsc (Linden et al., 2008, Ryou et al., 2007).

### Les modèles de changement de conformation

Le mécanisme menant à la conversion de PrPc en PrPsc n'est pas encore complètement élucidé à ce jour et plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette conversion (Voir la Figure 4.4). L'idée généralement admise est que PrPsc en liant PrPc, la transforme en PrPsc, ceci pouvant se faire spontanément ou avec l'aide d'autres partenaires protéiques ou non. Deux types de modèles de conversion ont été développés et sont présentés à la Figure 4.5.

Le premier modèle porte le nom de modèle de polymérisation assistée par une amorce. La PrPsc serait plus stable que la PrPc, rendant la conversion irréversible. PrPc pourrait soit spontanément prendre une forme intermédiaire, soit interagir avec un partenaire et former une molécule intermédiaire. Cette forme ou cette molécule intermédiaire favoriserait la rencontre entre PrPc et PrPsc. PrPsc agirait alors comme une « amorce » et convertirait PrPc en PrPsc, ou en une autre forme intermédiaire, par contact direct (Ryou et al., 2007, Soto, 2004) (Figure 4.5a).

Le deuxième modèle porte le nom de modèle de nucléation-polymérisation dans lequel PrPsc se présente comme un noyau qui va initier une polymérisation. Le changement de PrPc en PrPsc serait réversible tant que la protéine reste seule et ne forme pas d'agrégat. PrPsc étant moins stable que PrPc, l'agrégation de la PrPsc permettrait alors sa stabilisation et formerait un noyau auquel des PrPc ou d'autres PrPsc se lieraient. Cette interaction aurait pour conséquence la conversion de PrPc en PrPsc et cette fois-ci de façon stable et non réversible puisque déjà sous la forme d'agrégats (Bousset and Melki, 2005). Il a été proposé que lorsque l'agrégat de PrPsc atteint



une certaine masse, il devient instable et se dissocie en plusieurs morceaux. Chaque morceau pouvant devenir un noyau et démarrer une nouvelle polymérisation ; ce qui engendre un phénomène d'amplification (Figure 4.5b).

#### 4.4.4 Localisation de PrP

La protéine PrP, qui peut se présenter sous de nombreuses formes, peut être localisée dans de nombreux compartiments cellulaires. La conversion de PrPc en PrPsc peut apparemment avoir lieu dans le milieu extracellulaire et/ou dans les différents compartiments présentés ci-dessous.

##### À la membrane plasmique et dans le milieu extracellulaire

PrPc se retrouve principalement ancrée au niveau de la membrane plasmique et plus précisément dans des microdomaines riches en cholestérol et en sphingolipides nommés « lipid rafts » ou « radeaux lipidiques » par son ancre GPI (Linden et al., 2008). Au niveau de la membrane plasmique, PrPc peut être secrétée dans l'espace extracellulaire dans des vésicules ou relarguée telle quelle après un clivage en amont de son ancre GPI. La PrPc présente dans l'espace extracellulaire peut donc ensuite être endocytée par les cellules et se retrouver dans des vésicules tapissées de clathrine ou associée à la cavéoline (Linden et al., 2008).

##### Entre le RE et la membrane plasmique

Pour arriver jusqu'à la membrane, PrPc passe dans plusieurs compartiments cellulaires lors de sa biosynthèse. PrPc est transféré dans le RE grâce à une séquence signal ; cette séquence sera clivée dans le RE. Dans ce compartiment, la PrPc subit des modifications post-traductionnelles avec par exemple des glycosylations et/ou glypiations. On y retrouve principalement les PrPc avec ancre GPI, les ntmPrP et les ctmPrP. Les PrPc peuvent ensuite migrer dans l'appareil de Golgi. L'appareil de Golgi, organe intermédiaire entre le RE et la membrane plasmique, régule le transport vésiculaire et l'exocytose. Certaines modifications post-traductionnelles ont également lieu dans ce compartiment. Les PrPc peuvent donc se retrouver au niveau des membranes de vésicules en transit vers la membrane plasmique ou vers des lysosomes.

##### Dans le cytoplasme

Il semblerait que PrPc puisse être localisée dans le cytoplasme mais ceci est fortement débattu. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer cette localisation particulière (Linden et al., 2008). Il a été proposé que PrPc se retrouve dans le cytoplasme lors d'une anomalie de séquence dans la séquence signal permettant le transfert dans le RE. Il semblerait également qu'une inhibition de l'activité du protéasome engendre une accumulation de PrPc dans le cytoplasme. Les conséquences de cette localisation restent floues et ont été décrites à la fois comme positives pour la cellule avec par exemple un rôle anti-apoptotique de la forme cytosolique de PrPc et comme négatives avec l'association de cette forme avec des pathologies neurologiques (Linden et al., 2008).

##### Dans le noyau

PrPc peut également être localisée dans le compartiment nucléaire des cellules et notamment dans celles qui se divisent activement (Morel et al., 2008). Lorsque PrPc est tronquée au niveau de son COOH-terminal, une séquence signal nucléaire (ou en anglais Nuclear Localization Signal) est démasquée, permettant ainsi à la protéine d'être transloquée dans le noyau. De récentes recherches ont mis en évidence que PrPc pouvait se

<b>Ligands</b>	<b>Descriptions</b>
Synapsin Ib	Synaptic vesicle release regulator
PSD-95	Postsynaptic density scaffolding protein
Grb	Adaptor protein for tyrosine kinase receptors
GASP	G protein-coupled receptor-associated sorting protein
14-3-3	Intracellular scaffolding protein
CK2	Protein kinase
Fyn, ZAP-70	Protein tyrosine kinases, soluble
PTPD1	Protein tyrosine phosphatase, soluble
Aldolase C/zebrin II	Glycolytic pathway enzyme
Bcl-2	Anti-apoptotic protein
Fbx6/Fbxo2	Substrate recognition unit of ubiquitin ligase complex
GFAP	Intermediate filament protein
DNA	Nucleic acid
RNA	Nucleic acid
hnRNP A2/B1	RNA-binding protein
Nrf2	Transcription factor
Pint1	Exonuclease motif
Hsp60	Chaperone
$\alpha$ B-crystallin	Stress-induced small hsp
BiP/Grp78	Endoplasmic reticulum chaperone
Hop/STH1	Co-chaperone
Laminin	Extracellular matrix component
LRP/LR	Laminin receptor precursor/laminin receptor
NCAM	Cell adhesion molecule
LRP1	Scavenger receptor
$\beta$ -Dystroglycan	Transmembrane protein
APLP1	Amyloid precursor-like protein
Heparin/heparan sulfate	Glycosaminoglycans
50, 56, 64, 72, 110 kDa proteins	Unidentified

TABLEAU 4.2 – Tableau représentant les protéines capables de lier la protéine Prion.

Source : (Linden et al., 2008)

localiser au niveau de la membrane nucléaire et co-localiser avec les histones H1 et H3 ainsi qu'avec la Lamine-B (Strom et al., 2011).

#### **Au niveau de la mitochondrie**

Il a été montré que les souris transgéniques présentant un nombre élevé de PrPc développaient spontanément des dysfonctions neurologiques de façon dépendante de l'âge. Ces souris transgéniques n'avaient pas besoin d'infection par PrPsc pour développer des dommages neurologiques. Une localisation particulière de PrPc au niveau des mitochondries a été décrite dans les cellules neuronales de ces souris transgéniques âgées (Hachiya et al., 2005).

#### **4.4.5 Partenaires protéiques et non-protéiques de PrP**

Les partenaires de PrP (Tableau 4.2) sont de différentes natures. En effet, il peuvent être des protéines, des peptides, des acides nucléiques (ADN et ARN) et des métaux avec principalement le cuivre. Les rôles joués par ces différents partenaires ne sont pas totalement déterminés. Ces partenaires peuvent être impliqués dans les fonctions physiologiques de PrPc, dans la conversion de PrPc en PrPsc et/ou dans la propagation et le développement des maladies à Prions (Linden et al., 2008).

#### **4.4.6 Fonctions de PrP**

L'utilisation de souris présentant une invalidation du gène codant pour PrP (PrP knock-out mice) et de souris transgéniques a permis d'étudier les fonctions de PrPc (Weissmann and Flechsig, 2003). Ces souris présentent d'importantes anomalies à différents niveaux : cognitif, musculaire et immunitaire. Au niveau de l'organisme entier, PrPc semble donc impliquée dans le système nerveux avec principalement un rôle dans la mémoire et dans le maintien des cellules neuronales, dans le système immunitaire avec un rôle encore non défini, dans l'activité musculaire et la mobilité, etc. (Linden et al., 2008). Ces résultats suggèrent que PrPc possède différentes fonctions au sein de la cellule (Figure 4.6).

Elle a été décrite comme étant impliquée dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires (Lee and Baskakov, 2010), dans l'adhérence (Schmitt-Ulms et al., 2001) et la communication inter-cellulaire (Solis et al., 2010), dans la transduction du signal (Linden et al., 2008), dans la protection cellulaire face à un stress mais aussi dans la mort cellulaire par apoptose (Linden et al., 2008).

Il semblerait qu'une incubation avec PrPc retarde la différenciation et promeut la prolifération cellulaire chez des cellules d'embryon humain (Lee and Baskakov, 2010). Une autre étude a montré qu'un arrêt du cycle cellulaire prouvait engendrer une augmentation de l'expression de PrPc chez les cellules neuronales (Miyazawa et al., 2010). PrPc est surexprimée dans les cellules cancéreuses gastriques et cette surexpression semble promouvoir la prolifération et la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (Liang et al., 2007). Cependant, il semblerait que le rôle joué par PrPc dans le cycle cellulaire soit différent en fonction du type cellulaire (Linden et al., 2008, Mehrpour and Codogno, 2010).

PrPc joue un rôle protecteur vis-à-vis des stress oxydatifs et des dommages à l'ADN dans les cellules neuronales. Des cellules déficientes en PrPc montrent plus de dommages à l'ADN causés par des ROS, sont plus sensibles au stress oxydatif et sont donc moins viables en culture que des cellules qui expriment PrPc (Watt et al., 2007). Ce rôle protecteur face au stress oxydatif découlerait de sa faculté à lier des ions métalliques et de sa participation aux mécanismes antioxydants. Il a été montré que PrPc pouvait avoir une activité enzymatique proche de celle d'une superoxyde dismutase dans certaines conditions. On parle dans ce cas d'activité « superoxyde dismutase

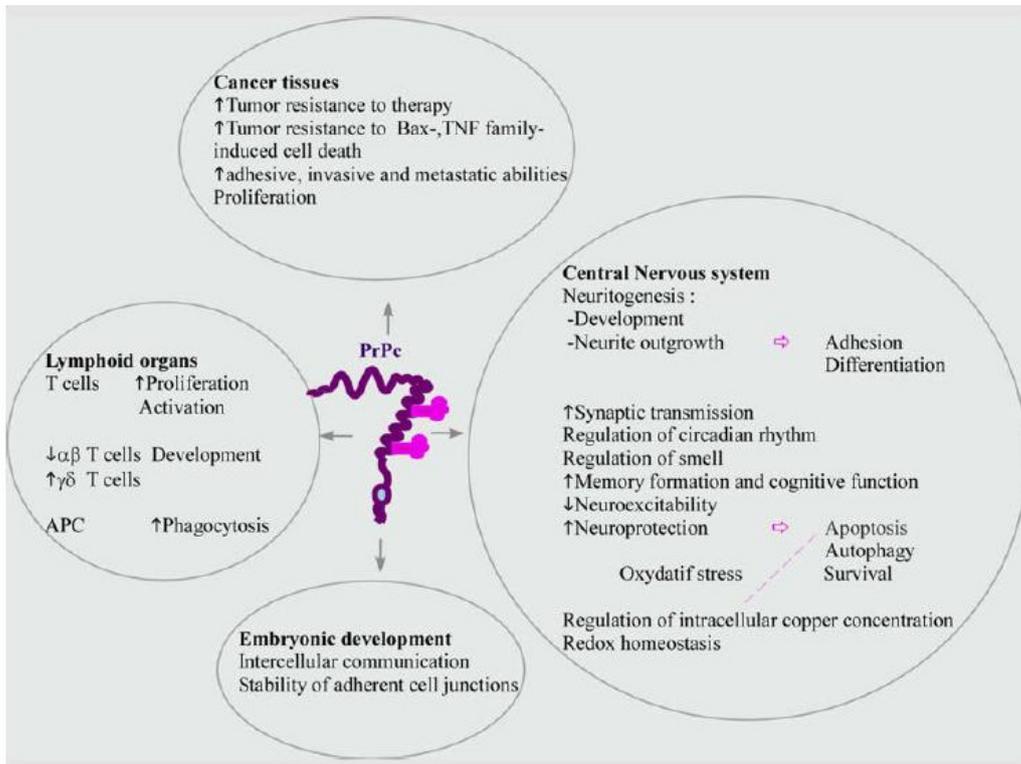


FIGURE 4.6 – Schéma représentant les rôles physiologiques de la protéine Prion.

Source : (Mehrpour and Codogno, 2010)

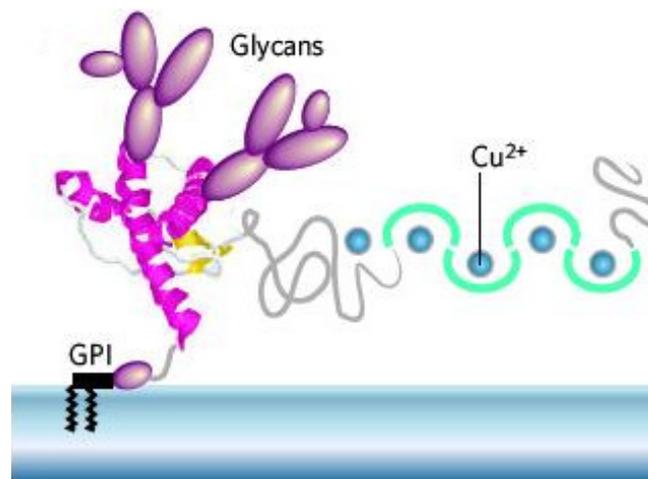


FIGURE 4.7 – Schéma représentant la liaison de Cu(II) avec la protéine Prion. Un domaine dit « non-structuré » avec une extrémité NH<sub>2</sub>-terminal flexible possédant une répétition de 5 octapeptides (en turquoise) avec dans cette figure 5 atomes de cuivre. Deux N-glycosylation (en rose) sont également visibles. Le domaine globulaire COOH-terminal possède une séquence hydrophobe qui permet l'ajout d'une ancre GPI.

Source : (Caughey and Baron, 2006)

like ». Cette activité serait dépendante de la région NH<sub>2</sub>-terminal qui contient 4 à 5 répétitions de huit résidus ou octapeptides capables de lier le cuivre (Malaisé et al., 2008).

## 4.5 Liens entre le cuivre et la PrP

PrPc est capable de lier entre deux et six ions Cu(II) (Figure 4.7), en fonction du pH et du cuivre disponible, au niveau de la zone de répétitions d'octapeptides (PHGGGWGQ). Ces répétitions d'octapeptides présentent une plus forte affinité pour Cu(II) par rapport à Cu(I) et peuvent lier d'autres ions métalliques (Linden et al., 2008). Cette liaison avec les ions Cu(II) semble pouvoir induire un changement de conformation de PrPc avec surtout une modification de la forme en trois dimensions de la partie NH<sub>2</sub>-terminale qui devient moins flexible après liaison avec le cuivre. Il n'a pas été déterminé si ce changement de conformation jouait un rôle particulier. Il semblerait que la présence du cuivre puisse faciliter son association avec une autre PrP et former des dimères. Cependant, il n'est pas clairement établi qu'une liaison avec le cuivre pouvait mener à la conversion de PrPc en PrPsc et être associé avec les maladies à Prions (Quaglio et al., 2001) (Chiesa et al., 2001).

En analysant la séquence du promoteur du gène PRNP, plusieurs séquences avec un motif très conservé nommés « éléments de réponse aux métaux » ou en anglais « Metal Response Elements ou MRE » ont été mises en évidence. Il est donc probable que l'expression de PrPc dépende directement de la présence de cuivre et peut-être d'autres métaux (Varela-Nallar et al., 2006a). L'expression de PrP semble dépendante de l'activité de la protéine chaperonne du cuivre et facteur de transcription Atox1 (Wright et al., 2009) mais également des facteurs de transcription Sp1 et MTF1. L'abondance protéique et la translocation nucléaire de ces facteurs de transcription sont influencés par le cuivre.

Comme présenté auparavant, PrPc peut jouer un rôle protecteur face à un stress oxydatif et peut être considérée comme une protéine antioxydante. Il est connu que les ions de cuivre, par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, peuvent contribuer à la production de ROS et provoquer un stress oxydatif. PrPc, en liant les ions de cuivre, peut donc jouer un rôle protecteur. Ces observations ont été retrouvées chez des cellules neuronales de souris et chez les cellules humaines HeLa (Qin et al., 2009). Il semblerait également que l'expression de PrPc puisse influencer l'expression d'autres protéines ayant des propriétés antioxydantes (Rachidi et al., 2005). De plus, une activité similaire à la superoxyde dismutase qui n'est plus observable en l'absence de la zone de répétitions d'octapeptides et qui nécessite la présence d'au moins deux ions de cuivre a été décrite plusieurs fois (Choi et al., 2007).

Des recherches menées par Pauly et al. ont permis de mettre en évidence qu'une augmentation de la concentration en Cu(II) dans l'environnement de cellules provenant de neuroblastome de souris provoquait l'endocytose de PrPc ainsi qu'une redistribution de la protéine au niveau de la surface cellulaire (Pauly and Harris, 1998). Ces résultats suggèrent que la PrPc pourrait servir de récepteur-transporteur qui permet à la cellule d'absorber des ions de cuivre provenant du milieu extracellulaire. Les ions de cuivre internalisés pourraient ensuite être distribués à des protéines capables de lier le cuivre, permettant ainsi à PrPc d'être recyclée et de se trouver de nouveau au niveau de la membrane plasmique pour faire entrer de nouveaux ions de cuivre (Pauly and Harris, 1998). Cependant, une surexpression de PrPc ne semble pas modifier l'entrée du cuivre dans la cellule.

La zone contenant les répétitions d'octapeptides a été décrite comme étant capable de réduire Cu(II) en Cu(I) *in vitro*, faisant de PrPc une potentielle métalloréductase (Varela-Nallar et al., 2006b).

PrPc pourrait également jouer le rôle de senseur de cuivre car son expression et son activité varient en fonction de la présence d'ions de cuivre. Il a été montré que PrPc pouvait interagir avec les acides nucléiques et que celle-ci possédait quelques similitudes avec certains facteurs de transcription à doigts de zinc, ce qui suggère que PrPc pourrait jouer le rôle d'un facteur de transcription possédant une activité transcriptionnelle dépendante



de la présence de cuivre. PrPc pourrait peut-être se comporter comme une protéine à doigts de zinc mais avec des ions Cu(II) à la place du zinc (Biro, 2003, Walter et al., 2007).

## 4.6 Liens entre le vieillissement et la PrP

La plupart des études sur PrP ont été réalisées dans le contexte des maladies à Prions ou pour déterminer le rôle physiologique de PrPc dans le système nerveux central. Il faut noter que ces recherches se font majoritairement chez la souris. Peu d'études concernant le rôle potentiel de PrPc dans le vieillissement humain et plus particulièrement au niveau cellulaire, ont été réalisées à ce jour. Cependant, plusieurs éléments tentent à montrer que PrPc et le vieillissement sont liés.

Premièrement, l'étude du vieillissement des souches de souris nulles KO (knock-out) pour PrPc a apporté de nouveaux éléments quant à l'implication de PrPc dans les mécanismes du vieillissement. En résumé, il semblerait que l'absence de PrPc dans ces souris provoquent des anomalies au niveau du système nerveux avec des perturbations au niveau de la mémoire avec une augmentation de la mort neuronale, au niveau du système immunitaire, au niveau du système olfactif et comportemental, au niveau musculaire et de la mobilité, etc. (Katamine et al., 1998, Le Pichon et al., 2008, Benvegnù et al., 2011). Ces observations suggèrent que PrPc pourrait jouer un rôle important dans le vieillissement de la souris car les différents systèmes touchés le sont également lors du vieillissement.

Deuxièmement, il a été découvert qu'une souche de souris transgéniques possédant un grand nombre de copies de la forme non mutée de PrPc et qui accumulent PrPc, présentent un dysfonctionnement neurologique dépendant de l'âge. Les symptômes apparaissent spontanément chez les souris âgées, sans infection avec la PrPsc. Les souris âgées sauvages et mutées présentent une diminution de l'activité du protéasome par rapport aux souris jeunes. Il a également été observé que PrPc était localisée au niveau de la mitochondrie chez les souris âgées mutées, ce qui n'est pas le cas chez les souris sauvages. Cette localisation est accompagnée d'une diminution de l'activité de la SOD2 (Mn SOD) et de différents marqueurs de l'apoptose (Hachiya et al., 2005).

Troisièmement, certaines recherches ont montré que la PrPc présentait des modifications liées à l'âge dans son profil de N-glycosylation chez la souris (Goh et al., 2007). En effet, il semblerait que les oligosaccharides présents sur PrPc chez les souris âgées soient plus complexes, ce qui a déjà été décrit comme étant caractéristiques de PrPsc. Il a été suggéré que le vieillissement pourrait engendrer un changement de conformation (peut-être dû à des modifications dans les profils de N-glycosylation) et une perte ou un gain de fonction de PrPc. Cette dernière pourrait alors se comporter comme PrPsc.

Ces trois premières études suggèrent que l'absence, la surabondance ou des modifications du profil de N-glycosylations de PrPc pourrait influencer les mécanismes du vieillissement chez la souris.

De nombreuses maladies neurodégénératives dont la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson partagent deux caractéristiques : la première est que plus de 80 % des cas sont sporadiques et la seconde est que, bien que la plupart des protéines mutées spécifiques à une maladie soient exprimées dans l'embryogenèse, ces maladies neurodégénératives se déclarent tardivement et semblent dépendantes de modifications de conformation. Cela donne à penser qu'un événement survient avec le vieillissement (Prusiner, 2001).

Une étude plus récente, réalisée chez les bovins, a montré que la proportion de PrPc était beaucoup moins importante au profit d'une forme insoluble dans les cerveaux de bovins âgés par rapport aux jeunes (Yoshioka et al., 2010). Il faut noter qu'au Japon, la plupart des cas d'encéphalopathies spongiformes atypiques chez les bovins sont signalés chez des individus âgés. Cette forme insoluble n'est cependant pas de type PrPsc, puisque elle est sensible à la protéinase K, et ne présente pas de modifications dans son profil de glycosylations.



Chez les cellules eucaryotes, un des mécanismes importants pour l'élimination des protéines mal repliées est le protéasome. Les protéines anormales sont stockées dans le réticulum endoplasmique pour être ensuite exportées vers le cytoplasme et dégradées par le protéasome (Coux and Piechaczyk, 2000). Ce système est impliqué dans l'élimination des formes normales et anormales de PrP (Coux and Piechaczyk, 2000). Il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome engendrait une accumulation d'environ 10 % de la PrPc dans le cytoplasme sous une forme non-glycosylée et ubiquitinylée. Ces protéines se présentent avec des caractéristiques de PrPsc, c'est-à-dire en agrégats insolubles et qui résistent à la digestion par la protéinase K sans avoir de caractéristique infectieuse. Il a été supposé que la diminution de l'efficacité du protéasome au cours du vieillissement pourrait avoir comme conséquence une accumulation de PrPc dans le cytoplasme. PrPc cytoplasmique pourrait également être exportée dans le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire (Jaegly et al., 1998, Rybner et al., 2002) .

La théorie des radicaux libres propose que des molécules (ADN, ARN, protéines, etc.) altérées à cause d'oxydations s'accumulent au cours du vieillissement. D'une part, PrPc est connue pour jouer un rôle protecteur vis-à-vis des stress oxydatifs (Brown et al., 2001) et d'autre part, cette protéine est impliquée dans la formation d'agrégats. En outre, des dépôts de protéines anormales peuvent induire un stress oxydatif, un dysfonctionnement du protéasome et des mitochondries (Butterfield and Kanski, 2001). Deux caractéristiques de PrPc font que celle-ci pourrait jouer un rôle dans le vieillissement.

Enfin, nous avons précédemment montré que PrPc est surexprimée dans les FDHs WI-38 en sénescence répllicative et dans les FDHs du derme en sénescence induite prématurément par les UVB (Scheckhuber et al., 2009).



# Chapitre 5

## Les objectifs et le modèle

### 5.1 Les objectifs

Comme nous venons de le voir dans l'introduction, il a été montré que des cellules soumises à un stress oxydatif pouvaient entrer en sénescence prématurée. Ces cellules présentent alors un phénotype proche de celui observé chez les cellules en sénescence répllicative. Les cellules en sénescence répllicative ont largement été décrites et plusieurs modèles de sénescence induite prématurément par des stress ont été mis au point par notre équipe sur différents types cellulaires (Toussaint et al., 2000a).

De nombreuses recherches soulignent le fait que le cuivre pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de la sénescence. Ainsi, le cuivre a été décrit comme étant impliqué dans le développement de maladies liées au vieillissement telles que des maladies neurodégénératives (Brewer, 2007). De plus, lorsque les mécanismes impliqués dans l'homéostasie du cuivre sont altérés, ce qui est le cas dans certaines maladies génétiques, des marqueurs similaires à ceux de la sénescence apparaissent (Mansouri et al., 1997, Trocello et al., 2009). Les travaux réalisés par l'équipe de recherche du Dr. Heinz D. Osiewacz, auxquels nous avons participé dans le cadre d'un projet de recherche européen ont montré que le cuivre pouvait jouer un rôle important dans la sénescence chez les cellules humaines. Ces auteurs ont démontré que la mutation d'un facteur de transcription contrôlant l'homéostasie du cuivre avait un impact sur le phénotype et l'espérance de vie du champignon filamenteux *Podospora anserina*, que la distribution du cuivre au sein de cellules provenant de ce champignon changeait au cours du vieillissement et que des gènes connus pour être régulés par le cuivre étaient surexprimés dans les cellules « âgées » de ce champignon (voir annexes - chapitre 10). Qu'en est-il chez l'Homme? Existe-t-il un lien réel entre le cuivre et le vieillissement?

L'objectif principal de cette thèse était de déterminer si le cuivre joue un rôle dans la sénescence chez les FDHs WI-38. Notre travail se divise en plusieurs parties.

La première partie de ce travail porte sur le fait que les cellules en sénescence répllicative peuvent présenter un bouleversement au niveau de l'homéostasie du cuivre sous la forme d'un changement de la distribution du cuivre intracellulaire, d'une accumulation de cuivre ou d'une indisponibilité du cuivre menant à une déficience. Nous avons tout d'abord déterminé si l'expression de protéines connues pour être exprimées en réponse à une perturbation liée à l'homéostasie du cuivre était différente dans les cellules sénescents<sup>1</sup> par rapport aux cellules prolifératives<sup>2</sup>. Les résultats préliminaires, publiés dans l'article de C. Q. Scheckhuber en 2009 (Scheckhuber et al., 2009), et obtenus grâce à l'étude de l'expression de gènes influencés par le cuivre, ont confirmé qu'une perturbation de l'homéostasie du cuivre pouvait être liée à la sénescence cellulaire. Nous avons ensuite détecté, quantifié et caractérisé le cuivre présent dans les FDHs WI-38 prolifératifs et sénescents avec différentes techniques telles qu'un dosage à l'aide d'un test colorimétrique quantitatif, une sonde fluorescente, un protocole histochimique et une analyse du spectre d'un rayonnement de rayons X nommée « analyse dispersive en énergie » ou en anglais « Energy Dispersive X-Ray Spectrometry » (EDX) (voir annexes - chapitre 11). Les résultats de

---

1. Cellules en sénescence répllicative, qui possèdent un nombre de passage en culture élevé, nommées également cellules « âgées »

2. Cellules qui possèdent un nombre de passage en culture faible, nommées également cellules « jeunes »



ces différentes expériences suggèrent que le cuivre s'accumule dans les FDHs WI-38 sénescents. Cependant, ces résultats n'apportent aucune information sur la possibilité que le cuivre joue un rôle actif dans l'établissement du phénotype sénescents.

