



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARE
NANCY 1
ECOLE DOCTORALE
"BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

UNIVERSITE DE MEDECINE ET
PHARMACIE "CAROL DAVILA"
BUCAREST

THESE
Cotutelle France-Roumanie

Présentée et soutenue publiquement
le 2 mars 2001 à Bucarest



pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARE – NANCY 1**
Mention Biologie structurale moléculaire et cellulaire
et

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MEDECINE ET
PHARMACIE "CAROL DAVILA" – BUCAREST**
Mention Biochimie pour Pharmacie

par
Milica ENOIU

Sujet :

**Rôle pro-oxydant de la gamma-glutamyltransférase et
de la gamma-glutamyltransférase « related »
dans la peroxydation lipidique**

MEMBRES DU JURY

Juges : Pr. Chantal FINANCE (Faculté de Pharmacie Nancy, Doyen)
Pr. Dumitru LUPULEASA (Faculté de Pharmacie Bucarest, Doyen)
Dr. Maria WELLMAN (Faculté de Pharmacie Nancy)
Pr. Niculina MITREA (Faculté de Pharmacie Bucarest)

Rapporteurs : Pr. Yves ARTUR (Faculté de Pharmacie Dijon)
Pr. Dana IORDĂCHESCU (Faculté de Biologie Bucarest)

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : Mme Chantal FINANCE

Vice Doyen : Mme Anne ROVEL

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mle BESSON Suzanne

Mle GIRARD Thérèse

M. LECTARD Pierre

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Physico-chimie appliquée à la formulation pharmaceutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M. BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M. CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M. CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M. COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M. COULON Joël	Biochimie
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M. DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M. FERRARI Luc	Biochimie
Mle FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M. GANTZER Christophe	Virologie
M. GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M. HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M. JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M. MENU Patrick	Physiologie
M. MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Informatique
Mme PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Biophysique
Mme POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M. VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M. DANGIEN Bernard	Botanique
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme PAVIS Annie	Parasitologie
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme GRISON Geneviève	Pratiques officinales
----------------------	-----------------------

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe	Anglais
-----------------------	---------

FACULTE DE PHARMACIE

Université de Médecine et Pharmacie "Carol Davila" Bucarest

Membres du personnel enseignant

Doyen

M. LUPULEASA Dumitru

Vice Doyen

Mme. ALDEA Victoria

DOYENS HONORAIRES

M. CONSTANTINESCU Dumitru Grigore

M. DOBRESCU Dumitru

M. MOISESCU Ștefan

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BALOESCU Corneliu

Mme. BAN Petra

M. CIULEI Ioan

M. IOVU Mircea

M. MORAIT Gheorghe

M. OȚLEANU Dumitru

M. STĂNESCU Victor

PROFESSEURS

Mme. ALDEA Victoria	Chimie inorganique
M. BĂLĂLĂU Dan	Toxicologie
Mme. CARATA Ana	Management et marketing pharmaceutique
Mme. CHIRIȚĂ Ileana	Chimie pharmaceutique
Mme. CRISTEA Aurelia Nicoleta	Pharmacologie
Mme. DUMITRESCU Ana Maria	Technologie pharmaceutique
M. GEORGESCU Corneliu	Physique pharmaceutique
Mme. ISTUDOR Viorica	Pharmacognosie
M. LUPULEASA Dumitru	Technologie pharmaceutique
Mme. MIHELE Denisa Elisabeta	Laboratoire clinique et Chimie sanitaire
M. MISSIR Alexandru	Chimie pharmaceutique
Mme. MITREA Niculina	Biochimie
M. MOISESCU Ștefan	Chimie physique et colloïdale
Mme. MONCIU Maria Crina	Chimie analytique
Mme. NACEA Veronica	Chimie inorganique
Mme. ȘARAMET Ioana	Chimie organique
Mme. STANCIU Teodora	Pharmacie galénique



MAITRES DE CONFERENCES

M. ANDRIEȘ Adrian	Industrie du médicament et biotechnologie pharmaceutique
M. BREZINA Alexandru	Pharmacologie
Mme. FRĂȚILĂ Daniela	Analyse du médicament
M. GUȚIU Ion Axente	Urgence médicale
Mme. HÂRJĂU Victoria	Technologie pharmaceutique
M. MIRCIOIU Constantin	Biomathématique et biostatistique
Mme. PALADE Madelena	Botanique et biologie végétale
Mme. PREDESCU Irina	Chimie physique et colloïdale
Mme. ȘTEFĂNESCU Eufemia	Toxicologie
M. TURCULEȚ Virgil	Chimie analytique

CHEF DE TRAVAUX

Mme. ARAMĂ Corina Cristina	Chimie analytique
Mme. DINU Mihaela	Botanique et biologie végétale
Mme. DRĂGĂNESCU Doina	Physique pharmaceutique
Mme. ENOIU Milica	Biochimie
Mme. GÂRD Cerasela Elena	Pharmacognosie
Mme. IONIȚĂ Corina	Laboratoire clinique et Chimie sanitaire
Mme. LIMBAN Carmen	Chimie pharmaceutique
M. MORUȘCEAG Laurențiu	Chimie pharmaceutique
Mme. NEAGU Alexandra	Chimie analytique
Mme. NEDELCU Angela	Chimie analytique
Mme. NEGREȘ Simona	Pharmacologie
Mme. NICOLESCU Florica	Toxicologie
Mme. PÂRVU Cristina Elena	Chimie physique et colloïdale
Mme. POPA Lăcrămioara	Chimie physique et colloïdale
Mme. RĂDULESCU Valeria	Chimie organique
Mme. SOROCEANU Valentina	Management et marketing pharmaceutique
M. STAMANICHI Mihai	Botanique et biologie végétale
Mme. UNTARU Marcela	Technologie pharmaceutique

ASSISTANTS

M. ANCUCEANU Robert	Pharmacognosie
Mme. BACONI Daniela Luiza	Toxicologie
Mme. BALACI Teodora Dařila	Technologie pharmaceutique
Mme. BÂRCĂ Monica	Analyse du médicament
Mme. BOSCENCU Rica	Chimie inorganique
Mme. CONSTANTINESCU Ioana Clementina	Chimie analytique
Mme. DUȚU Ligia Elena	Pharmacognosie
Mme. DIMCEVICI POESINA Nicoleta Elena	Biomathématique et Biostatistique
Mme. DUMITRESCU Anca Irina	Physique pharmaceutique
Mme. FIȚA Cătălina Ancuța	Pharmacie galénique

M.	HÎNCU Lucian	Industrie du médicament et biotechnologie pharmaceutique
Mme.	MARGINĂ Denisa	Biochimie
Mme.	MIRON Dalia Simona	Physique pharmaceutique
Mme.	MITU Mirela Adriana	Technologie pharmaceutique
Mme.	MORTEANU Eliza	Pharmacognosie
Mme.	MOROȘAN Elena	Laboratoire clinique et Chimie sanitaire
M.	NICOLESCU Teodor Octavian	Chimie organique
Mme.	POPESCU Maria Lidia	Pharmacognosie
Mme.	SIMION Oana	Technologie pharmaceutique
Mme.	STECOZA Camelia Elena	Chimie pharmaceutique
M.	ȘARAMET Gabriel	Technologie pharmaceutique
Mme.	TACHE Bianca Doina	Industrie du médicament et biotechnologie pharmaceutique
Mme.	TĂEREL Adriana Elena	Management et marketing pharmaceutique
Mme.	TOTIR Monica	Biochimie
Mme.	TRUȚIA Elena	Pharmacologie
Mme.	TURCULEȚ Ioana Laura	Pharmacologie
Mme.	TEODORESCU Carmen	Botanique et biologie végétale
Mme.	UTVAROȘI Valentina	Chimie inorganique
Mme.	VLĂDESCU Corina	Chimie pharmaceutique

*“La crainte du Seigneur est le commencement de la Sagesse
et l’intelligence la science des Saints”*

(Proverbes 9,10)

A mon mari,

A mes parents,

A mon frère,

A toute ma famille.

En témoignage de tout mon amour.

Ce travail a été réalisé à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Université Henri Poincaré Nancy 1,

au **Centre du Médicament** (responsable : Professeur Gérard SIEST)
sous la direction du Docteur Maria WELLMAN

et à la Faculté de Pharmacie,
Université de Médecine et Pharmacie "Carol Davila" Bucarest,

au **Laboratoire de Biochimie**
sous la direction du Professeur Niculina MITREA.

Remerciements

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Gérard SIEST, Directeur du Centre du Médicament, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire et pour m'avoir permis ainsi de réaliser ce travail.

Je remercie Madame le Docteur Maria WELLMAN pour avoir accepté de diriger ce travail. Qu'elle soit remerciée ici pour sa patience, pour la confiance qu'elle m'a témoignée ainsi que pour la liberté qu'elle m'a accordée et ses encouragements tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame le Professeur Niculina MITREA d'avoir dirigé de près ou de loin ce projet. Qu'elle trouve l'expression de ma gratitude pour ses conseils précieux, ainsi que pour son énorme bienveillance. J'espère avoir été à la hauteur de la confiance qu'elle m'a témoignée.

Je remercie vivement Madame le Professeur Chantal FINANCE, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nancy, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant sans hésitation de juger ce travail. Je tiens à lui exprimer mon très profond respect.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Dumitru LUPULEASA, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Bucarest, pour m'avoir accordé toute sa confiance ainsi que pour l'honneur qu'il me fait d'accepter de juger ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur le Professeur Yves ARTUR qui n'a pas hésité à accepter d'être le rapporteur de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Madame le Professeur Dana IORDĂCHESCU d'avoir accepté de juger en qualité de rapporteur ce travail. Qu'elle soit assurée de ma très sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Docteur Jean VILLOUTREIX de m'avoir apporté son soutien non seulement dans l'accomplissement de ce travail, mais aussi dans ma formation de chercheur. Qu'il soit remercié également pour l'amitié qu'il m'a constamment prouvée.

Je remercie Monsieur le Professeur Pierre LEROY pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, pour ses conseils en chimie analytique, ainsi que pour sa disponibilité et sa contribution à l'amélioration de la qualité de ce manuscrit.

J'exprime ma reconnaissance à Mademoiselle le Docteur Régine HERBER pour l'aide précieuse qu'elle m'a accordée et sans laquelle une partie de ce travail n'aurait pas abouti. Qu'elle soit remerciée pour sa bienveillance, pour l'amitié et la sympathie qu'elle m'a témoignées.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Marie ZIEGLER et Monsieur le Professeur Robert WENNIG pour la réalisation des expériences de spectrométrie de masse qui ont permis l'avancement de ce projet.

Je remercie Madame Haline BODAUD de m'avoir appris la technique de la culture cellulaire et pour le soutien moral qu'elle m'a accordé.

Je remercie toute l'équipe du Centre du Médicament, chercheurs, personnel technique et administratif pour la sympathie avec laquelle ils m'ont entourée, et en particulier Isabelle qui m'a montré une amitié chaleureuse et durable.

J'exprime ma reconnaissance à tous les membres du personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Bucarest, aux professeurs à qui je dois ma formation de pharmacien ainsi qu'à mes collègues de travail qui m'entourent avec amitié.

Je remercie tous mes amis, roumains et français, dont le soutien moral m'a beaucoup aidé et particulièrement Gabriela et ceux de la petite paroisse orthodoxe franco-roumaine de Nancy.

Je remercie également

Le Ministère de l'Enseignement de Roumanie

International Federation of Clinical Chemistry

Le Ministère des Affaires Etrangères de France

qui m'ont attribué des bourses d'études pendant ces trois années de thèse.

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ILLUSTRATIONS

I. INTRODUCTION	1
1. Le stress oxydant	3
2. Le glutathion	6
2.1. Principaux rôles physiologiques et métabolisme.....	6
2.2. Le glutathion et le stress oxydant.....	9
3. Autres thiols endogènes : rôle anti- et pro-oxydant	12
3.1. Rôle antioxydant.....	12
3.2. Rôle pro-oxydant.....	13
4. La γ-glutamyltransférase	16
4.1. Rôle antioxydant.....	18
4.2. Rôle pro-oxydant.....	18
5. La γ-glutamyltransférase « related »	28
6. La peroxydation lipidique	30
6.1. Le métabolisme du 4-hydroxynonéal.....	
II. HYPOTHESES ET OBJECTIFS	39
III. RESULTATS ET DISCUSSION	43
Chapitre I : Production d'espèces réactives de l'oxygène au cours du métabolisme du glutathion par la GGT et la GGT-rel	44
1.1. Métabolisme du glutathion et production d'espèces réactives de l'oxygène par la GGT.....	44
1.1.1. Résultats.....	47
1.2. Métabolisme du glutathion et production d'espèces réactives de l'oxygène par la GGT-rel.....	54
<i>Publication n° 1 : Evidence for the pro-oxidant effect of γ-glutamyltranspeptidase-related enzyme</i>	57

Chapitre II : Le système d'oxydation GGT/GSH/Fe³⁺ dans un modèle d'étude de la peroxydation lipidique.....	67
<i>Publication n° 2 : Gas and liquid chromatography-mass spectrometry of aldehydic products from lipid peroxidation</i>	<i>70</i>
2.1. Mise en évidence des aldéhydes formés au cours de l'oxydation des acides gras polyinsaturés	76
2.1.1. Formation des 2,4-dinitrophénylhydrazones	77
2.1.2. Séparation des 2,4-dinitrophénylhydrazones	78
2.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	80
2.1.2.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	81
2.1.3. Méthodes d'identification	83
2.1.3.1. Spectrométrie de masse par couplage à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS).....	83
2.1.3.2. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide haute performance (LC-MS).....	88
2.2. Oxydation des acides gras par le système GGT/GSH/Fe ³⁺	94
Chapitre III : Rôle de la GGT et de la GGT-rel dans le métabolisme de l'adduit glutathion-4-hydroxynonéal.....	100
3.1. Rôle de la GGT dans le métabolisme et la cytotoxicité de l'adduit glutathion-4-hydroxynonéal.....	103
<i>Publication n° 3 : γ-glutamyltranspeptidase-dependent metabolism of 4-hydroxynonenal-glutathione conjugate and resulting cytotoxicity.....</i>	<i>104</i>
3.2. Rôle de la GGT-rel dans le métabolisme et la cytotoxicité de l'adduit glutathion-4-hydroxynonéal.....	130
3.3. Formation des adduits GS-HNE et CysGly-HNE au cours de la peroxydation lipidique induite par le système GGT/GSH/Fe ³⁺ ou GGT-rel/GSH/Fe ³⁺	133
IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	137
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145
VI. ANNEXE	
<i>Publication : <u>Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent glutathione catabolism results in activation of NF-kB</u></i>	<i>163</i>

LISTE DES PUBLICATIONS

Par ordre d'apparition dans cette thèse :

- (p.57) M. Enoiu, H. Aberkane, JF. Salazar, P. Leroy, J. Groffen, G. Siest and M. Wellman.
Evidence for the pro-oxidant effect of γ -glutamyltranspeptidase-related enzyme.
Free Radic. Biol. Med., 2000, **29**, 825-833.
- (p. 70) M. Enoiu, M. Wellman, P. Leroy, J.-M. Ziegler, N. Mitrea and G. Siest.
Gas and liquid chromatography-mass spectrometry of aldehydic products from lipid peroxidation.
Analisis, 2000, **28**(4), 285-290.
- (p. 104) M. Enoiu, R. Herber, R. Wennig, C. Marson, H. Bodaud, P. Leroy, N. Mitrea, G. Siest and M. Wellman
 γ -glutamyltranspeptidase-dependent metabolism of 4-hydroxynonenal-glutathione conjugate and resulting cytotoxicity
Free Radic. Biol. Med., soumis.
- (p. 163) M.-J. Accaoui, M. Enoiu , M. Mergny, C. Masson, S. Dominici, M. Wellman and A. Visvikis.
Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent glutathione catabolism results in activation of NF-kB
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, **276**, 1062-1067.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP :	adénosine diphosphate
ALD :	alcool déshydrogénase
ALDH :	aldéhyde déshydrogénase
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ATP :	adénosine triphosphate
BSA :	« bovine serum albumine »
CCM :	chromatographie sur couche mince
CLHP :	chromatographie liquide haute performance
Cys :	cystéine
CysGly :	cystéinyglycine
CysGly-HNE :	adduit cystéinyglycine- 4-hydroxynonéal
DHN :	1,4-dihydroxynonène
DHR-123 :	dihydrorhodamine 123
DNP :	2,4-dinitrophénylhydrazine
EDTA :	acide éthylènediamine tétraacétique
EI :	ionisation par impact électronique (« electron impact »)
ESI :	ionisation par électrospray (« electrospray ionisation »)
ERO :	espèces réactives de l'oxygène
GC-MS :	spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (« gas chromatography-mass spectrometry »)
γ -GCS :	γ -glutamylcystéine synthétase
GGT :	γ -glutamyltransférase
GGT-rel :	γ -glutamyltransférase « related »
γ -GluCys :	γ -glutamylcystéine
GlyGly :	glycylglycine
GPx :	glutathion peroxydases
GR :	glutathion réductase
GSH :	glutathion
GS-HNE :	adduit glutathion- 4-hydroxynonéal
GSSG :	glutathion oxydé (disulfure)
GSSR :	disulfure mixte glutathion-protéine ou glutathion-thiol
GST :	glutathion-S-transférase
HNA :	acide hydroxynonénoïque
HNE :	4-hydroxy-2-nonéal
LDH :	lactate déshydrogénase
LC-MS :	spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (« liquid chromatography-mass spectrometry »)
LDL :	« low-density lipoprotein »
LPO :	peroxydation lipidique (« lipid peroxydation »)
MA :	acide mercapturique

MAP :	« mitogen-activated protein »
MDA :	aldéhyde malonique
ME :	β -mercaptoéthanol
MSTFA :	méthyltriméthylsilyl-trifluoroacétamide
MRP :	« multidrug-resistance protein »
MTT :	bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 -diphényltétrazolium
m/z :	quantité de masse/nombre de charges
NAD ⁺ :	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP ⁺ :	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OPA :	<i>o</i> -phtalaldialdéhyde
PBS :	« phosphate buffer saline »
Rh-123 :	rhodamine123
RPE :	résonance paramagnétique électronique
SOD :	superoxyde dismutases
SVF :	serum fœtal de veau
TBARs :	thiobarbituric acid reactive substances
TGF :	« transforming growth factor »
TMS :	triméthylsilyl
UV :	ultra-violet

LISTE DES ILLUSTRATIONS

I. TABLEAUX

Tableau I :	Etudes relatives au rôle pro-oxydant de la GGT (tableau récapitulatif).....	24
Tableau II :	Comparaison des caractéristiques de la GGT et de la GGT-rel.....	29
Tableau III :	Influence de la nature du milieu sur la production d'ERO par les cellules V79GGT et V79Cl.....	48
Tableau IV :	Influence de l'agent chélateur du Fe^{3+} sur la mesure d'ERO dans le milieu de culture	49
Tableau V :	Produits d'oxydation (dérivés DNPH) non-polaires du linoléate de méthyle	89
Tableau VI :	Composés hydroxyaldéhydiques (dérivés DNPH) identifiés parmi les produits d'oxydation du linoléate de méthyle	90
Tableau VII :	Estimation de la quantité totale des dérivés DNPH formés par l'oxydation GGT/GSH/ Fe^{3+} du linoléate de méthyle.....	95
Tableau VIII :	Comparaison des produits d'oxydation non-polaires formés par l'oxydation du linoléate de méthyle par les systèmes GGT/GSH/ Fe^{3+} et ascorbate/ Fe^{2+}	97

II. FIGURES

Figure 1 :	Réduction séquentielle univalente de l'oxygène	4
Figure 2 :	Structure du glutathion	6
Figure 3 :	Systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme du GSH (cycle de Meister)	8
Figure 4 :	Réactions du glutathion avec les espèces radicalaires	10
Figure 5 :	Le cycle des réactions glutathion-peroxydase – glutathion-réductase.....	11
Figure 6 :	Schéma des réactions conduisant à la formation d'ERO par l'auto-oxydation des thiols	14
Figure 7 :	Effets anti- et pro-oxydants de la GGT au cours du métabolisme du glutathion.....	19
Figure 8 :	Schéma général de la peroxydation lipidique	31
Figure 9 :	Voies métaboliques du 4-hydroxynonéal	36
Figure 10 :	Schéma général de la biosynthèse des acides mercapturiques.....	38
Figure 11 :	Métabolisme extracellulaire du GSH et formation de CysGly par les cellules V79GGT et V79Cl.....	45
Figure 12 :	Cinétique de la production d'ERO par les cellules V79GGT et V79Cl en présence de GSH/ Fe^{3+} -EDTA	48
Figure 13 :	Cinétique de la production d'ERO par les cellules V79GGT et V79Cl en présence de GSH/ Fe^{3+} -ADP	49
Figure 14 :	Production des ERO par les cellules V79GGT et V79Cl en fonction de la concentration en Fe^{3+}	50
Figure 15 :	Production d'ERO par les cellules V79GGT et V79Cl en fonction de la concentration en GSH	51
Figure 16 :	Cinétique de la production d'ERO par les cellules V79GGT et V79Cl (culots cellulaires).....	52
Figure 17 :	Production d'ERO par le système thiol/ Fe^{3+}	53

Figure 18 : Cinétique de la production de HO [*] par les cellules NIH3T3/GGT-rel et NIH3T3.....	55
Figure 19 : Formation du 4-hydroxynonénal à partir d'acide linoléique	68
Figure 20 : Chromatogrammes types des produits d'oxydation totaux (dérivés DNPH) du linoléate de méthyle (A) et linoléate de méthyle (B et C).....	79
Figure 21 : Chromatographie sur couche mince	80
Figure 22 : Profils CLHP des produits d'oxydation (dérivés DNPH) du linoléate de méthyle après séparation sur CCM	81
Figure 23 : Profils CLHP des bandes isolées en CCM	82
Figure 24 : Comparaison des profils CLHP en mode isocratique (A) et en mode gradient (B).....	83
Figure 25 : Spectre EI du 4-décénal-DNPH (M=334)	84
Figure 26 : Spectre EI du 4-hydroxyheptanal-DNPH (M=310).....	85
Figure 27 : Spectre EI du 4-hydroxynonénal-DNPH (M=336).....	86
Figure 28 : Spectre EI du 2,3,5-trihydroxy-1,10-décane dial-DNPH (M=578).....	86
Figure 29 : Spectre EI du 9-hydroxy-12-oxo-dodécanoate de méthyle (silylé) (M=513).....	87
Figure 30 : Spectre EI du 4,5-dihydroxy-9-oxo-nonanoate de méthyle (silylé) (M=487)	87
Figure 31 : Profil chromatographique des composés carbonyles (dérivés DNPH) identifiés par LC-MS dans une fraction polaire (R _f : 0 - 0,1) de linoléate de méthyle oxydé (détection UV λ _{360 nm}).....	91
Figure 32 : Spectres ESI : (A) : 4-hydroxynonénal-DNPH, (B) : hydroxydécénal-DNPH, dihydroxytridécane dial-DNPH, dihydroxytétradécane dial-DNPH.....	92
Figure 33 : Spectres ESI : (A) : 4-hydroxynonadiénal-DNPH, [M-H] ⁻ =333; (B) : hydroxy-oxo-décénoate de méthyle-DNPH, [M-H] ⁻ =505	93
Figure 34 : Comparaison des profils CLHP de la fraction non-polaire (R _f 0,6) obtenue par l'oxydation du linoléate de méthyle par le système GGT/GSH/Fe ³⁺ (A) et par le système ascorbate/Fe ²⁺ (B)	96
Figure 35 : Profils CLHP des dérivés DNPH identifiés dans des fractions polaires de linoléate de méthyle oxydé par le système GGT/GSH/Fe ³⁺	98
Figure 36 : Réaction du glutathion et de la cystéine avec les 4-hydroxyalkénals	101
Figure 37 : Profil CLHP des adduits GS-HNE et CysGly-HNE dans le milieu des cellules NIH3T3/GGT-rel	130
Figure 38 : Cytotoxicité de l'adduit GS-HNE dans les lignées cellulaires NIH3T3/GGT-rel et NIH3T3 déterminée par les tests MTT et Bleu de Trypan	131
Figure 39 : Libération de LDH dans le milieu extracellulaire des cellules NIH3T3/GGT-rel et NIH3T3 incubées en présence de GS-HNE.....	132
Figure 40 : Profils CLHP des adduits HNE-thiol formés lors de la peroxydation lipidique dépendante de la GGT	134
Figure 41 : Profils CLHP des adduits HNE-thiol formés lors de la peroxydation lipidique dépendante de la GGT-rel.....	135

INTRODUCTION

Le stress oxydant, syndrome intimement lié à la toxicité de l'oxygène et plus précisément aux espèces réactives qui dérivent de celui-ci, occupe une place importante dans la recherche biologique actuelle. L'intérêt considérable porté à ce domaine est justifié par les multiples implications des espèces réactives de l'oxygène dans des pathologies variées, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. C'est pourquoi la recherche fondamentale dans la biochimie du stress oxydant s'efforce de déchiffrer les bases moléculaires des agressions oxydatives provoquées par les espèces réactives de l'oxygène, ainsi que les systèmes physiologiques de protection et de réparation des lésions oxydatives.

La recherche dans ce domaine fait connaître des aspects nouveaux et parfois inattendus des éléments impliqués dans le stress oxydant. Ceci est le cas par exemple de certains antioxydants « classiques » dont les propriétés pro-oxydantes ont été démontrées. L'influence de certaines conditions peut par ailleurs amener une rupture de l'équilibre et la prédominance des propriétés soit antioxydantes, soit pro-oxydantes.

La γ -glutamyltransférase (GGT), enzyme liée au métabolisme extracellulaire du glutathion (GSH) est considérée comme ayant une fonction principalement antioxydante, car elle fournit les acides aminés nécessaires à la synthèse intracellulaire du GSH, dont le rôle antioxydant est bien connu. Cependant, au cours des dernières années, plusieurs études ont montré un rôle pro-oxydant de la GGT, lié au catabolisme du GSH en présence de métaux de transition. Dans ces conditions, les espèces réactives générées peuvent induire des dommages oxydatifs aux niveaux des biomolécules sensibles à l'attaque radicalaire. La GGT semble donc représenter un nouveau système physiologique d'oxydation dont la connaissance à l'heure actuelle est loin d'être parfaite.

Une deuxième enzyme à activité γ -glutamyltransférase, mais distincte de la GGT, la GGT-rel (« GGT-related enzyme ») a été identifiée récemment, mais son rôle physiologique et ses éventuelles implications dans le stress oxydant n'ont pas été encore étudiés.

La connaissance des mécanismes impliqués dans l'action pro-oxydante des systèmes physiologiques permettrait une meilleure compréhension de la contribution de chaque

système aux déséquilibres de la balance anti-/pro-oxydant, aux agressions oxydatives et finalement aux pathologies liées au stress oxydant. Une meilleure connaissance des systèmes d'oxydation permettrait également d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques, soit pour diminuer les phénomènes de stress oxydant, soit pour les augmenter, en fonction des objectifs thérapeutiques visés.

Au cours de ce travail, nous avons étudié quelques aspects du rôle pro-oxydant de la GGT, notamment dans la production d'espèces réactives et dans la peroxydation lipidique. De plus, nous avons tenu à vérifier si la GGT-rel possède également une fonction pro-oxydante, et enfin à mettre en évidence des conséquences du stress oxydant induit par la GGT (ou la GGT-rel) au niveau cellulaire.

Après un bref rappel sur le stress oxydant, nous présentons le rôle du glutathion et d'autres thiols dans le stress oxydant et nous insistons spécialement sur le rôle pro-oxydant de la GGT au cours du métabolisme du GSH. L'état actuel des connaissances sur ce sujet est résumé par une étude bibliographique. La peroxydation lipidique et surtout les effets toxiques induits au niveau cellulaire par le 4-hydroxynonéal, ainsi que le métabolisme de ce dernier sont également décrits.

1. Le stress oxydant

L'oxygène, élément indispensable de la vie, conduit à la formation d'espèces réactives au cours du métabolisme normal chez les organismes aérobies. Des processus physiologiques divers comme les oxydations mitochondriale et microsomale, le métabolisme des peroxysomes, la phagocytose, certaines activités enzymatiques, l'auto-oxydation des molécules physiologiques, génèrent des **espèces réactives de l'oxygène (ERO)**. Ce sont des intermédiaires formés par la réduction séquentielle univalente de l'oxygène (fig. 1) et qui rendent compte de la toxicité de ce dernier (Fridovich, 1998). Les principales ERO sont : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) et l'oxygène singulet.

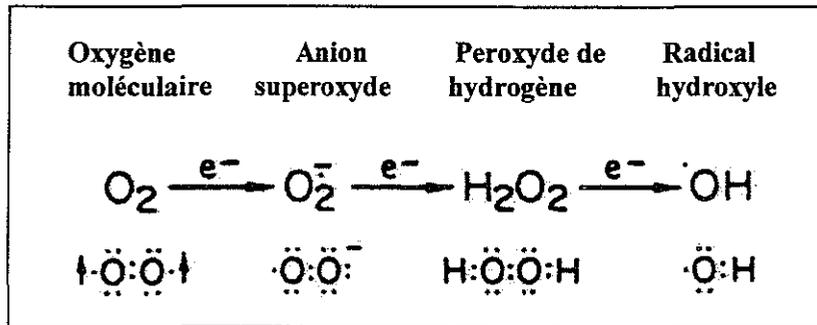
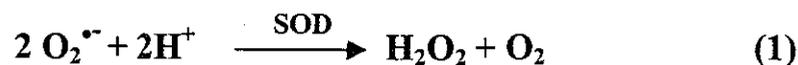


Figure 1 : Réduction séquentielle univalente de l'oxygène (d'après Reiter, 1995).

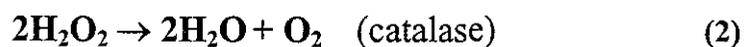
Les flèches (\uparrow) indiquent les spins des électrons célibataires dans la molécule d'oxygène. Le symbole " \cdot " représente l'électron non apparié.

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) représente la première étape de l'activation de l'oxygène par l'acceptation d'un électron. Il se forme comme intermédiaire dans de nombreuses réactions biochimiques physiologiques ou au cours du métabolisme des xénobiotiques. Il ne présente pas une réactivité élevée, mais il peut donner naissance à d'autres espèces plus réactives, telles que la forme protonnée (HO_2^{\cdot}) et libérer le fer de ses formes de dépôt (lié aux protéines) (Chaudière, 1994). $O_2^{\cdot -}$ a une demi-vie courte et il est rapidement inactivé par la superoxyde dismutase (SOD), qui catalyse la réaction (1) de dismutation du $O_2^{\cdot -}$ avec production de H_2O_2 :



Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) se forme principalement par la réaction de dismutation du $O_2^{\cdot -}$, mais aussi au cours des réactions enzymatiques comme celles catalysées par les monoamineoxydases, les monooxygénases à cytochrome P450, la xanthine oxydase. Bien que H_2O_2 ne soit pas un radical libre, il peut être, en fonction de sa concentration, nocif pour les cellules car il traverse les membranes cellulaires et nucléaires (Reiter, 1995).

H_2O_2 est catabolisé par la catalase et les peroxydases suivant les réactions (2) et (3):



Parmi les différentes ERO, H_2O_2 est la plus stable et la plus facile à mesurer.

Le radical hydroxyle (HO[•]) est extrêmement réactif et représente la plus toxique des ERO. Il se forme à partir de O₂^{•-} ou de H₂O₂ par la réaction Haber-Weiss (6), équilibre des deux réactions (4 et 5), dont la deuxième est de type Fenton, catalysée par des métaux :



Le radical HO[•] pouvant réagir avec presque tous les composés physiologiques est responsable des dommages oxydatifs produits dans des situations de stress oxydant, comme l'exposition excessive aux radiations ionisantes. Toutefois, il a une demi-vie extrêmement courte et est piégé par des antioxydants comme l'albumine et les métallothionéines. A noter que l'organisme ne dispose pas d'un système enzymatique pour l'élimination du HO[•] (Buechter, 1988).

L'oxygène singulet (¹O₂) est formé par inversion du spin d'un des deux électrons appariés de la molécule d'oxygène, suite à l'absorption d'énergie. Il présente une réactivité élevée et peut réagir avec divers composés organiques, mais il a une demi-vie courte et il est rapidement inactivé par des antioxydants, en particulier par le β-carotène (Martinez-Cayuela, 1995).

La réactivité élevée des ERO (notamment de HO[•]) est à l'origine de modifications oxydatives qu'elles peuvent entraîner au niveau des molécules biologiques (lipides, protéines et acides nucléiques), cibles sensibles à l'attaque radicalaire.

L'organisme dispose d'une variété de mécanismes pour inactiver les ERO mettant en jeu des systèmes enzymatiques (SOD, peroxydases, catalase), ainsi que des molécules antioxydantes (vitamines E, C, β-carotène, coenzyme Q₁₀, glutathion, métallothionéines, protéines du choc thermique, etc.). Cependant, dans certaines conditions, un déséquilibre entre la production et l'inactivation des ERO peut survenir, par suite d'une surproduction massive de celles-ci (inflammation, irradiation, intoxication) ou d'un effondrement des défenses endogènes provoqué par des carences en micronutriments antioxydants ou des

anomalies génétiques des enzymes antioxydantes. Le **stress oxydant** résulte donc d'un déséquilibre de la balance anti/pro-oxydants (Favier, 1997). Le niveau des ERO dépassant la capacité des mécanismes de protection entraîne des dommages oxydatifs directs au niveau des molécules biologiques, ainsi que des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique ou mutagène des produits d'oxydation formés.

Outre les dégâts provoqués par des niveaux élevés en ERO, il a été démontré au cours des dernières années que des niveaux sous-toxiques des ERO sont impliqués dans la signalisation cellulaire, la régulation des gènes et l'induction de processus biologiques variés, tels que la croissance cellulaire, l'apoptose, l'adhésion des cellules (Baeuerle *et al.*, 1996 ; Suzuki *et al.*, 1997 ; Allen and Tresini, 2000).

Par ailleurs, le stress oxydant a été incriminé dans différentes pathologies (cancer, athérosclérose, inflammation, maladies neurodégénératives, ischémie, vieillissement accéléré, etc.), en tant que facteur de genèse ou phénomène associé (Toyokuni, 1999).

2. Le glutathion

2.1. Principaux rôles physiologiques et métabolisme

Le **glutathion**, γ -glutamyl-cystéinyglycine (GSH) (fig. 2) est un tripeptide à cystéine qui joue un rôle important dans les mécanismes antioxydants. Le GSH est caractérisé par une liaison peptidique particulière entre le COOH en position γ de l'acide glutamique et la cystéine, ce qui le rend résistant à la majorité des peptidases.

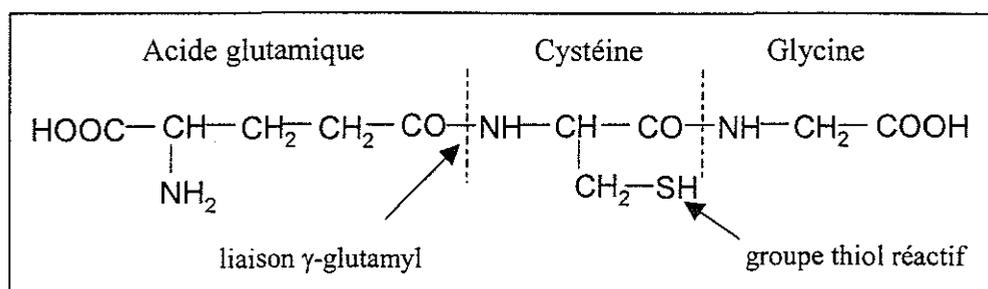


Figure 2 : Structure du glutathion.

Le GSH est impliqué dans un nombre important de fonctions cellulaires incluant la défense antioxydante, la détoxification des xénobiotiques électrophiles, la modulation de la transduction du signal par une régulation redox, le stockage et le transport de la cystéine, la régulation de la prolifération cellulaire, la synthèse des déoxyribonucléotides, la régulation du métabolisme des leucotriènes et des prostaglandines (Sies, 1999).

Dans la plupart des cellules animales, la concentration intracellulaire en GSH est comprise entre 0,5 et 10 mM, alors qu'elle est de l'ordre de 0,5 à 10 μ M dans le plasma. La majeure partie du glutathion intracellulaire se trouve sous forme réduite (GSH) et constitue un "tampon redox" qui maintient un potentiel redox thiol/disulfure donné. Deux pools de GSH intracellulaire ont été mis en évidence : le pool cytosolique, labile, et le pool mitochondrial, stable. Le noyau cellulaire contient aussi un pool de GSH qui serait essentiel pour la protection de l'ADN et d'autres structures nucléaires contre les agressions chimiques et oxydatives (Bellomo *et al.*, 1992).

Le glutathion sous forme de disulfure (GSSG), dénommé couramment glutathion oxydé (bien que d'autres produits d'oxydation, tels que les sulfonates puissent être formés à partir du GSH) (Winterbourn and Brennan, 1997) représente moins de 0,5% du glutathion total (Gérard-Monnier et Chaudière, 1996). L'équilibre thiol-disulfure et ses variations représentent un mécanisme clé pour de nombreuses propriétés métaboliques et régulatrices du glutathion (Sen, 1998 ; Arrigo, 1999). La formation des disulfures mixtes de type GSSR, dont une classe d'intérêt biologique particulier est représentée par les glutathion-cystéinyl disulfures des protéines, constitue le processus dénommé par le terme de **thiolation** des protéines. Par le biais de ce dernier, le GSH participe au contrôle de différents processus biologiques tels que la transduction du signal, l'expression des gènes, l'apoptose, car un nombre important d'enzymes et de protéines se trouvent « glutathionylées ». La liste de celles-ci est longue ; voici seulement quelques exemples : l'anhydrase carbonique, la glutathion S-transférase, la protéine-kinase C, la créatine kinase, l'aldose réductase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, la phosphorylase. Dans beaucoup de cas la thiolation a été rendue responsable d'altérations de fonctions des protéines. D'autre part, la thiolation et la réaction inverse de déthiolation (réduction des disulfures mixtes en sulfhydryles) représentent des réponses précoces au stress oxydant et ainsi protégeraient les protéines contre un dommage oxydatif irréversible (Thomas *et al.*, 1995, Seres *et al.*, 1996).

Par ailleurs, un autre dérivé du GSH, le S-nitrosoglutathion, formé par la réaction du GSH avec les espèces dérivées de NO, se révèle être une forme de stockage et de transfert de NO (Butler and Rhodes, 1997).

Le métabolisme du GSH fait intervenir plusieurs enzymes pour sa synthèse et sa dégradation, qui font partie du cycle γ -glutamyle ou cycle de Meister (Meister and Anderson, 1983) (fig 3).

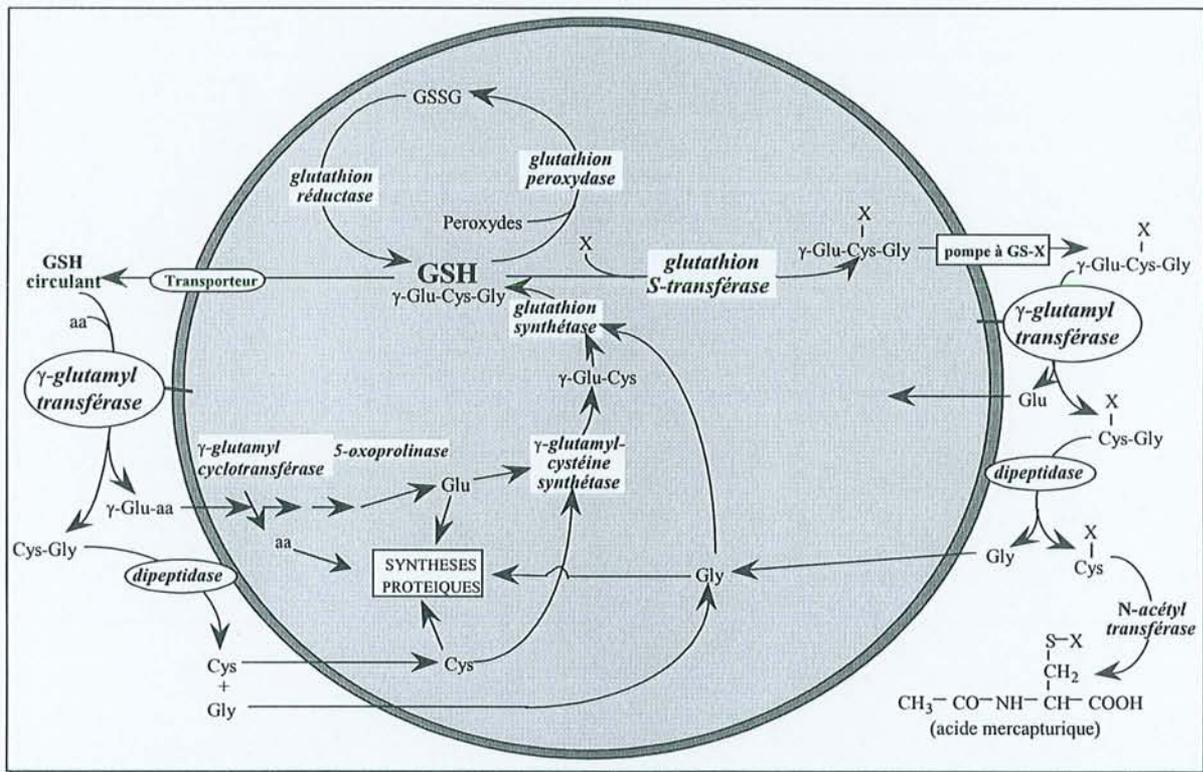


Figure 3 : Systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme du GSH (cycle de Meister).