La deuxième partie de notre travail porte sur le rôle éventuel du cuivre dans l'établissement du phénotype sénescents. Une accumulation de cuivre à l'intérieur des cellules pourrait en effet participer à l'apparition des marqueurs de la sénescence. Pour étudier cela, nous avons déterminé si une incubation avec une concentration élevée mais sub-létale en cuivre dans le milieu de culture des FDHs WI-38 engendrait une accumulation de cuivre dans les cellules. Nous avons détecté, quantifié et caractérisé le cuivre dans les FDHs WI-38 incubés avec du cuivre. Nous avons ensuite déterminé si l'incubation avec la concentration sub-létale de cuivre engendrait l'apparition de marqueurs de la sénescence 72 heures après la fin de l'incubation. Les marqueurs étudiés dans ce projet sont l'arrêt de la prolifération, l'augmentation de la proportion de cellules positives à la SA- $\beta$ gal, le changement morphologique caractéristique des cellules sénescents et la modification de l'expression de gènes impliqués dans la sénescence. L'étape suivante fut d'étudier les voies par lesquelles le cuivre engendre l'apparition de ces marqueurs. Le cuivre étant capable d'engendrer un stress oxydatif, nous avons donc prioritairement analysé le rôle du stress oxydatif généré par le cuivre dans l'apparition de ces marqueurs grâce à l'utilisation d'antioxydants comme le mannitol et le trolox. Nous avons ensuite étudié l'implication de Nrf2 et p38<sup>MAPK</sup> dans la réponse antioxydante et l'apparition des marqueurs de la sénescence.

La troisième partie de ce travail porte sur le rôle de la protéine Prion PrP dans la sénescence des FDHs WI-38. Nous avons remarqué que le gène codant pour PrP était surexprimé dans les FDHs WI-38 en sénescence réplivative et dans les FDHs du derme en sénescence induite prématurément par des stress aux UVB (Scheckhuber et al., 2009). Au cours de notre projet, nous avons également montré que PrP était surexprimée (en ARNm) dans les PBMC provenant de personnes âgées en bonne santé ( $82,5 \pm 6,8$  ans) par rapport aux personnes jeunes en bonne santé ( $35,0 \pm 6,5$  ans). De plus, PrP est connue comme étant une protéine induite par le cuivre et peut être potentiellement impliquée dans le maintien de l'homéostasie du cuivre intracellulaire. Nous avons donc vérifié si son expression était augmentée après la fin de l'incubation avec le cuivre chez les fibroblastes WI-38. Ces résultats nous ont poussé à caractériser PrP dans ces conditions. Nous avons ensuite étudié son rôle potentiel dans l'apparition des marqueurs de la sénescence grâce à l'invalidation de son expression par l'utilisation de siRNAs spécifiques. Nous avons ensuite réalisé quelques expériences préliminaires pour mettre en évidence son rôle dans la protection contre le stress oxydatif et les dommages à l'ADN.

## 5.2 Le modèle

### 5.2.1 Le modèle cellulaire et les consignes de culture

Au cours de notre travail, nous avons utilisé des fibroblastes diploïdes humains (ou FDHs) WI-38. Ces cellules, obtenues par L. Hayflick en 1961, sont des cellules embryonnaires normales prélevées dans les tissus pulmonaires d'un embryon humain féminin de 3 mois de gestation (Hayflick and Moorhead, 1961). Les cellules ont été décrites par L. Hayflick comme ayant une durée de vie proliférative limitée à environ 50 doublements de population et le temps de doublement est d'environ 24 heures lorsque les cellules sont dans la phase proliférative (Hayflick and Moorhead, 1961). Le temps de doublement de population devient de plus en plus long au cours de la culture cellulaire. Les cellules sont considérées sénescents (en sénescence réplivative) lorsqu'elles ne se divisent plus. Le milieu de culture est alors renouvelé tous les trois jours.

Le milieu de croissance utilisé est le milieu classique « Basal Medium Eagle » ou BME, développé par Harry Eagle et qui est largement utilisé pour la culture cellulaire. En règle générale, ce milieu est supplémenté avec du



sérum de veau avec une concentration de 10%. Ce milieu contient du cuivre à une concentration non détectable et la présence de cuivre n'est pas référencée. Le kit « Quantichrom Copper Assay » nous a permis de déterminer que la concentration en cuivre présent dans le milieu BME était inférieure au seuil de détection du kit, c'est-à-dire en dessous de  $1,0 \mu\text{M}$ . Le serum de veau foetal utilisé présente une concentration qui varie d'un lot à l'autre entre  $7,5$  et  $13 \mu\text{M}$ . Ces mesures ont été réalisées avec le kit « Quantichrom Copper Assay ». Il a été montré que le sérum d'origine humaine avait une concentration en cuivre un peu plus élevée, avec une moyenne autour de  $16 \mu\text{M}$  (DICU, 2009).

### 5.2.2 La molécules libérant des ions de cuivre utilisée dans les différentes expériences

Au début de notre étude, nous avons testé différentes molécules capables de libérer des ions de cuivre, avec principalement le  $\text{CuCl}_2$  (chlorure de cuivre) et le  $\text{CuSO}_4$  (sulfate de cuivre). Dans les expériences qui étudient les effets du cuivre dans les organismes, le plus souvent utilisé est le  $\text{CuSO}_4$ , celui-ci est considéré comme la molécule qui libère des ions de cuivre dans notre modèle. Le  $\text{CuSO}_4$  utilisé dans ce projet est sous la forme de pentahydrate et représente la forme commerciale la plus couramment utilisée.

Le  $\text{CuSO}_4$  est employé dans les engrais et les compléments alimentaires comme apport de cuivre, en cas de carence chez les végétaux et chez les animaux. Il a été montré qu'un supplément de  $\text{CuSO}_4$  dans le régime alimentaire de porcs d'élevage, favorisait leur prise de poids. Il est donc régulièrement ajouté comme complément dans leur nourriture. L'industrie alimentaire l'utilise également comme additif. Il possède des propriétés de fixateur de couleur, de conservateur alimentaire et permet une bonne gélification. Son numéro d'identification est le E519. Il peut aussi être utilisé comme herbicide, fongicide et bactéricide dans de nombreux domaines tels que la pisciculture, la conservation des aliments, le traitement des arbres etc.

Dans notre projet, nous l'utilisons à une concentration sub-létale déterminée par un comptage de cellules et par un test MTT. Une analyse de marqueurs de la mort cellulaire par apoptose a également été réalisée et n'a montré aucune apparition de ces marqueurs avec une incubation de 16h à une concentration sub-létale. Le  $\text{CuSO}_4$ , dans ce cas, est utilisé comme molécule libérant des ions de cuivre.



Deuxième partie

Résultats



## Chapitre 6

# Étude des mécanismes de la sénescence induite par le cuivre

### 6.1 Contexte

Article intitulé : Role of p38<sup>MAPK</sup> and oxidative stress in copper-induced senescence, soumis dans la revue « Age ».

L'objectif principal de ce projet était de déterminer s'il existait un lien entre le cuivre et la sénescence chez les FDHs WI-38. Ce premier article est divisé en deux parties. Premièrement, nous avons mis en évidence la présence d'une accumulation de cuivre dans les cellules en sénescence répliquative et deuxièmement, nous avons montré que le cuivre joue un rôle actif dans l'établissement du phénotype sénescence. L'étude des mécanismes par lesquels le cuivre induit l'apparition des marqueurs de la sénescence fait également partie de cette deuxième partie.

### 6.2 Une accumulation de cuivre dans la sénescence répliquative

Cette première partie présente les résultats obtenus lors des expériences effectuées dans le cadre de la première hypothèse, selon laquelle les FDHs WI-38 en sénescence répliquative présentent des perturbations au niveau du cuivre intracellulaire. Ces perturbations peuvent être observées sous la forme d'un changement de distribution du cuivre intracellulaire, d'une accumulation du cuivre intracellulaire ou au contraire d'un manque de cuivre, ce dernier étant lié à une indisponibilité du cuivre pour la cellule. Déjà en 2009, lors des expériences préliminaires, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de gènes régulés par le cuivre dans les cellules en sénescence répliquative par rapport aux cellules « jeunes ». D'une certaine manière, ces résultats soutenaient l'existence de perturbations au niveau de l'homéostasie du cuivre dans les cellules sénescence. Les résultats de ces expériences, réalisées en collaboration avec le Dr. Heinz D. Osiewacz de l'Université de Francfort, ont été publiés en 2009 (Scheckhuber et al., 2009) (voir annexes - chapitre 10). Au vu de ces premiers résultats, nous avons décidé de caractériser le cuivre dans les cellules sénescence. Nous avons mis environ une année pour mettre au point des protocoles de laboratoire permettant de détecter, quantifier et caractériser le cuivre intracellulaire présent dans les FDHs WI-38. Les méthodes et les protocoles de laboratoire utilisés sont présentés en détail dans le chapitre 11 en annexe. Dans cet article, nous présentons les résultats obtenus grâce aux différentes techniques mises au point avec l'aide de nombreuses collaborations et utilisées dans notre laboratoire. La détection du cuivre dans les cellules a pu être réalisée grâce à notre collaboration avec le Pr. Dr. C. Chang de l'Université de Californie, Berkeley, aux États-Unis, qui nous a fourni gracieusement une sonde fluorescente spécifique du cuivre, nommée coppersensor-1. À l'époque, cette sonde était quasiment inconnue et seule le laboratoire de Pr. Chang l'utilisait. La quantification du cuivre, par le kit « Quantichrom Copper Assay », dans les cellules a



été réalisée grâce à un kit de quantification utilisant une molécule chromogène qui forme un complexe coloré après sa liaison avec des ions de cuivre. Nous avons également utilisé une technique histologique assez ancienne, la technique de l'acide rubéanique, qui met en évidence les agrégats de cuivre à l'intérieur des cellule sous la forme de petits précipités foncés. Ces agrégats ont également été observés par microscopie électronique à transmission et la présence de cuivre y a été détectée par une méthode d'analyse nommée EDX ou « Energy Dispersive X-ray spectroscopy ». Celle-ci a pu mettre en évidence la présence de cuivre dans les agrégats. Nous avons également mis en évidence la présence de lipofuscine dans les FDHs WI-38 sénescents grâce à la microscopie électronique mais aussi par une technique histologique utilisant les propriétés de la fuch sine. Les résultats de ces différentes expériences vont tous dans le sens d'une accumulation de cuivre dans les FDHs WI-38 sénescents. Les résultats obtenus dans cette première partie nous permettent de conclure que les FDHs WI-38 présentent des perturbations de l'homéostasie du cuivre sous la forme d'une accumulation interne de cuivre mais nous n'avons cependant aucune idée quant au rôle potentiellement actif du cuivre dans l'établissement du phénotype sénescents. Nous ne pouvons pas déterminer si l'accumulation de cuivre observée participe activement à l'établissement du phénotype sénescents ou représente une conséquence du vieillissement de la cellule. De plus, cette première partie ne nous donne aucune indication sur les mécanismes par lesquels le cuivre s'est accumulé.

### 6.3 Une incubation avec une concentration sub-létale en cuivre induit l'apparition de biomarqueurs de la sénescence

Dans la suite de notre étude, nous avons montré qu'une perte de l'homéostasie du cuivre induite artificiellement, sous la forme d'une accumulation de cuivre générée par un excédent de cuivre dans le milieu, participe activement à l'apparition des marqueurs de la sénescence.

Nous avons mis au point un modèle d'incubation avec un excédent de cuivre dans le milieu de culture afin d'engendrer une accumulation de cuivre dans les cellules. Les FDHs WI-38 ont été incubés pendant 16 heures avec une concentration sub-létale de  $\text{CuSO}_4$ . Nous avons déterminé l'accumulation de cuivre engendrée par ces conditions dans les FDHs WI-38 grâce aux techniques précédemment utilisées pour l'analyse du cuivre dans les cellules en sénescence répliative. Ces expériences ont mis en évidence une forte accumulation de cuivre dans les fibroblastes traités par rapport aux fibroblastes contrôles. Cette accumulation est plus importante et transitoire par rapport à celle détectée dans les cellules en sénescence. Nous avons ensuite montré que ces conditions engendraient l'apparition de marqueurs de la sénescence 72 heures après la fin de l'incubation (une morphologie typique, un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire, une augmentation de l'activité SA- $\beta$ gal et des modifications dans l'expression en ARNm de gènes associés à la sénescence). Rappelons que le cuivre est capable d'engendrer un stress oxydatif ainsi que des dommages à l'ADN. Pour déterminer si c'est par un stress oxydatif que le cuivre engendre l'apparition de marqueurs de la sénescence, nous avons mesuré la production de ROS ainsi que l'apparition d'une réponse antioxydante avec l'induction de la voie de signalisation de Nrf2. Nous avons ensuite utilisé des antioxydants, comme le mannitol et le trolox, dans notre modèle dans le but de contrer le stress oxydatif généré par l'excès de cuivre. Nous avons ainsi montré que l'apparition des marqueurs de la sénescence engendrée par le cuivre était diminuée en présence d'antioxydants, ce qui signifie que le stress oxydatif généré par le cuivre joue un rôle au moins partiel dans la sénescence induite prématurément par le cuivre. Nous avons ensuite montré que les protéines Nrf2 et p38<sup>MAPK</sup> étaient activées par le stress oxydatif généré en présence de cuivre. Grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité de p38<sup>MAPK</sup> (SB503580), nous avons mis en évidence que p38<sup>MAPK</sup> est également impliquée dans l'apparition des marqueurs de la sénescence, ce qui ne semble pas être le cas de Nrf2.

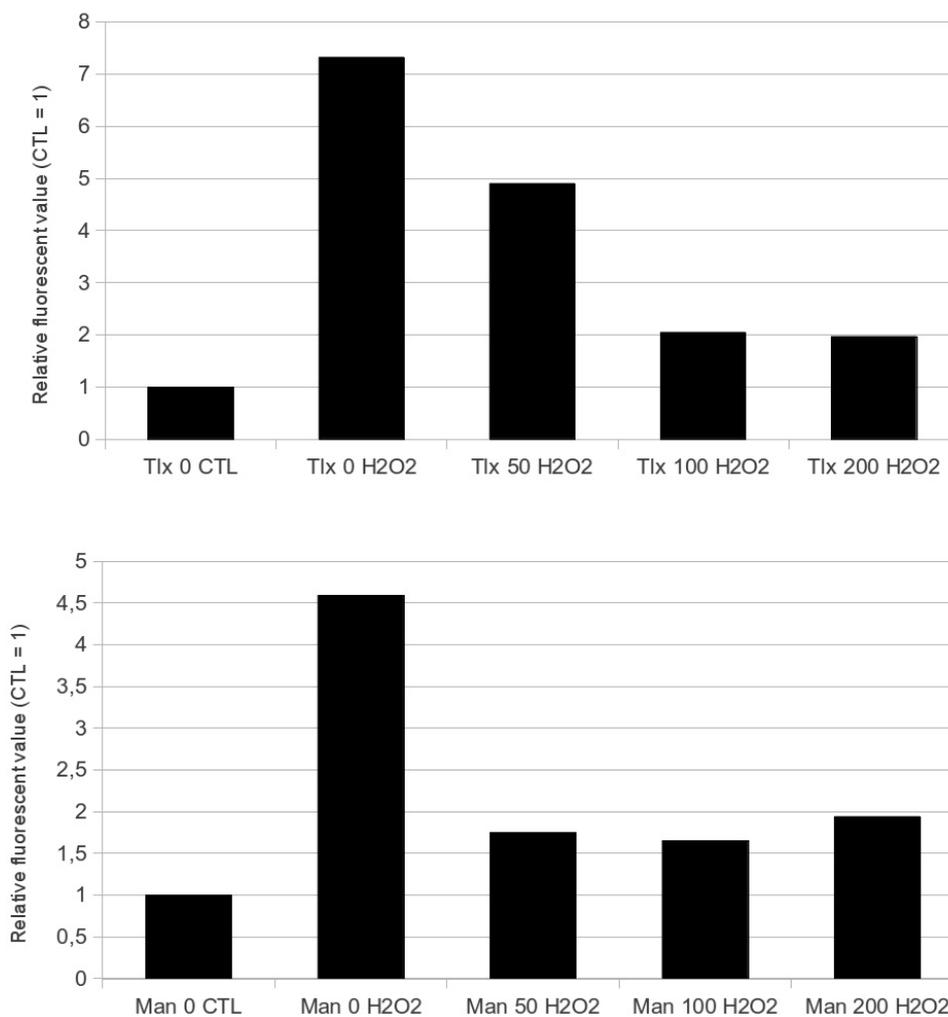


FIGURE 6.1 – Graphiques présentant l'efficacité antioxydante du trolox et du mannitol. Les FDHs WI-38 ont été incubées pendant 2 heures avec  $200 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en présence d'un antioxydant ou non. Nous avons mesuré la production de ROS grâce à la sonde DCF juste après le 2h. Tlx représente les conditions d'incubation avec du trolox ( $50$ ,  $100$  et  $200 \mu\text{M}$ ) et Man représente les conditions d'incubation avec le mannitol ( $50$ ,  $100$  et  $200 \text{mM}$ ). Les résultats sont représentés sous la forme de moyennes de deux expériences indépendantes.

## 6.4 Mise au point de l'utilisation de molécules antioxydantes dans notre modèle

Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé deux molécules antioxydantes : le trolox et le mannitol ; ceux-ci ont été détaillés précédemment dans l'introduction. Nous avons tout d'abord testé les capacités antioxydantes de ces molécules face à un stress oxydatif généré par du  $H_2O_2$  sur les FDHs WI-38. Ces cellules ont été incubées pendant 2 heures avec  $200 \mu M$  de  $H_2O_2$  et en présence d'antioxydant ou non. Les résultats sont présentés à la Figure 6.1.

Suite à ces résultats, nous avons choisi de travailler avec des concentrations de  $100 \mu M$  de Trolox et de  $50 mM$  de mannitol.

art1.pdf



## Chapitre 7

# Rôle de la protéine Prion dans la sénescence

### 7.1 Contexte

Article intitulé : Role of Prion protein in premature senescence of WI-38 HDFs, soumis dans la revue « Aging Cell ».

L'objectif principal de ce projet était de déterminer s'il existait un lien entre le cuivre et la sénescence chez les FDHs WI-38. Dans ce deuxième article, nous avons mis en évidence que l'invalidation de l'expression de PrP induisait l'apparition du phénotype sénescence même en l'absence du supplément de cuivre dans le milieu. Nous avons montré que cette protéine joue un rôle protecteur contre le stress oxydatif, les dommages à l'ADN et la sénescence.

### 7.2 Le rôle de la protéine Prion dans l'apparition des marqueurs de la sénescence

Cette dernière partie présente les résultats obtenus lors des expériences effectuées dans le cadre de la troisième hypothèse, selon laquelle PrP joue un rôle dans l'apparition de la sénescence chez les FDHs WI-38. Déjà en 2009, lors des expériences préliminaires, nous avons montré que l'expression de gènes régulés par le cuivre étaient augmentée dans les cellules en sénescence répllicative. Parmi ces gènes, figurait le gène codant pour PrP. Il avait été montré à l'époque que l'expression de cette protéine était induite en cas d'excès de cuivre dans la cellule (Scheckhuber et al., 2009) (voir annexes - chapitre 10). À ce moment-là, la fonction physiologique de cette protéine était encore inconnue. Seule l'implication de la forme anormale de PrP, PrP<sup>sc</sup>, avait été mise en évidence dans les Encéphalopathies (Subaiguës) Spongiformes Transmissibles. Parmi les symptômes de ces maladies, les caractéristiques d'une démence sénile avec l'apparition progressive de troubles cognitifs, rappelant des phénomènes liés à l'âge. Trois phénomènes ont fait que nous avons décidé d'étudier le rôle de PrP dans notre modèle : premièrement, l'expression de PrP peut être induite par un excès de cuivre intracellulaire, deuxièmement, cette protéine est surexprimée dans les FDHs en sénescence répllicative et en sénescence prématurée induite par des stress, troisièmement, une forme anormale de cette protéine est décrite comme participant au développement de maladies neurodégénératives dont certains symptômes rappellent ceux du vieillissement.

Nous avons montré que l'expression de PrP en ARNm était plus importante dans les PBMC provenant de personnes âgées saines par rapport aux personnes jeunes saines utilisés comme « contrôles ». Ce résultat nous confirme ce que nous avons observé dans les FDHs sénescents, ce qui nous a donc poussé à étudier le rôle de cette protéine dans notre modèle. Le modèle de sénescence induite par le cuivre chez les FDHs WI-38, utilisé dans les parties précédentes, induisait également une augmentation de l'expression de PrP directement après

la fin de l'incubation. Cette surexpression était également toujours visible, mais dans une moindre mesure, 72 heures après la fin de l'incubation. L'augmentation de l'expression de PrP ne se fait pas uniquement au niveau de l'ARNm (ARN messenger) mais également au niveau protéique. Nous avons montré que PrP était localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Nous avons mis en évidence, grâce à un protocole de digestion par la protéinase K, que PrP se présentait sous sa forme normale. Son rôle dans l'apparition des marqueurs de la sénescence dans notre modèle de sénescence induite par le cuivre a ensuite été étudié grâce à l'inactivation par siRNA de l'expression de PrP. Il est étonnant de voir que les marqueurs de la sénescence apparaissent dans les conditions où l'expression de PrP est invalidée même en absence du supplément de cuivre dans le milieu. Ces résultats suggèrent que l'absence de PrP engendre l'apparition de marqueurs de la sénescence, celle-ci joue donc un rôle dans la protection contre la sénescence. PrP avait déjà été décrite comme jouant un rôle dans la protection contre le stress oxydatif et les dommages à l'ADN (Linden et al., 2008). Nous avons donc réalisé quelques expériences préliminaires pour étudier son implication dans la protection contre les stress oxydatifs et les dommages à l'ADN générés par le cuivre dans notre modèle. La production de ROS, l'apparition de dommages de type 8-oxodG, une augmentation de l'expression en ARNm de gènes codants pour p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>WAF1</sup> et GADD45A qui vont dans le sens de la présence d'un stress oxydatif, de dommages oxydatifs à l'ADN et de la sénescence. Ces différents résultats suggèrent que PrP peut jouer un rôle dans la protection contre les stress oxydatifs et les dommages à l'ADN, et *a fortiori* un rôle protecteur vis à vis de la sénescence induite par un stress oxydatif.

art2.pdf



**Troisième partie**

**Discussion et conclusion**



# Chapitre 8

## Discussion et perspectives

### 8.1 Contexte

Comme nous l'avons vu, sur environ 25 éléments essentiels indispensables pour le maintien d'un être vivant, 14 sont des éléments métalliques. Au sein des organismes, les métaux jouent de nombreux rôles indispensables. Ils peuvent par exemple faire partie intégrante de molécules telles que les métalloprotéines et jouer un rôle dans des réactions biochimiques comme la respiration mitochondriale ou la photosynthèse (Bleackley and Macgillivray, 2011).

L'objectif de ce projet était de déterminer s'il existe un lien entre l'homéostasie du cuivre et la sénescence chez les fibroblastes humains WI-38. Le travail a été divisé en plusieurs hypothèses. La première était que les fibroblastes humains (FDHs) WI-38 sénescents présentent des perturbations de l'homéostasie du cuivre sous la forme d'accumulation, de modifications de la distribution ou de la biodisponibilité du cuivre intracellulaire. La deuxième était qu'une perturbation de l'homéostasie du cuivre sous la forme d'une accumulation engendrée par un excès de cuivre dans le milieu extracellulaire participait activement à l'établissement du phénotype sénescence des cellules. Nous avons ensuite essayé de caractériser les mécanismes par lesquels le cuivre provoquait l'apparition des marqueurs de la sénescence. La dernière hypothèse de notre projet propose que la protéine PrP, dont l'expression est induite suite à un excès de cuivre, joue un rôle actif dans la sénescence des FDHs WI-38. Cette section du manuscrit est divisée en trois parties chacune discutant et présentant les conclusions et les perspectives d'une des trois hypothèses de départ.

### 8.2 Les fibroblastes humains WI-38 en sénescence présentent-ils des perturbations au niveau de leur homéostasie du cuivre ?

La première hypothèse de ce projet était que les fibroblastes WI-38 en sénescence présentaient des perturbations au niveau de l'homéostasie du cuivre. Ces perturbations peuvent se présenter sous la forme d'un changement de distribution du cuivre intracellulaire, d'une accumulation de cuivre ou au contraire d'une déficience à cause de l'indisponibilité du cuivre. Les expériences préliminaires, réalisées en collaboration avec le Pr. Dr. H. Osiewicz de l'université Johann Wolfgang Goethe de Francfort, ont montré que l'expression de protéines connues pour être exprimées en réponse à un excès de cuivre était différente dans les cellules dites « âgées » par rapport aux cellules dites « jeunes ». Parmi ces protéines, nous retrouvons la protéine Prion (PrP) et la métallothionéine 2A (Scheckhuber et al., 2009). Ces résultats ont confirmé la présence de perturbations au niveau de l'homéostasie du cuivre, probablement sous la forme d'une accumulation intracellulaire, dans les cellules sénescences. Cet article présente de nouvelles données allant dans le sens d'une implication du cuivre dans la sénescence chez le champignon filamenteux *Podospora anserina*. Ces données indiquent par exemple que les mitochondries sont impliquées dans ce processus. Ils ont montré que la concentration en cuivre cytosolique augmente au cours de la sénescence à cause d'une libération de composants de la matrice mitochondriale (Scheckhuber et al., 2009).

## CHAPITRE 8. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de la première partie de ce travail, nous avons détecté, quantifié et caractérisé le cuivre intracellulaire présent à l'intérieur des FDHs WI-38 sénescents et comparé les résultats avec ceux obtenus pour les cellules « jeunes ». Pour cela, nous avons utilisé différentes techniques. La détection du cuivre dans les cellules a pu être réalisée grâce à notre collaboration avec le Pr. Dr. C. Chang de l'Université de Californie, Berkeley aux États-Unis qui nous a fourni gracieusement une sonde fluorescente spécifique du cuivre (coppersensor 1 ou CS1). Nous avons mis en évidence des agrégats qui sont plus importants et plus nombreux dans les cellules sénescents. La quantification du cuivre dans les cellules a été réalisée à l'aide d'un kit de quantification colorimétrique. Nous avons également utilisé une technique histologique, l'acide rubéanique, qui met en évidence les agrégats de cuivre à l'intérieur des cellule sous la forme de petits précipités foncés. Ces agrégats ont également été observés par microscopie électronique à transmission et analysés par une méthode d'analyse nommée EDX « Energy Dispersive X-ray spectroscopy ». Celle-ci a pu mettre en évidence la présence de métaux et plus particulièrement du cuivre dans les agrégats. Nous avons également confirmé la présence de lipofuscine dans les fibroblastes WI-38 sénescents par une technique histologique. Les résultats de ces différentes expériences montrent que le cuivre s'accumule dans les fibroblastes WI-38 « âgés ».