Le GSH est synthétisé *de novo* à l'intérieur de la cellule par l'action séquentielle de la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS, EC 6.3.2.2) et la GSH synthétase (EC 6.3.2.3). La γ -GCS catalyse la synthèse de la γ -glutamylcystéine (γ -GluCys), dipeptide intermédiaire, à partir des acides aminés constituants. La γ -GluCys subit ensuite l'action de la GSH synthétase catalysant la fixation d'une molécule de glycine. La régulation de la synthèse du GSH est soumise au moins à trois facteurs : (i) le niveau d'expression de la γ -GCS dans la cellule ; (ii)

la disponibilité des substrats, en particulier de la Cys (acide aminé limitant) et (iii) le rétro-contrôle négatif de la γ -GCS par le GSH (Griffith, 1999).

La dégradation du GSH est initiée à l'extérieur de la cellule par la γ -glutamyltransférase (GGT, EC 2.3.2.2), enzyme capable de cliver la liaison γ -glutamyl-cystéine du GSH. Le produit formé, la cystéinyglycine (CysGly) est ensuite soumis à l'action des dipeptidases membranaires (EC 3.4.13.6) qui libèrent les acides aminés cystéine et glycine, lesquels peuvent entrer dans la cellule et servir à la synthèse *de novo* du GSH (Curthoys and Hughey, 1979, Meister and Anderson, 1983). Ainsi, l'initiation de la dégradation du GSH à l'extérieur de la cellule est nécessaire pour la synthèse intracellulaire du GSH, car celui-ci ne traverse pas la membrane cellulaire.

Une fois synthétisé, le GSH peut être exporté et participer au cycle inter-organes dans lequel le foie, le rein et l'intestin jouent un rôle important. L'exportation du GSH sert de système transporteur d'acides aminés et de système cyclique de récupération de la cystéine qui est utilisée pour la synthèse du GSH. Ce processus présente une importance majeure car, à part le foie, organe capable de synthétiser la cystéine à partir du squelette carboné de la sérine (voie métabolique de la méthionine), la synthèse du GSH est dépendante de l'apport extracellulaire de cystéine.

2.2. Le glutathion et le stress oxydant

Le rôle du GSH dans la défense antioxydante est bien établi et ceci dans de très nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, par exemple, le GSH inhibe la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines dans les microsomes (Palamanda and Kehrer, 1992), la production du radical HO^{*} par la réaction de Fenton et l'oxydation de l'ADN (Spear and Aust, 1995) et sa concentration dans les macrophages est inversement corrélée à la capacité de ces cellules d'oxyder les LDL (Rosenblat and Aviram, 1998). Grâce à sa concentration élevée, le GSH est un antioxydant majeur de la cellule par un mécanisme de piègeur direct des espèces réactives et par sa fonction de substrat pour d'importantes enzymes de défense. Il possède en effet des propriétés réductrices et nucléophiles et est un piègeur efficace du radical hydroxyle ainsi que d'espèces réactives variées d'oxygène et d'azote (Kalyanaraman *et al.*, 1996,

Luperchio *et al.*, 1996). Il intervient alors comme donneur soit d'hydrogène, soit d'électrons (sous sa forme ionisée GS⁻). Il peut également agir en synergie avec d'autres antioxydants, en transférant à l'ascorbate les électrons nécessaires au recyclage de l' α -tocophérol à partir des radicaux tocophéroxyles (Gérard-Monnier et Chaudière, 1996).

En réagissant avec différentes espèces radicalaires, le GSH forme le radical glutathionyle (GS[•]), espèce radicalaire peu réactive qui est inactivée par dimérisation (formation de GSSG) ou par réaction avec l'anion GS⁻. Dans ce dernier cas, il se forme l'anion radical GSSG^{•-} qui, en présence d'oxygène, produit du GSSG et l'anion superoxyde. Ainsi, le radical GS[•] peut initier des réactions de production des ERO dont l'inactivation nécessite l'intervention d'enzymes antioxydantes (SOD) (Munday and Winterbourn, 1989) (fig. 4). De cette façon, bien que la majorité des fonctions du GSH vis-à-vis du stress oxydant soient protectrices, la possibilité de certaines réactions secondaires ne doit pas être exclue (Diplock, 1994).

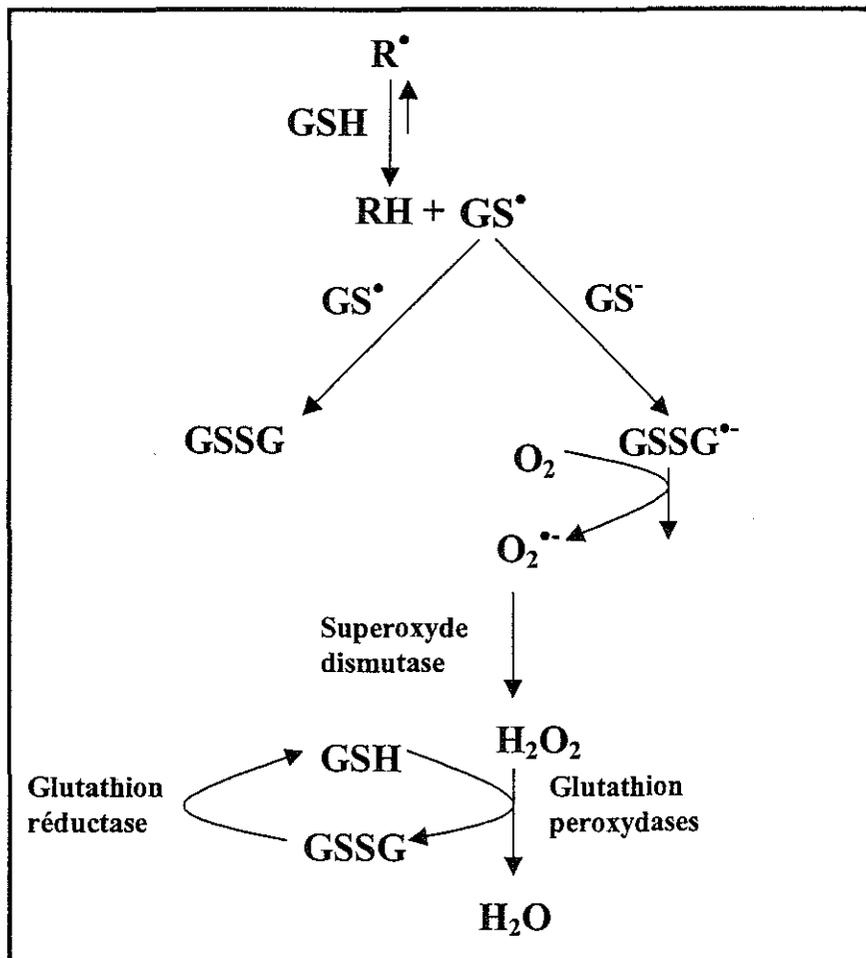


Figure 4 : Réactions du glutathion avec les espèces radicalaires (d'après Winterbourn, 1995).

Le rôle protecteur et détoxifiant du GSH résulte principalement de sa fonction de coenzyme de quelques enzymes antioxydantes clés : les glutathion peroxydases, les glutathion-S-transférases, la glutathion réductase.

Les **glutathion peroxydases (GPx)** (EC 1.11.1.3) représentent une famille de sélénoprotéines qui réduisent H_2O_2 en eau et les peroxydes organiques en alcools aux dépens du GSH. Les isoenzymes de la GPx diffèrent par leur distribution et leurs rôles tissulaires spécifiques ainsi que par la spécificité de leur substrat. La GPx cytosolique (cGPx) présente une distribution ubiquitaire et utilise le GSH pour réduire H_2O_2 et quelques peroxydes organiques. D'autres GPx sont connues, telles que l'isoenzyme gastro-intestinale (GI-GPx), la plus proche de la forme cGPx, la PH-GPx (phospholipid hydroperoxide GPx), qui réduit les hydroperoxydes des phospholipides, du cholestérol et des lipoprotéines et qui n'est pas GSH-spécifique, et la GPx plasmatique (pl-GPx) qui semble avoir un rôle dans la défense antioxydante extracellulaire (Brigelius-Flohé, 1999). L'activité de la GPx nécessite le recyclage du GSH par coopération de plusieurs systèmes enzymatiques, dont la **glutathion réductase (GR)** (E.C. 1.6.4.2), qui réduit le GSSG avec consommation de NADPH. Ce dernier est régénéré par l'action de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase dans le cycle des pentoses-phosphate, source de NADPH (fig.5).

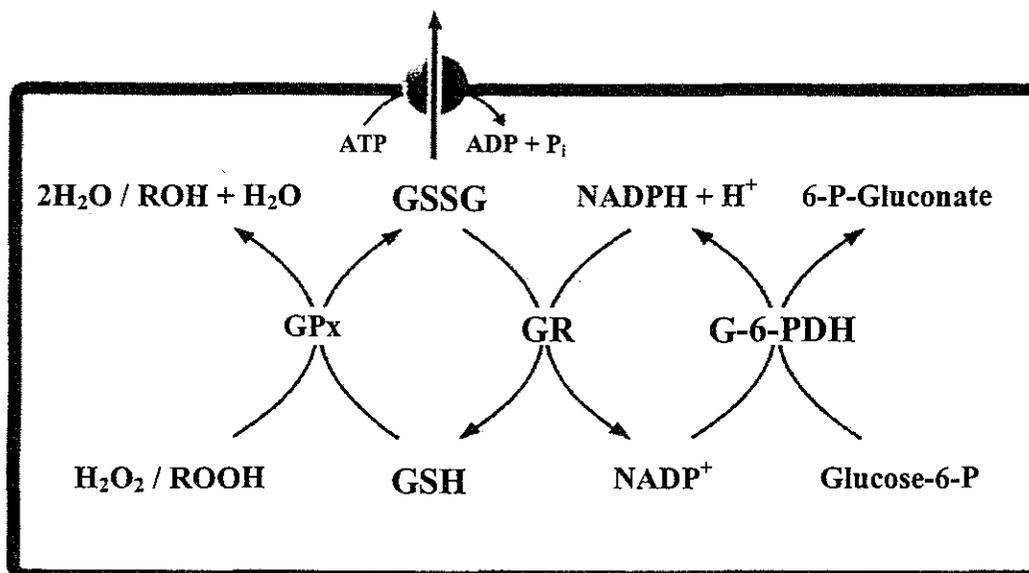


Figure 5 : Le cycle des réactions glutathion-peroxydase – glutathion-réductase.
 GPx : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, G-6-PDH : glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

Les **glutathion-S-transférases (GST)** (EC 2.1.5.18) représentent une vaste famille d'isoenzymes homo- ou hétéro-dimériques qui ont un rôle important de détoxification par conjugaison au GSH de nombreux substrats électrophiles exogènes ou endogènes. De plus, les GST ont une activité réductrice des hydroperoxydes, dont l'importance physiologique est controversée. Les différentes isoenzymes cytosoliques sont groupées en quatre classes principales en fonction de leurs propriétés structurales, immunologiques et catalytiques : alpha (A), mu (M), pi (P) et théta (T). De plus, des activités GST ont été trouvées dans les microsomes, les mitochondries et le noyau cellulaire (Commandeur *et al.*, 1995).

Les réactions qui consomment le GSH produisent du GSSG qui est soit reconverti en GSH soit excrété à l'extérieur de la cellule. Dans des conditions normales, l'activité de la GR et la disponibilité en NADPH sont suffisantes pour maintenir le rapport $[GSH]/[GSSG] > 100$. La diminution du rapport $[GSH]/[GSSG]$ dans certaines conditions de stress oxydant entraîne une altération du statut redox de la cellule, ce qui influence une variété de fonctions cellulaires, comme l'activation et la phosphorylation des stress kinases, l'activation des facteurs de transcription sensibles au stress oxydant comme AP-1 et NF-kB, conduisant éventuellement à l'augmentation de l'expression des gènes (Arrigo, 1999 ; Rahman and MacNee, 2000). Une déplétion plus marquée en GSH produit une amplification des dégâts oxydatifs (Bains and Shaw, 1997). La déplétion sévère en GSH a été incriminée dans quelques maladies comme les dysfonctionnements hépatiques, la fibrose pulmonaire, le SIDA et les maladies neurodégénératives (Uhlir and Wendel, 1992).

3. Autres thiols endogènes : rôle anti- et pro-oxydant

Le GSH est en effet le thiol intracellulaire le plus abondant, mais d'autres **thiols endogènes** sont aussi impliqués dans les phénomènes complexes liés au stress oxydant, et ceci d'une manière ambivalente, par des effets anti- ou pro-oxydants.

3.1. Rôle antioxydant

Le rôle antioxydant de plusieurs thiols (cystéine, méthionine, acide lipoïque, lipoamide, γ -glutamylcystéine) a été mis en évidence par différentes études *in vitro* ou *in vivo*.

Ces thiols peuvent protéger contre le dommage oxydatif, en réagissant directement avec les espèces oxydantes et non par un mécanisme enzymatique spécifique comme dans le cas du GSH. Ainsi, dans une étude *in vitro* non seulement le GSH, mais aussi la **cystéine**, ont été capables de protéger la Na⁺K⁺-ATP-ase contre l'inhibition induite par les radicaux libres produits au cours d'une réaction de Fenton (Tsakiris *et al.*, 2000). De même, la cystéine et la **méthionine** préviennent l'inactivation de la dihydrolipoamide déhydrogénase par le système oxydant de la myéloperoxydase (Gutierrez-Coreea and Stoppani, 1999). L'**acide lipoïque** protège les LDL contre l'oxydation induite *in vitro* par Cu²⁺ (Lodge *et al.*, 1998), mais également la supplémentation en acide lipoïque de l'alimentation chez les humains, conduit *in vivo* à la diminution du taux d'oxydation des LDL (Marangon *et al.*, 1999). La **lipoamide** manifeste aussi des propriétés antioxydantes, réduisant les dommages multiples provoqués par reperfusion après l'ischémie dans un modèle expérimental de cœur perfusé (Szabados *et al.*, 1999). Bien que moins étudiée, la **γ-glutamylcystéine** pourrait avoir aussi un effet antioxydant, comme le démontre la protection contre le stress oxydant induit par H₂O₂, O₂^{•-} ou le *tert*-butylhydroperoxyde chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Grant *et al.*, 1997).

Le mécanisme d'action antioxydante de ces molécules fait intervenir la réaction directe du groupe -SH avec les ERO, ainsi que la complexation des métaux. De plus, l'acide dihydrolipoïque et son amide semblent jouer un rôle important dans la réduction du radical semi-déhydroascorbate et participent ainsi indirectement au recyclage de l'α-tocophérol, comme, cela est connu pour le GSH (Gérard-Monnier et Chaudière, 1996).

3.2. Rôle pro-oxydant

En dehors du rôle antioxydant évoqué ci-dessus, les thiols peuvent avoir aussi un effet pro-oxydant au cours du processus d'auto-oxydation en présence de métaux de transition (Fe³⁺, Cu²⁺), ce qui conduit à la formation d'ERO et, par suite, au dommage oxydatif de biomolécules.

Le **mécanisme** de production d'ERO, schématisé dans la figure 6, a pour origine la réduction du Fe³⁺ (Cu²⁺) en Fe²⁺ (Cu⁺) (réaction 1) avec formation concomitante du radical thiyle correspondant. Ce dernier peut conduire à la formation de O₂^{•-} (conformément au

schéma des réactions décrites pour le GSH, fig 4), de même que la réaction (2) de Fe^{2+} avec l'oxygène. La première ERO qui se forme est donc $\text{O}_2^{\bullet-}$ dont la dismutation produit ensuite une deuxième ERO, à savoir H_2O_2 (réaction 3). L'auto-oxydation des thiols fournit donc Fe^{2+} et H_2O_2 , qui peuvent interagir selon la réaction de Fenton pour former HO^\bullet , espèce hautement réactive (réaction 4).

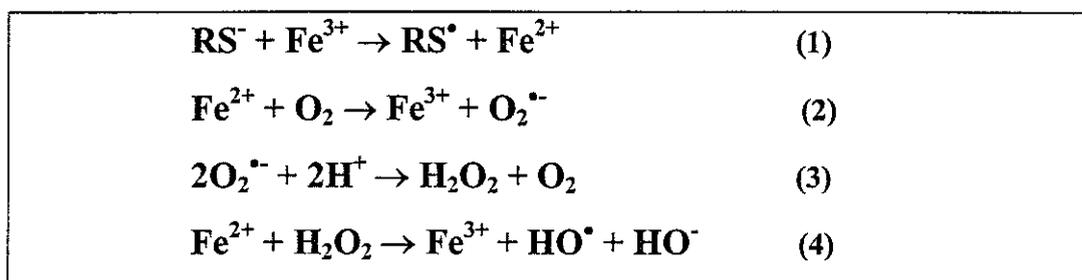


Figure 6 : Schéma des réactions conduisant à la formation d'ERO par l'auto-oxydation des thiols.

Plusieurs données expérimentales viennent à l'appui de ce mécanisme. La formation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ au cours de l'auto-oxydation des thiols a été mise en évidence par Misra (1974), et celle de H_2O_2 par Kwon *et al.*, 1998. D'autres études ont montré également la formation de HO^\bullet et donc le rôle de la réaction de Fenton (Held *et al.*, 1996 ; Nappi and Vass, 1997). De plus, l'apparition du radical thiyle (Saez *et al.*, 1982), ainsi que la réduction de Fe^{3+} (Tien *et al.*, 1982), viennent aussi confirmer ce mécanisme.

La réactivité des différents thiols, dans le schéma décrit ci-dessus, n'est pas identique et des études comparatives ont montré une réactivité faible pour le GSH et plus élevée pour d'autres thiols biologiques, tels que la cystéine, la cystéinyglycine, l'homocystéine (Lynch and Frei, 1997, Nappi and Vass, 1997, Winterbourn and Metodiewa, 1999). Cette différence de réactivité est souvent expliquée par des valeurs de pK_a (corrélation inverse avec la réactivité). En effet, l'ionisation des thiols est requise pour l'initiation de la chaîne de réactions et par conséquent l'auto-oxydation augmente avec le pH. Mais l'ionisation n'est pas le seul déterminant de la réactivité des thiols (Winterbourn and Metodiewa, 1999), d'autres facteurs, comme la longueur de la chaîne (Wood and Graham, 1995) et la capacité de complexer le fer (importante pour le GSH) (Spear and Aust, 1994) influencent aussi la réactivité des thiols.

Les conséquences du processus pro-oxydant dépendant des thiols ont été mises en évidence par la constatation de dommages oxydatifs causés à différentes biomolécules. Ainsi, dans des modèles d'étude *in vitro*, plusieurs auteurs ont démontré la **peroxydation** par différents thiols, notamment la Cys, d'acides gras polyinsaturés (Schöneich *et al.*, 1989), de liposomes (Tien *et al.*, 1982) et de lipoprotéines de faible densité (LDL) (Parthasarathy, 1987 ; Sparrow and Olszewski, 1993 ; Lynch and Frei, 1997). L'ADN peut être aussi une cible des espèces réactives produites par l'auto-oxydation des thiols, comme le montre la formation de 8-hydroxydésoxyguanosine, produit d'oxydation de l'ADN, par le GSH (Park and Floyd, 1997). Il en est de même en ce qui concerne l'induction de la mutagenèse chez des bactéries par le GSH, la Cys (Glatt, 1989) ou par la Cys et la CysGly (Martinez *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'**oxydation des protéines** par le système thiol/métal peut se traduire par une perte de leur activité enzymatique comme dans le cas de l'aldose réductase (Giannessi *et al.*, 1993). De plus, des modifications structurales (fragmentation, agrégation, formation de groupes carbonyles) ont été mises en évidence dans le cas de la superoxyde dismutase (Kwon *et al.*, 1998). Le radical HO[•] a été le plus souvent incriminé dans les dommages oxydatifs, mais il en est de même pour d'autres espèces réactives telles que H₂O₂ (Martinez *et al.*, 1999) et même le radical thiyle (Schöneich *et al.*, 1989).