Cependant, suite à ces résultats, nous n'avons aucune information quant au rôle potentiel joué par le cuivre dans l'établissement du phénotype sénescents. Très peu d'études faisant le lien entre les métaux et le vieillissement ont été réalisées. Il a été montré que le fer s'accumulait en fonction de l'âge dans plusieurs tissus *in vivo* et pouvait être associé à de nombreuses maladies liées au vieillissement. L'hypothèse de cette accumulation progressive serait liée à une perte de l'homéostasie du fer au niveau des cellules (Killilea et al., 2003). Killilea et al. ont étudié les changements de concentration en fer dans les cellules primaires de fibroblastes humains (IMR-90) lors de la sénescence cellulaire. Cette étude a montré que la concentration en fer augmentait de façon exponentielle au cours de la sénescence cellulaire. La concentration en fer est dix fois plus élevée dans les cellules sénescents par rapport aux cellules jeunes (Killilea et al., 2003, KILLILEA et al., 2004). Cette équipe a aussi montré que l'accumulation de fer s'accélérait lorsque les cellules IMR-90 étaient en sénescence prématurée induite par une faible dose de  $H_2O_2$  et que ceci pouvait être atténué par un antioxydant, le *N-tert*-butylhydroxylamine (*NtBHA*). Les cellules IMR-90 immortalisées par transformation avec le SV40, ne présentent aucune accumulation de fer en fonction du temps ou après un traitement avec du  $H_2O_2$  et/ou du *NtBHA* (Killilea et al., 2003, KILLILEA et al., 2004).

En ce qui concerne le cuivre, il a été observé que le cuivre s'accumulait dans les cerveaux de bovins (Zatta et al., 2008) et d'humains (Vasudevaraju et al., 2010) âgés, favorisant peut-être l'apparition de maladies neurodégénératives. Dans cette étude, les mesures de cuivre ont été effectuées sur des tissus avec la technique de spectrométrie d'absorption atomique. Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de la concentration en cuivre dans le sérum humain au cours du vieillissement (Del Corso et al., 2000). Aucune indication n'est cependant disponible quant à l'évolution de la concentration de cuivre intracellulaire au cours du vieillissement. Brewer et al. a émis l'hypothèse suivante selon laquelle le cuivre n'est pas géré de la même façon dans un organisme jeune et un organisme âgé. Il suggère qu'un apport supplémentaire en cuivre dans l'alimentation, à des doses non toxiques, pouvait avoir un effet bénéfique chez un organisme jeune (ex. jeune femme enceinte) mais avoir un effet tout à fait délétère chez un organisme âgé. Chez l'individu âgé, cet apport supplémentaire de cuivre pourrait plus facilement entraîner une déstabilisation de l'homéostasie du cuivre intracellulaire et engendrer une accumulation (Brewer et al., 2010). A notre connaissance, aucune étude concernant une accumulation de cuivre lors du vieillissement à un niveau cellulaire chez les mammifères et plus particulièrement chez l'homme, n'a été réalisée à ce jour. Dans cette partie du projet, nous avons montré une accumulation de cuivre intracellulaire au cours de la sénescence chez le FDHs WI-38. Par manque de temps, nous n'avons pas étudié les différents mécanismes par lesquels le cuivre peut s'accumuler dans ces cellules. Avant d'étudier ces mécanismes, il faudrait

confirmer ces observations sur d'autres types cellulaires et notamment avec des cellules non embryonnaires.

### 8.2.1 Confirmation et généralisation du phénomène d'accumulation de cuivre

Il est possible que le maintien de l'homéostasie du cuivre ou d'autres métaux se fasse différemment chez les cellules embryonnaires. Il a été montré que l'homéostasie du cuivre dans les cellules embryonnaires jouait un rôle important dans la croissance et la survie de ces cellules. Les embryons de souris mutés pour invalider l'expression de *Ctrl1*, nommés embryons mutants *Ctrl1 KO*, ont montré des retards de croissance, une augmentation de la mortalité et un défaut de la fermeture du tube neural. Dans cette étude, les mécanismes n'ont pas été élucidés mais il est possible que les perturbations liées à un déséquilibre de l'homéostasie du cuivre engendrent un arrêt en catastrophe du développement (Turski and Thiele, 2009). Il est donc possible que des cellules embryonnaires, plus que d'autres, aient cette tendance à stocker et à accumuler du cuivre.

Suite au dosage du cuivre dans le milieu de culture utilisé, nous avons observé que les cellules humaines en culture sont confrontées à des concentrations en cuivre inférieures à celles mesurées par exemple dans le sérum humain (DICU, 2009). En effet, nous utilisons du sérum d'origine bovine, moins riche en cuivre et avec une biodisponibilité moins élevée (le cuivre étant lié à des protéines d'origine bovine) et avec une proportion de 10 % dilué dans du milieu BME. Ces conditions de culture pourraient en fait représenter une situation de carence en cuivre disponible pour les cellules humaines en culture. Ces dernières favoriseraient alors l'entrée et le stockage du cuivre, engendrant ainsi un phénomène d'accumulation au fil des passages en culture. Nous pourrions réaliser des cultures cellulaires avec différentes concentrations en cuivre disponible dans le milieu (milieu enrichi avec ajout de cuivre ou appauvri avec ajout de molécules chélatrices de cuivre) et comparer l'impact de ces concentrations sur l'apparition de la sénescence répllicative.

En utilisant les techniques citées précédemment, nous pourrions caractériser le cuivre intracellulaire dans d'autres types cellulaires (cellules primaires, cellules cancéreuses et cellules immortalisées), jeunes, en sénescence répllicative ou en sénescence induite prématurément par des stress selon les différents modèles établis au laboratoire, et déterminer ainsi si le cuivre s'accumule de façon systématique au fil des passages en culture ou avec l'établissement du phénotype sénescence en réponse aux stress. Au lieu de comparer des cellules à de faibles passages en culture, dites « jeunes » et après de nombreux passages en culture, dites en sénescence répllicative, nous devrions mesurer les concentrations et caractériser le cuivre intracellulaire tout au long de la culture cellulaire. De même, les expériences impliquant la sénescence induite prématurément par les stress devraient être réalisées avant et à différents temps après l'arrêt du stress. Nous pourrions également mesurer et caractériser le cuivre intracellulaire de tissus provenant de biopsies de personnes jeunes et âgées afin de déterminer si le cuivre s'accumule avec l'âge *in vivo*. L'analyse de biopsies et la mise en culture de cellules provenant de personnes atteintes de maladies génétiques perturbant l'homéostasie du cuivre (ex. maladies de Menkès et de Wilson) pourraient également apporter d'importantes informations. En effet, il serait intéressant d'étudier les marqueurs de la sénescence au niveau basal et induits par des stress dans ces cellules. Par exemple, les hépatocytes provenant d'une personne atteinte de la maladie de Wilson présentent des concentrations en cuivre plus importantes que ceux provenant d'une personne saine et nous n'avons aucune idée quant au vieillissement de ces cellules en culture.

### 8.2.2 Études des mécanismes permettant l'accumulation de cuivre

Si le phénomène d'accumulation est observable dans plusieurs types cellulaires et que les cellules provenant de biopsies de personnes âgées présentent une concentration plus importante en cuivre que celles provenant de personnes jeunes, nous pourrions alors seulement généraliser le concept selon lequel le cuivre et le vieillissement

sont réellement liés à un niveau cellulaire. Concrètement, ce phénomène peut être expliqué par deux hypothèses, qui sont d'une part une augmentation de l'entrée du cuivre, et d'autre part une diminution de la sortie du cuivre lors du vieillissement. Chacune de ces hypothèses peut être expliquée par plusieurs phénomènes pouvant intervenir en parallèle. En effet, plusieurs phénomènes peuvent intervenir pour favoriser l'entrée ou défavoriser la sortie du cuivre.

### **La sénescence cellulaire favorise-t-elle l'entrée de cuivre dans la cellule ?**

**Modifications de la matrice extracellulaire** Un des marqueurs de la sénescence est l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de protéines qui composent la matrice extracellulaire (MEC) telles que la fibronectine, l'ostéonectine (ou SPARC (secreted protein acid rich-cystein)), l'ApoJ (apolipoprotéine J) (ou clusterine) ainsi que différentes MMP. Des modifications au niveau de la composition, de la structure et des interactions entre les protéines de la MEC apparaissent au cours de la sénescence. Ces modifications peuvent être engendrées par un déséquilibre de la dégradation protéolytique et la libération de radicaux libres (Hay, 1991). Ces derniers peuvent agir directement sur les composants de la MEC et perturber la structure des complexes de molécules tels que les élastines, les collagènes, les protéoglycanes, les glycoprotéines, des facteurs de croissance et des cytokines. Ces différentes molécules qui composent la matrice extracellulaire sont nécessaires pour permettre les fonctions de soutien structural, d'adhérence, de migration et de régulation de la cellule (Hay, 1991, Kurtz and Oh, 2012). Dans la MEC, d'autres types de protéines sont également présents, par exemple les métalloprotéinases de la matrice ou MMP. Ces protéines font partie de la famille des enzymes « peptidases », c'est-à-dire qui coupent des liens peptidiques dans les protéines, et possèdent un ion métallique dans leur site actif. Un ion de zinc représente l'ion métallique le plus couramment décrit dans le site actif des MMP et est important pour leur fonction. Il est connu que les MMP ont un impact important sur la structure de la matrice extracellulaire et permettent notamment son remodelage. Nous pourrions faire l'hypothèse que le cuivre présent dans le milieu extracellulaire entre en contact avec la MEC, modifie ses constituants ou se fixe dans sa structure. La MEC deviendrait alors un réservoir de cuivre en concentrant ces ions. Sa proximité avec les cellules pourrait alors favoriser le contact de ces ions de cuivre avec la surface cellulaire ainsi que leur entrée. Il a été découvert que le cuivre pouvait induire l'expression de MMP (ex. : MMP1 (matrix metalloproteinase 1)) (Philips et al., 2010) et donc remodeler la MEC. Certaines protéines qui constituent la MEC semblent pouvoir également interagir avec le cuivre (ex. : l'ostéonectine) (Weaver et al., 2008).

**Une surexpression de récepteurs ou de protéines de transport du cuivre au niveau de la membrane plasmique** L'expression de protéines permettant le transport du cuivre à travers la membrane plasmique pourrait augmenter au cours du vieillissement, engendrant ainsi une augmentation de l'apport en cuivre. Ces protéines membranaires dont la fonction est de transporter du cuivre à travers la membrane plasmique peuvent par exemple être Ctr1, DMT1 ou PrP. Quelques études ont montré que l'expression de DMT1, capable de faire entrer de nombreux métaux dans la cellule (Garrick et al., 2003), augmente dans certaines régions du cerveau en fonction de l'âge chez les rats (Ke et al., 2005). A notre connaissance, aucune information concernant un lien potentiel entre le transporteur spécifique du cuivre, Ctr1 et le vieillissement n'a été publiée à ce jour. Lors d'une étude réalisée chez le rat, il a été montré que la protéine Prion normale joue un rôle important dans l'internalisation de cuivre à travers une endocytose dépendante de la clathrine (Urso et al., 2010). Une augmentation de l'expression de PrP pourrait peut-être engendrer une augmentation de l'entrée du cuivre dans la cellule. Il serait alors intéressant d'étudier les rôles des protéines Ctr1, DMT1 et PrP dans l'accumulation du cuivre observée chez les cellules âgées. Nous pourrions tout d'abord caractériser l'expression de ces protéines dans les cellules sénescents et ensuite étudier leurs rôles dans la sénescence en invalidant leur expression par siRNA

ou de manière stable. Cependant, il a été démontré qu'un excès de métal intracellulaire engendre généralement une diminution de l'expression de ces transporteurs et donc une diminution de l'apport en métal dans la cellule mais on pourrait imaginer que les métaux accumulés dans les cellules sénescents ne soient pas utilisables car indisponibles ou que l'efficacité des senseurs soient diminuées dans les cellules sénescents.

**Une perte de la disponibilité du cuivre ou de l'efficacité des senseurs** Une perte de la disponibilité du cuivre pourrait alors engendrer un signal cellulaire de déficience métallique, ce qui activerait les voies d'entrée du cuivre. Nous pourrions par exemple étudier les protéines capables de lier le cuivre dans le milieu extracellulaire. Il a été montré qu'une modification de l'albumine par glycation apparaît au cours du vieillissement chez le rat. Cette modification change la structure de l'albumine et altère sa reconnaissance par son récepteur (Cessac-Guillemet, 1995) mais peut-être également sa capacité à transporter le cuivre. On pourrait également supposer que les mécanismes de senseurs de métaux deviennent progressivement moins efficaces au cours du vieillissement. Nous pourrions par exemple étudier la structure, la localisation et l'activité des différents facteurs de transcription impliqués dans le maintien de l'homéostasie (ex. : Atox1, MTF1 et Sp1) dans les cellules sénescents. Atox1 paraît être un candidat intéressant puisqu'il est à la fois une protéine chaperonne du cuivre, un facteur de transcription responsable de l'expression de PrP et une protéine impliquée dans la sortie du cuivre. À notre connaissance, aucun lien entre Atox1 et le vieillissement n'a été détecté à ce jour.

#### **La sénescence cellulaire défavorise-t-elle la sortie du cuivre ?**

**Une perte de fonction ou une diminution de l'expression de protéines de transport de cuivre impliquées dans son export** Comme expliqué en détail dans l'introduction, plusieurs protéines peuvent être impliquées dans l'export et la sortie du cuivre. Plus particulièrement, les ATPases 7A et 7B ont été décrites comme étant des protéines régulatrices du métabolisme du cuivre avec ATP7B dans le foie ou ATP7A dans d'autres tissus. Une étude récente a mis en évidence que l'expression du gène ATP7A dans le foie des souris dépend de l'âge. En effet, l'expression d'ATP7A chez des souris adultes est très faible par rapport aux souris nouveau-nés ou jeunes (Lenartowicz et al., 2010). Au vu de ces résultats, nous pourrions faire l'hypothèse qu'une diminution de l'expression de protéines impliquées dans la sortie du cuivre réduit la sortie de celui-ci, engendrant une accumulation. En perspectives, nous pourrions caractériser ces protéines qui permettent l'export du cuivre dans les cellules sénescents.

**Une perte de la gestion du cuivre intracellulaire** Le cuivre entré peut également s'accumuler parce qu'il n'est plus pris en charge par des protéines intracellulaires qui gèrent et transportent le cuivre au sein de la cellule. Au cours de la sénescence, ces protéines pourraient être altérées et ne plus assurer leurs fonctions. Il est alors possible que le cuivre n'arrive pas aux protéines qui permettent son export et reste dans le cytoplasme sous forme d'agrégats (ex. : lipofuscine) ou faiblement lié à des molécules (ex. : glutathion ou métallothionéines). En perspectives, nous pourrions caractériser les protéines qui sont impliquées dans le trafic intracellulaire du cuivre (ex. : CCS, Atox1, etc.) dans les cellules sénescents.

**La présence de structures intracellulaires capables d'interagir et fixer le cuivre** Il se pourrait également que le cuivre n'arrive pas aux protéines d'export ou ne soit pas pris en charge par les protéines impliquées dans son trafic au sein de la cellule car celui-ci est séquestré par une protéine, par des agrégats ou d'autres structures internes dont l'abondance augmente lors de la sénescence. Nous pourrions étudier des structures intracellulaires telles que la lipofuscine ou les agrégats protéiques et déterminer si la proportion de cuivre y augmente en fonction de l'âge. Il a également été montré que le phénomène de glycation, ou

glycosylation non-enzymatique, était accru chez les personnes atteintes de diabète et chez les personnes âgées, ce qui engendre une accumulation de protéines glyquées. La glycation des protéines peut avoir comme conséquence un changement de conformation et une perte de la fonction initiale. Par exemple, la glycation des protéines Cu/Zn-SOD peut engendrer une fragmentation de leurs sites spécifiques et libérer leurs ions de cuivre, inhibant ainsi leur activité enzymatique (Kawamura et al., 1992, Ookawara et al., 1992). La libération de ces ions peut alors aggraver le stress oxydatif déjà présent et endommager l'ADN. Les recherches de Eaton et Qian ont montré que les protéines qui présentent des glycations possèdent une forte affinité de liaison pour les métaux de transition (Eaton and Qian, 2002) qui gardent leur activité redox malgré leur liaison à ces protéines. Un accroissement de la quantité de protéines glyquées peut donc engendrer une augmentation de la quantité d'ions de cuivre réactifs, c'est-à-dire pouvant participer au maintien d'un stress oxydatif et peut-être participer à l'établissement du phénotype sénescence.

Les expériences réalisées pour déterminer si des perturbations de l'homéostasie du cuivre apparaissent au cours de la sénescence des cellules nous permettront de déterminer si un lien entre la sénescence et le cuivre existe sans toutefois nous donner d'indications quant à la participation active du cuivre dans l'établissement du phénotype sénescence. La seconde partie de notre projet était de déterminer si une accumulation de cuivre induite expérimentalement pouvait déclencher l'apparition de la sénescence chez les fibroblastes WI-38.

### 8.3 Une perte de l'homéostasie du cuivre engendre-t-elle l'apparition de la sénescence ?

Déterminer si une perte de l'homéostasie du cuivre et plus particulièrement une accumulation de cuivre intracellulaire peut participer activement à l'apparition des marqueurs de la sénescence représente la deuxième hypothèse présentée dans l'article. Nous avons donc mis au point un modèle d'incubation au cuivre sur les fibroblastes WI-38 que nous avons ensuite caractérisé. Nous avons déterminé si l'incubation avec une concentration élevée mais sub-létale en cuivre dans le milieu de culture des fibroblastes WI-38 engendrait une accumulation de cuivre dans les cellules grâce aux mêmes techniques précédemment utilisées pour l'analyse du cuivre dans les cellules en sénescence répliquative. Ces expériences ont mis en évidence une accumulation de cuivre dans les fibroblastes traités par rapport aux contrôles. Cette accumulation est plus importante et transitoire que celle détectée en sénescence répliquative. Nous avons ensuite montré que l'incubation avec la concentration sub-létale de cuivre engendrait l'apparition de marqueurs de la sénescence 72 heures après la fin de l'incubation.

Les propriétés du cuivre font que celui-ci est capable d'engendrer un stress oxydatif. Pour déterminer si c'est par un stress oxydatif que le cuivre engendre l'apparition de marqueurs de la sénescence, nous avons tout d'abord montré que le cuivre induisait une production de ROS ainsi que l'apparition d'une réponse antioxydante avec la voie de signalisation de Nrf2 caractéristique d'une réponse à un stress oxydatif. Nous avons ensuite utilisé des antioxydants comme le mannitol et le trolox dans notre modèle. Nous avons ainsi montré que l'apparition des marqueurs de la sénescence engendrée par le cuivre était moindre en présence d'antioxydants, ce qui signifie que le stress oxydatif généré par le cuivre joue un rôle au moins partiel dans la sénescence induite prématurément par le cuivre. Nous avons ensuite montré que, comme la voie de Nrf2, celle de p38<sup>MAPK</sup> était induite par le stress oxydatif généré par la présence de cuivre. Grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité de p38<sup>MAPK</sup>, nous avons mis en évidence que cette protéine est également impliquée dans l'apparition des marqueurs de la sénescence, ce qui ne semble pas être le cas de Nrf2.

### 8.3.1 Confirmation et généralisation de la participation active du cuivre dans la sénescence

Nous avons montré qu'une incubation avec une concentration élevée en cuivre dans le milieu extracellulaire engendrait une accumulation de cuivre dans les fibroblastes WI-38 ainsi que l'apparition de marqueurs de la sénescence. Il faudrait répéter les expériences citées précédemment sur d'autres types cellulaires et en utilisant d'autres molécules capables de libérer des ions de cuivre. Cependant, nous sommes conscients que le cuivre accumulé dans ces conditions se fait d'une façon particulière, plus brusquement, transitoirement et de façon plus importante, que dans les cellules en sénescence réplivative. Ces conditions, même si elles sont sub-létales, engendrent peut-être un stress trop important au sein de la cellule pour être réellement comparable au phénomène lié à la sénescence réplivative. Pour compléter notre étude, nous pourrions provoquer une accumulation de cuivre intracellulaire progressive en utilisant d'autres méthodes. La surexpression de protéines de transport de cuivre à travers la membrane plasmique (Ctr1, DMT1 ou PrP) permettrait de faire entrer le cuivre différemment et de peut-être engendrer une accumulation plus proche de ce qui est observé lors de la sénescence réplivative. Cette accumulation pourrait stimuler d'autres mécanismes de sortie ou de neutralisation du cuivre ou peut-être également engendrer l'apparition de marqueurs de la sénescence. Si cela est le cas, ces derniers résultats pourraient confirmer la participation active du cuivre dans l'établissement du phénotype sénescence. Dans notre modèle d'incubation, nous avons utilisé une concentration de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  pendant 16 heures. Même si les expériences mesurant la survie cellulaire n'ont montré aucun signe de mortalité cellulaire, nous pourrions développer un modèle de sénescence induite prématurément par les stress en utilisant des concentrations beaucoup plus faibles mais de façon répétée. Nous pourrions également réaliser une culture cellulaire avec un milieu de culture enrichi en cuivre (conditions d'apport chronique en cuivre) et étudier l'impact de ces conditions de culture sur le nombre de passages en culture avant la sénescence réplivative et sur l'apparition des marqueurs de la sénescence. Les hépatocytes provenant de patients atteints de la maladie génétique de Wilson possèdent un gène codant pour l'ATPase 7B défectueux, ce qui empêche la sortie du cuivre de la cellule et donc favorise une accumulation dans les cellules. Il a été montré que les hépatocytes qui ont accumulé du cuivre présentent un stress oxydatif, des dommages à l'ADN avec notamment des délétions dans l'ADN mitochondrial (Mansouri et al., 1997) et une accumulation de lipofuscine (Motonishi et al., 2006). La caractérisation des niveaux de cuivre internes ainsi que la présence de marqueurs de la sénescence chez ces hépatocytes pourrait également compléter notre étude.

### 8.3.2 Étude des mécanismes qui génèrent l'accumulation intracellulaire de cuivre et l'apparition de la sénescence

Plusieurs mécanismes, tels que les mécanismes qui interviennent dans l'entrée, dans la sortie et/ou dans le stockage interne, peuvent être impliqués pour permettre au cuivre de s'accumuler dans la cellule et peut-être engendrer l'apparition des marqueurs de la sénescence. Il serait intéressant d'étudier activement ces mécanismes en perturbant leur homéostasie et en déterminant leur impact sur la concentration en cuivre intracellulaire et sur les marqueurs de la sénescence.

Comme explicité précédemment dans la partie sur la caractérisation des cellules en sénescence, nous pourrions étudier les mécanismes d'entrée, de sortie et de stockage/transport interne du cuivre. Dans ces expériences, nous ne nous contenterons pas de caractériser les mécanismes lors de la sénescence mais nous étudierons leur rôle dans l'accumulation de cuivre et dans l'apparition de marqueurs de la sénescence de façon plus active, c'est-à-dire en favorisant ou en défavorisant l'un ou l'autre mécanisme afin de perturber l'homéostasie du cuivre

intracellulaire.

La surexpression de protéines liées à l'entrée du cuivre telles que Ctr1, DMT1 ou PrP pourrait induire une accumulation de cuivre intracellulaire et peut-être engendrer l'apparition de marqueurs de la sénescence. A notre connaissance, aucune étude permettant d'établir un lien entre une surexpression artificielle d'une de ces protéines et le vieillissement n'a été réalisée à ce jour.

Nous pourrions également invalider l'expression de protéines responsables de la sortie du cuivre, telles que les ATPases 7A et 7B. Ces dernières représentent des cibles thérapeutiques dans le traitement des cancers. Il a été observé que ces protéines, surexprimées dans les cellules cancéreuses, sont impliquées dans la résistance de celles-ci aux agents chimiothérapeutiques utilisant du platine (Lutsenko et al., 2007). Il est possible que l'invalidation des gènes codant pour ATP7A ou ATP7B n'engendre pas seulement une accumulation de cuivre, ce que nous voudrions provoquer, mais d'autres phénomènes ; rendant l'étude plus complexe.

Nous pourrions aussi invalider l'expression de protéines responsables du transport du cuivre au sein de la cellule. Il a été montré que l'invalidation par siRNA de l'expression de la « Copper chaperone for SOD1 » ou CCS, une protéine importante pour le transport du cuivre à l'intérieur de la cellule, induit une accumulation de cuivre dans la cellule. Cette accumulation peut disparaître grâce à l'induction de métallothionéines, une diminution de l'expression de Ctr1 et une augmentation de l'expression de l'ATP7A (Miyayama et al., 2011). Il serait intéressant d'étudier les marqueurs de la sénescence dans ces conditions. Il a été découvert que l'expression de la MT2A (metallothionéine 2A) était augmentée lors de la sénescence chez les fibroblastes diploïdes humains et stable lorsque les cellules sont quiescentes (Mocchegiani et al., 2006). Au cours de notre projet, nous avons également mis en évidence que MT2A était surexprimée en ARNm dans les PBMC provenant de personnes âgées en bonne santé ( $82,5 \pm 6,8$  ans) par rapport aux personnes jeunes en bonne santé ( $35,0 \pm 6,5$  ans) (Vo et al., 2010). Ces résultats suggèrent que le niveau élevé de l'expression de MT2A n'est pas une caractéristique générale de l'arrêt de la prolifération cellulaire, mais est spécifique de la sénescence. L'invalidation de l'expression des métallothionéines pourrait engendrer des modifications dans le stockage du cuivre dans la cellule et perturber son homéostasie. Cependant, une corrélation entre l'invalidation de l'expression de MT2A et l'immortalisation de différents types cellulaires semble exister sans toutefois mettre en évidence de relation de cause à effet (Duncan and Reddel, 1999). D'autres protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre pourraient également jouer un rôle dans la sénescence.

### 8.3.3 Étude de l'implication du stress oxydatif dans la sénescence prématurée induite par le cuivre

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence que le cuivre engendrait un stress oxydatif. Concrètement, nous avons montré qu'une incubation de 16 heures avec  $500 \mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  engendrait une augmentation de la production de ROS ainsi qu'une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif chez les fibroblastes WI-38. De plus, le stress oxydatif induit par le cuivre semble jouer un rôle dans l'établissement du phénotype sénescence car l'utilisation de molécules antioxydantes, telles que le trolox et le mannitol, abolit au moins partiellement l'apparition des marqueurs de la sénescence. Cette étude est incomplète et demande encore un approfondissement. En effet, à part une idée théorique avec la capacité du cuivre à engendrer des réactions de Fenton et de Haber-Weiss, nous n'avons pas mis en évidence les différents types de ROS générés par le cuivre ainsi que les dommages générés par ces derniers dans nos conditions.

L'homéostasie du cuivre est importante pour limiter le développement d'un stress oxydatif. En effet, d'une part le cuivre est capable de générer des ROS par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss et d'autre part, il joue un rôle

important dans les systèmes antioxydants face aux stress oxydatifs. Un excès ou une carence en cuivre peuvent l'un et l'autre aboutir à un stress oxydatif et à des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN, des lipides et des protéines (Jomova and Valko, 2011). Par exemple, un excès de cuivre peut provoquer un stress oxydatif car les ions de cuivre libres ou des complexes de faible poids moléculaire contenant du cuivre sont capables de catalyser la réaction entre un anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène pour produire des radicaux hydroxyles ; cette réaction représente la réaction de Fenton (Halliwell, 1999). Les radicaux hydroxyles produits peuvent alors endommager les constituants cellulaires (protéines, acides nucléiques et lipides) et notamment empêcher les protéines antioxydantes, par exemple la céruloplasmine, la Cu/Zn-SOD, etc., de réaliser leurs fonctions. Le cuivre peut aussi interagir et se fixer directement sur des groupements thiols de cystéines, endommageant les protéines et favorisant l'apparition de phénomènes de réticulations et d'oxydation (Uriu-Adams and Keen, 2005). Le cuivre peut de manière indirecte, par la génération de ROS, engendrer un phénomène de peroxydation lipidique et altérer les fonctions des membranes cellulaires ou de dommages à l'ADN (Obulesu et al., 2011).

Une carence ou une indisponibilité du cuivre peut premièrement, compromettre plusieurs mécanismes de défense avec notamment une baisse des activités de Cu/Zn-SOD et de la céruloplasmine, qui ont besoin de cuivre comme cofacteur catalytique. Des enzymes antioxydantes ne contenant pas de cuivre peuvent également être sensibles à un déficit en cuivre avec par exemple une baisse de l'activité de la catalase et de la glutathion peroxydase dépendante du sélénium (Se-GPx). Deuxièmement, cela peut également altérer l'activité de protéines capables de séquestrer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme les métallothionéines ou de molécules non protéiques telles que le glutathion (Uriu-Adams and Keen, 2005). Troisièmement, cela peut promouvoir le phénomène de glycation et donc, par conséquent, une accumulation de protéines possédant un long temps de demi-vie et ayant perdu leurs fonctions (Groppe et al., 2008). Quatrièmement, une augmentation de la peroxydation lipidique a également été mise en évidence dans ces conditions.

Suite à ces informations, nous pouvons nous rendre compte à quel point l'étude du stress oxydatif généré par le cuivre dans notre étude est incomplète. Nous pourrions caractériser les différents types de ROS produits par le cuivre grâce à des sondes fluorescentes spécifiques et pour compléter notre étude, il serait intéressant de détecter les différents dommages occasionnés par ceux-ci au sein de la cellule.

Au niveau protéique, nous pourrions étudier les protéines oxydées de façon globale grâce à l'utilisation d'oxyblot et de façon plus spécifique avec une étude protéomique réalisée sur les protéines oxydées extraites selon des protocoles mis au point au sein de notre laboratoire. Nous pourrions ainsi déterminer quelles sont les protéines oxydées par le cuivre et donc découvrir celles qui ont potentiellement perdu leurs fonctions.

Les ROS peuvent également endommager les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires et engendrer la formation de peroxydes lipidiques. Les peroxydes lipidiques se décomposent notamment en MDA (malonalaldéhyde), en 4-hydroxynonanal, en éthane ou en pentane. Nous pourrions déterminer la présence de ces molécules dans nos conditions afin de déterminer si le cuivre engendre un stress oxydatif. Pendant de nombreuses années, seule la détermination de MDA par l'acide thiobarbiturique, la méthode TBARS, était utilisée pour déterminer la présence de peroxydations lipidiques. De nos jours, cette technique est considérée comme non-spécifique, a été remplacé par des techniques HPLC plus précises et l'étude de la peroxydation lipidique s'est élargie aux autres molécules (Meagher and FitzGerald, 2000).

Les ROS possèdent une forte affinité pour certaines bases de l'ADN telles que la guanine qui peut facilement être transformée en 8-oxodG. Les 8-oxodG sont normalement éliminés par des enzymes de réparation de l'ADN

mais si ces dernières sont défailtantes, une accumulation de ces molécules apparaît et endommage de plus en plus l'ADN causant par exemple des mutations. Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence qu'une incubation de FDHs WI-38 avec du  $\text{CuSO}_4$  pendant 16 heures engendrait une augmentation de la présence de 8-oxodG. D'autres dommages générés par les ROS produits par le cuivre tels que des cassures ou des oxydations d'autres bases nucléiques pourraient également être étudiés dans nos conditions.

Le GSH, un tripeptide antioxydant, peut interagir directement avec les ROS et être utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase, une enzyme qui assure l'élimination des lipides peroxydés. Lors d'un stress oxydant, le GSH est généralement consommé. Il est donc important de mesurer la forme oxydée, GSSG et de calculer le rapport GSH/acGSSG afin d'obtenir une idée plus précise de l'importance du stress oxydant. Il a été montré par ailleurs par Jones et al. qu'une diminution progressive de ce rapport avait lieu au cours du vieillissement (Jones et al., 2002).

Après avoir déterminé la présence des différents ROS ainsi que les dommages occasionnés par leur présence, nous compléterons notre recherche par l'étude des systèmes antioxydants et de réparation. Ces systèmes montrent une diminution de leur efficacité au cours du vieillissement et jouent donc un rôle dans l'établissement du phénotype sénescence. Au niveau des systèmes antioxydants, l'influence n'est plus à démontrer puisque, comme dit précédemment, l'absence de cuivre engendre une diminution de l'activité antioxydante d'enzymes telles que la Cu/Zn SOD, ce qui pourrait être responsable de manière indirecte d'une élévation de la concentration de ROS. De plus en plus d'études démontrent que la présence de métaux de transition tels que le cuivre altère les systèmes de réparation de l'ADN (Gadhia et al., 2012). Il semblerait que le cuivre puisse même jouer un rôle régulateur pour certaines protéines impliquées dans les systèmes de réparation de l'ADN (Du et al., 2011). Il serait donc intéressant d'étudier l'influence du cuivre sur l'activité de ces différents mécanismes dans notre modèle.

### 8.3.4 Le rôle de Nrf2, p38<sup>MAPK</sup> et du TGF- $\beta$ 1 dans la sénescence prématurée induite par le cuivre

#### La voie de p38<sup>MAPK</sup> et du TGF- $\beta$ 1

L'implication des protéines p38<sup>MAPK</sup> et TGF- $\beta$ 1 a déjà été largement décrite dans l'établissement du phénotype sénescence induit par des stress tels que le  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou les UV (Debacq-Chainiaux et al., 2010a, Frippiat et al., 2002). Au cours de notre recherche, nous avons montré que p38<sup>MAPK</sup> est impliquée dans la sénescence prématurée induite par le  $\text{CuSO}_4$ . Rappelons que dans le cadre de la sénescence prématurée induite par du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la protéine p38<sup>MAPK</sup>, phosphorylée et donc active, phosphoryle le facteur de transcription ATF-2 et permet notamment l'expression du TGF- $\beta$ 1 ainsi que l'apparition des marqueurs de la sénescence, ceux-ci étant partiellement dépendants du TGF- $\beta$ 1. La protéine p38<sup>MAPK</sup> peut rester phosphorylée à plus long terme après la fin du stress grâce au TGF- $\beta$ 1 qui est sécrété 36 heures après l'incubation avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . La sécrétion du TGF- $\beta$ 1 maintient actifs les récepteurs au TGF- $\beta$ 1 et donc les protéines p38<sup>MAPK</sup> et ATF-2 actives, ce qui représente une boucle de rétroaction positive (Frippiat et al., 2002). Il a été montré que le cuivre ( $\text{CuCl}_2$ ) pouvait activer p38<sup>MAPK</sup> de façon indépendante des ROS générés par la présence de cuivre chez les amphibiens (Gaitanaki et al., 2007). Dans cette recherche, un rôle protecteur de p38<sup>MAPK</sup> face à un excès de cuivre est suggéré. Dans notre étude, nous avons mis en évidence que l'abondance de la forme phosphorylée de p38<sup>MAPK</sup> diminuait en présence de mannitol. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation, et donc l'activation de p38<sup>MAPK</sup>, est au moins partiellement dépendante de la présence de ROS.

Dans notre modèle, nous avons également montré que l'incubation avec le  $\text{CuSO}_4$  engendrait une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$ 1. Cependant, l'implication de cette protéine dans la sénescence prématurée induite par le  $\text{CuSO}_4$  n'a pas été démontrée à cause d'un manque de temps, et représenterait une voie de recherche à explorer. Le fait qu'une incubation avec du cuivre engendre une surexpression du TGF- $\beta$ 1 a déjà été observé chez les chondrocytes de jeunes cochons mis en culture (Zhu et al., 2011). De plus, il a déjà été évoqué que des chélateurs spécifiques de cuivre pouvaient empêcher l'activation du TGF- $\beta$ 1 (Gong et al., 2008).

### La voie de Nrf2

Nous avons montré que l'incubation avec du  $\text{CuSO}_4$  provoquait une augmentation de l'expression, une translocation nucléaire ainsi que l'activation de la protéine Nrf2. Nous n'avons cependant pas montré d'implication de la protéine Nrf2 dans l'apparition des marqueurs de la sénescence. En effet, lorsque nous utilisons des siRNAs spécifiques permettant l'invalidation de l'expression de la protéine Nrf2, nous n'avons observé aucune conséquence majeure sur l'apparition des marqueurs de la sénescence induits par le  $\text{CuSO}_4$ . Le fait que nous n'ayons rien vu ne signifie pas pour autant que Nrf2 n'est pas du tout impliqué dans la sénescence.

Le facteur de transcription Nrf2, important dans la régulation de la réponse antioxydante, a été décrit comme capable de réguler l'expression de plusieurs sous-unités du protéasome chez la souris. Plus précisément, Kensler et al. ont rapporté que les gènes codant pour des protéines formant le complexe protéasome 26S sont régulés par Nrf2 en réponse à des molécules antioxydantes (Kwak et al., 2003). Il a été montré que l'expression et l'activité transcriptionnelle de Nrf2 sont réduites dans les cellules en sénescence répliquative. De plus, l'invalidation de l'expression de Nrf2 par siRNA engendre la sénescence prématurée. Dans ces expériences, la durée de la transfection est longue puisqu'elle dure 17 jours avec une transfection tous les 2 jours. Il a été montré que l'activation de Nrf2 induite par une molécule, nommée 18 $\alpha$ -Glycyrrhétinac acid (18 $\alpha$ -GA), engendrait des niveaux élevés d'activité du protéasome qui ne sont observable que lorsque Nrf2 est fonctionnel. Cette molécule en stimulant la voie de Nrf2 accroît la survie des cellules après un stress oxydatif et retarde l'apparition de la sénescence répliquative chez les fibroblastes humains lorsque le traitement est continu (Kapeta et al., 2010). Ces résultats suggèrent que Nrf2 joue un rôle protecteur contre l'apparition de la sénescence.

Des études préliminaires réalisées au sein de notre laboratoire ont montré que l'invalidation de Nrf2 dans notre modèle de sénescence induite par le cuivre, sans toutefois influencer la morphologie, la prolifération cellulaire et la SA- $\beta$ gal, faisait chuter l'expression de gènes associés à la sénescence tels que les gènes codant pour l'IGFBP3, l'apolipoprotéine J et le CTGF. Ces résultats suggèrent l'implication de Nrf2 dans l'expression de ces gènes et peut-être un rôle actif dans la sénescence. Ces résultats sont donc en contradiction par rapport à ce qui a été décrit précédemment. Nous pourrions par exemple prolonger les temps de transfection et étudier l'impact d'une invalidation de Nrf2 plus longue sur la sénescence dans notre modèle. L'activité du protéasome dans notre modèle peut également représenter une autre voie à explorer.

## 8.4 Le rôle de la PrPc dans l'apparition de la sénescence chez les fibroblastes humains WI-38

La dernière partie de ce travail porte sur le rôle de la PrP dans la sénescence des fibroblastes humains WI-38. La plupart des études déjà réalisées ont été faites dans le contexte des maladies à Prions ou pour déterminer le rôle physiologique de PrPc dans le système nerveux central. Ces expériences sont le plus souvent effectuées chez la souris. Peu d'études concernant le rôle potentiel de PrPc dans le vieillissement humain ont été réalisées, rendant notre étude originale. Nous avons montré précédemment que le gène codant pour la PrP était surexprimé

durant la sénescence répllicative et la sénescence induite prématurément par des stress (Scheckhuber et al., 2009). Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la PrP est connue pour être induite par le cuivre. Son rôle reste encore inconnu mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans le maintien de l'homéostasie du cuivre. Dans les résultats présentés dans le deuxième article, nous avons montré que l'expression en ARNm de PrP était plus importante dans les PBMC provenant de personnes âgées en bonne santé par rapport aux personnes jeunes en bonne santé. Ces résultats nous ont poussés à étudier le rôle de PrP à un niveau cellulaire. Nous avons montré que son expression est augmentée après la fin de l'incubation avec du cuivre chez les FDHs WI-38, aussi bien au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique. Nous avons ensuite étudié la localisation intracellulaire de PrP. Cette protéine semble localisée dans le noyau et le cytoplasme. Nous avons pu déterminer que la PrP observée dans nos cellules suite à une incubation avec du  $\text{CuSO}_4$  se présente sous une conformation normale, c'est-à-dire PrPc, grâce à un traitement à la protéinase K. Nous avons ensuite montré que PrPc jouait un rôle dans l'apparition des marqueurs de la sénescence. Pour cela, nous avons invalidé l'expression de PrPc en utilisant des siRNA spécifiques et étudié l'apparition des marqueurs de la sénescence en réponse à l'incubation avec le cuivre, 72 heures après la fin de l'incubation. Nous avons découvert que les marqueurs de la sénescence apparaissent dans les conditions où l'expression de la PrPc est invalidée même lorsque les cellules ne sont pas incubées avec du cuivre. Ces résultats suggèrent que l'absence de PrP engendre l'apparition de marqueurs de la sénescence. La PrP avait déjà été décrite comme pouvant jouer un rôle dans la protection contre le stress oxydatif et les dommages à l'ADN. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle cette protéine joue un rôle protecteur face à la sénescence. Quelques expériences préliminaires ont permis d'étudier son implication dans la protection contre les stress oxydatifs et les dommages à l'ADN. Nous avons montré que l'invalidation de l'expression de PrP engendre une augmentation de la production de ROS, l'apparition de dommages de type 8-oxodG et une augmentation de l'expression en ARNm de gènes codant pour p21<sup>WAF1</sup>, p16<sup>INK4A</sup> et GADD45A. Ces différents résultats suggèrent que PrPc peut jouer un rôle protecteur contre les stress oxydatifs et les dommages à l'ADN, et donc contre l'apparition de la sénescence.

### 8.4.1 Étude du rôle protecteur de PrPc contre le stress oxydatif et les dommages à l'ADN

De plus en plus d'études suggèrent que PrPc joue un rôle dans la réponse au stress oxydatif. Par exemple, la PrPc a été décrite comme jouant un rôle protecteur contre la toxicité du Mn (Manganèse). Ces résultats ont été obtenus en comparant l'effet du Mn sur les cellules neuronales provenant de souris exprimant la PrPc ou de souris KO pour PrPc. Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré que PrPc interfère avec l'absorption du Mn et protège les cellules contre le stress oxydatif induit par celui-ci. Sa présence entraîne également une meilleure résistance au Mn avec l'observation d'une diminution de la mort cellulaire par apoptose (Choi et al., 2007).

D'autres molécules capables de générer un stress oxydatif ont été étudiées. L'exposition de cellules au paraquat conduit à la production d'anions superoxydes et ceux-ci peuvent réagir avec le  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour donner des radicaux hydroxyles. Ces derniers peuvent engendrer une peroxydation lipidique et la mort cellulaire. En 2004, les effets de la surexpression de PrPc sur la toxicité induite par le paraquat en utilisant un système inductif particulier ont été étudiés. Cette étude a montré que la surexpression de PrPc réduisait considérablement la toxicité induite par le paraquat, l'apparition de dommages à l'ADN et les niveaux d'acide malondialdéhyde, ce qui soutient le rôle protecteur de PrPc. Il a été alors proposé que PrPc jouait un rôle protecteur contre le stress oxydatif en raison de son activité semblable à la superoxyde dismutase (Rachidi et al., 2004). Cette activité antioxydante, qui semble dépendante du cuivre, a été mise en évidence dans différentes études (Brown et al., 1999) (Brown

et al., 2008).

Dupiereux et al. ont étudié l'effet d'un stress oxydatif induit par une incubation avec du paraquat sur des cellules de neuroblastome SH-SY5Y. Ils ont observé que les cellules exprimant une forme de PrP dépourvue de répétitions d'octa-peptides ou dont la portion NH<sub>2</sub>-terminale est reliée à la membrane, développent une sensibilité accrue au paraquat par rapport à des cellules exprimant la PrP de type sauvage, PrP<sup>c</sup>. Ces cellules transfectées montrent une baisse de viabilité, une perte de l'intégrité membranaire et une réduction de l'activité des mitochondries. Il a également été mis en évidence que les mécanismes impliqués dans la résistance cellulaire au stress oxydatif sont compromis lors d'une infection. Cette étude soutient l'hypothèse selon laquelle l'expression de PrP<sup>c</sup> protège les cellules contre le stress oxydatif induite par le paraquat (Dupiereux et al., 2008)

De plus, il a clairement été montré grâce à la technique « COMET ASSAY » que l'expression de la PrP<sup>c</sup> protège les cellules de neuroblastome SH-SY5Y contre les dommages à l'ADN dans des conditions basales et après une exposition avec des ions de cuivre ou de fer, qui génèrent des radicaux hydroxyles, ou suite à une exposition lumineuse et à la présence d'un photosensibilisateur (méthylène) générant de l'oxygène singulet. Les cellules exprimant une forme dépourvue de répétitions d'octa-peptides ou les cellules infectées par la forme infectieuse présentaient des niveaux accrus de dommages à l'ADN par rapport aux cellules exprimant la PrP<sup>c</sup>. Ces données indiquent que la PrP<sup>c</sup> joue un rôle protecteur dans la protection des cellules contre les dommages de l'ADN induits par les ROS.

Il serait donc intéressant de continuer à investiguer le rôle protecteur de PrP<sup>c</sup> contre le stress oxydatif et les dommages à l'ADN dans notre modèle.

#### 8.4.2 Étude du rôle protecteur de PrP<sup>c</sup> dans l'apparition de la sénescence

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, PrP<sup>c</sup> pourrait jouer un rôle dans le vieillissement ou représenter une des caractéristiques de celui-ci. Premièrement, nous avons montré que son expression est augmentée au cours du vieillissement et dans les cellules sénescents. Deuxièmement, il a été observé que la PrP<sup>c</sup> présentait des modifications liées à l'âge au niveau du profil de glycosylation chez la souris (Goh et al., 2007). Une étude plus récente a montré que la proportion de PrP<sup>c</sup> était beaucoup moins importante au profit d'une forme insoluble dans les cerveaux de bovins âgés par rapport aux jeunes (Yoshioka et al., 2010). Il serait donc intéressant de caractériser PrP<sup>c</sup> au niveau des modifications post-traductionnelles (ex. : phosphorylations et glycosylations) dans les FDHs WI-38 en sénescence répllicative et en sénescence prématurée induite par le CuSO<sub>4</sub> ou par d'autres stress afin de mettre en évidence les modifications communes. La comparaison de ces différents types de cellules sénescents pourraient nous permettre de déterminer si PrP<sup>c</sup> se présente sous une forme particulière et caractéristique de la sénescence ; ce qui pourrait constituer un nouveau marqueur associé à la sénescence. La PrP associée à la sénescence pourrait alors présenter des caractéristiques à la fois de PrP<sup>c</sup> et de PrP<sup>sc</sup>, et donc constituer un nouveau type de PrP, une PrP associée à la sénescence ou SA-PrP.

Il a été découvert qu'une souche de souris transgéniques possédant un grand nombre de copies de la forme non mutée de PrP<sup>c</sup> et qui accumulent PrP<sup>c</sup>, présentent un dysfonctionnement neurologique dépendant de l'âge. Les symptômes apparaissent spontanément chez les souris âgées, sans infection avec la PrP<sup>sc</sup>. Les souris âgées sauvages et mutées présentent une diminution de l'activité du protéasome par rapport aux souris jeunes. Dans ce cas, PrP<sup>c</sup> semble localisée au niveau des mitochondries chez les souris âgées mutées, ce qui n'est pas le cas chez les souris sauvages. Cette localisation est accompagnée d'une diminution de l'activité de la SOD2 et de différents marqueurs de l'apoptose (Hachiya et al., 2005). Chez les souris KO, il semblerait que l'absence de PrP<sup>c</sup> dans ces souris provoquent des anomalies au niveau du système nerveux avec des perturbations au niveau de la mémoire avec une augmentation de la mort neuronale, au niveau du système immunitaire, au

niveau du système olfactif et comportemental, au niveau musculaire et de la mobilité, etc. (Katamine et al., 1998, Le Pichon et al., 2008, Benvegnù et al., 2011). Ces observations suggèrent que PrPc peut peut-être jouer un rôle dans le vieillissement de la souris car les différents systèmes touchés le sont également lors du vieillissement. Nous pourrions compléter ces études au niveau *in vitro* avec des cellules humaines. Nous pourrions par exemple étudier l'apparition des marqueurs de la sénescence au cours de la sénescence répllicative mais également dans les modèles de sénescence prématurée induite par les stress mis au point dans notre laboratoire dans des cellules présentant une surexpression ou une invalidation de l'expression de PrPc.

### 8.4.3 Perte ou gain de fonction de PrPc au cours de la sénescence ?

De nombreux rôles biologiques ont été attribués à la PrPc, ce qui laisse présumer que cette protéine agit dans de nombreux processus cellulaires et peut interagir avec beaucoup de molécules biologiques différentes. Il a été souvent proposé que la conversion de PrPc en PrPsc engendrait une perte des fonctions normales de PrPc (ex. protection contre les stress oxydatifs) et/ou un gain de fonction (ex. infectiosité). En médecine, on parle de protéinopathie ou protéopathie qui représente une classe de maladies dans lesquelles certaines protéines prennent une conformation anormale et perturbent ainsi le fonctionnement des cellules (Walker and Levine, 2000). Les protéines peuvent ne pas retrouver leur configuration normale, elles peuvent alors perdre leur fonction normale (perte de fonction) et/ou devenir toxiques (gain de fonction toxique) (Luheshi et al., 2008). Ces maladies comprennent par exemple les maladies d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et les maladies du prion.

Nous pourrions faire l'hypothèse selon laquelle PrPc perd ses fonctions normales et peut-être acquiert d'autres fonctions au cours du vieillissement. Les formes PrPc deviendraient progressivement des PrPsc avec l'âge. Il serait donc intéressant d'étudier ce phénomène de transition vers la forme de PrPsc qui aurait lieu au cours du vieillissement. Nous pourrions par exemple prendre des biopsies de peau et déterminer le rapport PrPc/PrPsc en fonction de l'âge dans celles-ci. Il a d'ailleurs été émis que l'avancée en âge est un facteur de risque important pour le développement de telles maladies ; il a même été mis en évidence que plusieurs protéinopathies pouvaient se développer en même temps dans le cerveau d'une personne âgée (Walker and Levine, 2000).

La technique utilisée pour faire la différence entre PrPc et PrPsc est l'utilisation de la protéinase K. La forme normale, PrPc, est sensible à la digestion par la protéinase K, la forme anormale, PrPsc, y est résistante. Récemment, une nouvelle maladie neurodégénérative, la prionopathie protéase-sensible, a été découverte. Cette maladie est causée par une forme anormale de la PrP mais qui, contrairement à la forme anormale responsable de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), est sensible à l'activité de protéinase K (Gambetti et al., 2008). Dans notre modèle, nous avons mis en évidence qu'une incubation avec du cuivre engendrait une forme qui peut être digérée par la protéinase K. Il serait intéressant de mettre en culture des cellules provenant de personnes atteintes de différentes prionopathies, d'infecter ou de transfecter des cellules saines avec différentes formes de PrP afin de voir comment ces cellules se comportent au fil du temps et si elles présentent une réponse au stress et une sénescence différentes.

### 8.4.4 Étude des mécanismes engendrant une perte ou un gain de fonction de PrPc observée durant la sénescence

Après une analyse de la transition de PrPc vers une forme anormale, après la caractérisation de ces formes et de l'impact de celles-ci sur le comportement cellulaire, nous devrions nous intéresser aux mécanismes qui engendrent cette perte ou gain. L'élimination des formes normales et anormales de PrP semble être dépendante de l'activité du protéasome (Coux and Piechaczyk, 2000). Il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome engendrait une accumulation d'environ 10 % de la PrPc dans le cytoplasme sous une forme non-glycosylée et

ubiquitinylée, qui présente des caractéristiques de PrP<sup>sc</sup> et forme des agrégats insolubles résistants à la digestion par la protéinase K. Cependant, cette forme ne semble pas infectieuse. Il a été supposé que la diminution de l'efficacité du protéasome au cours du vieillissement pourrait avoir comme conséquence une accumulation de PrP<sup>c</sup> dans le cytoplasme et même favoriser son entrée dans le noyau (Jaegly et al., 1998) (Rybner et al., 2002). L'étape suivante de notre recherche pourrait être d'étudier les mécanismes par lesquels les modifications et l'éventuelle accumulation de PrP<sup>c</sup> apparaissent au cours de la sénescence.

Vu le grand nombre de molécules avec lesquelles PrP peut interagir, il se pourrait que ces molécules interviennent dans la perte ou le gain de fonction de PrP<sup>c</sup>. Dans un premier temps et sur base de la littérature scientifique, nous pourrions déterminer une liste de partenaires capables d'interagir avec la PrP<sup>c</sup>. Ensuite, parmi ces partenaires, nous pourrions choisir ceux dont l'expression/la concentration est décrite comme étant accrue dans les cellules sénescents. Parmi ceux-ci, nous pourrions plus particulièrement nous intéresser au TGF- $\beta$ 1, cette protéine étant une protéine importante pour l'apparition des marqueurs de la sénescence. Les membres du transforming growth factor- $\beta$  sont connus pour réguler une multitude de processus cellulaires ainsi que l'expression de protéines avec, par exemple, les MMP. Il a été démontré que la surexpression de PrP<sup>c</sup> dans les cellules épithéliales des glandes mammaires de souris était capable de moduler la voie du TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) conduisant à une augmentation de la sécrétion de la MMP2 (matrix metalloproteinase 2) active. Ce phénomène semble avoir pour conséquence la modification de la forme des cellules (Wurm and Wechselberger, 2006). Il a également été observé que PrP pouvait interagir directement avec le récepteur du TGF- $\beta$ . Comme très peu d'études ont été réalisées sur ce sujet, nous pourrions analyser les liens entre les membres du TGF- $\beta$  et la PrP<sup>c</sup>.

#### 8.4.5 Étude du lien entre PrP<sup>c</sup> et le cuivre durant la sénescence

Il a été montré que l'expression de PrP<sup>c</sup> influençait le métabolisme du cuivre. En effet, la manipulation de l'expression de cette protéine engendre des modifications dans l'expression et l'activité de protéines associées à l'accumulation, le stockage et l'exportation du cuivre dans la cellule. Il a été également montré que l'altération de l'expression de la SOD engendrait une spectaculaire augmentation de l'expression de PrP<sup>c</sup>. L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude montrent un lien étroit entre la résistance cellulaire au stress oxydatif et le métabolisme du cuivre (Kralovicova et al., 2009). Nous pourrions émettre l'hypothèse selon laquelle au fil du temps, la cellule accumule du cuivre, ce qui engendre une augmentation de l'expression de PrP<sup>c</sup>, ce qui favorise la perte de sa fonction et la formation d'agrégats, menant peut-être à une perte de l'homéostasie du cuivre et finalement à l'apparition de la sénescence.



# Chapitre 9

## Conclusion

### 9.1 L'importance des métaux pour le maintien de la vie

L'origine de la vie sur notre planète demeure incertaine mais celle-ci aurait fait son apparition, selon les estimations, entre 3,5 à 3,8 milliards d'années. Plusieurs théories scientifiques tentent d'expliquer l'apparition de la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui. Une de ces hypothèses est que la vie est apparue au cœur des sources hydrothermales, découvertes en 1977 à 2 600 mètres de profondeur. Ces sources, situées sur la couche sédimentaire et profondes d'environ 70 à 100 mètres, sont composées en partie de sulfures de fer, de cuivre et de zinc.

Au cours de ces quelques millions d'années, les organismes ont été confrontés à des changements spectaculaires au niveau environnemental, ce qui a forcé ces organismes à évoluer et s'adapter, et donc influencé leur contenu intracellulaire et extracellulaire en ions métalliques. Très tôt, s'est développée cette capacité de détecter, d'utiliser et de gérer différents ions métalliques. Par exemple, il semblerait que le fer ait été utilisé en premier au cours de l'évolution. Les débuts de la vie dans l'eau ont favorisé l'utilisation du fer ferreux, Fe(II), qui est soluble alors que le cuivre était sous la forme de Cu(I), insoluble dans l'eau. Le cuivre est pourtant devenu un oligo-élément essentiel pour la plupart des organismes vivants y compris l'humain. Le côté essentiel du cuivre peut être expliqué par le fait que lorsque l'atmosphère de la Terre s'est progressivement chargée en dioxygène, grâce aux premiers organismes photosynthétiques, la présence grandissante de cette molécule a changé la disponibilité des métaux. L'oxydation de Fe(II) en Fe(III) l'a rendu insoluble et donc indisponible alors que l'oxydation du Cu(I) en Cu(II) l'a rendu soluble et donc disponible. C'est donc l'arrivée du dioxygène rendant le fer indisponible qui a créé la nécessité d'utiliser le cuivre, maintenant sous une forme biodisponible et capable d'exploiter le pouvoir oxydant du dioxygène (Crichton and Pierre, 2001).