Les propriétés pro- et antioxydantes des thiols sont influencées de manière importante par les conditions expérimentales, en particulier par la concentration en thiol (Tien *et al.*, 1982, Spear and Aust, 1995), par la présence de métaux, leur nature (Fe³⁺ ou Cu²⁺), leur concentration et même par la composition du milieu d'incubation (Parthasarathy, 1987, Spear and Aust, 1998). Par exemple, l'oxydation des LDL induite par Cu²⁺ est inhibée par les thiols, alors que celle induite par Fe³⁺ est stimulée (Lynch and Frei, 1997). Dans cette étude, le GSH a été le plus efficace dans l'inhibition de l'oxydation induite par Cu²⁺, tandis que la Cys a eu l'effet stimulateur le plus marqué sur l'oxydation des LDL dépendante de Fe³⁺. L'homocystéine a présenté un effet intermédiaire dans les deux cas. Cette influence multifactorielle peut expliquer les résultats parfois contradictoires obtenus par différents auteurs, par exemple en ce qui concerne l'implication ou non des thiols produits par les macrophages dans l'oxydation des LDL (Sparrow and Olszewski, 1993, Santanam and Parthasarathy, 1995). Néanmoins, les différentes études convergent vers un effet prédominant antioxydant du GSH, et des effets pro- et antioxydants d'autres thiols, les thiols endogènes présentant les effets pro-oxydants les plus marqués étant la **cystéine**, la **cystéinyglycine** et l'**homocystéine**.

Bien que la plupart des études évoquées s'appuient sur des modèles *in vitro*, des études *in vivo* suggèrent aussi un effet pro-oxydant des thiols, particulièrement dans le cas de l'homocystéine. En effet, l'hyperhomocystéinémie semble impliquée dans le processus d'athérogenèse par un mécanisme qui serait dû à son activité pro-oxydante. De nombreuses études épidémiologiques ont permis d'établir une corrélation entre l'oxydation des LDL et la concentration plasmatique en homocystéine. De ce fait, l'hyperhomocystéinémie est à présent comptée parmi les facteurs de risque des pathologies cardiovasculaires (Stamler and Slivka, 1996, Brattström and Wilcken, 2000, Ueland *et al.*, 2000).

4. La γ -glutamyltransférase

La γ -glutamyltransférase (GGT) est une glycoprotéine membranaire hétéro-dimérique, constituée de deux sous-unités, dont les masses moléculaires varient selon l'espèce (57kD et 23kD pour la GGT hépatique humaine). La séquence amino terminale de la grande sous-unité contient un domaine hydrophobe qui assure l'ancrage de l'enzyme à la membrane, tandis que la petite sous-unité contient le site actif de l'enzyme qui se trouve orienté vers l'extérieur de la cellule (Stole and Meister, 1991). La GGT est synthétisée sous forme d'un propeptide, qui après glycosylation est clivé en deux sous-unités qui migrent vers la membrane (Taniguchi and Ikeda, 1998).

La distribution de la GGT dépend des tissus et son expression varie au cours du développement. Les taux les plus élevés en GGT sont exprimés dans le rein adulte, spécialement dans la membrane luminale des tubules proximales, puis par ordre décroissant dans le pancréas, la prostate et le foie (Taniguchi and Ikeda, 1998, Courtay *et al.*, 1994). Il faut noter l'expression accrue de la GGT dans certains cancers (foie, colon, ovaire, prostate) corrélée, semble-t-il, avec les besoins augmentés en GSH des cellules tumorales. Des études consacrées à l'expression de la GGT et sa corrélation avec la réponse aux chimiothérapies sont maintenant développées (Hannigan, 1998). De plus, la synthèse de prodrogues γ -glutamyle constitue une nouvelle approche dans le ciblage des médicaments chimiothérapeutiques vers les tumeurs riches en GGT (Keren and Stark, 1998).

La GGT se trouve également dans le plasma où son origine est principalement hépatique. Le taux sérique de GGT augmente lors de pathologies hépato-biliaires, comme cholestases, cancer du foie et cirrhose (Philipps *et al.*, 1986). L'augmentation de la GGT hépatique qui précède celle de la GGT sérique est un marqueur très précoce de l'évolution dysplasique des hépatocytes. L'élévation la plus caractéristique est liée à l'alcoolisme, la GGT étant considérée comme un test de dépistage de l'alcoolisme et de surveillance du sevrage chez les sujets alcooliques, bien que les mécanismes moléculaires à l'origine de l'augmentation de l'expression de la GGT par l'éthanol ne soient pas bien connus (Ishii *et al.*, 1986). L'augmentation de l'activité GGT sérique a été rapportée au cours d'autres pathologies, comme les affections rénales, pancréatiques, cardiaques, pulmonaires, les tumeurs cérébrales et les affections malignes comme le cancer du sein et les mélanomes malins.

La GGT clive le résidu γ -glutamyle du GSH, ainsi que celui de ses dérivés S-substitués et des composés γ -glutamyle et transfère ce résidu sur différents accepteurs. Suivant la nature de l'accepteur, la réaction catalysée par la GGT est de type :

- transpeptidation : l'accepteur est un acide aminé ou un dipeptide,
- hydrolyse : l'accepteur est une molécule d'eau,
- autotranspeptidation : le substrat donneur du γ -glutamyle est aussi son accepteur (Meister *et al.*, 1981).

Les réactions catalysées par la GGT rendent compte des rôles polyvalents de cette enzyme. En dehors de l'approvisionnement des cellules en précurseurs du GSH, la GGT participe au transport transmembranaire des acides aminés. Le γ -glutamyl-acide aminé formé par transpeptidation pénètre dans la cellule et, sous l'action de la γ -glutamylcyclotransférase, conduit à la formation de 5-oxo-proline et libère l'acide aminé. Ce dernier peut être utilisé pour la synthèse des protéines en fonction des besoins cellulaires et la 5-oxo-proline fournit de l'acide glutamique sous l'action de la 5-oxoprolinase (fig. 3) (Meister et Anderson, 1983).

Quand l'accepteur du γ -glutamyle est la cystine, la γ -glutamylcystine formée peut ensuite pénétrer dans la cellule et après l'action d'une réductase, former de la γ -GluCys qui participe à la synthèse du GSH. Cette voie permet la synthèse du GSH évitant l'action de la γ -GCS (Anderson and Meister, 1983).

4.1. Rôle antioxydant

En initialisant le métabolisme du GSH à l'extérieur des cellules, la GGT fournit les précurseurs nécessaires pour la synthèse intracellulaire du GSH. De ce fait, la GGT est considérée comme faisant partie des systèmes de défense antioxydante (fig. 7A). En effet, un des mécanismes de protection par le GSH des cellules soumises à un stress oxydant consiste en l'augmentation du GSH intracellulaire, qui est sous dépendance de la GGT. Ainsi, l'ajout de GSH dans le milieu extracellulaire des macrophages alvéolaires (Forman and Skelton, 1990), ou des cellules épithéliales de rat (Kugelman *et al.*, 1994), protège les cellules contre le stress oxydant induit par différents agents. Cependant, cette protection est supprimée, au moins partiellement, par les inhibiteurs de la GGT comme l'acivicine et la sérine-borate, ce qui démontre que la GGT joue un rôle dans la défense antioxydante. La présence de GGT dans une lignée cellulaire de lymphoblastome humain prévient l'apoptose induite par stress oxydant lorsque les cellules sont incubées en milieu déficient en cyst(é)ine (Karp *et al.*, 2000).

De plus, l'augmentation de l'expression de la GGT observée dans différentes conditions de stress oxydant, par exemple lorsqu'il est induit expérimentalement par les quinones (Choi *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 1998b) ou par une surcharge en fer (Brown *et al.*, 1998), constitue aussi une adaptation de la défense antioxydante.

Cependant, au cours des dernières années, plusieurs travaux ont également mis en évidence un rôle pro-oxydant de la GGT.

4.2. Rôle pro-oxydant

Griffith and Tate (1980) ont signalé pour la GGT une activité apparente de **glutathion oxydase**. Cette activité peut être attribuée à la formation de CysGly, dont l'oxydation plus rapide que celle du GSH conduit à la formation de disulfures (cystinyl-bis-glycine ou disulfure mixte entre CysGly et GSH). Ces disulfures, identifiés par ailleurs par d'autres auteurs (Madhu *et al.*, 1992), participent à des réactions non-enzymatiques de transhydrogénation conduisant à la formation de GSSG, ce qui rend compte de l'activité de GSH oxydase de la GGT.

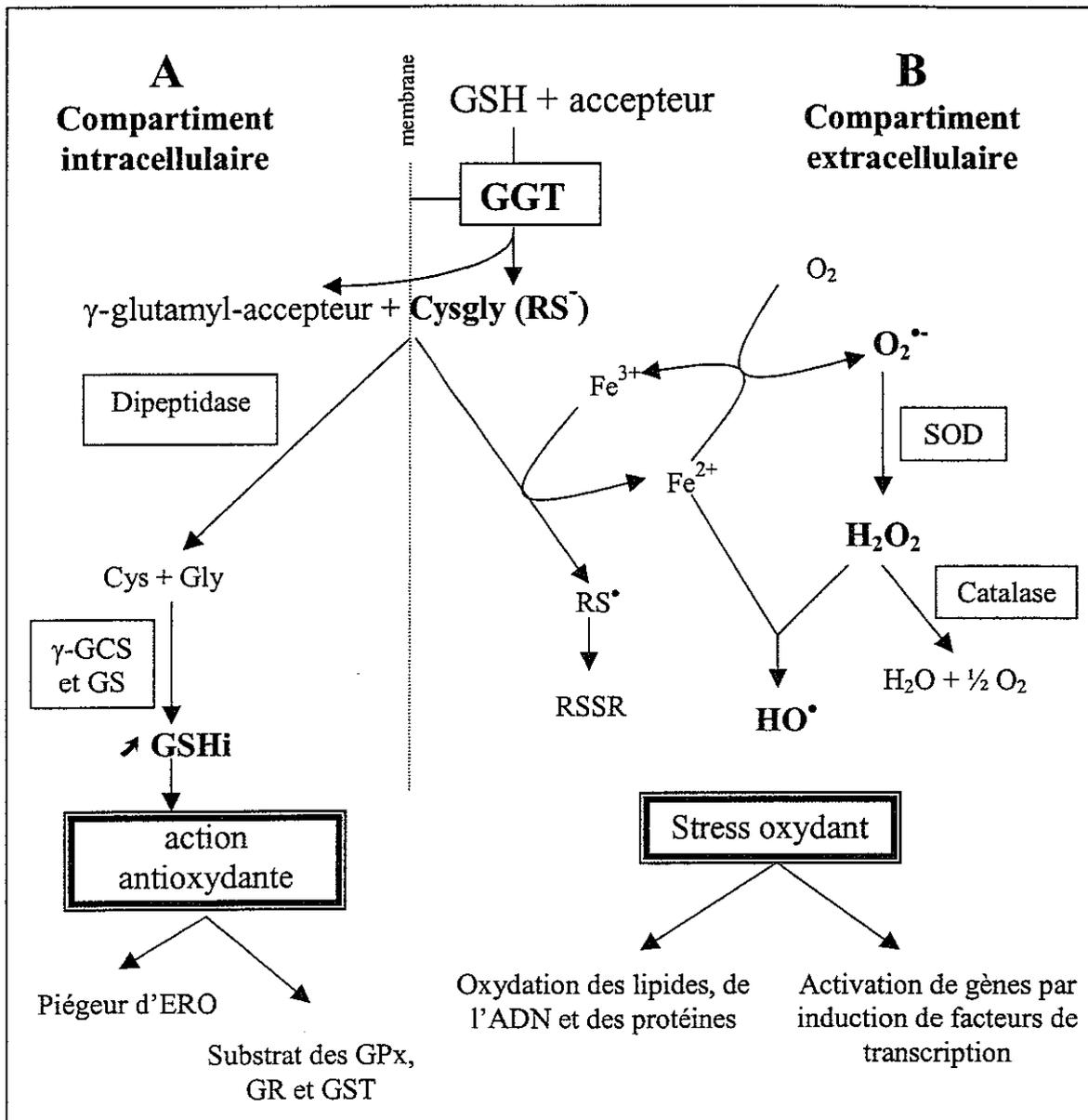


Figure 7 : Effets anti- et pro-oxydants de la GGT au cours du métabolisme du glutathion.

γ -GCS : γ -glutamylcystéine synthétase, GPx : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GS : glutathion synthétase, GSHi : glutathion intracellulaire, GST : glutathion-S-transférases, RS \cdot : radical thiyle ; RS $^-$: anion thiolate ; RSSR : disulfure ; SOD : superoxyde dismutase

Mis à part cette activité de GSH oxydase, de plus en plus d'études montrent un effet **pro-oxydant** de la GGT lié au métabolisme du GSH en présence des métaux (fig. 7B). Cet effet pro-oxydant est basé sur la différence importante de réactivité entre le GSH et son métabolite, la CysGly. En effet, comme nous l'avons décrit pour différents thiols, la CysGly présente une sensibilité beaucoup plus élevée à l'auto-oxydation que le GSH, fait illustré aussi par la différence de pK_a du group -SH des deux thiols (6,4 pour CysGly et 8,5 pour GSH).

L'auto-oxydation de la CysGly en présence des métaux initialise les réactions en chaîne de production d'espèces réactives, conformément au schéma des réactions déjà décrit (fig.6).

Le rôle pro-oxydant de la GGT a été mis en évidence initialement par Stark *et al.* (1993) dans la peroxydation de l'acide linoléique en présence de GSH/Fe³⁺ dans un modèle *in vitro*. Les auteurs ont caractérisé ce système qui requiert, en plus de la GGT et du GSH, du fer(III), un chélateur de celui-ci (EDTA, ADP) ou du fer sous forme de transferrine et de l'oxygène. Un substrat accepteur pour la réaction de transpeptidation (glygly) augmente l'efficacité de ce système, tandis que les inhibiteurs de la GGT (serine-borate et acivicine) inhibent cet effet. Un lien entre l'expression accrue de la GGT dans les foyers préneoplasiques hépatiques et le dommage oxydatif induit par le métabolisme du GSH extracellulaire à ce niveau a été suggéré en corrélation avec l'hépatocarcinogénèse. Cette hypothèse a été ultérieurement confirmée par des études histochimiques démontrant la colocalisation de la GGT et de la peroxydation lipidique dans les foyers préneoplasiques hépatiques induits chez le rat par des carcinogènes chimiques (Stark *et al.*, 1994, Pompella *et al.*, 1996). Ces résultats apportent la preuve qu'un tel phénomène peut se produire *in vivo*, bien que son rôle potentiel dans la modulation de la carcinogénèse ne soit pas connu (contribution à l'évolution vers la malignité ou, au contraire, à la regression des lésions par les produits cytotoxiques libérés).

D'autres travaux viennent à l'appui du rôle pro-oxydant de la GGT dans différents modèles, notamment de **peroxydation lipidique**. Ainsi, il a été signalé que le métabolisme du GSH par la GGT en présence de fer est capable d'induire la peroxydation lipidique des microsomes hépatiques de rat utilisés en tant que modèle de substrat lipidique membranaire (Zalit *et al.*, 1996, Paolicchi *et al.*, 1997). Les membranes des cellules vivantes peuvent aussi subir un dommage oxydatif dépendant de la GGT, comme le montrent des expériences réalisées avec des hépatocytes et des cellules d'hépatome humain HepG2 en culture (Paolicchi *et al.*, 1997). Dans ce cas, l'accumulation extracellulaire et non intracellulaire du malondialdéhyde, produit de la peroxydation lipidique, a été observée. Cette constatation est en accord avec la **localisation membranaire de la GGT dont l'action catalytique s'exerce à l'extérieur de la cellule et par conséquent le métabolisme du GSH présent dans l'environnement cellulaire crée les conditions pour l'initiation d'un événement pro-oxydant extracellulaire dont les lipides membranaires seraient les premières cibles.**

En dehors des dommages oxydatifs induits par la GGT au niveau tissulaire et qui semblent être en relation avec la carcinogénèse, des preuves récentes témoignent de l'implication de la GGT dans l'**oxydation des LDL** (Paolicchi *et al.*, 1999). Dans cette étude l'oxydation des LDL en présence de GSH et Fe^{3+} -ADP a été obtenue à l'aide de la GGT purifiée ou de la GGT des cellules leucémiques U937. Dans tous les cas, l'augmentation de l'oxydation des LDL a été inhibée par l'acivicine. De plus, l'étude histochimique de colocalisation de la GGT et des LDL oxydées dans les plaques d'athérome a permis d'envisager une possible implication de la GGT dans l'athérogenèse *in vivo* (Paolicchi *et al.*, 1999). Il a été suggéré que l'oxydation des LDL dépendante de la GGT contribuerait au dommage vasculaire et à la progression des athéromes. En effet, une corrélation entre des taux plasmatiques élevés en GGT et la mortalité par rechute de l'infarctus du myocarde a été rapportée lors d'études épidémiologiques (Wannamethee *et al.*, 1995).

Récemment, une étude *in vivo* a montré la contribution de la GGT au stress oxydant dans un modèle d'ischémie rénale chez le rat (Cutrin *et al.*, 2000). Dans ce modèle, la surexpression de la GGT a été observée aussi bien dans la zone médullaire que corticale du rein, suite à une hypoxie. Cette surexpression a été accompagnée par une diminution de la concentration en GSH et une augmentation importante de la peroxydation lipidique. Tous ces effets ont été prévenus par le prétraitement des animaux par l'acivicine.

Les lipides ne sont pas les seuls composés sensibles au stress oxydant induit par GGT/GSH/ Fe^{3+} . La **mutagenèse oxydative**, suite à des atteintes de l'ADN, a été décrite chez les bactéries (Stark and Glass, 1997, Martinez *et al.*, 1999) incubées en présence de ce système. Cette mutagenèse de nature oxydative est augmentée par des concentrations réduites en Cu^{2+} ou céruloplasmine mais, au contraire, inhibée par des concentrations élevées (Stark and Glass, 1997).

Des **modifications oxydatives des protéines** au cours du métabolisme du GSH par la GGT ont été également signalées. Il s'agit de réactions d'oxydation et de S-thiolation des groupes -SH des protéines membranaires, comme l'atteste une étude sur les cellules U937 (Dominici *et al.*, 1999). Dans ce modèle, l'oxydation des groupes -SH des protéines a été augmentée par la stimulation de l'activité GGT par l'addition des substrats GSH et glygly et inhibée par l'acivicine. Des résultats similaires ont été rapportés avec une lignée de mélanome exprimant des niveaux élevés de GGT (Me665/2/60) (Maellaro *et al.*, 2000). Puisque la thiolation des protéines peut également représenter un mécanisme de protection contre le

dommage oxydatif irréversible (Thomas *et al.*, 1995, Seres *et al.*, 1996), il a été suggéré que la modulation redox des groupes thiols des protéines membranaires pourrait contribuer à la résistance aux chimiothérapies pro-oxydantes et à la radiothérapie des tumeurs riches en GGT (Dominici *et al.*, 1999).

Les études citées ci-dessus montrent l'effet pro-oxydant de la GGT de manière indirecte, à la fois par l'évaluation du dommage oxydatif subi par des molécules biologiques (lipides, ADN, protéines) et par la suppression de celui-ci grâce aux inhibiteurs de la GGT. La première démonstration directe de la **production d'ERO** dépendante de la GGT a été réalisée au cours d'une étude où la production globale d'espèces réactives a été mesurée par chimiluminescence (Drozd *et al.*, 1998). Les auteurs ont démontré que la GGT, en présence de concentrations physiologiques de GSH et de transferrine est impliquée dans la formation d'espèces réactives de l'oxygène. De plus, au cours de cette étude, une production d'ERO dépendante de la GGT a été également mise en évidence dans une lignée fibroblastique V79 surexprimant la GGT. Ultérieurement, d'autres études ont montré à l'aide d'une technique spécifique, que H₂O₂ est produit au cours du métabolisme du GSH par la GGT (Del Bello *et al.*, 1999 ; Dominici *et al.*, 1999). Cette constatation est importante, car H₂O₂ est une espèce réactive relativement stable et capable de traverser librement les membranes cellulaires et nucléaires (Reiter, 1995). H₂O₂ produit dans l'espace extracellulaire suite au processus pro-oxydant dépendant de GGT pourrait donc diffuser et induire des effets toxiques à l'intérieur des cellules.