Plusieurs enzymes, telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase, ainsi qu'une classe particulière de protéines capables de se lier au cuivre sont également apparues pour protéger les organismes et permettre l'utilisation du dioxygène (Decker and Terwilliger, 2000). Le fer sous sa forme Fe (III) a pu de nouveau être utilisé par les organismes grâce au développement des chélateurs de Fe (III) qui ont rendu le fer à nouveau accessible, et grâce à l'apparition de la ferritine qui est une protéine de stockage capable de contrôler la toxicité potentielle du fer. La majorité des organismes utilisent donc le fer et le cuivre et il a été observé que les mécanismes de régulation de l'homéostasie de ces deux métaux sont connectés voire dépendants l'un de l'autre chez les levures et les mammifères.

Cette évolution axée sur les métaux a engendré un réseau complexe de processus maintenant l'homéostasie des ions métalliques, faisant des métaux, les éléments centraux de nombreuses réactions biochimiques. Pourtant, la recherche de l'implication des ions métalliques dans les processus biochimiques n'est qu'à ses balbutiements et semble prendre de l'ampleur depuis quelques années avec notamment l'apparition de journaux spécialisés tels que « Biometals » ou « Metallomics ».

Au cours de ce projet, nous avons étudié le rôle du cuivre dans le vieillissement grâce à des modèles *in vitro* de FDHs WI-38 en sénescence répllicative et en sénescence induite par les stress. Premièrement, dans notre projet, nous avons abordé l'hypothèse selon laquelle les cellules en sénescence répllicative présentent des perturbations au niveau de l'homéostasie du cuivre. Nous avons montré que l'expression de protéines connues pour être exprimées en réponse à une perte de l'homéostasie du cuivre était plus importante dans les cellules sénescents en comparaison avec les cellules « jeunes » (Scheckhuber et al., 2009). Nous avons ensuite détecté, quantifié et caractérisé le cuivre présent à l'intérieur des FDHs WI-38 sénescents et comparer les résultats avec ceux obtenus pour les « jeunes » grâce à différentes techniques. Les résultats de ces différentes expériences vont dans le sens d'une accumulation de cuivre dans les FDHs WI-38 sénescents. Suite à ces résultats, nous n'avions aucune information quant à son rôle dans l'établissement du phénotype sénescents.

Dans la deuxième partie, nous avons essayé de déterminer si la perte de l'homéostasie du cuivre qui engendre une accumulation de cuivre intracellulaire participe activement à l'apparition du phénotype sénescents. Nous avons mis au point un modèle d'incubation au cuivre sur des FDHs WI-38. Nous avons montré qu'une incubation avec une concentration élevée mais sub-létale en cuivre dans le milieu de culture des FDHs WI-38 engendrait une accumulation de cuivre avec les techniques utilisées précédemment. Ces mêmes conditions engendraient un stress oxydatif ainsi que l'apparition de marqueurs de la sénescence 72 heures après la fin de l'incubation partiellement dépendante de ce stress oxydatif et de p38<sup>MAPK</sup>. Les résultats de ces deux premières parties ont été présentés dans l'article portant le titre : « Role of p38<sup>MAPK</sup> and oxidative stress in copper-induced senescence ».

La dernière partie de ce travail portait sur le rôle de la protéine Prion (PrP) dans la sénescence chez les FDHs WI-38. Nous avons mis en évidence une surexpression de PrP chez les PBMC provenant de personnes âgées en bonne santé. Après avoir vérifié l'induction de l'expression de la PrP par le cuivre dans notre modèle, nous avons mis en évidence une possible localisation de cette protéine, de conformation normale, au niveau du cytoplasme et du noyau. Nous avons observé que l'inactivation de l'expression de PrP par des siRNAs spécifiques engendrait l'apparition de marqueurs de la sénescence même en absence d'incubation avec le cuivre. Nous avons également mis en évidence que cette protéine joue un rôle protecteur face au stress oxydatif et aux dommages à l'ADN. Les résultats obtenus durant cette recherche sont incomplets et demandent encore de nombreuses investigations pour pouvoir déterminer les mécanismes qui lient à la fois la sénescence, le cuivre et la PrP. Néanmoins, notre recherche a permis de mettre en évidence la présence d'une accumulation de cuivre dans les cellules sénescents, la capacité de celui-ci à engendrer l'apparition d'une sénescence prématurée ainsi que le rôle protecteur de PrP vis-à-vis du stress oxydatif, des dommages à l'ADN et des marqueurs de la sénescence. Ces trois axes semblent converger vers un rôle du cuivre dans les mécanismes de la sénescence, soutenant l'idée selon laquelle les métaux font partie intégrante des mécanismes biochimiques et jouent un rôle régulateur dans ces mécanismes.

## 9.2 Dans le futur...

Les dernières recherches tendent à montrer que les métaux ont une place bien plus importante que présu-mée dans les processus biochimiques. En effet, les dernières découvertes suggèrent que les ions métalliques influencent toute la machinerie transcriptionnelle en se liant aux protéines, et régulent également leurs interactions mutuelles (Zambelli et al., 2012). Ces ions métalliques sont importants pour structurer les protéines et leur permettre de remplir leurs fonctions, d'exprimer les gènes, structurer les ARNs, etc. (Frederiksen et al., 2012). Les ions métalliques peuvent jouer un double-jeu, comme celui de permettre à une enzyme d'acquérir une fonction antioxydante et à la fois de catalyser un stress oxydatif. De plus, il est intéressant de noter que c'est la combinaison de ces ions qui, s'influençant les uns les autres, peuvent induire la cellule à adopter un comportement ou le comportement inverse.

Par exemple, le cuivre, le zinc et le fer, trois éléments universellement essentiels, doivent être considérés comme un trio. Ceux-ci sont des éléments métalliques de transition et font partie du groupe des métaux-traces, c'est-à-dire qu'ils représentent moins de 0,01 % de la masse d'un homme. La concentration de chacun de ces éléments influence celles des deux autres. Ceux-ci doivent être consommés comme un mélange équilibré sous peine de dérégler l'homéostasie métallique. C'est d'ailleurs pour cela qu'un apport supplémentaire d'un seul de ces éléments est vivement déconseillé. En effet, le rapport entre le cuivre et ces autres éléments est considéré comme étant aussi important que la teneur en cuivre elle-même dans l'alimentation (Kozłowski et al., 2009). Il semblerait que le fer et le cuivre soient indispensables grâce au fait qu'ils peuvent changer d'état d'oxydation et donc participer à des réactions biochimiques de transferts d'électrons. Le zinc avec un degré d'oxydation + II, possède une configuration électronique telle qu'il ne peut pas intervenir lors de processus d'oxydoréduction mais intervient plutôt comme un acide extrêmement fort, capable de capter un doublet électronique libre. Ce dernier est considéré comme jouant un rôle d'antioxydant.

Lorsqu'il y a un excès de zinc, il y a une forte diminution de l'absorption du cuivre dans l'intestin. Chez l'homme, on observe une altération de la disponibilité du cuivre lorsque le rapport zinc/cuivre est supérieur à 10/1 (Solomons et al., 1983). Un excès de zinc peut engendrer une carence en cuivre. Ces éléments sont également en compétition pour passer de l'intestin à la circulation sanguine. Un excès de zinc influence également le métabolisme du fer à cause de l'effet antagoniste que le zinc a sur le cuivre. Le cuivre est en effet indispensable pour le métabolisme du Fe car l'activité des enzymes impliquées dans le transport du fer est dépendante de celui-ci. L'indisponibilité ou la carence en cuivre induite par un excès de zinc, peut donc indirectement engendrer une carence en fer. Un excès de fer peut entraîner des perturbations dans l'homéostasie du cuivre et du zinc en diminuant l'absorption de ceux-ci par l'organisme. En effet, ces éléments sont en compétition pour se lier à des molécules de transport dans l'organisme. Si l'apport en fer est trop important, on peut alors être confronté à une carence en zinc. Un excès de cuivre peut perturber l'absorption du zinc et entraîner une carence. De plus, le cuivre jouant un rôle important dans le métabolisme du fer, sa concentration peut alors fortement influencer l'assimilation du fer par l'organisme. Le cuivre et le fer sont par exemple nécessaires pour la production de l'hémoglobine, protéine de transport de l'oxygène.

L'équipe de Vasudevaraju a montré que les concentrations en ces trois éléments étaient modifiées au cours du vieillissement. Ils ont évalué les concentrations de ces éléments dans différentes régions de cerveaux normaux provenant de personnes d'âges différents. Ils ont effectué en parallèle un prélèvement de l'ADN génomique afin d'étudier son intégrité et ont observé que les concentrations en cuivre et en fer étaient significativement plus élevées et que celle du zinc était significativement diminuée au cours du vieillissement. Ils ont également remarqué que le nombre de cassures dans l'ADN augmente avec le vieillissement. Une corrélation claire entre les concentrations de cuivre et du fer, le nombre de cassures dans l'ADN et le vieillissement a été mise en évidence. Ces données indiquent qu'il y a une accumulation de métaux capables d'engendrer un stress oxydatif tels que cuivre et le fer avec le vieillissement, tandis que la concentration en zinc, un métal aux propriétés plutôt antioxydantes, diminue avec l'âge (Vasudevaraju et al., 2010).

À l'avenir, il est donc essentiel d'étudier l'implication non pas d'un seul métal, ce que nous avons fait dans notre travail, mais de ces trois éléments dans les mécanismes de la sénescence. L'homéostasie de ces ions est donc primordiale pour permettre un bon fonctionnement de la cellule. À la citation « Rien n'est poison, tout est poison. Le poison, c'est la dose » par laquelle nous avons commencé cet ouvrage, nous pourrions donc conclure en ajoutant que, dans notre contexte, il s'agit aussi d'une question de sensibilité, d'équilibre et de synergie.



Quatrième partie

**Annexes**

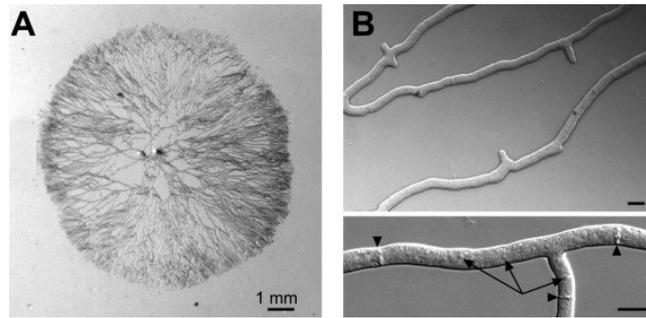


FIGURE 10.1 – Photos de *Podospira anserina*. Sur la photo (A), nous pouvons observer un réseau de filaments reliés entre eux (ou hyphes) qui apparaissent comme des fils noirs. Ceux-ci constituent un mycélium. Ce mycélium est le résultat d'une croissance de 24 h après la germination des spores. Sur la photo (B), les filaments sont observés par microscopie optique. Nous pouvons également observer que les filaments sont cloisonnés (têtes de flèche) et certains noyaux visibles (flèches).

Source : (Pinan-Lucarré et al., 2007)

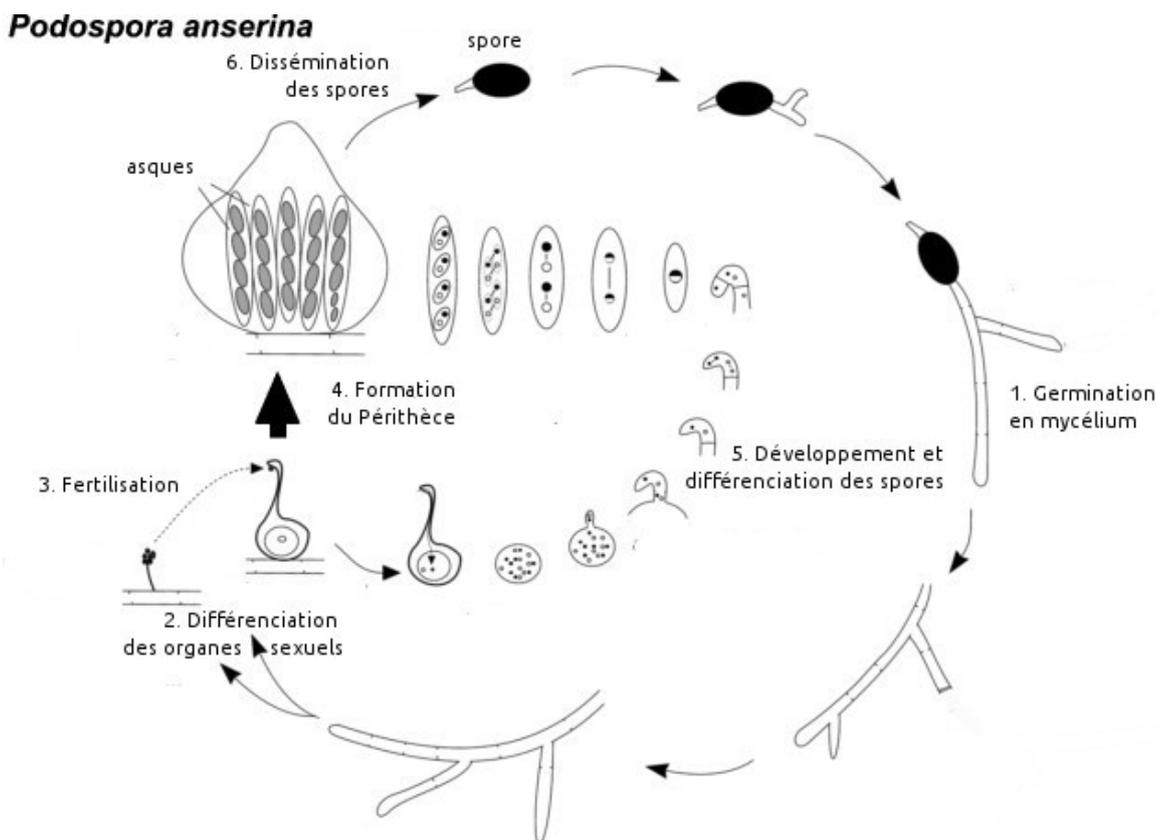


FIGURE 10.2 – Schéma du cycle de vie de *Podospira anserina*.

Source : (Pinan-Lucarré et al., 2007)

# Chapitre 10

## *Podospora anserina*

### 10.1 Qu'est-ce que *Podospora anserina* ?

*P. anserina* est un champignon coprophile de type filamenteux qui fait partie des ascomycètes<sup>1</sup> et qui vit sur les excréments d'herbivores (Figure 10.1). Ce champignon est utilisé dans les laboratoires de mycologie mais aussi en biologie moléculaire et cellulaire comme modèle d'étude. Récemment, une équipe de chercheurs a entièrement séquencé son génome dont la taille est de 35 Mb répartis sur 7 chromosomes (Espagne et al., 2008).

Comme tous les champignons filamenteux, *P. anserina* est composé d'un réseau de hyphes, nommé le mycélium. Les hyphes sont constitués de cellules eucaryotes alignées dont seule la cellule apicale, localisée à l'extrémité, se divise. La plupart des cellules du mycélium sont polynucléées et certaines d'entre elles sont ramifiées, ce qui permet aux hyphes de se multiplier. La mise en culture de ce champignon est aisée puisqu'un nouveau mycélium est capable de se régénérer à partir de petits morceaux d'un mycélium initial placés sur un milieu de croissance approprié.

#### 10.1.1 Cycle de vie

Le cycle de vie complet de ce champignon se fait entre 7 et 10 jours avec une température optimale de 27°C. Plusieurs étapes composent le cycle de vie de *P. anserina* (Figure 10.2). Brièvement, la première étape est la germination des spores en mycélium. Ensuite, la différenciation des organes sexuels au niveau des filaments du mycélium, avec donc la formation d'ascogones (femelles) et de conidies (mâle). Un mycélium est hermaphrodite puisqu'il développe à la fois les structures mâles et femelles. La troisième étape est la fertilisation et apparaît lorsque les deux types d'organes sexuels se rencontrent. La fertilisation peut se faire de façon sexuée entre deux mycéliums différents mais complémentaires (hétérothallisme) ou entre deux filaments complémentaires mais provenant d'un même mycélium (pseudo-homothallisme<sup>2</sup>). Leurs organes sexuels peuvent alors entrer en contact et former un périthèce qui va permettre le développement des asques, ce qui constitue la quatrième étape. Ensuite, les asques vont se former et se différencier avant d'être violemment projetés pour permettre une meilleure dissémination. Dans la nature, les spores doivent être digérés par un herbivore pour permettre la germination, ceci est reproduit en laboratoire par un passage dans un milieu d'acétate (Pinan-Lucarré et al., 2007).

---

1. Les ascomycètes (Ascomycota) représentent un embranchement de champignons caractérisés par la formation de spores à l'intérieur de structures particulières, nommées asques. Généralement utiles pour l'homme, ces champignons peuvent être des champignons classiques (morilles, pézizes, truffes, etc.), des champignons associés aux algues dans les lichens, des moisissures ainsi que des champignons phytopathogènes.

2. Hétérothallisme : représente la rencontre de deux gamètes provenant chacun d'individus différents mais complémentaires. Pseudo-homothallisme : représente la rencontre de deux gamètes de types sexuels différents portés par le même thalle. Chez *P. anserina* deux types sexuels sont déterminés par un locus situé sur le chromosome 1 ; ceux-ci sont appelés mat+ et mat-. Généralement, un mycélium contient à la fois des noyaux mat+ et des noyaux mat-, le rendant autofertile.



FIGURE 10.3 – Photos de *Podospora anserina* jeune (photo de gauche) et sénescence (photo de droite).

Source : (Lorin et al., 2006)

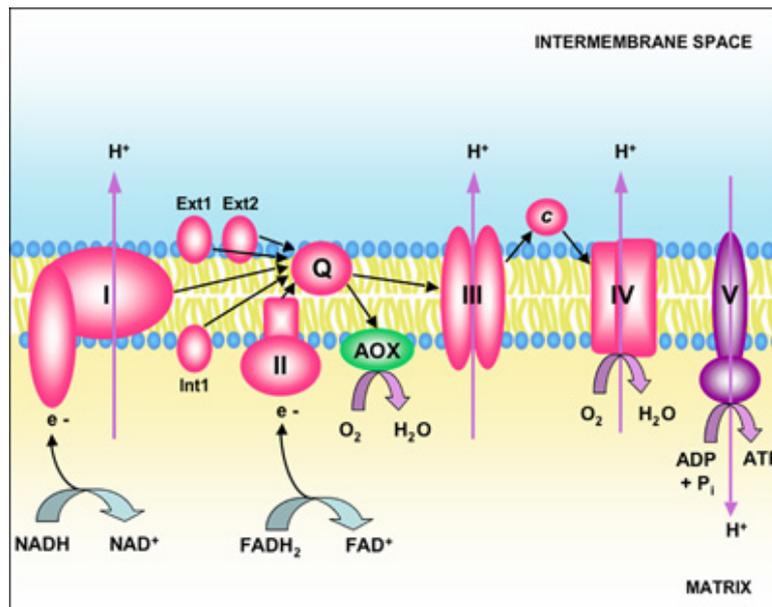


FIGURE 10.4 – Schéma de la chaîne respiratoire de *Podospora anserina*. Description : la chaîne respiratoire est composée de la NADH déshydrogénase (I), la succinate déshydrogénase (II), du cytochrome bc1 (III), la cytochrome c oxydase (IV), l'ATPase (V), d'ubiquinone (Q), l'oxydase alternative (AOX), le cytochrome c (c) et de NAD(P)H déshydrogénases externes (Ext1 et Ext2). La voie classique utilise l'activité de transfert d'électron des complexes I, III and IV pour générer un gradient de protons, ce qui permet la synthèse d'ATP par le complexe V. Lorsque la voie classique est déficiente, le transfert d'électrons et le gradient de protons sont empêchés, ce qui entraîne l'activation de l'AOX. Cette voie alternative, branchée au niveau des quinones, permet le maintien de l'activité de transfert d'électrons et le gradient de protons mais uniquement couplés avec les électrons pris en charge par le complexe I.

Source : (Lorin et al., 2006)

## 10.2 Un champignon comme organisme modèle

### 10.2.1 Le phénotype sénescence chez *Podospira anserina*

Au début des années 1950, il a été décrit pour la première fois que le champignon *P. anserina* affichait, après une certaine période en culture, des caractéristiques attribuées à la sénescence (Rizet, 1953). Ces caractéristiques étaient une diminution liée à l'âge du taux de croissance d'un mycélium, une réduction de la formation d'hyphes ainsi qu'une augmentation de la pigmentation. On pouvait observer au microscope optique que la périphérie du mycélium était anormale, celle-ci apparaissait très ramifiée et présentait des gonflements (Figure 10.3). Une culture en fin de vie semblait arrêter complètement de proliférer et sa périphérie mourait.

Il a été montré depuis que ce champignon possédait une espérance de vie limitée, avec une moyenne de 25 jours. En effet, après plusieurs divisions, les cellules apicales arrêtent de proliférer. L'espérance de vie est alors mesurée comme le temps qu'il faut pour observer l'arrêt de la prolifération dans les cultures. Cet arrêt de la prolifération s'accompagne notamment d'une augmentation de la pigmentation, les champignons âgés apparaissant de plus en plus foncés, ce qui est attribué à l'accumulation de lipofuscine (Lorin et al., 2006). En plus de cet arrêt de prolifération et de l'accumulation de lipofuscine, la sénescence de cet organisme est associée à une accumulation d'ADNmt défectueux (Griffiths, 1992), ce qui en fait le premier modèle dans lequel le rôle des mitochondries dans la sénescence a été décrit.

Le champignon *P. anserina* est depuis longtemps considéré comme un organisme modèle pour la recherche sur le vieillissement. Plusieurs avantages lui permettent d'être encore largement utilisé aujourd'hui : une culture facile, un organisme peu complexe, une durée de vie courte ainsi que la disponibilité de mutants de longévité (par exemple, le mutant grisea).

### 10.2.2 Une sénescence dépendante des mitochondries

Chez *P. anserina*, l'analyse moléculaire a révélé que l'état de sénescence est systématiquement associée à des altérations de la mitochondrie et notamment à des modifications de l'ADNmt, générant une accumulation de molécules d'ADNmt mutés qui comportent des délétions ou des réarrangements, nommés senDNAs (senescence-specific circular DNAs)<sup>3</sup>. Cette accumulation de senDNAs peut aboutir à une perte de l'intégrité de l'ADNmt initial. Il a été proposé que ces modifications jouent un rôle actif dans l'apparition de la sénescence et soient en fait inducteurs de la sénescence. À l'heure actuelle, très peu d'informations sont disponibles à ce sujet. Cependant, il a été mis en évidence que la respiration mitochondriale joue un rôle important dans la régulation de la longévité chez *P. anserina*. Depuis, un lien entre la respiration mitochondriale et la durée de vie a également été signalé dans de nombreux organismes modèles, de la levure à la souris (Lorin et al., 2006).

Il a été montré que la perte de la respiration mitochondriale dépendante de l'activité de la cytochrome c oxydase pouvait mener à une augmentation de l'espérance de vie de *P. anserina* (Lorin et al., 2006). Des mutants de *P. anserina* ont montré un allongement de l'espérance de vie alors qu'ils étaient déficients pour l'activité de la cytochrome c oxydase. Ceux-ci n'accumulaient pas de senDNAs et compensaient la perte de la respiration mitochondriale par l'induction d'une voie alternative dépendant d'une autre oxydase. Cette oxydase alternative, nommée AOX (alternative oxidase)<sup>4</sup>, diminue la production de ROS, augmente la stabilité de l'ADNmt, et surtout engendre une augmentation de la durée de vie (Figure 10.4). Par exemple, pour les mutants dont

3. Les senDNAs proviennent de l'amplification de régions distinctes du chromosome mitochondrial, ces régions sont nommées  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$  (Jamet-Viorny et al., 1997)

4. Le gène AOX est présent dans les champignons, les plantes, les protistes, les métazoaires, les échinodermes et les urochordés et absent chez les vertébrés et les arthropodes (McDonald and Vanlerberghe, 2004). L'AOX est un outil pour comprendre les déficiences de la chaîne respiratoire chez les humains et les animaux (Rustin and Jacobs, 2009)



FIGURE 10.5 – Photos de *Podospira anserina* de type sauvage (à gauche) et mutant grisea (à droite) cultivées sur une plaque de gélose.

Source : (Osiewacz, 2002a)

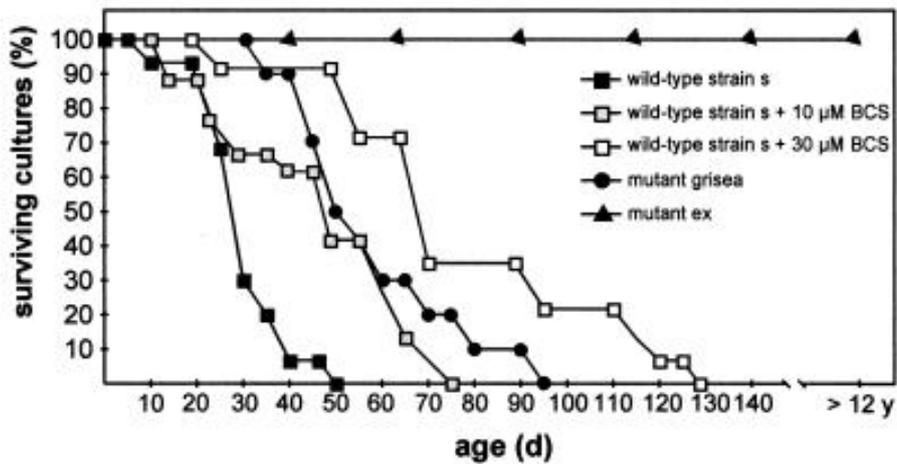


FIGURE 10.6 – Graphe représentant l'influence du cuivre sur l'espérance de vie de *Podospira anserina*. Des cultures de *P. anserina* de type sauvage (wild-type strain s) ont été réalisées jusqu'à la sénescence dans un milieu contenant 10 pM de BCS et 0,33 mM d'acide ascorbique ou contenant 30 uM de BCS et 1 mM d'acide ascorbique ou sans suppléments. Des *P. anserina* de type mutant grisea (mutant grisea) ont été cultivés jusqu'à la sénescence dans un milieu sans supplément. Une culture de mutant (mutant ex) a été également utilisée, celle-ci est en place depuis plus de 12 ans sans signes de sénescence.

Source : (Borghouts et al., 2001)

l'expression d'une sous-unité de la cytochrome c oxydase est invalidée, l'espérance de vie passe de 25 jours à deux ans. Cette voie alternative, inactive sous des conditions normales, est induite dans les organismes présentant une perte partielle ou complète de la voie dépendante de la cytochrome c oxydase. Le fonctionnement de cette voie n'est toujours pas élucidé mais semble être en relation avec un métabolisme au ralenti (Lorin et al., 2006).

## 10.3 Lien entre l'homéostasie du cuivre et l'apparition de la sénescence chez *Podospira anserina*

### 10.3.1 Rôle du facteur de transcription GRISEA dans la sénescence

Il a été montré que le contrôle de l'homéostasie cellulaire du cuivre par le facteur de transcription dépendant du cuivre, nommé GRISEA, jouait un rôle important sur le phénotype et la durée de vie de *P. anserina*. Une mutation dans le gène *Grisea*, qui empêche son expression, mène à un phénotype différent qui présente un allongement de la durée de vie d'environ 60 %. Cette mutation perturbe l'homéostasie du cuivre en diminuant fortement l'entrée du cuivre dans la cellule. Les mitochondries (pourtant considérées comme des réservoirs de cuivre) de ces mutants présentent de faibles concentrations en cuivre, ce qui augmente la stabilité de l'ADNmt et contribue à l'allongement de la durée de vie observé (Borghouts et al., 1997). La stabilisation de l'ADNmt semble être due à une diminution des mécanismes de recombinaison dans la mitochondrie, ce qui suggère que ces mécanismes sont dépendants de la présence du cuivre (Borghouts et al., 2000). Le mutant *grisea* qui possède une durée de vie plus longue présente une hypopigmentation par rapport à la souche sauvage (Figure 10.5). Les mutants *grisea* montrent une déficience en cuivre et expriment l'AOX (Osiewacz, 2002b).

### 10.3.2 Rôle du cuivre dans la sénescence

#### Une déficience en cuivre allonge l'espérance de vie de *P. anserina*

Il a été montré qu'un manque de cuivre pouvait induire la voie respiratoire alternative et engendrer une augmentation de l'espérance de vie. En effet, des cultures de *P. anserina* réalisées avec un milieu contenant un chélateur de cuivre, le BCS (bathocuproïne disulphonate)<sup>5</sup> (Figure 10.6).

Il a été montré que les dysfonctionnements mitochondriaux engendrés par ce manque sont compensés par l'expression de l'AOX, nommée PaAox (*p. anserina* alternative oxidase), qui est codée par un gène nucléaire. Cette voie semble être induite suite au non-fonctionnement de la cytochrome c oxydase cuivre-dépendante. Cette voie n'est pas induite au cours de la sénescence malgré la diminution des fonctions mitochondriales (Borghouts et al., 2001). Il a été également montré que l'expression de PaAox est diminuée lorsque les niveaux de cuivre cellulaire, de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène sont élevés.

5. le bathocuproïne disulphonate (2,9-diméthyl-4,7-diphényl-1,10-phenanthroline disulfonic acid, disodium salt) est un chélateur de cuivre spécifique.



**Les cellules sénescents présentent une accumulation cytoplasmique de cuivre**

La concentration en cuivre influence l'expression du gène codant pour la PaSOD2 (*p. anserina* Mn superoxyde dismutase) (mitochondriale) de façon dépendante du facteur de transcription GRISEA. Chez les souches sauvages sénescents, il a pu être montré que l'activité de PaSOD2 était diminuée, alors que celle de la PaSOD1 (*p. anserina* Cu/Zn superoxyde dismutase) (cytoplasmique) augmentait. Ces premiers résultats suggèrent que le cuivre pouvait être libéré par les mitochondries et se retrouver dans le cytoplasme. En 2009, il a été confirmé que la concentration en cuivre augmentait dans le cytoplasme des cellules sénescents chez *P. anserina* de type sauvage (Scheckhuber et al., 2009). Dans cette recherche, une fuite de cuivre mitochondrial a également été mise en évidence au cours de la sénescence. La création d'un plasmide codant pour une PaMT1 (*p. anserina* metallothionéine 1) capable de réagir avec le cuivre, a mis en évidence que lorsque le cuivre est lié par PaMT1, la voie respiratoire alternative est induite, l'expression de PaAox est augmentée et l'espérance de vie augmente. L'expression de PaMT1 est comparable à celle de la metallothionéine endogène induite par un milieu de culture avec 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . Ces résultats suggèrent que le cuivre mitochondrial et la perméabilité membranaire des mitochondries jouent un rôle dans la sénescence.



art3.pdf



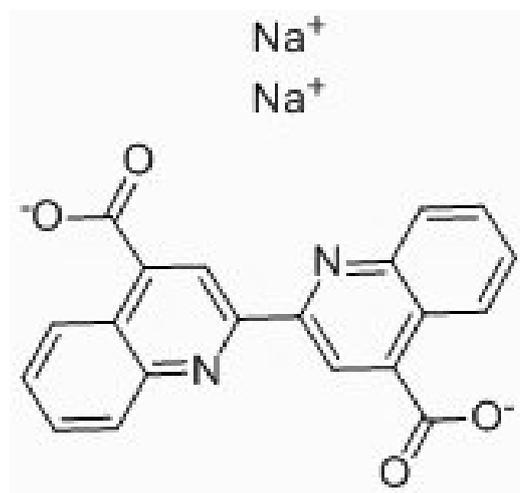


FIGURE 11.1 – Structure de la molécule chromogène utilisée dans le kit Quantichrom Copper Assay, la 4,4'-Dicarboxy-2,2'-biquinoline

# Chapitre 11

## Les méthodes de détection du cuivre

### 11.1 Contexte

En 2009, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de gènes codants pour la métallothionéine 2A, la protéine Prion et la protéine de choc thermique Hsp70 dans les cellules humaines en sénescence répliquative et en sénescence prématurée induite par les UV. L'expression de ces protéines peut être induite par un excès de cuivre dans la cellule, ce qui a été ensuite confirmé par l'incubation de cellules jeunes avec du  $\text{CuSO}_4$ . Nous avons également montré que ces gènes sont surexprimés dans d'autres modèles de SIPS avec des stress tels que le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le *t*-BHP (*tert*-butyl hydroperoxyde) et l'EtOH (éthanol) ainsi qu'au niveau protéique. Ces résultats suggèrent la présence de perturbations de l'homéostasie du cuivre dans les cellules sénescences. Cependant, ces résultats ne peuvent pas être considérés comme la mise en évidence d'une élévation de la concentration du cuivre intracellulaire dans les cellules sénescences. Nous avons recherché des méthodes plus directes afin de quantifier et détecter cette accumulation de cuivre.

Pour ce faire, nous avons utilisé quatre méthodes différentes pour quantifier et/ou détecter le cuivre intracellulaire dans notre projet. Nous avons réalisé ces expériences sur des FDHs WI-38 en sénescence répliquative ainsi que sur des fibroblastes incubés avec du  $\text{CuSO}_4$ .

### 11.2 Le test colorimétrique du Quantichrom Copper Assay Kit

#### 11.2.1 La méthode

La méthode de dosage utilisée dans ce test est la colorimétrie.

Le kit de dosage de cuivre, nommé « Quantichrom Copper Assay Kit » (BioAssay Systems, USA), a été conçu pour mesurer le cuivre dans tous les types d'échantillons biologiques. Ce système utilise les propriétés d'un chromogène qui forme un complexe coloré spécifiquement avec des ions cuivre. Dans notre cas, le chromogène utilisé est le 4,4'-Dicarboxy-2,2'-biquinoline (CAS 979-88-4) (Figure 11.1). L'intensité de la couleur du complexe formé, mesurée à 359 nm, est directement proportionnelle à la concentration de cuivre dans l'échantillon. Une détection linéaire est possible entre 1,0  $\mu\text{M}$  et 47  $\mu\text{M}$ . Si le signal est saturé, il est alors possible de diluer l'échantillon avec de l' $\text{dH}_2\text{O}$  (eau distillée) et de multiplier les résultats calculés par le facteur de dilution.

#### 11.2.2 La procédure utilisée

Directement ou 72 heures après la fin de l'incubation avec le  $\text{CuSO}_4$ , les FDHs WI-38 sont rincés une fois avec du PBS (phosphate buffer saline) puis incubés avec de la trypsine pendant 10 minutes. Les cellules, remises en suspension dans du PBS, sont ensuite comptées avec la chambre de Neubauer. Une centrifugation à 1000 rpm (revolutions per minute) pendant 5 minutes permet de récupérer les cellules sous la forme d'un culot. Le culot de cellules est ensuite lysé avec du NaOH (hydroxyde de sodium) 0,5 N pendant 30 minutes sous agitation.

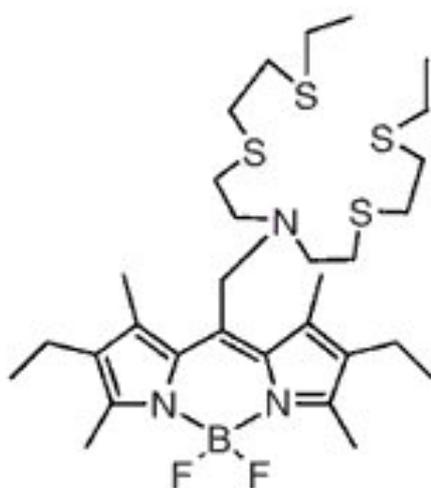


FIGURE 11.2 – Structure de la sonde fluorescente coppersensor-1 spécifique des ions de cuivre (I)

Ces lysats ont ensuite été incubés à 100°C pendant 30 minutes avant le dosage du cuivre avec le kit. Nous avons ensuite suivi la procédure du kit (DICU-250, BioAssay Systems, USA). Les échantillons recueillis ont été traités avec de l'acide trichloroacétique 30 % afin de faire précipiter les protéines puis centrifugés à 12000 rpm pendant 2 minutes. Un mélange contenant de l'acide ascorbique (< 0,9%), la molécule chromogène (< 0,01%)(CAS 979-88-4), du NaOH (< 2%)(CAS 1310-73-2) et de l'Hepes free acid (< 8%)(CAS 7365-45-9) est ensuite ajouté à 100  $\mu$ l de surnageant récolté. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, la DO (densité optique) est lue à 359 nm. Une courbe d'étalonnage ayant suivi le même traitement avec l'étalon fourni par la firme (CuSO<sub>4</sub> CAS 7758-98-7) ainsi que plusieurs concentrations en CuSO<sub>4</sub> réalisées par nous-même, a été réalisée à chaque expérience. La quantité de protéines a été analysée en utilisant la méthode Pierce (Sigma, USA) avant la précipitation des protéines afin d'avoir une idée de la quantité de cuivre par milligramme de protéines. Le comptage de cellule effectué au préalable nous permet également d'avoir une idée de la quantité de cuivre par cellule.

## 11.3 La sonde fluorescente Coppersensor-1

### 11.3.1 La méthode

Les petites molécules de type fluorophore sensibles à la présence de cuivre sont rares (Cody and Fahrni, 2004, Yang et al., 2005). Généralement, ces sondes fluorescentes nécessitent une excitation dans l'UV, ce qui les rend peu utilisables en biologie cellulaire puisque les UV peuvent causer des dommages et interférer avec l'autofluorescence des cellules (Zeng et al., 2006). Néanmoins, l'équipe de recherche du professeur Christopher J. Chang de l'Université de Californie, Berkeley, USA a mis au point une sonde, nommée CS1 (coppersensor-1), capable d'interagir avec le cuivre et de former un complexe fluorescent mais surtout utilisable en biologie cellulaire (Figure 11.2). Plusieurs articles de recherche présentant des résultats obtenus avec cette sonde ont été publiés (Dodani et al., 2011, Achard et al., 2012).

De façon détaillée, la sonde CS1 est une petite molécule, soluble dans l'eau, capable de traverser les membranes biologiques pour permettre de visualiser par microscopie à fluorescence les ions de cuivre labiles présents dans les échantillons biologiques, y compris dans les cellules vivantes ou fixées. La molécule en question comprend un chromophore de type BODIPY (bore dipyrrométhène) couplé à un récepteur riche en thioéther. Cette sonde a une affinité forte pour le Cu(I), de l'ordre du picomolaire, et interagit peu avec les autres ions métalliques présents dans les cellules. La fluorescence est jusqu'à 10 fois supérieure lorsque la sonde CS1 lie un ion Cu(I). La sonde CS1 peut être visualisée en utilisant n'importe quel type de microscope à fluorescence, y compris à épifluorescence, confocale et multiphotonique. Pour les expériences standards en microscopie confocale, il est proposé d'utiliser une longueur d'onde d'excitation de 543 nm (Miller et al., 2006).

### 11.3.2 La procédure utilisée

Les FDHs WI-38 sont ensemencés sur des lamelles couvre-objets en verre, puis rincés avec du PBS. Les FDHs sont ensuite incubés avec la sonde CS1 à 10  $\mu$ M dans du milieu de culture classique, à savoir du BME (basal medium eagle) + 10% de FBS (fetal bovine serum), pendant 20 minutes. Après cette incubation, les cellules sont lavées avec du PBS et fixées pendant 10 minutes avec du paraformaldéhyde 4% (Merck, Allemagne). Après trois lavages avec du PBS fraîchement préparé, les lamelles couvre-objets ont été montées sur des lames en verre avec du Mowiol (Molecular Probes, USA) et ont été incubées pendant une nuit à 4°C. Les cellules ont été analysées en utilisant un microscope laser confocal TCD (Leica, Allemagne) muni de prismes appropriés.

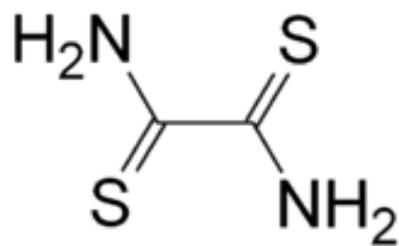


FIGURE 11.3 – Structure de l'acide rubéanique utilisé pour la détection du cuivre

## 11.4 Le test histologique de l'acide rubéanique

### 11.4.1 La méthode

L'acide rubéanique, aussi nommé dithiooxamide est un composé organique sulfuré analogue à l'oxamide. L'acide rubéanique agit comme un agent chélatant d'ions métalliques (Figure 11.3). Celui-ci est largement utilisé dans la détection du cuivre dans les échantillons biologiques ou autres (Bancroft and Gamble, 2008, Budavari, 1996, Kiernan, 1999). En effet, cette molécule est utilisée pour démontrer histochimiquement la présence pathologique d'agrégats de cuivre, comme dans la maladie de Wilson. Lorsque cette molécule est en présence de cuivre dans une solution alcaline et alcoolique, apparaît alors la formation de complexes de cuivre visibles sous la forme de petits précipités sombres, noirs ou verdâtres. L'acide rubéanique réagit également, mais dans une moindre mesure, avec le cobalt et le nickel.

### 11.4.2 La procédure utilisée

La solution initiale est obtenue après la dissolution de 50 mg d'acide rubéanique dans 50 ml d'éthanol absolu. Pour la solution utilisée sur les cellules fixées, nous diluons 2,5 ml de solution initiale dans 50 ml d'acétate de sodium en solution aqueuse de 10 %. Les FDHs WI-38 HDFS sont rincés une fois avec du PBS, fixés pendant 10 minutes avec du paraformaldéhyde 4% (Merck, Allemagne). Après la fixation, les cellules sont incubées avec la solution finale d'acide rubéanique une nuit à 37 ° C. Le lendemain, ces cellules sont rincées avec de l'éthanol 70% pendant 15 minutes, puis avec de l'éthanol absolu pendant 6 h. Les cellules sont ensuite observées au microscope optique après des rinçages avec de l'eau.

## 11.5 La microscopie électronique à transmission et l'analyse dispersive en énergie

### 11.5.1 L'analyse dispersive en énergie ou EDX

L'analyse dispersive en énergie ou EDX est une technique qui détecte la composition élémentaire de façon qualitative et/ou quantitative d'un échantillon. En effet, les spectres RX (rayons X) sont exploités afin de réaliser une analyse chimique de l'échantillon. L'échantillon est bombardé par un faisceau d'électrons et chaque atome du volume sous-jacent émet un spectre de RX avec des raies caractéristiques. Les mesures de l'énergie des RX émis par la région de l'échantillon bombardée par le faisceau d'électrons se font grâce à une diode de Silicium ou de Lithium. L'analyse de ces spectres en énergie, dont l'unité de mesure est le keV (kiloélectron-volt), conduit à l'identification des atomes présents dans la zone bombardée. L'analyse obtenue se présente sous la forme de spectre avec en abscisse les énergies mesurées (keV) et en ordonnée le nombre de photons reçus. Une base de données, contenant les énergies et les intensités des raies produits par chaque élément, facilite l'interprétation des spectres et donc la détermination de la composition chimique.

Lors de notre recherche, nous avons utilisé l'analyse d'imagerie à contraste *zeta*<sup>1</sup> pour détecter les atomes qui possèdent *zeta* élevé. Ceux-ci sont majoritairement des atomes métallique.

Normalement l'analyse EDX se réalise en microscopie électronique à balayage. Nos échantillons biologiques étant très fins et fragiles nous avons choisi la microscopie électronique à transmission qui est compatible avec une

1. Le terme *zeta* est utilisé pour se référer au numéro atomique élevé d'un élément chimique



analyse EDX de faible énergie. Ceci nous a permis de voir et de sélectionner une zone dans notre échantillon biologique et d'en déterminer (au moins partiellement) la composition chimique.

### 11.5.2 La procédure utilisée

Les FDHs WI-38 ont été rincés une fois avec du PBS (10 mM de phosphate, 155 mM de NaCl, pH 7,4) et ensuite fixés à l'aide de glutaraldéhyde 2,5% dans un tampon cacodylate (0,2 M, pH 7,4) pendant 2,5 heures. La fixation est suivie de trois fois rinçages avec du tampon cacodylate et une post-fixation avec une solution de tétroxyde d'osmium à 1% dans un tampon cacodylate. Les échantillons ont ensuite été maintenus dans 0,2 M de tampon cacodylate pendant une nuit à 4 °C. Le lendemain, les échantillons ont été déshydratés par différentes étapes de lavage à l'éthanol (éthanol à 30°, 50°, 70°, 85° et 100°). Ensuite, les échantillons ont été lavés quatre fois avec de l'oxyde de propylène et deux fois avec un mélange d'oxyde de propylène et de résine (v :v) sous agitation. Pour finir, les échantillons ont été incubés avec de la résine pendant une nuit à 37 °C, 24 heures à 45°C et 72 heures à 60°C avant d'être préparés pour la microscopie électronique. Les grilles utilisées comme support sont en or afin d'éviter les interférences avec le cuivre. Les images prises en microscopie électronique en transmission (TEM) ont été réalisées en utilisant un JEOL 7500F. Celui-ci peut être exploité comme un microscope électronique à transmission avec une tension d'accélération de 15 kV, est capable de faire une analyse EDX ainsi que de réaliser des analyses de contraste de *zeta*.



# Bibliographie

- (2008). Metals in chemical biology. *Nature Chemical Biology*, 4(3) :143–143.
- Achard, M. E. S., Stafford, S. L., Bokil, N. J., Chartres, J., Bernhardt, P. V., Schembri, M. A., Sweet, M. J., and McEwan, A. G. (2012). Copper redistribution in murine macrophages in response to salmonella infection. *The Biochemical journal*, 444(1) :51–57. PMID : 22369063.
- Aguzzi, A. and Haass, C. (2003). Games played by rogue proteins in prion disorders and alzheimer’s disease. *Science*, 302(5646) :814–818.
- Akbar, A. and Henson, S. (2011). Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nature Reviews Immunology*, 11(4) :289–295.
- Alain, M. and Sylvain, L. (2002). Nouveaux aspects de la biologie de la protéine prion new insights into the biology of the prion protein. *Med Sci (Paris)*, 18 :1267–1275.
- Altmeyden, H., Puig, B., Dohler, F., Thurm, D., Falker, C., Krasemann, S., and Glatzel, M. (2012). Proteolytic processing of the prion protein in health and. *Am J Neurodegener Dis*, 1(1) :15–31.
- Annes, J., Munger, J., and Rifkin, D. (2003). Making sense of latent TGF $\beta$  activation. *Journal of Cell Science*, 116(2) :217–224.
- Appenroth, K. (2010). Definition of “Heavy metals” and their role in biological systems. *Soil heavy metals*, page 19–29.
- Arnesano, F., Balatri, E., Banci, L., Bertini, I., and Winge, D. (2005). Folding studies of cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure*, 13(5) :713–722.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., and Bonvin, A. M. J. J. (2004). A docking approach to the study of copper trafficking proteins ; interaction between metallochaperones and soluble domains of copper ATPases. *Structure (London, England : 1993)*, 12(4) :669–676. PMID : 15062089.
- Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C. V., and Nùñez, M. T. (2003). DMT1, a physiologically relevant apical cu1+ transporter of intestinal cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 284(6) :C1525–1530. PMID : 12734107.
- Arredondo, M. and Nùñez, M. (2005). Iron and copper metabolism. *Molecular aspects of medicine*, 26(4-5) :313–327.
- Baker, D., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N., Childs, B., van de Sluis, B., Kirkland, J., and van Deursen, J. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372) :232–236.
- Baldwin, D., Tatara, C., and Scholz, N. (2011). Copper-induced olfactory toxicity in salmon and steelhead : Extrapolation across species and rearing environments. *Aquatic Toxicology*, 101(1) :295–297.
- Banci, L., Bertini, I., McGreevy, K. S., and Rosato, A. (2010). Molecular recognition in copper trafficking. *Natural Product Reports*, 27(5) :695–710.
- Bancroft, J. D. and Gamble, M. (2008). *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier Health Sciences.
- Barrette, I., Poisson, G., Gendron, P., and Major, F. (2001). Pseudoknots in prion protein mRNAs confirmed by comparative sequence analysis and pattern searching. *Nucleic Acids Research*, 29(3) :753–758.

- Bassaneze, V., Miyakawa, A., and Krieger, J. (2008). A quantitative chemiluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cell cultures. *Analytical biochemistry*, 372(2) :198–203.
- Bayreuther, K., Rodemann, H., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., and Franz, P. (1988). Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(14) :5112.
- Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78(2) :547–581. PMID : 9562038.
- Bellingham, S. A., Coleman, L. A., Masters, C. L., Camakaris, J., and Hill, A. F. (2009). Regulation of prion gene expression by transcription factors SP1 and metal transcription factor-1. *The Journal of biological chemistry*, 284(2) :1291–1301. PMID : 18990686.
- Benedetti, M. G., Foster, A. L., Vantipalli, M. C., White, M. P., Sampayo, J. N., Gill, M. S., Olsen, A., and Lithgow, G. J. (2008). Compounds that confer thermal stress resistance and extended lifespan. *Experimental gerontology*, 43(10) :882–891. PMID : 18755260.
- Benvegnù, S., Gasperini, L., and Legname, G. (2011). Aged PrP null mice show defective processing of neuregulins in the peripheral nervous system. *Molecular and Cellular Neuroscience*.
- Biro, J. C. (2003). The prion paradox : infection or polymerisation ? *Applied Bioinformatics*, 2 :25–30.
- Bleackley, M. R. and Macgillivray, R. T. A. (2011). Transition metal homeostasis : from yeast to human disease. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*. PMID : 21479832.
- Bodnar, A., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S., Chiu, C., Morin, G., Harley, C., Shay, J., Lichtsteiner, S., and Wright, W. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349) :349–352.
- Borel, J., Randoux, A., Maquart, F., and Gillery, P. (1997). *Biochimie dynamique*. De Boeck Supérieur.
- Borghouts, C., Kerschner, S., and Osiewacz, H. (2000). Copper-dependence of mitochondrial DNA rearrangements in *podospora anserina*. *Current genetics*, 37(4) :268–275.
- Borghouts, C., Kimpel, E., and Osiewacz, H. D. (1997). Mitochondrial DNA rearrangements of *podospora anserina* are under the control of the nuclear gene *grisea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20) :10768–10773. PMID : 9380708.
- Borghouts, C. and Osiewacz, H. D. (1998). GRISEA, a copper-modulated transcription factor from *podospora anserina* involved in senescence and morphogenesis, is an ortholog of MAC1 in *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics : MGG*, 260(5) :492–502. PMID : 9894921.
- Borghouts, C., Werner, A., Elthon, T., and Osiewacz, H. D. (2001). Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *podospora anserina*. *Molecular and Cellular Biology*, 21(2) :390–399. PMID : 11134328.
- Bornstein, P. (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins : an appraisal of thrombospondin 1. *The Journal of cell biology*, 130(3) :503–506.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., and Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants : Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in enzymology*, 186 :343–355.
- Bousset, L. and Melki, R. (2005). Protéines prions : propriétés de repliement et d'agrégation. *M/S : médecine sciences*, 21(6-7).

- Brack, C., Lithgow, G., Osiewacz, H., and Toussaint, O. (2000). EMBO WORKSHOP REPORT : molecular and cellular gerontology serpiano, switzerland, september 18-22, 1999. *The EMBO Journal*, 19(9) :1929–1934. PMID : 10790359.
- Brekken, R. and Sage, E. (2000). SPARC, a matricellular protein : at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biology*, 19(7) :569–580.
- Brewer, G. (2003). Copper in medicine. *Current opinion in chemical biology*, 7(2) :207–212.
- Brewer, G., Kanzer, S., Zimmerman, E., Celmins, D., Heckman, S., and Dick, R. (2010). Copper and ceruloplasmin abnormalities in alzheimer’s disease. *American Journal of Alzheimer’s Disease and Other Dementias*, 25(6) :490–497.
- Brewer, G. J. (2007). Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and alzheimer’s disease. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 232(2) :323–335. PMID : 17259340.
- Brewer, G. J. (2010). Risks of copper and iron toxicity during aging in humans. *Chemical Research in Toxicology*, 23(2) :319–326.
- Brown, D., Clive, C., and Haswell, S. (2001). Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *Journal of neurochemistry*, 76(1) :69–76.
- Brown, D., Clive, C., and Haswell, S. (2008). Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *Journal of neurochemistry*, 76(1) :69–76.
- Brown, D., Wong, B., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S., and Jones, I. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochemical Journal*, 344(Pt 1) :1.
- Brunk, U. T. and Terman, A. (2002). Lipofuscin : mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(5) :611–619. PMID : 12208347.
- Buckley, W. (2000). Trace element dynamics. *Farm animal metabolism and nutrition. Wallingford : CAB International*, page 161–182.
- Budavari, S. (1996). *The Merck Index*. Chapman & Hall.
- Butterfield, D. and Kanski, J. (2001). Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mechanisms of ageing and development*, 122(9) :945–962.
- Cammack, R. and Hughes, M. (2007). Considerations for the specification of enzyme assays involving metal ions. In *Proceedings of the Beilstein-Institut Workshop, September 23rd–26th, Rudesheim, Germany*, page 93–107.
- Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging : good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120(4) :513–522.
- Campisi, J. and d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence : when bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9) :729–740. PMID : 17667954.
- Carroll, M. C., Girouard, J. B., Ulloa, J. L., Subramaniam, J. R., Wong, P. C., Valentine, J. S., and Culotta, V. C. (2004). Mechanisms for activating cu- and zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS cu chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16) :5964–5969. PMID : 15069187.
- Castro, P., Giri, D., Lamb, D., and Ittmann, M. (2003). Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate*, 55(1) :30–38.
- Caughey, B. and Baron, G. S. (2006). Prions and their partners in crime. *Nature*, 443(7113) :803–810.

- Cessac-Guillemet, A. (1995). *Etude de la réabsorption de l'albumine dans le tube proximal de rein de rat. Modifications au cours du vieillissement*. PhD thesis.
- Chainiaux, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2002). Exposure of human skin diploid fibroblasts to repeated subcytotoxic doses of ultraviolet-b induces the overexpression of transforming growth factor-beta1 mRNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973 :44–48. PMID : 12485831.
- Chen, J., Myerburg, M. M., Passero, C. J., Winarski, K. L., and Sheng, S. (2011). External cu<sup>2+</sup> inhibits human epithelial na<sup>+</sup> channels by binding at a subunit interface of extracellular domains. *The Journal of biological chemistry*, 286(31) :27436–27446. PMID : 21659509.
- Chen, J.-H., Hales, C. N., and Ozanne, S. E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing : causal or correlative? *Nucleic Acids Research*, 35(22) :7417–7428.
- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L. J., and Ames, B. N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10) :4337–4341. PMID : 7753808 PMCID : 41939.
- Chen, Q. M., Tu, V. C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O., and Dilley, T. (2000). Involvement of rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 22) :4087–4097. PMID : 11058095.
- Chiesa, R., Pestronk, A., Schmidt, R. E., Tourtellotte, W. G., Ghetti, B., Piccardo, P., and Harris, D. A. (2001). Primary myopathy and accumulation of PrPSc-Like molecules in peripheral tissues of transgenic mice expressing a prion protein insertional mutation. *Neurobiology of Disease*, 8(2) :279–288.
- Choi, C. J., Anantharam, V., Saetveit, N. J., Houk, R. S., Kanthasamy, A., and Kanthasamy, A. G. (2007). Normal cellular prion protein protects against manganese-induced oxidative stress and apoptotic cell death. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 98(2) :495–509. PMID : 17483122.
- Chondrogianni, N. and Gonos, E. (2004). Proteasome inhibition induces a senescence-like phenotype in primary human fibroblasts cultures. *Biogerontology*, 5(1) :55–61.
- Chondrogianni, N., Stratford, F., Trougakos, I., Friguet, B., Rivett, A., and Gonos, E. (2003). Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30) :28026–28037.
- Chuaire-Noack, L., Sánchez-Corredor, M. C., and Ramírez-Clavijo, S. R. (2010). Papel dual de la senescencia en la tumorigénesis. *International Journal of Morphology*, 28(1) :37–50.
- Ciechanover, A. (2005). Intracellular protein degradation : from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin–proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 44(37) :5944–5967.
- Cobine, P., Ojeda, L., Rigby, K., and Winge, D. (2004). Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14) :14447–14455.
- Cobine, P., Pierrel, F., Bestwick, M., and Winge, D. (2006). Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(48) :36552–36559.
- Cody, J. and Fahrni, C. (2004). Fluorescence sensing based on cation-induced conformational switching : copper-selective modulation of the photoinduced intramolecular charge transfer of a donor-acceptor biphenyl fluorophore. *Tetrahedron*, 60(49) :11099–11107.