En dehors de la production de dommages oxydatifs sur les biomolécules, il a été montré récemment qu'une production modérée d'espèces réactives dépendante de la GGT peut induire des effets modulateurs sur différentes fonctions cellulaires. Ainsi, la **croissance cellulaire** d'une lignée de carcinome ovarien (A2780) est inhibée lorsque la GGT de ces cellules métabolise le GSH ajouté au milieu (30 µM à 1 mM) (Perego *et al.*, 1997). Cependant, pour des concentrations en GSH plus élevées, aucun effet inhibiteur de la croissance cellulaire n'a été observé. De plus, dans une autre lignée (IGROV-1) et bien que le niveau d'expression de la GGT soit approximativement 5 fois plus élevé que dans la lignée A2780, la croissance cellulaire n'a pas été inhibée. Ceci pourrait être dû à des niveaux également élevés d'autres enzymes dépendantes du GSH et exerçant une fonction antioxydante, telles que la GPx, les GST, la GR.

Au contraire, de faibles concentrations de H₂O₂ (de l'ordre de 5 nmoles/million cellules/h) produites au cours du métabolisme du GSH (100 µM) par la GGT, sont nécessaires pour le maintien de la prolifération cellulaire et la prévention de l'apoptose des cellules U937. En effet, l'inhibition de la GGT et par conséquent la suppression de la production de H₂O₂, ainsi que l'élimination de H₂O₂ provoquent l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire (Del Bello *et al.*, 1999).

D'autres fonctions cellulaires sont modulables par le pouvoir pro-oxydant de la GGT, en particulier l'**activation des facteurs de transcription**, rapportée très récemment (Accaoui *et al.*, 2000, Maellaro *et al.*, 2000). Ainsi, dans la lignée cellulaire V79GGT surexprimant la GGT, le métabolisme extracellulaire du GSH (0,5 à 2,5 mM) est accompagné d'une activation du facteur NF-kB, effet dépendant de la concentration en GSH et du temps d'incubation. Cet effet a été inhibé par la catalase, ce qui démontre l'implication de H₂O₂ dans l'activation du NF-kB dépendante de GGT/GSH. Dans les mêmes conditions, aucun effet n'a été observé dans la lignée témoin, dépourvue de GGT (Accaoui *et al.*, 2000). De même, dans la lignée de mélanome Me665/2/60 exprimant des taux élevés de GGT, une activation plus importante du facteur NF-kB a été observée, par rapport à la lignée Me665/2/21 n'exprimant que de faibles niveaux de GGT (Maellaro *et al.*, 2000).

La GGT est donc impliquée dans les phénomènes liés au stress oxydant par ses rôles anti- et pro-oxydants (fig. 7). L'équilibre de ces fonctions serait influencé par différents facteurs, dont, en particulier, la concentration des sources physiologiques de fer, celle du GSH, le niveau d'expression de la GGT ainsi que le statut des mécanismes antioxydants.

Les références des études relatives au rôle pro-oxydant de la GGT et aux effets qui en découlent, sont présentées dans le tableau I. On constate alors que malgré les conditions assez variées utilisées par différents auteurs, en ce qui concerne les modèles d'étude, les concentrations en GSH, Fe³⁺ et l'activité de la GGT, les effets observés ont pour origine le processus pro-oxydant dépendant de la GGT. En vertu de ces études, dont la plupart ont été réalisées en même temps que notre travail de thèse, le métabolisme du GSH par la GGT est reconnu actuellement comme étant une source physiologique d'espèces réactives qui peut avoir de multiples conséquences biologiques. Néanmoins, il reste beaucoup d'inconnues et nous nous sommes proposée dans ce travail d'approfondir quelques aspects concernant le rôle pro-oxydant de la GGT.

Tableau I. Etudes relatives au rôle pro-oxydant de la GGT (tableau récapitulatif).

MODELE D'ETUDE	EFFET OBSERVE	CONDITIONS				REFERENCE
		[GSH]	[Fe ³⁺]	[GGT]	milieu	
Production des ERO						
Cellules fibroblastiques surexprimant ou non la GGT (V79GGT/V79Cl)	Production des ERO dépendante de GGT (chimiluminescence)	2,5 mM	Transferrine 80 µM	Activité surexprimée de cellules V79GGT (2 U/mg protéines) ou 100 mU/ml GGT purifiée	Tampon phosphate 55 mM pH 7,4	Drozdz <i>et al.</i> , 1998
Cellules de lymphome U937	Production de H ₂ O ₂ dépendante de GGT	100 µM	-	Activité intrinsèque des cellules U937 (ca. 15 mU/mg protéines)	Tampon phosphate Krebs-Ringer	Del Bello <i>et al.</i> , 1999
		100–200 µM	-	idem	Milieu de Hank's	Dominici <i>et al.</i> , 1999
Peroxydation lipidique						
Acides gras insaturés (acide linoléique)	Formation de MDA (TBARS)	1 ou 2 mM	Fe ³⁺ -EDTA 100 : 110 µM ou Fe ³⁺ -ADP 100 : 500 µM ou transferrine 100 µM	100 mU/ml	Tampon Tris 50mM pH 6,9	Stark <i>et al.</i> , 1993
	Formation de MDA (TBARS) Augmentation de la peroxydation lipidique en présence de GGT/GSH/Fe ³⁺ par Cu ²⁺ et céruloplasmine	300 ou 600 µM	Fe ³⁺ -EDTA-ADP 50 : 27,5 : 125 µM ± 1 µM CuSO ₄ ou 0,4 µM céruloplasmine	75 mU/ml	HEPES 50 mM pH 7	Glass et Stark, 1997

Tableau I. Etudes relatives au rôle pro-oxydant de la GGT (tableau récapitulatif) (suite).

Microsomes de foie (rat)	Formation de MDA (TBARS)	500 μ M	Fe ³⁺ -Citrate 10 : 80 μ M ou Cu ²⁺ - Histidine 2 : 4 μ M	160 mU/ml	HEPES 50 mM pH 7,4	Zalit <i>et al.</i> , 1996
		2 mM	Fe ³⁺ -ADP 0,15-1,5 mM	200 mU/ml	Milieu de Hank's	Paolicchi <i>et al.</i> , 1997
Foyers préneoplasiques de foie de rat induits par des carcinogènes	Localisation <i>in situ</i> de la peroxydation lipidique dépendante de l'activité GGT (détection des fonctions aldéhydiques avec le réactif de Schiff)	\leq 5 mM	Fe ³⁺ -EDTA 100 : 110 μ M ou Fe ³⁺ -ADP 100 : 500 μ M	Activité élevée par rapport au tissu normal	Tampon Tris 50mM pH 7	Stark <i>et al.</i> , 1994
	Colocalisation de la peroxydation lipidique et diminution des groupes -SH des protéines	0,05-2mM	Fe ³⁺ -ADP 0,05 : 1 mM ou transferrine 100 μ M	Activité élevée par rapport au tissu normal	Tampon Tris 50mM pH 7,4	Pompella <i>et al.</i> , 1996
Hépatocytes Cellules d'hépatome HepG2 humain	Formation du MDA (TBARS)	2 mM	Fe ³⁺ -ADP 0,15 : 1,5 mM	200 mU/ml	Milieu de Hank's	Paolicchi <i>et al.</i> , 1997
LDL humaines	Formation de MDA (TBARS) Réduction du Fe ³⁺ Colocalisation de la peroxydation lipidique et de la GGT dans les plaques d'athérosclérose	2 mM	Fe ³⁺ -ADP 0,1 : 1 mM	200 mU/ml	PBS pH 7,4	Paolicchi <i>et al.</i> , 1999
Ischémie rénale chez le rat (<i>in vivo</i>)	Augmentation du niveau de la GGT et de la peroxydation lipidique (TBARS)					Cutrin <i>et al.</i> , 2000

Tableau I. Etudes relatives au rôle pro-oxydant de la GGT (tableau récapitulatif) (suite).

<i>Modulation redox des protéines (thiolation)</i>						
Cellules de lymphome U937 humain	Diminution des groupes -SH des protéines par réactions d'oxydation et de thiolation	100-200 μ M	-	Activité intrinsèque des cellules U937 (ca. 15 mU/mg protéines)	Milieu de culture RPMI 1640	Dominici <i>et al.</i> , 1999
Cellules de mélanome Me665/2	Diminution des groupes -SH des protéines	0,1 mM	-	Activité intrinsèque des cellules Me665/2	Milieu de culture RPMI 1640	Maellaro <i>et al.</i> , 2000
<i>Mutagenèse oxydative</i>						
<i>Salmonella typhimurium</i> TA102	Mutagenèse oxydative dépendante de GGT/GSH/Fe ³⁺ Augmentation ou diminution par addition de Cu ²⁺ ou céruploplasmine (effet en fonction de la concentration)	300 μ M	Fe ³⁺ -EDTA-ADP 50 :27,5 :125 μ M	75 mU/ml	HEPES 50 mM pH 6,9	Stark <i>et al.</i> , 1987, Stark <i>et al.</i> , 1988 Stark et Glass, 1997
<i>Escherichia coli</i> WP2 souche IC203	Mutagenèse oxydative dépendante de GGT/GSH	1-20 mM	-	700 mU/ml	Bouillon nutritif Oxoid N°2	Martinez <i>et al.</i> , 1999

Tableau I. Etudes relatives au rôle pro-oxydant de la GGT (tableau récapitulatif) (suite et fin).

<i>Modulation de la croissance cellulaire</i>						
Cellules de carcinome ovarien humain A2780 et IGROV-1	Inhibition de la croissance dans les cellules A2780 Pas d'effet sur la croissance des cellules IGROV-1	30 μ M à 1 mM	-	Activité intrinsèque des cellules A2780	Milieu de culture RPMI 1640	Perego <i>et al.</i> , 1997
Cellules de lymphome U937	Prévention de l'apoptose par des concentrations faibles de H ₂ O ₂ produites par GGT/GSH	100 μ M	-	Activité intrinsèque des cellules U937	Milieu de culture RPMI 1640	Del Bello <i>et al.</i> , 1999
<i>Modulation des facteurs de transcription</i>						
Cellules fibroblastiques surexprimant ou non la GGT (V79GGT/V79C1)	Activation du facteur de transcription NF-kB dans les cellules V79GGT	0,5 à 2,5 mM	-	Activité surexprimé (2U /mg protéines)	Milieu de culture RPMI 1640	Accaoui <i>et al.</i> , 2000
Cellules de mélanome Me665/2/60	Activation du facteur de transcription NF-kB	0,1 mM	-	Activité intrinsèque des cellules Me665/2/60	Milieu de culture RPMI 1640	Maellaro <i>et al.</i> , 2000

5. La γ -glutamyltransférase « related »

En dehors de la GGT, une autre enzyme GGT-rel (« GGT-related »), capable aussi d'initier le clivage du GSH, a été identifiée (Heisterkamp *et al.*, 1991, Morris *et al.*, 1993) et clonée initialement à partir de l'ADNc de placenta humain. Il s'agit également d'une protéine hétérodimérique glycosylée dont les deux sous-unités présentent des masses moléculaires de 53,5 et 26,8 kDa. La GGT-rel présente une homologie de structure de 40% avec la GGT humaine. La GGT-rel semble également être localisée sur la membrane cellulaire et orientée vers l'extérieur de la cellule. De même que la GGT, la GGT-rel appartient aussi à une famille multigénique dont les gènes codants sont localisés sur le chromosome 22.

Son expression chez l'homme n'est que très peu connue. Ainsi, dans les lignées cellulaires humaines suivantes : lymphoblastes IM-9 et GM 7441, fibroblastes pulmonaires, cellules de carcinome rénal A498 et pulmonaire ChaGo, cellules de glioblastome A172, la GGT-rel n'est pas exprimée. En revanche, de faibles niveaux d'expression de la GGT-rel (ARNm) ont été détectés dans les lignées cellulaires humaines K562 (erythroleucémie) et HepG2 (hépatoblastome). Dans cette dernière, l'enzyme est inductible par la dexaméthasone (Heisterkamp *et al.*, 1991). De même, chez la souris, la plupart des tissus examinés n'expriment pas de GGT-rel (cerveau, œil, cœur, poumon, thyroïde, vessie, intestin, rein, foie, pancréas, rate, moelle osseuse, glandes salivaires, placenta et tissus embryonnaires). En revanche, des taux élevés d'expression de la GGT-rel ont été trouvés dans les cellules épithéliales trachéales de rat (Potdar *et al.*, 1997). Dans ce cas, la protéine présente une homologie structurale de 79% avec la GGT-rel humaine et peut être induite par le facteur de croissance épidermique et par exposition aux carcinogènes chimiques comme le nitrite d'isobutyle.

L'activité biologique de la GGT-rel a été mise en évidence par l'étude du métabolisme du GSH dans un modèle cellulaire. Ce dernier est constitué par des cellules issues d'une lignée fibroblastique NIH3T3 transfectée par l'ADNc de la GGT-rel (NIH3T3/GGT-rel). Ainsi, une diminution de la concentration du GSH (ajouté au milieu à la concentration de 0,2 mM), en fonction du temps, a été mise en évidence dans la lignée NIH3T3/GGT-rel, tandis que dans la lignée NIH3T3 témoin la concentration en GSH reste, dans les mêmes conditions, sensiblement constante (Heisterkamp *et al.*, 1991). Toutefois, le métabolisme du GSH par la GGT-rel n'a pas été étudié en détail et aucune information n'existe actuellement

au sujet des métabolites du GSH formés par la réaction enzymatique catalysée par la GGT-rel. Par ailleurs, il a été démontré que la GGT-rel catalyse la conversion du leucotriène C4, un substrat physiologique de la GGT, en leucotriène D4 (Heisterkamp *et al.*, 1991).

Bien que la GGT-rel semble capable de cliver le résidu γ -glutamyle, sa spécificité de substrat est différente de celle de la GGT. Ainsi, la GGT-rel ne reconnaît pas les substrats synthétiques (contenant le résidu γ -glutamyle lié à un noyau aromatique) couramment utilisés pour la mesure de l'activité GGT, tels que le L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide et le γ -glutamyl-4-méthoxynaphtylamide. De ce fait, une éventuelle activité GGT-rel n'interfère pratiquement pas dans le dosage de l'activité GGT reposant sur l'utilisation des substrats évoqués ci-dessus. En revanche, l'acivicine, inhibiteur de la GGT, est également capable d'inhiber la GGT-rel, bien que pour cette dernière l'effet semble plus limité.

Une comparaison des caractéristiques de la GGT et la GGT-rel est résumée dans le tableau II.

Tableau II. Comparaison des caractéristiques de la GGT et de la GGT-rel.

<i>Caractère</i>	<i>GGT</i>	<i>GGT-rel</i>
Localisation des gènes codants (gènes distincts)	chromosome 22	chromosome 22
Protéine glycosylée	+	+
Masse moléculaire (grande et petite sous-unité glycosylées)	57/23kD	53.5/26.8kD
<i>Spécificité de substrat :</i>		
GSH	+	+
Leucotriène C4	+	+
γ -glutamyle-3-carboxy-4-nitroanilide	+	-
γ -glutamyle-4-méthoxynaphtylamide	+	-
Inhibition par acivicine	+	+

Le rôle physiologique de la GGT-rel est très mal connu ; elle semble liée aux différentes étapes de développement (Heisterkamp *et al.*, 1991), ou à la défense antitoxique (Potdar *et al.*, 1997). Par ailleurs, des activités GGT-rel ont été proposées pour rendre compte d'une fonction protéolytique, en particulier en relation avec le métabolisme de l'IL-6 et IGF-1 (Laouar *et al.*, 1993, Laouar *et al.*, 1994).

Enfin, aucune donnée de la littérature ne mentionne un effet éventuel pro-oxydant de la GGT-rel, comme dans le cas de la GGT.

Une conclusion est tout de même certaine : la GGT n'est pas la seule enzyme capable de cliver le résidu γ -glutamyle et, par conséquent, la GGT-rel doit être prise en considération pour toute étude du métabolisme du GSH, de ses conjugués et des dérivés γ -glutamyle en général, ainsi que pour les conséquences biologiques qui en découlent.

6. La peroxydation lipidique

Ainsi que nous l'avons évoqué précédemment, le rôle pro-oxydant de la GGT a été démontré principalement dans des modèles d'étude de la peroxydation lipidique.

La peroxydation lipidique (LPO), généralement définie comme « la détérioration oxydative des lipides polyinsaturés », est un processus complexe qui comprend 3 étapes : initiation, propagation et terminaison (fig. 8). L'initiation du processus résulte d'une attaque radicalaire par des ERO notamment HO^\bullet . Cependant, ceci peut être également le fait d'autres espèces présentant une réactivité suffisante pour arracher un atome d'hydrogène à un groupe $-\text{CH}_2-$ adjacent à une double liaison. Il se forme alors un radical centré sur ce carbone et qui se stabilise par réarrangement spontané avec formation d'un radical diène conjugué.

Dans le cas de l'acide linoléique (1), pris ici comme exemple, deux atomes de carbone sont susceptibles de subir cette abstraction d'hydrogène. Il s'ensuit, dans chaque cas, la formation d'un **radical diène conjugué** qui peut adopter, soit une configuration cis-trans (2 et 3), soit trans-trans (4 et 5). En aérobiose, la fixation d'oxygène conduit à un **radical peroxyde** (LOO^\bullet) (6), qui, à son tour, est capable d'arracher un atome d'hydrogène à une autre molécule d'acide linoléique. Il se forme alors un **hydroperoxyde** (LOOH) (7) et un radical $-\text{CH}^\bullet-$ qui assure ainsi la propagation du phénomène d'oxydation. Ce dernier peut être interrompu par la réaction du radical peroxyde avec le tocophérol, antioxydant majeur des membranes cellulaires, ou par combinaison des deux radicaux conduisant à une espèce moins réactive (de type LOOL , LOH).

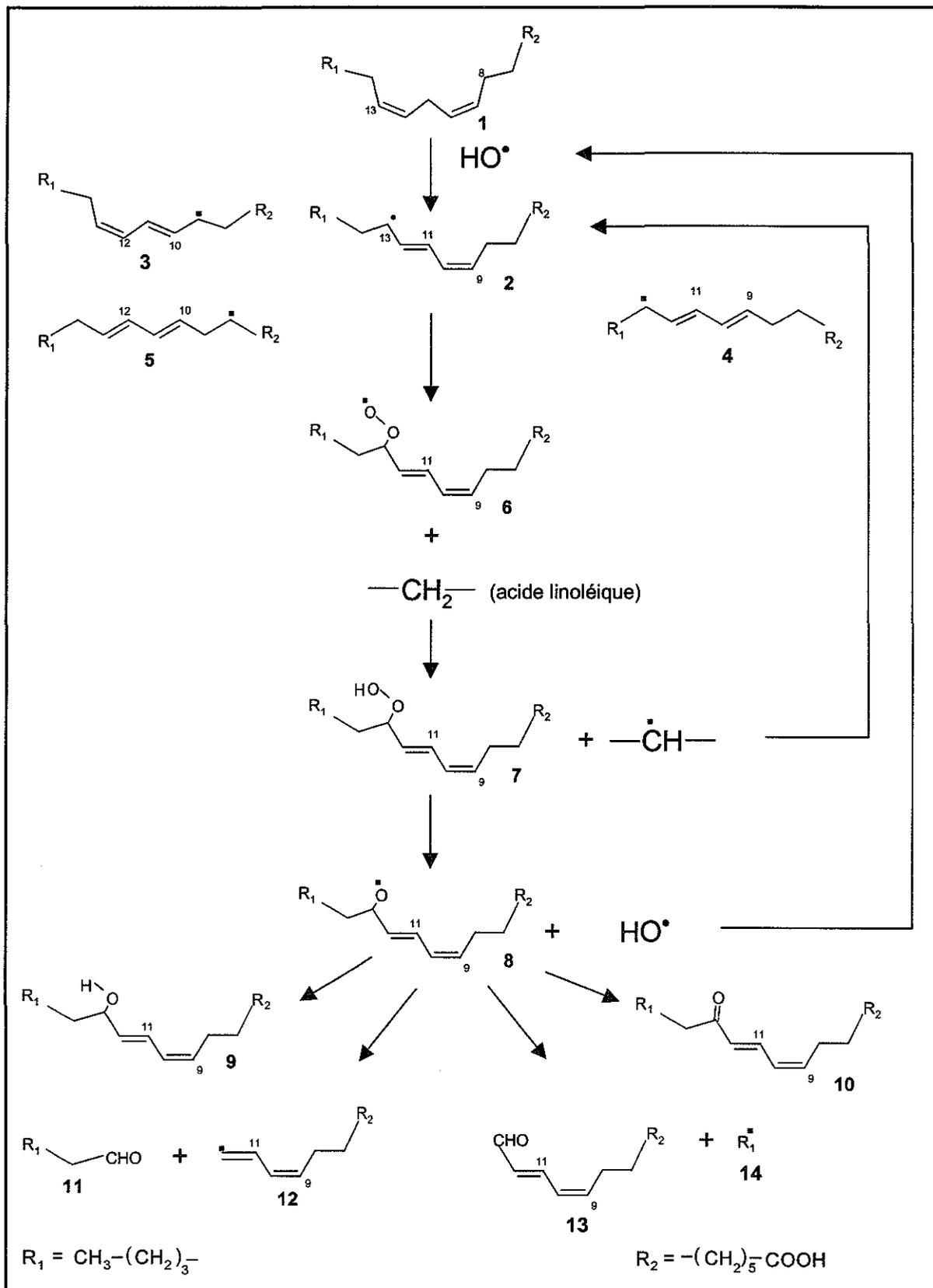


Figure 8. Schéma général de la peroxydation lipidique.