- Cohen, S., Graham, M., Lovrecz, G., Bache, N., Robinson, P., and Reddel, R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*, 315(5820) :1850–1853.
- Colby, D. W. and Prusiner, S. B. (2011). Prions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1).
- Coppé, J., Patil, C., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D., Goldstein, J., Nelson, P., Desprez, P., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*, 6(12) :e301.
- Coux, O. and Piechaczyk, M. (2000). Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe (s) pour dégrader les protéines : Interactions moléculaires. *MS. Médecine sciences*, 16(5) :623–629.
- Coyle, P., Philcox, J., Carey, L., and Rofe, A. (2002). Metallothionein : the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(4) :627–647.
- Crichton, R. R. and Pierre, J. L. (2001). Old iron, young copper : from mars to venus. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 14(2) :99–112. PMID : 11508852.
- Crick, F. et al. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258) :561–563.
- Cuadrado, A. and Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal*, 429(3) :403–417. PMID : 20626350.
- Culotta, V. (2010). Cell biology of copper. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15(1) :1–2.
- Das, P., Golde, T., et al. (2006). Dysfunction of TGF-beta signaling in alzheimer's disease. *Journal of Clinical Investigation*, 116(11) :2855.
- de Magalhães, J. P. and Toussaint, O. (2004). Telomeres and telomerase : a modern fountain of youth? *Rejuvenation Research*, 7(2) :126–133. PMID : 15312299.
- de Romaña, D., Olivares, M., Uauy, R., and Araya, M. (2011). Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.
- Debacq-Chainiaux, F., Boilan, E., Dedessus Le Moutier, J., Weemaels, G., and Toussaint, O. (2010a). p38(MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 694 :126–137. PMID : 20886761.
- Debacq-Chainiaux, F., Boilan, E., Moutier, J., Weemaels, G., and Toussaint, O. (2010b). p38 MAPK in the senescence of human and murine fibroblasts. *Protein Metabolism and Homeostasis in Aging*, page 126–137.
- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S., Remacle, J., and Toussaint, O. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 4) :743–758. PMID : 15671065.
- Debacq-Chainiaux, F., Pascal, T., Boilan, E., Bastin, C., Bauwens, E., and Toussaint, O. (2008). Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGFBP-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(10) :1817–1832. PMID : 18329388.
- Decker, H., Schweikardt, T., Nillius, D., Salzbrunn, U., Jaenicke, E., and Tuczec, F. (2007). Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene*, 398(1) :183–191.
- Decker, H. and Terwilliger, N. (2000). Cops and robbers : putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *Journal of Experimental Biology*, 203(12) :1777–1782.

- Del Corso, L., Pastine, F., Protti, M., Romanelli, A., Moruzzo, D., Ruocco, L., and Pentimone, F. (2000). Blood zinc, copper and magnesium in aging. a study in healthy home-living elderly. *Panminerva medica*, 42(4) :273.
- DeMartino, G. and Gillette, T. (2007). Proteasomes : machines for all reasons. *Cell*, 129(4) :659–662.
- di Fagagna, F., Reaper, P., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N., and Jackson, S. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *NATURE-LONDON*, page 194–197.
- DICU, Q. (2009). QuantiChrom™ copper assay kit.
- Dierick, J. F., Kalume, D. E., Wenders, F., Salmon, M., Dieu, M., Raes, M., Roepstorff, P., and Toussaint, O. (2002). Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Letters*, 531(3) :499–504. PMID : 12435600.
- Dijke, P. and Hill, C. (2004). New insights into TGF- $\beta$ -Smad signalling. *Trends in biochemical sciences*, 29(5) :265–273.
- Dimri, G. P. and Campisi, J. (1994). Molecular and cell biology of replicative senescence. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 59 :67–73. PMID : 7587128.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20) :9363–9367. PMID : 7568133.
- Dodani, S., Leary, S., Cobine, P., Winge, D., and Chang, C. (2011). A targetable fluorescent sensor reveals that copper-deficient SCO1 and SCO2 patient cells prioritize mitochondrial copper homeostasis. *Journal of the American Chemical Society*.
- Du, T., Caragounis, A., Parker, S. J., Meyerowitz, J., La Fontaine, S., Kanninen, K. M., Perreau, V. M., Crouch, P. J., and White, A. R. (2011). A potential copper-regulatory role for cytosolic expression of the DNA repair protein XRCC5. *Free radical biology & medicine*, 51(11) :2060–2072. PMID : 21971347.
- Duan, X., Block, E., Li, Z., Connelly, T., Zhang, J., Huang, Z., Su, X., Pan, Y., Wu, L., Chi, Q., et al. (2012). Crucial role of copper in detection of metal-coordinating odorants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9) :3492–3497.
- Duffus, J. (2002). “Heavy metals”—a meaningless term? *Pure Appl. Chem*, 74(5) :793–807.
- Dulic, V., Kaufmann, W., Wilson, S., Tlsty, T., Lees, E., Harper, J., Elledge, S., and Reed, S. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, 76(6) :1013–1023.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Fripiat, C., Mazarati, J. B., Eliaers, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2000). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(3) :361–373. PMID : 10699747.
- Dumont, P., Royer, V., Pascal, T., Dierick, J. F., Chainiaux, F., Fripiat, C., de Magalhaes, J. P., Eliaers, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2001). Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Letters*, 502(3) :109–112. PMID : 11583109.
- Duncan, E. and Reddel, R. (1999). Downregulation of metallothionein-IIA expression occurs at immortalization. *Oncogene*, 18(4) :897.

- Dupiereux, I., Falisse-Poirrier, N., Zorzi, W., Watt, N., Thellin, O., Zorzi, D., Pierard, O., Hooper, N., Heinen, E., and Elmoualij, B. (2008). Protective effect of prion protein via the n-terminal region in mediating a protective effect on paraquat-induced oxidative injury in neuronal cells. *Journal of neuroscience research*, 86(3) :653–659.
- Dupiereux, I., Zorzi, W., Quadrio, I., Perret-Liaudet, A., Kovacs, G., Heinen, E., and Elmoualij, B. (2009). Creutzfeldt-jakob, parkinson, lewy body dementia and alzheimer diseases : from diagnosis to therapy. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 9(1) :2–11.
- Eaton, J. and Qian, M. (2002). Interactions of copper with glycated proteins : possible involvement in the etiology of diabetic neuropathy. *Molecular and cellular biochemistry*, 234(1) :135–142.
- Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B., Couloux, A., Aury, J., Ségurens, B., Poulain, J., et al. (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *podospira anserina*. *Genome Biol*, 9(5) :R77.
- Evans, P., Halliwell, B., et al. (2001). Micronutrients : oxidant/antioxidant status. *British Journal of Nutrition*, 85(2) :67.
- Field, L. S., Luk, E., and Culotta, V. C. (2002). Copper chaperones : personal escorts for metal ions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 34(5) :373–379. PMID : 12539964.
- Finkel, T., Holbrook, N., et al. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *NATURE-LONDON*, page 239–247.
- Folmer, D., Malingré, H., Klomp, A., Merckx, M., Berger, R., Klomp, L., et al. (2007). Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. *The Biochemical journal*, 407(Pt 1) :49.
- Frederiksen, J., Li, N., Das, R., Herschlag, D., and Piccirilli, J. (2012). Metal-ion rescue revisited : Biochemical detection of site-bound metal ions important for RNA folding. *RNA*, 18(6) :1123–1141.
- Frippiat, C., Chen, Q. M., Zdanov, S., Magalhaes, J. P., Remacle, J., and Toussaint, O. (2001). Subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(4) :2531–2537. PMID : 11060295.
- Frippiat, C., Dewelle, J., Remacle, J., and Toussaint, O. (2002). Signal transduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(10) :1334–1346.
- Frippiat, C., Remacle, J., and Toussaint, O. (2003). Down-regulation and decreased activity of cyclin-dependent kinase 2 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35(2) :246–254.
- Fujiwara, N., Nakano, M., Kato, S., Yoshihara, D., Ookawara, T., Eguchi, H., Taniguchi, N., and Suzuki, K. (2007). Oxidative modification to cysteine sulfonic acid of cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49) :35933–35944.
- Fumagalli, M. and Di Fagagna, F. (2009). SASPense and DDRama in cancer and ageing. *Nature cell biology*, 11(8) :921–923.
- Gadhia, S. R., Calabro, A. R., and Barile, F. A. (2012). Trace metals alter DNA repair and histone modification pathways concurrently in mouse embryonic stem cells. *Toxicology letters*, 212(2) :169–179. PMID : 22641096.
- Gaitanaki, C., Pliatska, M., Stathopoulou, K., and Beis, I. (2007). Cu<sup>2+</sup> and acute thermal stress induce protective events via the p38-MAPK signalling pathway in the perfused rana ridibunda heart. *The Journal of experimental biology*, 210(Pt 3) :438–446. PMID : 17234613.

- Galhardi, C., Diniz, Y., Faine, L., Rodrigues, H., Burneiko, R., Ribas, B., and Novelli, E. (2004). Toxicity of copper intake : lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food and chemical toxicology*, 42(12) :2053–2060.
- Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., Alsheklee, A., Castellani, R., Cohen, M., Barria, M., Gonzalez-Romero, D., et al. (2008). A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Annals of neurology*, 63(6) :697–708.
- Gambling, L., Kennedy, C., and McArdle, H. (2011). Iron and copper in fetal development. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- Garrick, M., Dolan, K., Horbinski, C., Ghio, A., Higgins, D., Porubcin, M., Moore, E., Hainsworth, L., Umbreit, J., Conrad, M., et al. (2003). DMT1 : a mammalian transporter for multiple metals. *Biometals*, 16(1) :41–54.
- Giannopoulos, P. N., Robertson, C., Jodoin, J., Paudel, H., Booth, S. A., and LeBlanc, A. C. (2009). Phosphorylation of prion protein at serine 43 induces prion protein conformational change. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(27) :8743–8751. PMID : 19587281.
- Gilca, M., Stoian, I., Atanasiu, V., Virgolici, B., et al. (2007). The oxidative hypothesis of senescence. *Journal of postgraduate medicine*, 53(3) :207.
- Gilley, D., Tanaka, H., and Herbert, B. (2005). Telomere dysfunction in aging and cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(5) :1000–1013.
- Ginaldi, L., Loreto, M. F., Corsi, M. P., Modesti, M., and De Martinis, M. (2001). Immunosenescence and infectious diseases. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 3(10) :851–857. PMID : 11580980.
- Glickman, M. and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway : destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*, 82(2) :373–428.
- Goh, A. X.-H., Li, C., Sy, M.-S., and Wong, B.-S. (2007). Altered prion protein glycosylation in the aging mouse brain. *Journal of Neurochemistry*, 100(3) :841–854. PMID : 17144900.
- Goldfarb, L. G., Brown, P., McCombie, W. R., Goldgaber, D., Swergold, G. D., Wills, P. R., Cervenakova, L., Baron, H., Gibbs, C. J., and Gajdusek, D. C. (1991). Transmissible familial creutzfeldt-jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23) :10926.
- Gong, D., Lu, J., Chen, X., Reddy, S., Crossman, D. J., Glyn-Jones, S., Choong, Y.-S., Kennedy, J., Barry, B., Zhang, S., Chan, Y.-K., Ruggiero, K., Phillips, A. R. J., and Cooper, G. J. S. (2008). A copper(II)-selective chelator ameliorates diabetes-evoked renal fibrosis and albuminuria, and suppresses pathogenic TGF-beta activation in the kidneys of rats used as a model of diabetes. *Diabetologia*, 51(9) :1741–1751. PMID : 18636238.
- Gray, A., Staples, V., Murren, K., Dhariwal, A., and Bentham, P. (2001). Olfactory identification is impaired in clinic-based patients with vascular dementia and senile dementia of alzheimer type. *International journal of geriatric psychiatry*, 16(5) :513–517.
- Griffiths, A. J. (1992). Fungal senescence. *Annual review of genetics*, 26 :351–372. PMID : 1482117.
- Gropper, S., Smith, J., and Groff, J. (2008). *Advanced nutrition and human metabolism*. Wadsworth Pub Co.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., and Davies, K. J. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and  $\alpha$ -aggregates<sup>TM</sup> during oxidative stress, aging, and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12) :2519–2530.

- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., and Hediger, M. A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388(6641) :482–488. PMID : 9242408.
- Guo, Y., Smith, K., Lee, J., Thiele, D. J., and Petris, M. J. (2004). Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human ctr1 copper transporter. *The Journal of biological chemistry*, 279(17) :17428–17433. PMID : 14976198.
- Gutteridge, J. and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000 : a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1) :136–147.
- Günther, V., Lindert, U., and Schaffner, W. (2012). The taste of heavy metals : Gene regulation by MTF-1. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(9) :1416–1425. PMID : 22289350.
- Hachiya, N., Yamada, M., Watanabe, K., Jozuka, A., Ohkubo, T., Sano, K., Takeuchi, Y., Kozuka, Y., Sakasegawa, Y., and Kaneko, K. (2005). Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP<sup>c</sup>. *Neuroscience letters*, 374(2) :98–103.
- Haigis, M. C. and Yankner, B. A. (2010). The aging stress response. *Molecular Cell*, 40(2) :333–344.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants : updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5) :257–265.
- Handy, R. (2002). Sodium-dependent copper uptake across epithelia : a review of rationale with experimental evidence from gill and intestine. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1566 :104.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274) :458–460. PMID : 2342578.
- Hart, E. B., Steenbock, H., Waddell, J., and Elvehjem, C. A. (2002). Iron in nutrition. VII. copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. 1928. *The Journal of biological chemistry*, 277(34) :e22. PMID : 12243126.
- Hay, E. (1991). *Cell biology of extracellular matrix*. Springer.
- Hayashi, H., Yano, M., Fujita, Y., and Wakusawa, S. (2006). Compound overload of copper and iron in patients with wilson’s disease. *Medical molecular morphology*, 39(3) :121–126.
- Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25 :585–621. PMID : 13905659.
- Herbig, U., Jobling, W., Chen, B., Chen, D., and Sedivy, J. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Molecular cell*, 14(4) :501–513.
- Hirai, H., Roussel, M., Kato, J., Ashmun, R., and Sherr, C. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin d-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Molecular and cellular biology*, 15(5) :2672–2681.
- Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 458(7237) :422–429.
- Horikoshi, T., Balin, A., and Carter, D. (1986). Effect of oxygen on the growth of human epidermal keratinocytes. *Journal of investigative dermatology*, 86(4) :424–427.
- Horikoshi, T., Balin, A., and Carter, D. (1991). Effects of oxygen tension on the growth and pigmentation of normal human melanocytes. *Journal of investigative dermatology*, 96(6) :841–844.

- Hussain, F. and Wittung-Stafshede, P. (2007). Impact of cofactor on stability of bacterial (CopZ) and human (Atox1) copper chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, 1774(10) :1316–1322.
- Höhn, A., Jung, T., Grimm, S., and Grune, T. (2010). Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants : role in senescent cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 48(8) :1100–1108. PMID : 20116426.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by nrf2 through binding to the amino-terminal neh2 domain. *Genes & development*, 13(1) :76–86.
- Iwasa, H., Han, J., and Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells*, 8(2) :131–144.
- Jaegly, A., Mouthon, F., Peyrin, J. M., Camugli, B., Deslys, J. P., and Dormont, D. (1998). Search for a nuclear localization signal in the prion protein. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 11(3) :127–133.
- Jamet-Vierny, C., Boulay, J., and Briand, J. (1997). Intramolecular cross-overs generate deleted mitochondrial DNA molecules in *podospora anserina*. *Current genetics*, 31(2) :162–170.
- Jeyapalan, J. and Sedivy, J. (2008). Cellular senescence and organismal aging. *Mechanisms of ageing and development*, 129(7) :467–474.
- Jolly, R., Douglas, B., Davey, P., and Roiri, J. (1995). Lipofuscin in bovine muscle and brain : a model for studying age pigment. *Gerontology*, 41(2) :283–296.
- Jomova, K. and Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3) :65–87. PMID : 21414382.
- Jones, D., Mody, V., Carlson, J., Lynn, M., Sternberg, P., et al. (2002). Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(9) :1290–1300.
- Kaden, D., Bush, A., Danzeisen, R., Bayer, T., and Multhaup, G. (2011). Disturbed copper bioavailability in alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011.
- Kapeta, S., Chondrogianni, N., and Gonos, E. S. (2010). Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 285(11) :8171–8184. PMID : 20068043.
- Kaplan, J. H. and Lutsenko, S. (2009). Copper transport in mammalian cells : special care for a metal with special needs. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(38) :25461–25465. PMID : 19602511.
- Kar, S., Subbaram, S., Carrico, P., and Melendez, J. (2010). Redox-control of matrix metalloproteinase-1 : A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respiratory physiology & neurobiology*, 174(3) :299–306.
- Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science*, 295(5564) :2446–2449.
- Katamine, S., Nishida, N., Sugimoto, T., Noda, T., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Kataoka, Y., Nakatani, A., Hasegawa, S., Moriuchi, R., et al. (1998). Impaired motor coordination in mice lacking prion protein. *Cellular and molecular neurobiology*, 18(6) :731–742.
- Kawamura, N., Ookawara, T., Suzuki, K., Konishi, K., Mino, M., and Taniguchi, N. (1992). Increased glycated cu, zn-superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 74(6) :1352–1354.

- Ke, Y., Chang, Y. Z., Duan, X. L., Du, J. R., Zhu, L., Wang, K., Yang, X. D., Ho, K. P., and Qian, Z.-M. (2005). Age-dependent and iron-independent expression of two mRNA isoforms of divalent metal transporter 1 in rat brain. *Neurobiology of aging*, 26(5) :739–748. PMID : 15708449.
- Kiernan, J. A. J. A. (1999). *Histological and histochemical methods : theory and practice / J.A. Kiernan*. Oxford [U.K.]; Boston : Butterworth-Heinemann, 3rd ed edition. Includes index.
- Kikugawa, K., Kato, T., Beppu, M., Hayasaka, A., et al. (1989). Fluorescent and cross-linked proteins formed by free radical and aldehyde species generated during lipid oxidation. *Advances in experimental medicine and biology*, 266 :345.
- Killilea, D. W., Atamna, H., Liao, C., and Ames, B. N. (2003). Iron accumulation during cellular senescence in human fibroblasts *In Vitro. Antioxidants & Redox Signaling*, 5(5) :507–516.
- KILLILEA, D. W., WONG, S. L., CAHAYA, H. S., ATAMNA, H., and AMES, B. N. (2004). Iron accumulation during cellular senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019(1) :365–367.
- Kim, B., Nevitt, T., and Thiele, D. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature chemical biology*, 4(3) :176–185.
- Kim, K., Park, G., Lim, Y., Rue, S., Jung, J., Sonn, J., Bae, Y., Park, J., and Lee, Y. (2004). Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor-[beta]-mediated signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 318(4) :819–825.
- Kinnula, V. (2005). Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax*, 60(8) :693–700.
- Klinman, J. (1996). Mechanisms whereby mononuclear copper proteins functionalize organic substrates. *Chemical reviews*, 96(7).
- Klionsky, D., Herman, P., and Emr, S. (1990). The fungal vacuole : composition, function, and biogenesis. *Microbiological reviews*, 54(3) :266.
- Kong, Y., Cui, H., Ramkumar, C., and Zhang, H. (2011). Regulation of senescence in cancer and aging. *Journal of Aging Research*, 2011 :1–15.
- Korth, C., Kaneko, K., and Prusiner, S. B. (2000). Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrPSc formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *Journal of General Virology*, 81(10) :2555.
- Kozłowski, H., Janicka-Kłos, A., Brasun, J., Gaggelli, E., Valensin, D., and Valensin, G. (2009). Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coordination Chemistry Reviews*, 253(21) :2665–2685.
- Kralovicova, S., Fontaine, S. N., Alderton, A., Alderman, J., Ragnarsdottir, K. V., Collins, S. J., and Brown, D. R. (2009). The effects of prion protein expression on metal metabolism. *Molecular and cellular neurosciences*, 41(2) :135–147. PMID : 19233277.
- Kupfer, L., Hinrichs, W., and Groschup, M. (2009). Prion protein misfolding. *Current Molecular Medicine*, 9(7) :826–835.
- Kurtz, A. and Oh, S. (2012). Age related changes of the extracellular matrix and stem cell maintenance. *Preventive Medicine*.
- Kurz, D., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 113(20) :3613–3622.

- Kurz, D., Decary, S., Hong, Y., Trivier, E., Akhmedov, A., and Erusalimsky, J. (2004). Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *Journal of cell science*, 117(11) :2417–2426.
- Kurz, T., Eaton, J., and Brunk, U. (2010). Redox activity within the lysosomal compartment : implications for aging and apoptosis. *Antioxidants & redox signaling*, 13(4) :511–523.
- Kwak, M., Wakabayashi, N., Greenlaw, J., Yamamoto, M., and Kensler, T. (2003). Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the keap1-nrf2 signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, 23(23) :8786–8794.
- Le Pichon, C., Valley, M., Polymenidou, M., Chesler, A., Sagdullaev, B., Aguzzi, A., and Firestein, S. (2008). Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nature neuroscience*, 12(1) :60–69.
- Leary, S. and Winge, D. (2007). The janus face of copper : its expanding roles in biology and the pathophysiology of disease. *EMBO reports*, 8(3) :224–227.
- Leary, S. C., Winge, D. R., and Cobine, P. A. (2009). "Pulling the plug" on cellular copper : The role of mitochondria in copper export. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(1) :146–153.
- Leask, A. and Abraham, D. (2003). The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochemistry and cell biology*, 81(6) :355–363.
- Lee, H. and Wei, Y. (1997). Role of mitochondria in human aging. *Journal of biomedical science*, 4(6) :319–326.
- Lee, Y. J. and Baskakov, I. V. (2010). Treatment with normal prion protein delays differentiation and helps to maintain high proliferation activity in human embryonic stem cells. *Journal of Neurochemistry*, 114(2) :362–373. PMID : 20089130.
- Lenartowicz, M., Wiczerzak, K., Krzeptowski, W., Dobosz, P., Grzmił, P., Starzyński, R., and Lipiński, P. (2010). Developmental changes in the expression of the atp7a gene in the liver of mice during the postnatal period. *Journal of Experimental Zoology Part A : Ecological Genetics and Physiology*, 313(4) :209–217.
- Lewis, E. and Tolman, W. (2004). Reactivity of Dioxygen—Copper systems. *ChemInform*, 35(21) :no–no.
- Liang, J., Pan, Y., Zhang, D., Guo, C., Shi, Y., Wang, J., Chen, Y., Wang, X., Liu, J., Guo, X., et al. (2007). Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS. *The FASEB Journal*, 21(9) :2247–2256.
- Liang, Z. D., Tsai, W.-B., Lee, M.-Y., Savaraj, N., and Kuo, M. T. (2012). Specificity protein 1 (sp1) oscillation is involved in copper homeostasis maintenance by regulating human high-affinity copper transporter 1 expression. *Molecular pharmacology*, 81(3) :455–464. PMID : 22172574.
- Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A. M., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Brentani, R. R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiological Reviews*, 88(2) :673–728.
- Linder, M. and Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *The American journal of clinical nutrition*, 63(5) :797S–811S.
- Linder, M., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., and Lomeli, N. (1998). Copper transport. *The American journal of clinical nutrition*, 67(5) :965S–971S.
- Linder, M. C. (2012). The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1–2) :83–91.

- Lorin, S., Dufour, E., and Sainsard-Chanet, A. (2006). Mitochondrial metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(5) :604–610.
- Lovell, M., Robertson, J., Teesdale, W., Campbell, J., Markesbery, W., et al. (1998). Copper, iron and zinc in alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the neurological sciences*, 158(1) :47.
- Lu, T. and Finkel, T. (2008). Free radicals and senescence. *Experimental cell research*, 314(9) :1918–1922.
- Luheshi, L., Crowther, D., and Dobson, C. (2008). Protein misfolding and disease : from the test tube to the organism. *Current opinion in chemical biology*, 12(1) :25–31.
- Lutsenko, S., Barnes, N. L., Bartee, M. Y., and Dmitriev, O. Y. (2007). Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiological Reviews*, 87(3) :1011–1046.
- MacKenzie, E., Ray, P., and Tsuji, Y. (2008). Role and regulation of ferritin h in rotenone-mediated mitochondrial oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(9) :1762–1771.
- Malaisé, M., Schätzl, H., and Bürkle, A. (2008). The octarepeat region of prion protein, but not the TM1 domain, is important for the antioxidant effect of prion protein. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(12) :1622–1630.
- Mangialasche, F., Polidori, M., Monastero, R., Ercolani, S., Camarda, C., Cecchetti, R., and Mecocci, P. (2009). Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing research reviews*, 8(4) :285–305.
- Mansouri, A., Gaou, I., Fromenty, B., Berson, A., Letteron, P., Degott, C., Erlinger, S., and Pessayre, D. (1997). Premature oxidative aging of hepatic mitochondrial DNA in wilson's disease. *Gastroenterology*, 113(2) :599–605.
- Maret, W. (2006). Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10) :1419–1441.
- Martin, J. and Buckwalter, J. (2001). Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *The Journals of Gerontology Series A : Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(4) :B172–B179.
- Materia, S., Cater, M., Klomp, L., Mercer, J., and La Fontaine, S. (2012). Clusterin and COMMD1 independently regulate degradation of the mammalian copper ATPases ATP7A and ATP7B. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4) :2485–2499.
- Mays, C. and Ryou, C. (2010). Plasminogen stimulates propagation of protease-resistant prion protein in vitro. *The FASEB Journal*, 24(12) :5102–5112.
- McDonald, A. and Vanlerberghe, G. (2004). Branched mitochondrial electron transport in the animalia : presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUBMB life*, 56(6) :333–341.
- MDuff, F. and Turner, S. (2011). Jailbreak : Oncogene-induced senescence and its evasion. *Cellular signalling*, 23(1) :6–13.
- Meagher, E. and FitzGerald, G. (2000). Indices of lipid peroxidation in vivo : strengths and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(12) :1745–1750.
- Medrano, E. (2005). Analysis of cellular senescence in culture in vivo : The senescence-associated  $\beta$ -galactosidase assay. *Current Protocols in Cell Biology*, 18 :1–18.
- Mehrpour, M. and Codogno, P. (2010). Prion protein : From physiology to cancer biology. *Cancer letters*, 290(1) :1–23.
- Mendez, M., Stanley, A., Park, H., Shon, K., Phillips, T., and Menzoian, J. (1998). Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *Journal of vascular surgery*, 28(5) :876–883.