Les hydroperoxydes lipidiques sont des produits primaires de la LPO présentant une stabilité réduite et qui sont convertis par des réactions de scission, de réarrangement et d'oxydation en produits secondaires (8 à 14). (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Les produits secondaires comprennent des **composés aldéhydiques** et des **hydrocarbures** (alcane, alcène). Les composés carbonylés issus de la LPO incluent une variété de produits : alcanals, 2-alcénals, 2,4-alcadiénals, alcatriénals, α -hydroxyaldéhydes, 4-hydroxyalcénals, malondialdéhyde (MDA), composés α -dicarbonyle, cétones saturées et insaturées (Rice-Evans and Diplock, 1991). A l'opposé des hydroperoxydes lipidiques, les aldéhydes ont une demi-vie plus longue et la capacité de diffuser et de transmettre à distance les conséquences de l'évènement oxydatif initial. Cela conduit à une amplification du processus de la LPO par les aldéhydes, qui sont considérés de ce fait comme des « seconds messagers toxiques » de la LPO (Esterbauer *et al.*, 1991, Comporti, 1998).

La peroxydation lipidique a été incriminée dans des pathologies variées telles que le cancer, les maladies neurodégénératives, l'athérosclérose, etc., (Martinez-Cayuela, 1995, Chisolm and Steinberg, 2000). Les atteintes de l'intégrité et des fonctions des membranes cellulaires ainsi que les modifications oxydatives des LDL seraient des facteurs de genèse de telles maladies. Cela justifie l'intérêt du choix des **marqueurs de la LPO**.

Les principaux produits issus de la LPO utilisés comme marqueurs sont les aldéhydes, les diènes conjugués, les hydrocarbures et les isoprostanes (De Zwart *et al.*, 1999). Ces derniers sont des isoeicosanoïdes (composés « prostaglandin-like ») formés par la peroxydation de l'acide arachidonique sous l'action des radicaux libres et non par les voies enzymatiques de la cyclooxygénase ou de la lipoxygénase (Roberts et Morrow, 1997). Leur dosage dans l'urine, de même que le dosage des alcanes dans l'air expiré sont des méthodes non-invasives de mesure de la LPO *in vivo*. Le dosage des diènes conjugués par absorption UV (230-235 nm) est adapté à la mise en évidence des modifications peroxydatives précoces de lipides à l'état pur mais soumis à beaucoup d'interférences lorsqu'il s'agit des milieux biologiques complexes (Meagher and Fitzgerald, 2000). Les marqueurs de la LPO les plus souvent utilisés restent les produits secondaires aldéhydiques et parmi ceux-ci le **MDA** et le **4-hydroxynonéal** (HNE). Le premier permet par un simple dosage colorimétrique (condensation avec l'acide thiobarbiturique) une appréciation du niveau de la LPO et de ce fait a été extensivement utilisé (Esterbauer, 1996). L'HNE présente une réactivité biologique

beaucoup plus élevée que le MDA et il est considéré actuellement comme étant un meilleur indicateur de la LPO car il permet également l'évaluation d'un processus toxique dû à la LPO.

Depuis l'identification du HNE comme produit d'oxydation des lipides dans des systèmes biologiques soumis à un stress oxydant, de nombreuses études ont mis en évidence les effets du HNE sur une variété de fonctions cellulaires :

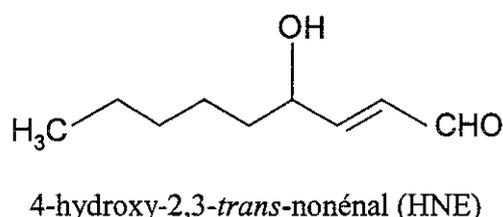
- inhibition de la croissance cellulaire (Zarkovic *et al.*, 1995, Haynes *et al.*, 2000)
- induction de l'apoptose (Herbst *et al.*, 1999, Haynes *et al.*, 2000)
- inhibition de la synthèse des acides nucléiques (White and Rees, 1984, Hauptlorenz *et al.*, 1985) et des protéines (Benedetti *et al.*, 1981, White and Rees, 1984)
- inhibition de la respiration mitochondriale (Humphries et Szweda, 1998)
- inhibition de plusieurs activités enzymatiques (Siems *et al.*, 1996, Del Corso *et al.*, 1998, Buko *et al.*, 1999)
- effets cytotoxiques (Spitz *et al.*, 1990, Fukuda *et al.*, 1996)
- effets génotoxiques (Eckl *et al.*, 1993)
- activité chémotactique envers les polymorphonucléaires (Rossi *et al.*, 1994).

Selon les travaux, la concentration en HNE nécessaire pour l'induction de ces effets biologiques varie de 1 à 500 μM . En dehors des effets principalement toxiques évoqués ci-dessus, des études récentes montrent que pour des concentrations physiologiques ($<0,1-1\mu\text{M}$) ou modérément élevées, le HNE exerce des effets modulateurs sur quelques fonctions cellulaires telles que la différenciation (Dianzani *et al.*, 1999, Rinaldi *et al.*, 2000) et la prolifération cellulaire (Zarkovic *et al.*, 1993, Barrera *et al.*, 2000), la transduction du signal (Uchida *et al.*, 1999, Leonarduzzi *et al.*, 2000) et l'expression des gènes. Il a été montré que le HNE induit l'expression des gènes du TGF β 1 (transforming growth factor) (Leonarduzzi *et al.*, 1997), de la protéine du choc thermique hsp70 (Cajone et Crescente, 1992, Allevi *et al.*, 1995), de la γ -globine (Fazio *et al.*, 1992) et de la γ -GCS (Liu *et al.*, 1998a) dans différents modèles cellulaires. La signalisation par l'HNE impliquerait l'activation du facteur de transcription AP-1 (Camandola *et al.*, 1997) et la voie de la MAP kinase (Leonarduzzi *et al.*, 2000). L'ensemble de ces effets cellulaires suggère que l'HNE agirait non seulement comme un médiateur toxique et mutagénique du stress oxydant, mais également comme un signal biologique dans des conditions normales et pathologiques (Parola *et al.*, 1999a).

D'autres 4-hydroxyalcénals identifiés parmi les produits de la LPO (4-hydroxyhénénal, 4-hydroxyocténal, 4-hydroxyundécénal, 4,5-dihydroxydécénal, 4,5-dihydroxydécénal) ainsi que différents aldéhydes α,β -insaturés (2-nonénal, 2,4-décadiénal, 4-oxononénal) possèdent aussi une réactivité biologique élevée, ainsi que le montrent des études récentes (Parola *et al.*, 1999b, Rossi and Dianzani, 2000, Lee *et al.*, 2000, Carvalho *et al.*, 2000). L'HNE étant toutefois l'hydroxyalcénal majoritaire produit par l'oxydation dans différents systèmes biologiques, il est considéré souvent comme étant une molécule modèle du stress oxydant (Esterbauer *et al.*, 1991, Comporti, 1998).

6.1. Le métabolisme du 4-hydroxynonénal

La grande réactivité du HNE est due à la présence de trois groupes fonctionnels : le groupe aldéhyde, la double liaison éthylénique et le groupe hydroxyle :



HNE réagit facilement avec les composés possédant un groupe thiol (GSH, Cys, coenzyme A), par une réaction d'addition de type Michael (Esterbauer *et al.*, 1975a). Il forme également des adduits avec les protéines, par réaction avec les groupes -SH des cystéines, ainsi que par formation de bases de Schiff avec les groupes -NH₂ des acides aminés lysine et histidine. La liaison thio-éther qui lie l'HNE ou d'autres hydroxyalcénals aux protéines présente une stabilité élevée, même en milieu acide et permet la réaction du groupe -CHO avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (Esterbauer *et al.*, 1991). Cependant, l'aldéhyde peut être déplacé de sa liaison à la protéine par un excès de thiol de petite masse moléculaire (Schauenstein *et al.*, 1971, Esterbauer *et al.*, 1991).

La formation des **adduits HNE-protéines** est à l'origine de l'inactivation de certaines activités enzymatiques comme par exemple : les enzymes à cytochrome P450 (Bestervelt *et al.*, 1995, Buko *et al.*, 1999), la cytochrome c oxydase (Chen *et al.*, 1999), l'aldose réductase (Del Corso *et al.*, 1998), l' α -cétoglutarate déshydrogénase et la pyruvate déshydrogénase

(Humphries et Szweda, 1998). La formation des adduits HNE-protéines a été associée avec quelques états pathologiques impliquant un stress oxydant comme l'ischémie (Eaton *et al.*, 1999), les maladies neurodégénératives (Montine *et al.*, 1997) et le cancer (Toyokuni *et al.*, 1994, Okamoto *et al.*, 1994). Dans les LDL, les adduits HNE-protéines constituent un marqueur de l'athérosclérose (Uchida *et al.*, 1994, Salomon *et al.*, 2000). HNE forme aussi des adduits avec l'ADN, en réagissant avec le groupe $-NH_2$ de la désoxyguanosine, ce qui entraîne des lésions de l'ADN et des effets mutagènes (Chung *et al.*, 2000).

Dans les cellules, HNE est rapidement métabolisé en composés moins réactifs, ce qui constitue un mécanisme de défense qui protège les biomolécules contre les modifications induites par la LPO. Au cours des dernières années, plusieurs études ont été consacrées à l'identification des **métabolites du HNE** et ceci dans différents modèles cellulaires (Grune *et al.*, 1991, Hartley *et al.*, 1995, Siems *et al.*, 1997, Srivastava *et al.*, 2000), des fractions subcellulaires (Esterbauer *et al.*, 1985, Ullrich *et al.*, 1994) ou des organes isolés perfusés (Grune *et al.*, 1997, Srivastava *et al.*, 1998).

Trois voies majeures du métabolisme du HNE ont été ainsi identifiées (fig. 9) :

- oxydation en **acide hydroxynonénoïque** (HNA), catalysée par l'aldéhyde déshydrogénase,
- réduction en **1,4-dihydroxynonène** (DHN), catalysée par l'alcool déshydrogénase ou l'aldose réductase,
- conjugaison avec le GSH formant l'**adduit GS-HNE**, catalysée par la GST.

L'existence de ces systèmes enzymatiques rend très efficace le métabolisme du HNE. C'est ainsi que 95% de HNE (100 μ M) ajouté à une suspension d'hépatocytes ont été métabolisés en 3 minutes et moins de 3% seulement du HNE consommé ont été retrouvés sous forme liée aux protéines (Siems *et al.*, 1997). De ce fait, il a même été suggéré que le dosage des métabolites du HNE serait un meilleur indicateur de la production de HNE que la mesure de l'aldéhyde libre et des adduits HNE-protéines. En effet, ces deux dernières sous-estiment de manière importante le niveau de la LPO, à cause du métabolisme efficace du HNE (Srivastava *et al.*, 1998, Alary *et al.*, 1998b).

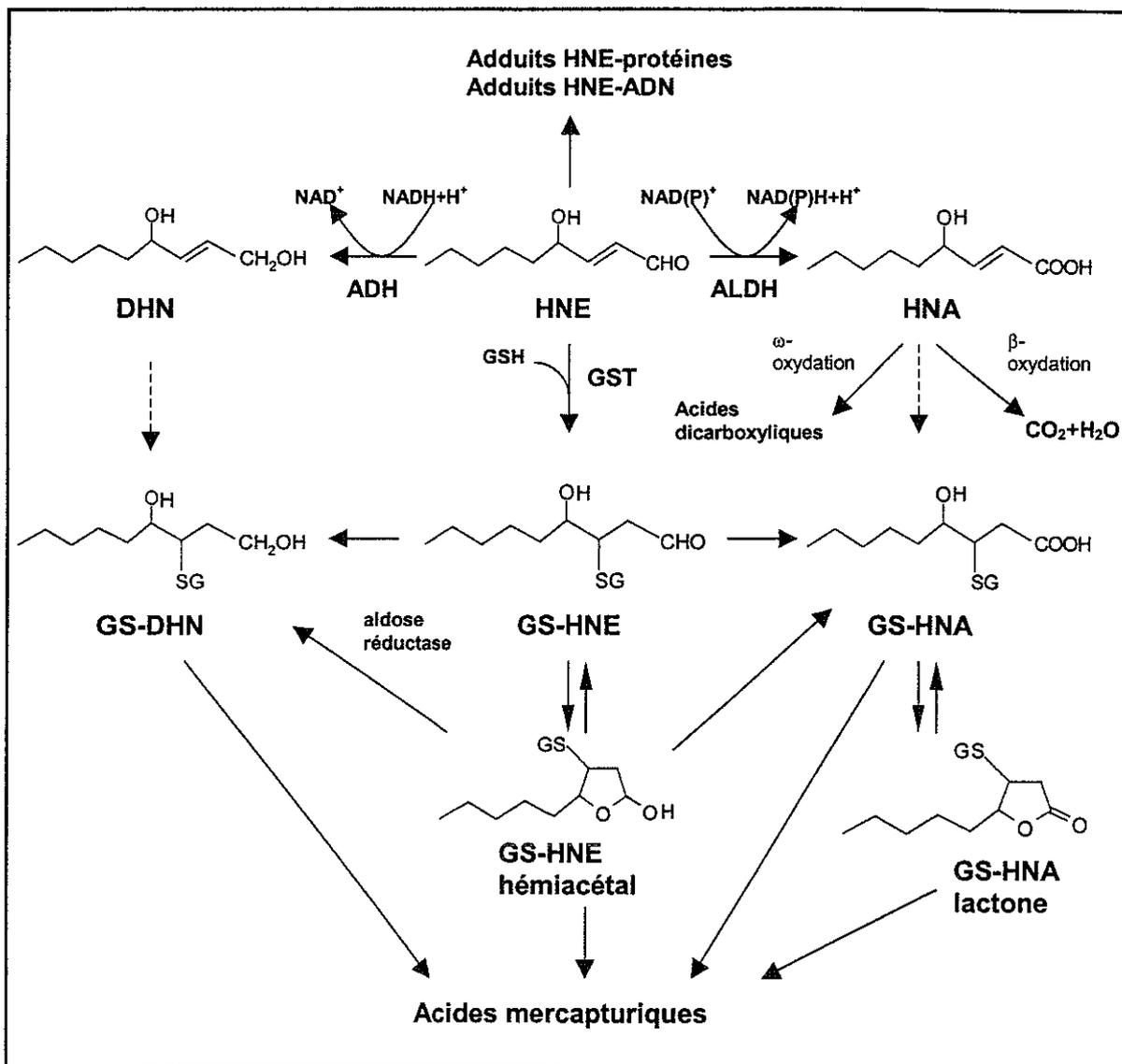


Figure 9 : Voies métaboliques du 4-hydroxynonanal (d'après Boon *et al.*, 1999)

ADH, alcool déshydrogénase ; ALDH, aldéhyde déshydrogénase ; DHN, dihydroxynonène ; GST, glutathion S-transférase ; HNA, acide hydroxynonénoïque ; HNE, 4-hydroxynonanal, -SG, conjugué au GSH.

La conjugaison du HNE avec le GSH semble être la voie majeure de défense antioxydante contre ce produit de la LPO. Plusieurs GST, telles que la GST humaine A4-4 (Hubatsch *et al.*, 1998) la GST 8-8 de rat (Stenberg *et al.*, 1992) et particulièrement la GST humaine atypique 5.8 (Singhal *et al.*, 1994) montrent une affinité élevée vis-à-vis du HNE. Le GS-HNE peut être métabolisé ensuite par des voies oxydative et réductrice, formant les conjugués GS-HNA et GS-DHN. Il a été démontré que le conjugué GS-DHN, identifié dans

différents modèles se forme par réduction du GS-HNE catalysée par l'aldose réductase et non par une réaction directe de conjugaison catalysée par la GST (Srivastava *et al.*, 1998, Laurent *et al.*, 1999). Les conjugués du HNE ou de ses métabolites au GSH sont exportés à l'extérieur des cellules par le même système de transport que pour les autres conjugués au GSH (Dygas *et al.*, 1998, Tjalkens *et al.*, 1999). Ce processus, consommateur d'ATP, est assuré par des glycoprotéines membranaires appartenant à la famille récemment découverte des protéines MRP (multidrug-resistance protein) (Keppler, 1999). L'HNA peut subir à son tour d'autres transformations métaboliques qui font intervenir les équipements enzymatiques de la β -oxydation et de l' ω -oxydation (Guérad *et al.*, 1999).

L'analyse des métabolites du HNE dans l'urine a conduit à la mise en évidence des mercapturates de HNE, DHN, HNA et HNA-lactone (Petras *et al.*, 1995, Alary *et al.*, 1995), et plus récemment des acides dicarboxyliques (Alary *et al.*, 1998a). Parmi les différents **acides mercapturiques** (MA), le DHN-MA est le métabolite final majeur et a été retrouvé en tant que composé physiologique dans l'urine chez le rat et chez l'homme (Alary *et al.*, 1998b).

De façon générale, il est connu que le métabolisme des conjugués du GSH par la voie de l'acide mercapturique implique, à la fois, le clivage du résidu γ -glutamyle par la GGT, l'hydrolyse par une dipeptidase (la CysGly-dipeptidase ou l'aminopeptidase M) et l'acétylation catalysée par une N-acétyltransférase (Curthoys et Hughey, 1979, Commandeur *et al.*, 1995). Les produits formés sont respectivement des conjugués à la CysGly, à la Cys et à la N-acétylcystéine, ce dernier étant appelé couramment acide mercapturique (fig. 10).

Bien que la formation des acides mercapturiques représente généralement une voie de détoxification, car elle conduit à l'élimination du produit initial sous une forme hydrosoluble et souvent moins réactive, elle induit cependant, dans certains cas, une augmentation de la toxicité du conjugué initial. Tel est le cas de plusieurs dérivés halogénés, hydroquinoniques ou phénoliques comme le dichlorovinyle (Elfarra and Anders, 1984), le bromobenzène (Monks *et al.*, 1985), l'hydroquinone (Peters *et al.*, 1997), la bromohydroquinone (Lau and Monks, 1990), les polyphénols (Monks and Lau, 1998), le 17- β -estradiol et ses métabolites catéchols (Butterworth *et al.*, 1997). L'augmentation de la toxicité de ces composés conjugués au GSH est induite au niveau rénal par l'initialisation de la voie de l'acide mercapturique par

la GGT et est supprimée, dans la plupart des cas, par l'acivicine. Ce même phénomène a été observé pour le conjugué au GSH de l'acroléine, un aldéhyde α,β -insaturé (Horvath *et al.*, 1992).

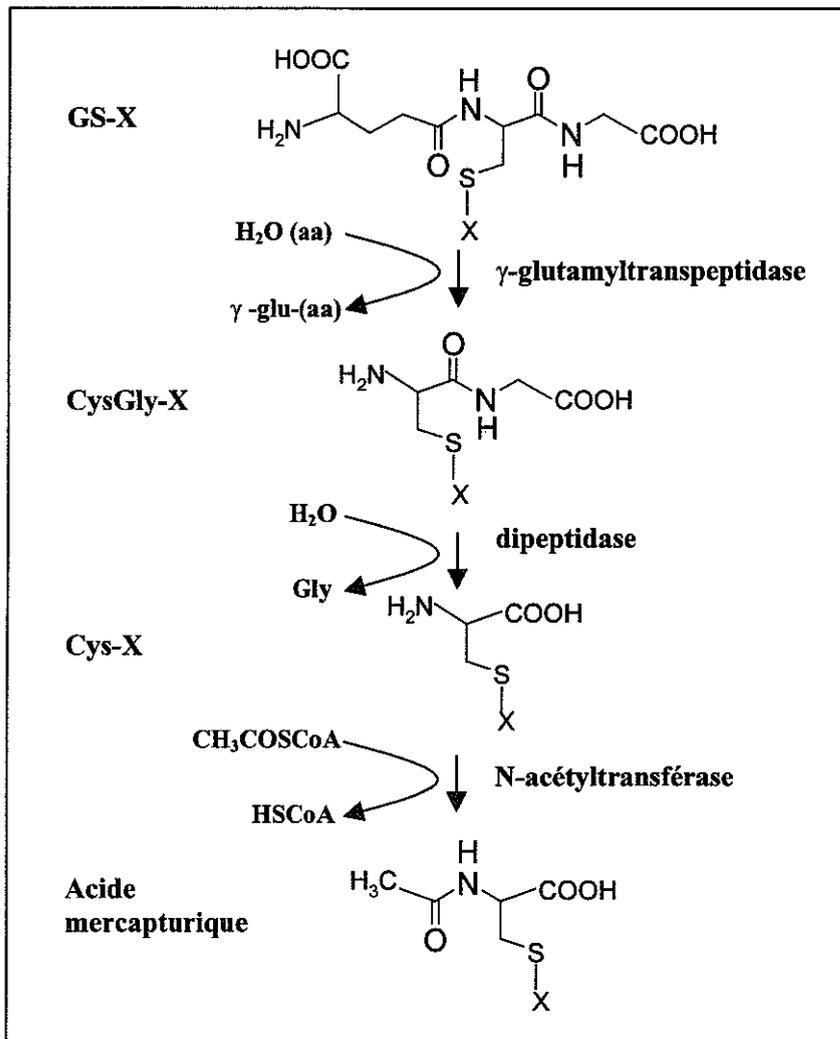


Figure 10 : Schéma général de la biosynthèse des acides mercapturiques.

Bien que les acides mercapturiques du HNE ou de ses métabolites aient été identifiés en tant que métabolites urinaires finaux, le métabolisme du GS-HNE par les enzymes de la voie des acides mercapturiques, et en particulier par la GGT, n'a pas été étudié. Dans une seule étude récente (Boon *et al.*, 1999) la GGT a été uniquement utilisée pour confirmer la structure du conjugué GS-HNE formé par réaction spontanée ou catalysée par la GST.

HYPOTHESES ET
OBJECTIFS

Le rôle majeur du **GSH** dans la défense antioxydante, aussi bien en tant que piègeur direct d'espèces réactives, que par sa fonction de cofacteur enzymatique, est bien connu. De même, la **GGT** est généralement considérée comme faisant partie des systèmes de défense antioxydante. En effet, de nombreuses études ont établi que l'augmentation du GSH intracellulaire suite à l'action de la GGT représente un mécanisme de protection des cellules contre le stress oxydant.

Cependant, au cours des dernières années, quelques études ont montré que le métabolisme du GSH par la GGT en présence de fer peut induire un processus pro-oxydant, qui a été mis en évidence par le dommage oxydatif provoqué aux biomolécules. Il s'agit dans la plupart des cas de conséquences sur la peroxydation lipidique, mais également sur la mutagenèse et la thiolation des protéines. Néanmoins, le rôle pro-oxydant de la GGT a fait l'objet de relativement peu d'études et sa connaissance est encore très imparfaite.

En plus de la GGT, une autre enzyme, la **GGT-rel**, est capable de cliver le GSH. Le rôle physiologique de cette enzyme est inconnu et une éventuelle fonction pro-oxydante de la GGT-rel n'a jamais été mise en évidence.

Lors de la peroxydation lipidique, en plus du MDA, le marqueur le plus souvent utilisé, il se forme d'autres produits réactifs, en particulier le HNE. Ce dernier est détoxifié par plusieurs voies métaboliques, dont celle de la conjugaison au GSH semble avoir une fonction antioxydante majeure. La GGT métabolise généralement les conjugués du GSH, étant la première enzyme à intervenir dans la voie de synthèse des acides mercapturiques. Le HNE-acide mercapturique a été identifié en tant que métabolite final du GS-HNE, mais le métabolisme du GS-HNE par la GGT et les propriétés des métabolites résultants n'ont jamais été étudiés.

Le but général de notre travail est de mieux comprendre l'implication de la GGT dans le stress oxydant et de vérifier si la GGT-rel possède également un effet pro-oxydant. Nous nous basons sur l'**hypothèse** que la GGT et éventuellement la GGT-rel jouent un rôle pro-oxydant au cours du métabolisme du glutathion en présence de fer et que cela peut

conduire à un état de stress oxydant et donc par conséquent à des effets sur les constituants et les fonctions cellulaires.

Nous nous sommes donc proposé comme **objectifs** principaux :

- **d'étudier la relation entre le métabolisme du GSH par la GGT ainsi que par la GGT-rel et la production d'espèces réactives de l'oxygène ;**
- **d'identifier les produits issus de la peroxydation lipidique induite par le système GGT(GGT-rel)/GSH/Fe³⁺ ;**
- **d'étudier le rôle potentiel de la GGT et de la GGT-rel dans le métabolisme de l'adduit glutathion-4-hydroxynonéal et ses conséquences éventuelles au niveau cellulaire.**

Un problème majeur lors des études du stress oxydant *in vitro* est le choix d'un modèle approprié, ainsi que des paramètres à mesurer et des méthodes de dosage correspondantes. Notre travail est basé principalement sur l'utilisation de modèles cellulaires différant seulement par la présence ou non de l'expression de la GGT ou de la GGT-rel. L'emploi de ces couples de cellules GGT ou GGT-rel positives ou négatives, permet en effet d'apprécier la contribution directe de la GGT ou de la GGT-rel aux variations des paramètres du stress oxydant mesurés.

La première partie de ce travail vise l'étude du métabolisme du GSH par la GGT et la GGT-rel, plus précisément la formation de CysGly, suivie en CLHP. La production d'ERO qui en découle en présence de fer et la dépendance de celle-ci vis-à-vis de l'activité GGT (GGT-rel) devrait être démontrée par un dosage global des espèces réactives en spectrofluorimétrie.

La deuxième partie de notre étude se propose d'analyser dans un modèle *in vitro*, à l'aide des techniques de spectrométrie de masse, les produits aldéhydiques formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés sous l'action du système oxydant GGT/GSH/Fe³⁺. En effet, mis à part le MDA, aucun autre produit n'a été identifié dans les oxydations auxquelles participe la GGT. Le but est de mieux comprendre l'implication de

la GGT (et éventuellement de la GGT-rel) dans la peroxydation lipidique, décrite dans la littérature et, selon la nature des composés formés, d'envisager l'étude des effets toxiques éventuels au niveau cellulaire.

Enfin, la troisième partie de notre travail est consacrée à l'étude du rôle que la GGT et la GGT-rel peuvent jouer dans le métabolisme du conjugué glutathion-4-hydroxynonéol, dans la voie de l'acide mercapturique. La CLHP et la spectrométrie de masse sont envisagées comme outils d'analyse des produits de cette réaction enzymatique en utilisant comme substrat le conjugué GS-HNE synthétisé chimiquement. De plus, la voie de la biosynthèse de l'acide mercapturique pouvant conduire, dans certains cas, à une augmentation de la toxicité, nous nous proposons d'étudier les conséquences éventuelles de ce métabolisme par la GGT et la GGT-rel sur la cytotoxicité dans les modèles cellulaires évoqués ci-dessus.

Les résultats répondant à chaque objectif fixé font partie de trois chapitres. Ces derniers comprennent à chaque fois les publications issues de ce travail qui rassemblent une partie importante de nos résultats ainsi que la discussion de ceux-ci. Cependant, un certain nombre de résultats complémentaires, non-publiés, ou qui ont servi aux mises au point des techniques sont présentés également dans les chapitres correspondants.

RESULTATS ET
DISCUSSION

CHAPITRE I

Production d'espèces réactives de l'oxygène au cours du métabolisme du glutathion par la GGT et la GGT-rel

Le rôle pro-oxydant de la GGT au cours du catabolisme du GSH en présence de fer ou de cuivre a été suggéré par plusieurs études montrant un lien entre ce processus métabolique et les conséquences sur le dommage oxydatif des biomolécules dans différents modèles. Bien que le mécanisme exact de formation et l'identité des espèces réactives responsables de cet effet ne soient pas connus avec précision, un travail récent réalisé au laboratoire soutient l'hypothèse de la production d'ERO liée à l'activité de la GGT (Drozd *et al.*, 1998). Les auteurs ont montré que le métabolisme du GSH par la GGT en présence de transferrine en tant que source de fer génère des ERO, dont la mesure repose sur la chimiluminescence du luminol. Dans ces conditions, la production d'ERO a été corrélée à la formation de CysGly à partir du GSH en présence de GGT purifiée ou de cellules exprimant la GGT.

Si l'effet pro-oxydant de la GGT a été décrit dans plusieurs études, aucune donnée de la littérature ne suggère un effet similaire dans le cas de la GGT-rel. Cette enzyme, distincte de la GGT est également capable de catalyser le clivage du GSH (Heisterkamp *et al.*, 1991). A partir de cette analogie, nous avons supposé que la GGT-rel pourrait aussi avoir un effet pro-oxydant lors du métabolisme du GSH en présence de fer.

Nous nous sommes proposé d'étudier d'une part la relation entre le métabolisme du GSH par la GGT et la production d'ERO dans un modèle cellulaire permettant de mettre en évidence de façon directe le rôle de la GGT. D'autre part, nous avons tenu à vérifier si un effet pro-oxydant similaire à la GGT peut être mis en évidence dans le cas de la GGT-rel.

1.1. Métabolisme du glutathion et production d'espèces réactives de l'oxygène par la GGT

Pour répondre au premier objectif cité ci-dessus, nous nous sommes proposé d'approfondir l'étude du rôle pro-oxydant de la GGT dans un modèle cellulaire afin de mieux connaître les conditions optimales de production d'ERO et d'améliorer sa quantification. Pour ce faire, deux lignées cellulaires issues de fibroblastes de Hamster Chinois (V79) et

précédemment établies au laboratoire : V79GGT (cellules V79 transfectées par l'ADNc codant la GGT humaine) et V79Cl (cellules V79 transfectées uniquement par le vecteur) ont été choisies comme modèle (Visvikis *et al.*, 1991). Le couple des cellules V79GGT/V79Cl semble être un modèle parfaitement adapté à cette étude, car la seule différence notable entre les activités des enzymes liées au métabolisme du GSH porte sur la GGT (Parmentier, 1998).

Le métabolisme du GSH par la GGT dans le modèle cellulaire choisi a été déjà étudié au laboratoire (Parmentier, 1998). Au cours de l'incubation des cellules V79GGT en présence de GSH à la concentration de 2,5 mM nous avons également observé un métabolisme extracellulaire rapide du GSH accompagné d'une formation équivalente de CysGly (fig. 11) (Accaoui *et al.*, 2000). La concentration de ce dernier métabolite augmente également à l'intérieur des cellules ($5,1 \pm 0,5$ nmoles/mg protéines) contrairement aux cellules cultivées en l'absence de GSH surajouté, chez lesquelles la CysGly n'est pas détectée (Parmentier, 1998). Enfin, dans les mêmes conditions d'incubation (2,5 mM GSH), la CysGly n'est pas détectée ni dans le milieu d'incubation ni dans les cellules V79Cl.

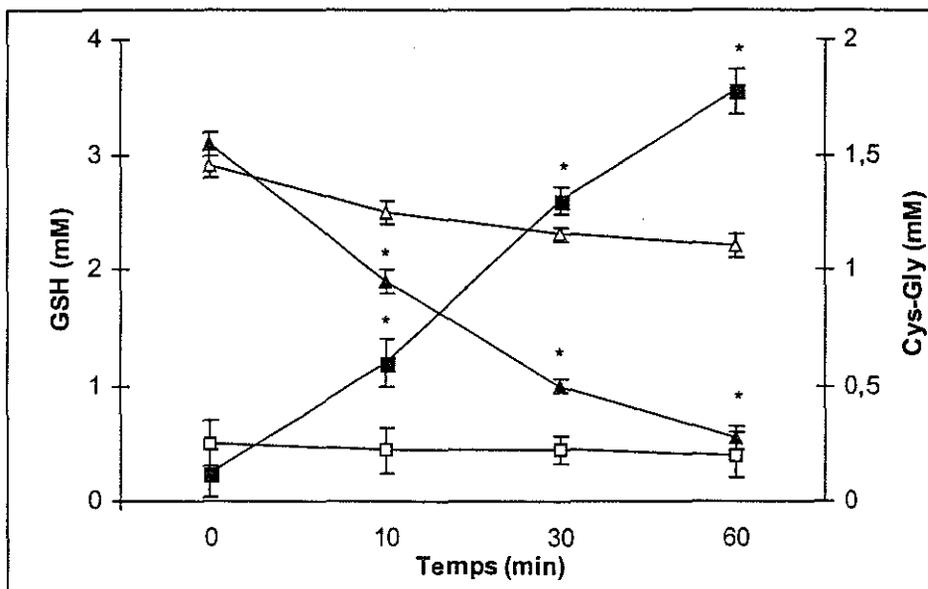
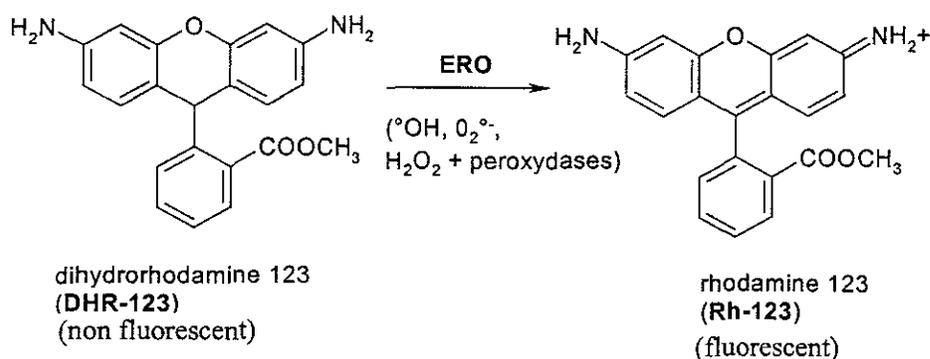


Figure 11 : Métabolisme extracellulaire du GSH et formation de CysGly par les cellules V79GGT et V79Cl.

Métabolisme du GSH dans les cellules V79GGT (▲) et V79Cl (△) ; formation de CysGly dans les cellules V79GGT (■) et V79Cl (□). Les cellules ont été incubées en présence de 2,5 mM GSH et 25 mM glygly. * $p < 0,05$ par rapport au temps 0.

Puisque la production d'ERO est liée à la formation de CysGly à partir du GSH, nous avons tenu à déterminer l'activité de la GGT vis-à-vis du GSH. L'activité exprimée en nmoles de CysGly formée/mg protéines/min permet en effet une comparaison plus juste entre les niveaux des activités de type GGT présentes dans les lignées cellulaires exprimant soit la GGT, soit la GGT-rel. En présence de 2,5 mM GSH et de 25 mM glygly (glycylglycine, substrat accepteur), les cellules V79GGT possèdent une activité de $243 \pm 3,90$ mU (1 mU = 1 nmole CysGly/mg protéines/min). Cette méthode d'estimation s'est imposée également par le fait que la GGT-rel ne reconnaît pas les substrats synthétiques (tels que la γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide) couramment utilisés pour la mesure de l'activité de la GGT.

Les méthodes de mesure des ERO reposent essentiellement sur la résonance paramagnétique électronique (RPE), la chimiluminescence et la fluorescence. La RPE n'étant pas disponible et la chimiluminescence étant limitée à des incubations de courte durée, nous avons opté pour une méthode basée sur une mesure de fluorescence. L'utilisation d'une sonde qui devient fluorescente suite à l'interaction avec les ERO semble la méthode la mieux adaptée. En effet, l'accumulation de la sonde oxydée est directement liée à la production d'ERO initiée par la CysGly formée sous l'influence de la GGT au dépens du GSH et permet une mesure cinétique pendant une assez longue période d'incubation. L'identité des espèces réactives produites au cours du métabolisme du GSH par la GGT n'étant pas connue et afin de piéger toutes les ERO produites conformément au mécanisme proposé (voir introduction, fig. 6 et 7) notre choix s'est porté sur la dihydrorhodamine 123 (DHR-123). Cette sonde est capable de former de la rhodamine 123 (Rh-123) fluorescente par réaction avec différentes ERO : HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 en présence de peroxydases (Royall and Ischiropoulos, 1993 ; Parmentier *et al.*, 1999) :



Le choix des conditions d'incubation des cellules V79GGT et V79Cl pour la mesure des ERO a été fait à partir des données de la littérature (voir introduction, tableau I). En fait, les conditions sont très variées suivant les auteurs, aussi bien en ce qui concerne la source d'enzyme que la composition du milieu d'incubation. Ainsi, les concentrations en GSH s'échelonnent de 100 μM à 2,5 mM et celles du Fe^{3+} de 0 à 150 μM . Le fer est utilisé sous forme de complexe, le plus souvent avec de l'EDTA (rapport des concentrations Fe^{3+} : EDTA 1 : 1,1) ou de l'ADP (rapport des concentrations Fe^{3+} : ADP 1 : 10), mais la transferrine peut être également utilisée en tant que source physiologique de fer (Stark *et al.*, 1994). Enfin, un substrat accepteur pour stimuler la réaction de transpeptidation (glygly) est ajouté systématiquement, dans un rapport constant de 10 fois la concentration en GSH.

1.1.1. Résultats

Afin de créer les conditions optimales pour une production élevée d'ERO, nous avons d'abord incubé les cellules exprimant ou non la GGT en présence de concentrations relativement élevées en GSH et Fe^{3+} . Dans la suite du travail, les conditions ont été toutefois modifiées, afin de mieux discerner la contribution de chaque facteur dans ce processus. L'incubation des cellules V79GGT et V79Cl dans les conditions suivantes : GSH 2,5 mM, glygly 25 mM, Fe^{3+} -EDTA 150 :165 μM dans un milieu simple (PBS pH 7,4) et en présence de 25 μM de DHR-123. Dans ces conditions, la production d'ERO (mesurée sous forme de Rh-123 oxydée) dans le milieu d'incubation des cellules V79GGT est linéaire en fonction du temps. Il en est de même pour les cellules V79Cl, mais à un niveau considérablement plus faible (fig.12).

La reproduction de ces expériences dans le milieu de culture RPMI (exempt de serum fœtal de veau), s'est montrée décevante. Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les lignées V79GGT et V79Cl, bien que la production d'ERO soit, dans ces conditions, beaucoup plus élevée que lors des incubations dans du PBS. Ceci résulte vraisemblablement d'une interférence du milieu RPMI dans le processus d'oxydation de la sonde (tableau III) qu'il est difficile de maîtriser et qui de plus, par son niveau élevé, peut masquer l'oxydation due à la GGT.

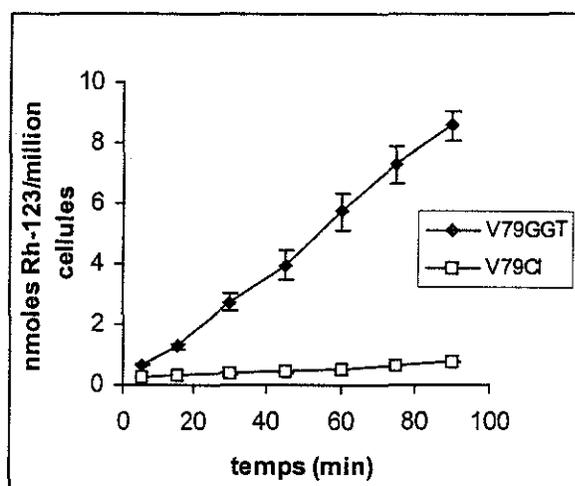


Figure 12 : Cinétique de la production d'ERO par les cellules V79GGT et V79Cl en présence de GSH/Fe³⁺-EDTA

Les cellules ont été incubées en présence de 2,5 mM GSH, 25 mM glygly, 150 :165 μM Fe³⁺-EDTA et 25 μM DHR 123 dans du PBS. Significativité statistique des différences V79GGT/V79Cl : $p < 0.01$ pour tous les temps examinés.