- Mercer, J. et al. (2001). The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends in molecular medicine*, 7(2) :64.
- Miller, E. W., Zeng, L., Domaille, D. W., and Chang, C. J. (2006). Preparation and use of coppersensor-1, a synthetic fluorophore for live-cell copper imaging. *Nature Protocols*, 1(2) :824–827. PMID : 17406313.
- Minamino, T. and Komuro, I. (2002). Role of telomere in endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*, 13(5) :537.
- Miyajima, H., Takahashi, Y., and Kono, S. (2003). Aceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism. *Biometals*, 16(1) :205–213.
- Miyayama, T., Ishizuka, Y., Iijima, T., Hiraoka, D., and Ogra, Y. (2011). Roles of copper chaperone for superoxide dismutase 1 and metallothionein in copper homeostasis. *Metallomics*, 3(7) :693–701.
- Miyazawa, K., Emmerling, K., and Manuelidis, L. (2010). Proliferative arrest of neural cells induces prion protein synthesis, nanotube formation, and cell-to-cell contacts. *Journal of cellular biochemistry*, 111(1) :239–247.
- Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Cipriano, C., Muti, E., and Malavolta, M. (2006). Zinc-binding proteins (metallothionein and  $\alpha$ -2 macroglobulin) and immunosenescence. *Experimental gerontology*, 41(11) :1094–1107.
- Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Piacenza, F., Basso, A., and Malavolta, M. (2012). Micronutrient (Zn, cu, fe)–gene interactions in ageing and inflammatory age-related diseases : Implications for treatments. *Ageing Research Reviews*, 11(2) :297–319.
- Morel, E., Fouquet, S., Strup-Perrot, C., Thievend, C., Petit, C., Loew, D., Faussat, A., Yvernault, L., Pinçon-Raymond, M., Chambaz, J., et al. (2008). The cellular prion protein PrPc is involved in the proliferation of epithelial cells and in the distribution of junction-associated proteins. *PLoS one*, 3(8) :e3000.
- Morris, M., Evans, D., Tangney, C., Bienias, J., Schneider, J., Wilson, R., and Scherr, P. (2006). Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline. *Archives of Neurology*, 63(8) :1085.
- Motonishi, S., Hayashi, H., Fujita, Y., Okada, H., Kusakabe, A., Ito, M., Miyamoto, K., and Ueno, T. (2006). Copper- and iron-rich matrices in hepatocellular lipofuscin particles of a young male patient : diagnostic ultrastructures for wilson disease. *Ultrastructural Pathology*, 30(6) :409–414. PMID : 17182432.
- Muller, P. and Klomp, L. (2009). ATOX1 : a novel copper-responsive transcription factor in mammals? *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(6) :1233–1236.
- Negro, A., Meggio, F., Bertoli, A., Battistutta, R., Sorgato, M. C., and Pinna, L. A. (2000). Susceptibility of the prion protein to enzymic phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(2) :337–341.
- Nordberg, M., Schaffner, W., Sigel, A., Sigel, H., and Sigel, R. (2009). *Metallothioneins and related chelators*, volume 5. Royal Society of Chemistry.
- Norrby, E. (2011). Prions and protein-folding diseases. *Journal of internal medicine*, 270(1) :1–14. PMID : 21481020.
- Obulesu, M., Venu, R., and Somashekhar, R. (2011). Lipid peroxidation in alzheimer’s disease : emphasis on metal-mediated neurotoxicity. *Acta Neurologica Scandinavica*, 124(5) :295–301.
- Ohgami, R., Campagna, D., McDonald, A., and Fleming, M. (2006). The steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 108(4) :1388.
- Ookawara, T., Kawamura, N., Kitagawa, Y., and Taniguchi, N. (1992). Site-specific and random fragmentation of cu, zn-superoxide dismutase by glycation reaction. implication of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 267(26) :18505–18510.

- Osiewacz, H. (2002a). Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing research reviews*, 1(3) :425–442.
- Osiewacz, H. D. (2002b). Aging in fungi : role of mitochondria in *podospora anserina*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(7) :755–764. PMID : 11869733.
- Palacios, O., Atrian, S., and Capdevila, M. (2011). Zn-and cu-thioneins : a functional classification for metallothioneins? *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, page 1–19.
- Palm-Espling, M., Niemiec, M., and Wittung-Stafshede, P. (2012). Role of metal in folding and stability of copper proteins in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*.
- Pamplona, R. (2011). Mitochondrial DNA damage and animal longevity : Insights from comparative studies. *Journal of Aging Research*, 2011 :1–9.
- Paravicini, T. and Touyz, R. (2006). Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular research*, 71(2) :247–258.
- Partridge, L. and Gems, D. (2007). Benchmarks for ageing studies. *Nature*, 450(7167) :165–167.
- Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chrétien, A., Bastin, C., Dabée, A.-F., Bertholet, V., Remacle, J., and Toussaint, O. (2005). Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS letters*, 579(17) :3651–3659. PMID : 15963989.
- Pauly, P. C. and Harris, D. A. (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(50) :33107–33110. PMID : 9837873.
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways : regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*, 22(2) :153–183.
- Percival, S. and Harris, E. (1990). Copper transport from ceruloplasmin : characterization of the cellular uptake mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 258(1) :C140–C146.
- Perret-Liaudet, A., Pelpel, M., Tholance, Y., Dumont, B., Vanderstichele, H., Zorzi, W., ElMoualij, B., Schraen, S., Moreaud, O., Gabelle, A., et al. (2012). Risk of alzheimer’s disease biological misdiagnosis linked to cerebrospinal collection tubes. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 31(1) :13–20.
- Philips, N., Hwang, H., Chauhan, S., Leonardi, D., and Gonzalez, S. (2010). Stimulation of cell proliferation and expression of matrixmetalloproteinase-1 and interleukin-8 genes in dermal fibroblasts by copper. *Connective tissue research*, 51(3) :224–229.
- Pinan-Lucarré, B., Paoletti, M., and Clavé, C. (2007). Cell death by incompatibility in the fungus *podospora*. *Seminars in Cancer Biology*, 17(2) :101–111.
- Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle : the many faces of the APC/C. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(7) :427–438.
- Polymenidou, M. and Cleveland, D. W. (2012). Prion-like spread of protein aggregates in neurodegeneration. *The Journal of experimental medicine*, 209(5) :889–893. PMID : 22566400.
- Portnoy, M., Schmidt, P., Rogers, R., and Culotta, V. (2001). Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 265(5) :873–882.
- Powell, J., Jugdaohsingh, R., Thompson, R., et al. (1999a). The regulation of mineral absorption in the gastrointestinal tract. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(1) :147–154.
- Powell, S., Gurzenda, E., Wingertzahn, M., and Wapnir, R. (1999b). Promotion of copper excretion from the isolated rat heart attenuates postischemic cardiac oxidative injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(3) :H956–H962.

- Power, R. and Horgan, K. (2000). Biological chemistry and absorption of inorganic and organic trace metals. *Biotechnology in the Feed Industry*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, page 277–291.
- Priola, S. A. and Lawson, V. A. (2001). Glycosylation influences cross-species formation of protease-resistant prion protein. *The EMBO journal*, 20(23) :6692–6699.
- Prohaska, J. (1990). Biochemical changes in copper deficiency. *Nutrition reports international*, 1(9) :452–461.
- Prohaska, J. (2008). Role of copper transporters in copper homeostasis. *The American journal of clinical nutrition*, 88(3) :826S–829S.
- Prusiner, S. (2001). Neurodegenerative diseases and prions. *New England Journal of Medicine*, 344(20) :1516–1526.
- Prusiner, S., Bolton, D., Groth, D., Bowman, K., Cochran, S., and McKinley, M. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, 21(26) :6942–6950.
- Prusiner, S. B., Bruening, G., Anderson, R. M., Satterthwaite, A. B., Rawlings, D. J., Witte, O. N., Cashmore, A. R., Rodan, G. A., Barenblatt, G. I., Bell, J. B., et al. (1998). Nobel lecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 :13363–13383.
- Puckett, C., Concannon, P., Casey, C., and Hood, L. (1991). Genomic structure of the human prion protein gene. *American journal of human genetics*, 49(2) :320.
- Puig, S., Lee, J., Lau, M., and Thiele, D. J. (2002). Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29) :26021–26030. PMID : 11983704.
- Qin, K., Zhao, L., Ash, R. D., McDonough, W. F., and Zhao, R. Y. (2009). ATM-mediated transcriptional elevation of prion in response to copper-induced oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(7) :4582–4593. PMID : 19064990.
- Quaglio, E., Chiesa, R., and Harris, D. A. (2001). Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14) :11432.
- Rachidi, W., Lehmann, S., Favier, A., Benboubetra, M., et al. (2004). Prion protein protects against DNA damage induced by paraquat in cultured cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(8) :1224–1230.
- Rachidi, W., Riondel, J., McMahon, H. M., and Favier, A. (2005). [Prion protein and copper : a mysterious relationship]. *Pathologie-Biologie*, 53(4) :244–250. PMID : 15850959.
- Ray, P. D., Huang, B.-W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24(5) :981–990. PMID : 22286106.
- Rees, E., Lee, J., and Thiele, D. (2004). Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52) :54221–54229.
- Reichard, J. F., Motz, G. T., and Puga, A. (2007). Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucleic Acids Research*, 35(21) :7074–7086. PMID : 17942419 PMCID : PMC2175339.
- Reiner, J. E. (2011). TGF-beta-dependent and -independent roles of STRAP in cancer. *Frontiers in Bioscience*, 16(1) :105.
- Richards, M. (1999). Zinc, copper, and iron metabolism during porcine fetal development. *Biological trace element research*, 69(1) :27–44.
- Riesner, D. (2003). Biochemistry and structure of PrPC and PrPSc. *British Medical Bulletin*, 66(1) :21–33.

- Rizet, G. (1953). Longevity of strains of *podospora anserina*. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 237(18) :1106.
- Rogakou, E. and Sekeri-Pataryas, K. (1999). Histone variants of H2A and h3 families are regulated during in vitro aging in the same manner as during differentiation. *Experimental gerontology*, 34(6) :741–754.
- Rolff, M., Schottenheim, J., Decker, H., and Tuczec, F. (2011). Copper–O<sub>2</sub> reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates : molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chem. Soc. Rev.*, 40(7) :4077–4098.
- Rubino, J. T., Chenkin, M. P., Keller, M., Riggs-Gelasco, P., and Franz, K. J. (2011). A comparison of methionine, histidine and cysteine in copper(I)-binding peptides reveals differences relevant to copper uptake by organisms in diverse environments. *Metallomics : integrated biometal science*, 3(1) :61–73. PMID : 21553704.
- Rudd, P. M., Merry, A. H., Wormald, M. R., and Dwek, R. A. (2002). Glycosylation and prion protein. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(5) :578–586.
- Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B., and Dwek, R. A. (2001). Prion glycoprotein : structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry*, 40(13) :3759–3766.
- Rustin, P. and Jacobs, H. (2009). Respiratory chain alternative enzymes as tools to better understand and counteract respiratory chain deficiencies in human cells and animals. *Physiologia plantarum*, 137(4) :362–370.
- Rybner, C., Finel-Szermanski, S., Felin, M., Sahraoui, T., Rousseau, C., Fournier, J. G., Sève, A. P., and Botti, J. (2002). The cellular prion protein : A new partner of the lectin CBP70 in the nucleus of NB4 human promyelocytic leukemia cells\*. *Journal of cellular biochemistry*, 84(2) :408–419.
- Ryou, C. et al. (2007). Prions and prion diseases : fundamentals and mechanistic details. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(7) :1059.
- Ryter, S. and Choi, A. (2005). Heme oxygenase-1 : redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxidants & redox signaling*, 7(1-2) :80–91.
- Sandahl, J., Baldwin, D., Jenkins, J., and Scholz, N. (2007). A sensory system at the interface between urban stormwater runoff and salmon survival. *Environmental science & technology*, 41(8) :2998–3004.
- Sasina, L. K., Tsymbalenko, N. V., Platonova, N. A., Puchkova, L. V., Voronina, O. V., Gyulikhandanova, N. E., and Gaitskhoki, V. S. (2000). Isolation and partial characterization of cDNA clone of human ceruloplasmin receptor. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 129(5) :491–495. PMID : 10977961.
- Scaler and Michka, B. (2012). *Tableau périodique des éléments — Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online ; accessed 20-August-2012].
- Scheckhuber, C. Q., Grief, J., Boilan, E., Luce, K., Debacq-Chainiaux, F., Rittmeyer, C., Gredilla, R., Kolbesen, B. O., Toussaint, O., and Osiewacz, H. D. (2009). Age-related cellular copper dynamics in the fungal ageing model *podospora anserina* and in ageing human fibroblasts. *PLoS One*, 4(3) :e4919. PMID : 19305496.
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M. A., Ball, H. L., Bradon, N., Bosque, P. J., Crossin, K. L., Edelman, G. M., DeArmond, S. J., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *Journal of Molecular Biology*, 314(5) :1209–1225. PMID : 11743735.
- Schätzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., et al. (1995). Prion protein gene variation among primates. *Journal of molecular biology*, 245(4) :362.
- Serrano, M., Lin, A., McCurrach, M., Beach, D., Lowe, S., et al. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5) :593–602.

- Seth, R., Yang, S., Choi, S., Sabeen, M., and Roberts, E. A. (2004). In vitro assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, hep g2. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 18(4) :501–509. PMID : 15130608.
- Shaw, B., Sahu, S., and Mishra, R. (2004). Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. *Heavy metal stress in plants : From biomolecules to ecosystems*, page 84–126.
- Shay, J., Wright, W., et al. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1) :72–75.
- Sheerin, A., Smith, S., Jennert-Burston, K., Brook, A., Allen, M., Ibrahim, B., Jones, D., Wallis, C., Engelmann, K., Rhys-Williams, W., et al. (2011). Characterization of cellular senescence mechanisms in human corneal endothelial cells. *Aging Cell*.
- Shen, B., Jensen, R. G., and Bohnert, H. J. (1997). Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology*, 115(2) :527–532. PMID : 12223821 PMCID : PMC158511.
- Shi, Q. and Dong, X.-P. (2011). (Ctm)PrP and ER stress : a neurotoxic mechanism of some special PrP mutants. *Prion*, 5(3) :123–125. PMID : 21795854.
- Shock, N., Greulich, R., Andres, R., Arenberg, D., Costa, P., Lakatta, E., and Tobin, J. (1984). Normal human aging. *The Baltimore Longitudinal Study of Aging. Washington, DC : US Government Printing Office*.
- Shukla, V., Mishra, S., Pant, H., et al. (2011). Oxidative stress in neurodegeneration. *Advances in pharmacological sciences*, 2011 :572634.
- Sikora, E., Arendt, T., Bennett, M., and Narita, M. (2011). Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Research Reviews*, 10(1) :146–152.
- SITTE, N., MERKER, K., VON ZGLINICKI, T., GRUNE, T., and DAVIES, K. (2000). Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts : part i—effects of proliferative senescence. *The FASEB Journal*, 14(15) :2495–2502.
- Solis, G., Malaga-Trillo, E., Plattner, H., and Stuermer, C. (2010). Cellular roles of the prion protein in association with reggie/flotillin microdomains. *Front Biosci*, 15 :1075–1085.
- Solomon, E., Hare, J., and Gray, H. (1976). Spectroscopic studies and a structural model for blue copper centers in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(5) :1389.
- Solomon, E., Sundaram, U., and Machonkin, T. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical reviews*, 96(7).
- Solomons, N., Pineda, O., Viteri, F., Sandstead, H., et al. (1983). Studies on the bioavailability of zinc in humans : mechanism of the intestinal interaction of nonheme iron and zinc. *The Journal of nutrition*, 113(2) :337.
- Somasundaram, K. and El-Deiry, W. (2000). Tumor suppressor p53 : regulation and function. *Front Biosci*, 5 :D424–D437.
- Song, I.-S., Chen, H. H. W., Aiba, I., Hossain, A., Liang, Z. D., Klomp, L. W. J., and Kuo, M. T. (2008). Transcription factor spl plays an important role in the regulation of copper homeostasis in mammalian cells. *Molecular pharmacology*, 74(3) :705–713. PMID : 18483225.
- Soto, C. (2004). Diagnosing prion diseases : needs, challenges and hopes. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10) :809–819.
- Soto, C. and Saborío, G. (2001). Prions : disease propagation and disease therapy by conformational transmission. *Trends in molecular medicine*, 7(3) :109–114.

- Souchelnytskyi, S. (2005). Proteomics of TGF-signaling and its impact on breast cancer. *Expert review of proteomics*, 2(6) :925–935.
- Stasser, J. P., Siluvai, G. S., Barry, A. N., and Blackburn, N. J. (2007). A multinuclear copper(I) cluster forms the dimerization interface in copper-loaded human copper chaperone for superoxide dismutase. *Biochemistry*, 46(42) :11845–11856. PMID : 17902702.
- Stern, B., Solioz, M., Krewski, D., Aggett, P., Aw, T., Baker, S., Crump, K., Dourson, M., Haber, L., Hertzberg, R., et al. (2007). Copper and human health : biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10(3) :157–222.
- Stewart, S. and Weinberg, R. (2000). Telomerase and human tumorigenesis. In *Seminars in cancer biology*, volume 10, page 399–406.
- Strain, J. et al. (1994). Newer aspects of micronutrients in chronic disease : copper. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53(3) :583–598.
- Strom, A., Wang, G., Picketts, D., Reimer, R., Stuke, A., and Scott, F. (2011). Cellular prion protein localizes to the nucleus of endocrine and neuronal cells and interacts with structural chromatin components. *European Journal of Cell Biology*.
- Stumm, W. et al. (1992). *Chemistry of the solid-water interface : processes at the mineral-water and particle-water interface in natural systems*. John Wiley & Son Inc.
- Suzuki, K., Someya, A., Komada, Y., and Ogra, Y. (2002). Roles of metallothionein in copper homeostasis : responses to cu-deficient diets in mice. *Journal of inorganic biochemistry*, 88(2) :173–182.
- Tapia, L., González-Agüero, M., Cisternas, M., Suazo, M., Cambiazo, V., Uauy, R., and González, M. (2004). Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *Biochemical Journal*, 378(Pt 2) :617.
- Taraboulos, A., Rogers, M., Borchelt, D. R., McKinley, M. P., Scott, M., Serban, D., and Prusiner, S. B. (1990). Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(21) :8262.
- Terman, A. and Brunk, U. (1998). Lipofuscin : mechanisms of formation and increase with age. *Apmis*, 106(1-6) :265–276.
- Terman, A. and Brunk, U. (2004). Lipofuscin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(8) :1400–1404.
- Thiele, D. and Gitlin, J. (2008). Assembling the pieces. *Nature chemical biology*, 4(3) :145–147.
- Toussaint (2000). Biological aging - euroconference on molecular, cellular and tissue Gerontology(Spa, belgium, 6-10 may 2000). supported by the european commission, research DG, human potential programme, high-level scientific conferences (Proposal no. : HPCF-1999-00115) - under the auspices of the international association of gerontology & united nations programme on ageing. *Experimental Gerontology*, 35(6-7) :669–670. PMID : 11053655.
- Toussaint, O., Dumont, P., Dierick, J. F., Pascal, T., Fripiat, C., Chainiaux, F., Magalhaes, J. P., Eliaers, F., and Remacle, J. (2000a). Stress-induced premature senescence as alternative toxicological method for testing the long-term effects of molecules under development in the industry. *Biogerontology*, 1(2) :179–183. PMID : 11707934.
- Toussaint, O., Medrano, E. E., and von Zglinicki, T. (2000b). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology*, 35(8) :927–945. PMID : 11121681.

- Toussaint, O., Remacle, J., Clark, B. F., Gonos, E. S., Franceschi, C., and Kirkwood, T. B. (2000c). Biology of ageing. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 22(10) :954–956. PMID : 10984722.
- Trachootham, D., Zhang, W., and Huang, P. (2009). Oxidative stress and drug resistance in cancer. *Drug Resistance in Cancer Cells*, page 137–175.
- Trocello, J.-M., Chappuis, P., Chaine, P., Rémy, P., Debray, D., Duclos-Vallée, J.-C., and Woimant, F. (2009). [Wilson disease]. *Presse Médicale (Paris, France : 1983)*, 38(7-8) :1089–1098. PMID : 19233606.
- Turski, M. L. and Thiele, D. J. (2009). New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2) :717–721.
- Underwood, E. and Suttle, N. (1999). *The mineral nutrition of livestock*. Cabi.
- Uriu-Adams, J. Y. and Keen, C. L. (2005). Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4-5) :268–298.
- Urso, E., Rizzello, A., Acierno, R., Lionetto, M., Salvato, B., Storelli, C., and Maffia, M. (2010). Fluorimetric analysis of copper transport mechanisms in the b104 neuroblastoma cell model : A contribution from cellular prion protein to copper supplying. *Journal of Membrane Biology*, 233(1) :13–21.
- Valko, M., Morris, H., and Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10) :1161–1208. PMID : 15892631.
- Varela-Nallar, L., Toledo, E. M., Chacón, M. A., and Inestrosa, N. C. (2006a). The functional links between prion protein and copper. *Biological Research*, 39(1) :39–44. PMID : 16629163.
- Varela-Nallar, L., Toledo, E. M., Larrondo, L. F., Cabral, A. L. B., Martins, V. R., and Inestrosa, N. C. (2006b). Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 290(1) :C271–281. PMID : 16148034.
- Vasudevaraju, P., Bharathi, T. J., Shamasundar, N. M., Subba Rao, K., Balaraj, B. M., Ksj, R., and T S, S. R. (2010). New evidence on iron, copper accumulation and zinc depletion and its correlation with DNA integrity in aging human brain regions. *Indian Journal of Psychiatry*, 52(2) :140–144. PMID : 20838501.
- Veldhuis, N., Gaeth, A., Pearson, R., Gabriel, K., and Camakaris, J. (2009). The multi-layered regulation of copper translocating p-type ATPases. *Biometals*, 22(1) :177–190.
- Venugopal, R. and Jaiswal, A. (1996). Nrf1 and nrf2 positively and c-fos and fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD (P) h : quinone oxidoreductase1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25) :14960.
- Vo, T. K. D., Godard, P., de Saint-Hubert, M., Morrhaye, G., Bauwens, E., Debacq-Chainiaux, F., Glupczynski, Y., Swine, C., Geenen, V., Martens, H. J., and Toussaint, O. (2010). Transcriptomic biomarkers of human ageing in peripheral blood mononuclear cell total RNA. *Experimental gerontology*, 45(3) :188–194. PMID : 19995600.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W., Lotze, C., et al. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence? *Experimental cell research*, 220(1) :186.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d’Adda di Fagagna, F., and Jackson, S. P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mechanisms of ageing and development*, 126(1) :111–117. PMID : 15610769.
- Walker, L. and LeVine, H. (2000). The cerebral proteopathies. *Molecular neurobiology*, 21(1) :83–95.

- Walter, E. D., Stevens, D. J., Visconte, M. P., and Millhauser, G. L. (2007). The prion protein is a combined zinc and copper binding protein : Zn<sup>2+</sup> alters the distribution of Cu<sup>2+</sup> coordination modes. *Journal of the American Chemical Society*, 129(50) :15440–15441.
- Wang, D., Song, Y., Li, J., Wang, C., and Li, F. (2011). Structure and metal ion binding of the first transmembrane domain of DMT1. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(6) :1639–1644. PMID : 21074515.
- Watt, N. T., Routledge, M. N., Wild, C. P., and Hooper, N. M. (2007). Cellular prion protein protects against reactive-oxygen-species-induced DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(6) :959–967. PMID : 17697940.
- Weaver, M. S., Workman, G., and Sage, E. H. (2008). The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin  $\beta$ 1 and activation of integrin-linked kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(33) :22826–22837. PMID : 18503049 PMCID : 2504874.
- Weissmann, C. (2004). The state of the prion. *Nature Reviews Microbiology*, 2(11) :861–871.
- Weissmann, C. and Flechsig, E. (2003). PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *British medical bulletin*, 66(1) :43–60.
- Wickner, R. B., Edskes, H. K., Shewmaker, F., and Nakayashiki, T. (2007). Prions of fungi : inherited structures and biological roles. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8) :611–618.
- Winberg, S., Bjerselius, R., Baatrup, E., and Døving, K. (1992). The effect of Cu (II) on the electro-olfactogram (EOG) of the atlantic salmon (*salmo salar* L) in artificial freshwater of varying inorganic carbon concentrations. *Ecotoxicology and environmental safety*, 24(2) :167–178.
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4(5) :278–286.
- Wittung-Stafshede, P. (2002). Role of cofactors in protein folding. *Accounts of chemical research*, 35(4) :201–208.
- Wittung-Stafshede, P. (2004). Role of cofactors in folding of the blue-copper protein azurin. *Inorganic chemistry*, 43(25) :7926–7933.
- Wolschendorf, F., Ackart, D., Shrestha, T. B., Hascall-Dove, L., Nolan, S., Lamichhane, G., Wang, Y., Bossmann, S. H., Basaraba, R. J., and Niederweis, M. (2011). Copper resistance is essential for virulence of mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4) :1621–1626. PMID : 21205886 PMCID : 3029754.
- Wopfner, F., Weidenhöfer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T., and Schätzl, H. M. (1999). Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *Journal of Molecular Biology*, 289(5) :1163–1178.
- Wright, J., McHugh, P., Stockbridge, M., Lane, S., Kralovicova, S., and Brown, D. (2009). Activation and repression of prion protein expression by key regions of intron 1. *Cellular and molecular life sciences*, 66(23) :3809–3820.
- Wurm, S. and Wechselberger, C. (2006). Prion protein modifies TGF- $\beta$  induced signal transduction. *Biochemical and biophysical research communications*, 349(2) :525–532.
- Yan, Q. and Sage, E. (1999). SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(12) :1495.
- Yang, L., McRae, R., Henary, M., Patel, R., Lai, B., Vogt, S., and Fahrni, C. (2005). Imaging of the intracellular topography of copper with a fluorescent sensor and by synchrotron x-ray fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32) :11179.

- Yoshioka, Y., Ishiguro, N., Inoshima, Y., et al. (2010). Proteasome activity and biological properties of normal prion protein : a comparison between young and aged cattle. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 72(12) :1583.
- Young, A. and Narita, M. (2009). SASP reflects senescence. *EMBO reports*, 10(3) :228–230.
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development*, 14(2) :163.
- Zambelli, B., Musiani, F., and Ciurli, S. (2012). Metal ion-mediated DNA-protein interactions. *Metal ions in life sciences*, 10 :135–170. PMID : 22210338.
- Zatta, P., Drago, D., Zambenedetti, P., Bolognin, S., Nogara, E., Peruffo, A., and Cozzi, B. (2008). Accumulation of copper and other metal ions, and metallothionein I/II expression in the bovine brain as a function of aging. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 36(1) :1–5. PMID : 18485665.
- Zeng, L., Miller, E., Pralle, A., Isacoff, E., and Chang, C. (2006). A selective turn-on fluorescent sensor for imaging copper in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1) :10–11.
- Zhang, F., Tao, Y., Zhang, Z., Guo, X., An, P., Shen, Y., Wu, Q., Yu, Y., and Wang, F. (2012). Metalloreductase steap3 coordinates the regulation of iron homeostasis and inflammatory responses. *Haematologica*.
- Zhu, X., Wang, J., Xie, G., Feng, H., Li, X., Liu, L., Wang, X., Li, D., Liu, Z., Qian, J., Wang, Z., and Liu, G. (2011). Effect of copper on the expression of TGF- $\beta$  in incubated chondrocytes of newborn pigs. *Biological trace element research*, 143(3) :1461–1469. PMID : 21267671.
- Zomosa-Signoret, V., Arnaud, J.-D., Fontes, P., Alvarez-Martinez, M.-T., and Liautard, J.-P. (2008). Physiological role of the cellular prion protein. *Veterinary Research*, 39(4) :9. PMID : 18073096.