Tableau III : Influence de la nature du milieu sur la production d'ERO par les cellules V79GGT et V79Cl.

nmoles Rh-123/million cellules		
Milieu	V79GGT	V79Cl
PBS	5,7 \pm 0,6	0,5 \pm 0,01
RPMI	21,9 \pm 0,9	19,3 \pm 1,1

Les cellules ont été incubées dans du PBS ou dans du milieu de culture RPMI exempt de serum fœtal de veau en présence de 2,5 mM GSH, 25 mM glygly, 150 :165 μM Fe³⁺-EDTA, 25 μM DHR. Temps d'incubation : 60 min .

En effet, l'incubation du milieu RPMI contenant 25 μM DHR-123 en présence de GSH/Fe³⁺-EDTA (conditions expérimentales identiques à celles décrites ci-dessus) mais en l'absence de cellules, conduit à une oxydation importante de la sonde (16,6 \pm 0,2 nmoles de Rh-123) (tableau IV) par rapport aux valeurs obtenues en présence de cellules V79GGT ou V79Cl (tableau III). Ces conditions ne permettent donc pas de quantifier l'oxydation induite par la GGT. En revanche, le remplacement de l'EDTA par de l'ADP comme agent complexant du fer, conduit à une très forte diminution de l'oxydation de la sonde (tableau IV).

Tableau IV : Influence de l'agent chélateur du Fe³⁺ sur la mesure d'ERO dans le milieu de culture.

Couple fer-ligand	nmoles Rh-123/essai
Fe ³⁺ -EDTA 150 :165 µM	16,6 ± 0,2
Fe ³⁺ -ADP 100 :1000 µM	1,4 ± 0,01
—	0,5 ± 0,01

Milieu : RPMI surchargé par 2,5 mM GSH, 150 : 165 µM Fe³⁺-EDTA ou 0,1 : 1 mM Fe³⁺-ADP, 25 µM DHR-123 ; temps d'incubation : 60 min.

L'importance des chélateurs du fer dans la formation des espèces réactives par différents systèmes, ainsi que dans l'induction de dommages oxydatifs à des biomolécules, a été signalée par plusieurs auteurs (Burkitt and Gilbert, 1991 ; Puntarulo and Cederbaum, 1988). Il est connu par exemple que le Fe³⁺ complexé par l'ADP possède une capacité moindre que le Fe³⁺-EDTA dans la catalyse de la réaction Haber-Weiss (Sutton, 1985). Dans notre système, l'utilisation de l'ADP comme agent complexant du fer diminue les interférences du milieu RPMI dans le processus d'oxydation et permet de détecter la production d'ERO dépendante de la GGT. La cinétique de production d'ERO dans les deux lignées cellulaires, mesurée dans le milieu RPMI en présence de Fe³⁺-ADP, devient ainsi comparable à celle mesurée dans le milieu PBS en présence de Fe³⁺-EDTA (fig. 13).

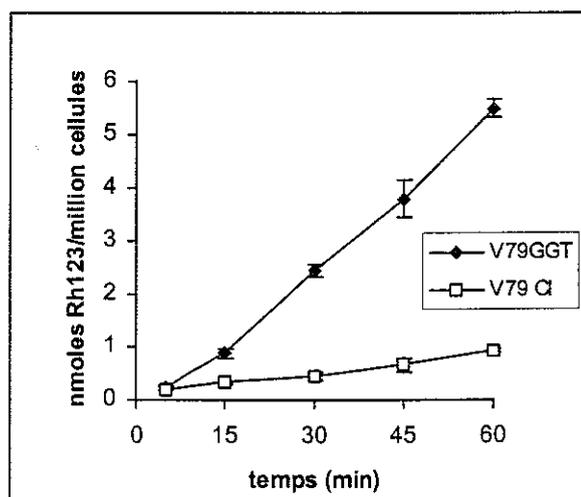


Figure 13 : Cinétique de la production d'ERO par les cellules V79GGT et V79Cl en présence de GSH/Fe³⁺-ADP.

Les cellules ont été incubées en présence de 2,5 mM GSH, 25 mM glygly, 10 :100 µM Fe³⁺-ADP et 25 µM DHR-123. Milieu d'incubation : RPMI exempt de serum foetal de veau. Significativité statistique des différences entre V79GGT et V79Cl : N.S. pour le temps 5 min, p < 0,05 pour les temps 15, 30 et 45 min, p < 0,001 pour le temps 60 min.

Bien que le fer soit un catalyseur nécessaire dans le processus d'auto-oxydation des thiols générant des ERO (Saez *et al.*, 1982), sa concentration ne semble pas jouer un rôle très spécifique, car des concentrations élevées en Fe^{3+} augmentent l'auto-oxydation non seulement de la CysGly, mais également du GSH, son précurseur. Ainsi, l'augmentation de la concentration du Fe^{3+} de 10 μM à 100 μM (Fe^{3+} lié a l'ADP, rapport constant 1 : 10), augmente le niveau de l'oxydation de la DHR-123 par un facteur d'environ 4 aussi bien dans les cellules V79GGT que V79Cl. Il faut cependant remarquer que ceci ne modifie pratiquement pas le rapport de production de Rh-123 entre les deux lignées cellulaires (fig. 14). Il en est de même pour le fer sous forme de transferrine, l'augmentation de sa concentration de 80 μM à 150 μM n'entraîne pas d'augmentation spécifique du niveau d'oxydation de la DHR-123 (résultats non-illustrés).

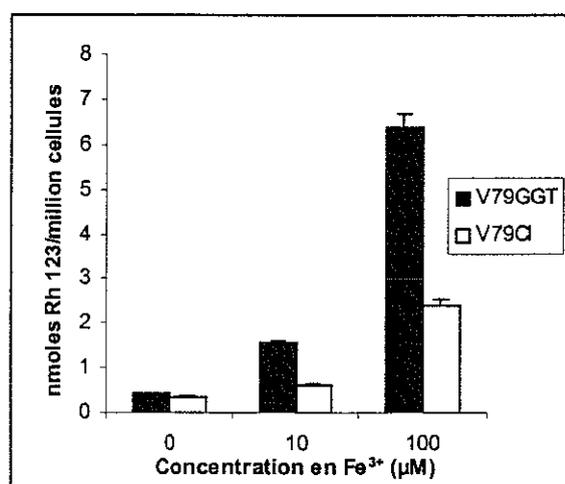


Figure 14 : Production des ERO par les cellules V79GGT et V79Cl en fonction de la concentration en Fe^{3+} .

Les cellules ont été incubées en présence de 1 mM GSH, Fe^{3+} -ADP 10 : 100 μM ou 100 : 1000 μM et 25 μM DHR-123 dans du milieu RPMI exempt de serum de veau foetal. Les rapports entre la production d'ERO V79GGT/V79Cl : 2,55 pour 10 μM Fe^{3+} ; 2,66 pour Fe^{3+} 100 μM . Significativité statistique des différences entre les deux lignées : N.S en l'absence de Fe^{3+} , $p < 0,001$ pour les concentration de 10 et 100 μM .

Quant au GSH, sa concentration représente un facteur important pour la production d'ERO liée à la GGT, comme l'illustre la figure 15 A. De plus, l'augmentation de sa concentration de 1 à 2,5 mM permet de détecter une différence significative entre les deux lignées cellulaires, même en absence de toute source de Fe^{3+} ajoutée au milieu de culture (fig. 15 B). Ceci est en accord avec les données rapportées par Dominici *et al.* (1999) montrant que les traces de fer toujours présentes dans les milieux de culture sont suffisantes pour déclencher le processus d'oxydation dépendant de la GGT.

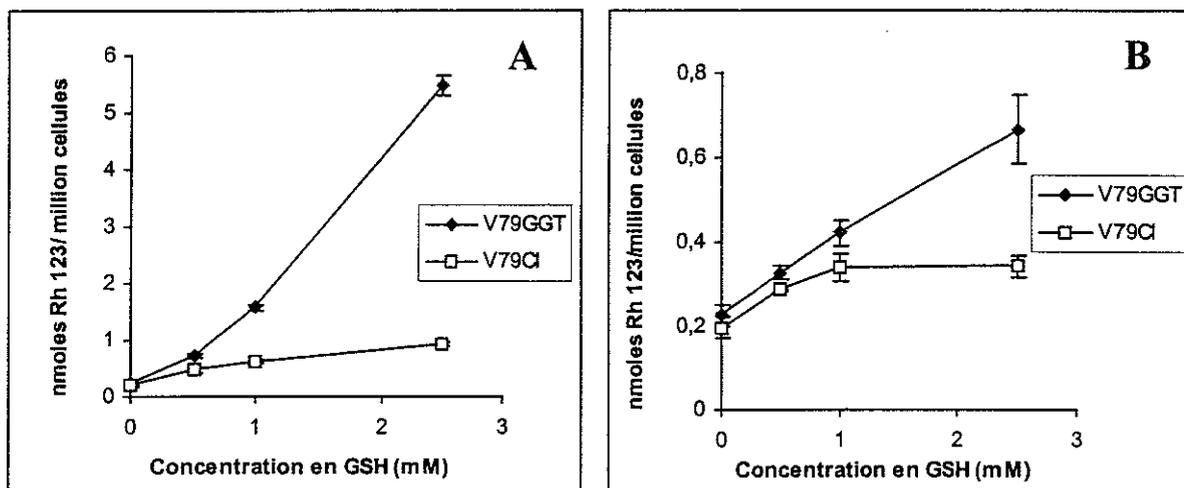


Figure 15 : Production d'ERO par les cellules V79GGT et V79Cl en fonction de la concentration en GSH.

Les cellules ont été incubées dans du milieu RPMI exempt de serum de veau fœtal en présence de 0,5 à 2 mM GSH et 10 :100 $\mu\text{M Fe}^{3+}$ -ADP (A) ou en l'absence de toute source de fer (B) (25 $\mu\text{M DHR-123}$).

Sachant que la DHR-123 convient aussi bien pour la quantification des ERO intracellulaires qu'extracellulaires (Ischiropoulos *et al.*, 1999), nous avons mesuré les ERO intracellulaires produites lors du même processus métabolique. Nos résultats montrent que la concentration de Rh-123 à l'intérieur des cellules V79GGT incubées pendant 60 min en présence de 2,5 mM GSH, 25 mM glygly et 25 $\mu\text{M DHR-123}$ ($0,035 \pm 0,002$ nmole Rh-123/million cellules) est plus élevée que dans les cellules V79Cl ($0,016 \pm 0,001$ nmole Rh-123/million cellules). Cependant, le fait que la concentration extracellulaire des ERO soit beaucoup plus importante que celle détectée à l'intérieur des cellules rend difficile l'interprétation de ces résultats. En effet, on ne peut pas écarter l'hypothèse d'une pénétration à l'intérieur des cellules de Rh-123, molécule lipophile, mais provenant de l'oxydation extracellulaire de DHR-123. Ce problème ne peut pas être exclu même lorsque les cellules sont préalablement incubées pendant 60 min en présence de DHR-123 avant l'addition du système d'oxydation. Toutefois, les valeurs absolues du produit d'oxydation étant beaucoup plus importantes dans le milieu extracellulaire qu'intracellulaire, ceci nous a amenée à conclure que le processus d'oxydation dépendant de la GGT est essentiellement extracellulaire et nous avons retenu sa mesure comme technique de routine pour l'évaluation des ERO dans ce modèle cellulaire. Sans jamais exclure la possibilité d'une production intracellulaire des ERO suite à l'action de la GGT, cette conclusion est d'ailleurs en accord

avec la localisation membranaire de la GGT dont le site actif est orienté vers l'extérieur de la cellule, ainsi qu'avec l'accumulation de CysGly plus importante à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule comme cela a été déjà rapporté (Parmentier 1998, Drozd *et al.*, 1998).

Il faut noter qu'une mesure globale de la production d'ERO extra et intracellulaires peut être également réalisée à partir des cellules récoltées dans leur milieu puis centrifugées. Après la remise en suspension des culots cellulaires dans du PBS et addition du système d'oxydation (2,5 mM GSH, 25 mM glygly, 150 : 165 μM Fe^{3+} -EDTA) et de 250 μM DHR-123, nous avons mesuré la production de Rh-123 en fonction du temps. Dans ce cas, l'utilisation du PBS élimine le problème de l'agent complexant du fer signalé précédemment. Les résultats (fig. 16) font ressortir que dans ces conditions la production d'ERO est beaucoup plus élevée que dans les cellules en culture. Aucune explication de ce phénomène n'est actuellement satisfaisante.

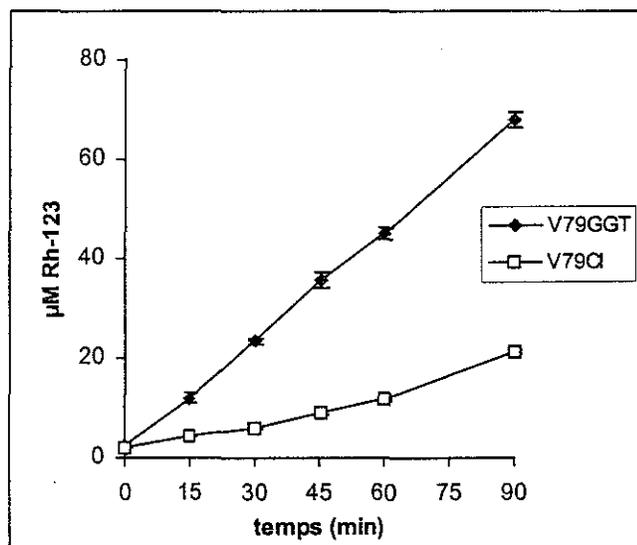


Figure 16 : Cinétique de la production d'ERO par les cellules V79GGT et V79Cl (culots cellulaires).

Les culots cellulaires contenant 10^6 cellules/ml ont été incubés en présence de 2,5 mM GSH, 25 mM glygly, 150 :165 μM Fe^{3+} -EDTA et 250 μM DHR-123.

Il ressort de nos expérimentations que les conditions utilisées pour la mise en évidence de la production d'ERO par le système GGT/GSH/ Fe^{3+} sont des facteurs importants pour l'intensité de ce processus ainsi que pour sa quantification. On note en particulier l'importance du choix de l'agent complexant du Fe^{3+} suivant la nature du milieu d'incubation

ainsi que de la concentration en GSH. Cependant, quelles que soient les conditions utilisées, nos résultats confirment pleinement l'hypothèse du rôle pro-oxydant de la GGT lié au métabolisme du GSH.

Il est important de préciser que la production d'ERO dépendante de la GGT est basée sur la formation de CysGly (métabolite responsable, par la suite, de l'initialisation d'un processus conduisant aux espèces réactives) et non sur une action pro-oxydante directe de l'enzyme. En effet, la mesure des ERO produites lors d'incubation de 3 thiols (GSH, CysGly et Cys) en présence de Fe^{3+} montre que les métabolites du GSH, à savoir la Cys et la CysGly sont beaucoup plus réactifs que le GSH lui-même (fig. 17).

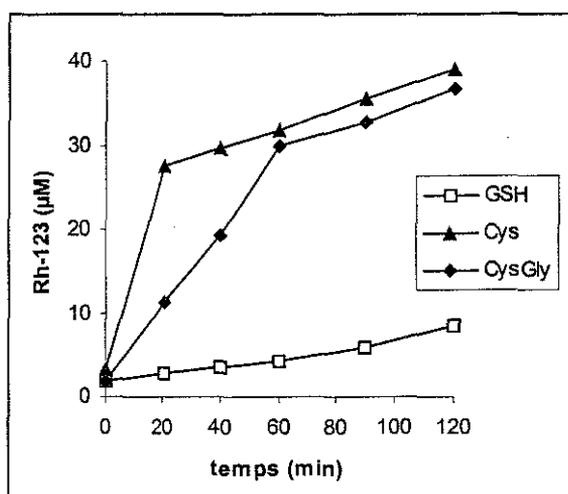


Figure 17 : Production d'ERO par le système thiol/ Fe^{3+} .

Conditions d'incubation : 400 μ M thiol (GSH, CysGly, Cys), 150 : 165 μ M Fe^{3+} -EDTA, 250 μ M DHR-123 dans du PBS pH 7,4. Une valeur représentative sur 3 est montrée.

L'étude de la production d'ERO dans différentes conditions nous a permis de choisir par la suite les concentrations des composants du système d'oxydation en fonction de l'application biologique visée. En effet, il est connu que la teneur en ERO est un facteur décisif pour les conséquences au niveau cellulaire : modulation des différentes fonctions par un processus de signalisation redox (concentrations réduites en ERO) ou dommage oxydatif des biomolécules (concentrations en ERO élevées) (Remacle *et al.*, 1995, Sen, 1998. Nous avons retenu les concentrations suivantes : GSH 0,5 - 2,5 mM (\pm Fe^{3+} -ADP 10 :100 μ M), conditions d'oxydation "douces", adéquates pour des études sur l'activation des facteurs de transcription ; GSH 2,5 mM + Fe^{3+} 150 μ M complexé par EDTA (165 μ M) ou ADP (1,5 mM),

conduisant à des processus d'oxydation plus intenses, pour l'étude des conséquences sur la peroxydation lipidique.

Enfin, après avoir démontré le lien entre le catabolisme du GSH dans le milieu extracellulaire des cellules V79GGT et la production d'ERO qui en résulte, il a été possible d'établir les conditions appropriées à la réalisation d'une **étude portant sur l'influence du catabolisme du GSH par la GGT sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B**. Une partie des résultats que nous venons d'évoquer représente notre contribution à ce travail ; le texte intégral est présenté en annexe n°1 du manuscrit :

M.-J. Accaoui, M. Enoiu , M. Mergny, C. Masson, S. Dominici, M. Wellman and A. Visvikis.
Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent glutathione catabolism results in activation of NF- κ B
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, **276**, 1062-1067.

1.2. Métabolisme du glutathion et production d'espèces réactives de l'oxygène par la GGT-rel

Afin de vérifier l'hypothèse d'un rôle pro-oxydant possible de la GGT-rel, nous avons suivi les mêmes démarches expérimentales que précédemment en ce qui concerne le métabolisme du GSH et la production des ERO.

Le modèle d'étude utilisé consiste dans un couple de cellules fibroblastiques exprimant ou non la GGT-rel : NIH3T3/GGT-rel, lignée cellulaire NIH3T3 transfectée par l'ADNc de la GGT-rel et la lignée NIH3T3 transfectée « à blanc » (plasmide sans insert).

Nous avons tout d'abord étudié le métabolisme du GSH par la GGT-rel car, si des études précédentes ont montré la transformation du leucotriène C4 en leucotriène D4 et la consommation du GSH sous la dépendance de la GGT-rel (Heisterkamp *et al.*, 1991), la formation de CysGly en tant que métabolite du GSH n'a jamais été démontrée. Nous avons mis en évidence par une technique de dosage des thiols en CLHP, que le métabolisme du GSH par la GGT-rel conduit à la **formation de CysGly** dépendante du temps d'incubation uniquement dans les cellules NIH3T3/GGT-rel. Cette constatation nous a permis ensuite

d'avancer l'hypothèse d'une production d'ERO *via* le même mécanisme que celui proposé pour la GGT.

L'évaluation de la production d'ERO dépendante de la GGT-rel a été faite selon le protocole que nous avons établi précédemment lors des études sur le modèle cellulaire V79GGT/V79Cl. Dans ces conditions, nous avons également observé une **production d'ERO** beaucoup plus élevée dans les cellules NIH3T3/GGT-rel que dans les cellules NIH3T3 dépourvues de toute activité GGT (et GGT-rel), aussi bien avec des cellules en culture que des culots cellulaires. De plus, en utilisant une méthode spécifique de mesure du radical HO[•] par le dosage CLHP des métabolites hydroxylés de l'acide salicylique, nous avons mis en évidence que le radical HO[•], espèce hautement réactive, est produit au cours du métabolisme du GSH par la GGT-rel (fig 18). La formation du radical HO[•] a été d'ailleurs signalée parmi les espèces réactives générées au cours de l'auto-oxydation des thiols (Nappi *et al.*, 1997), mais jamais démontrée de manière directe dans les oxydations induites par les enzymes GGT ou GGT-rel. La formation de HO[•] pourrait expliquer non seulement les conséquences que l'on connaît sur la peroxydation des lipides, mais également l'inefficacité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, peroxydase) dans l'inhibition de la peroxydation lipidique « GSH/GGT-dépendante » constatée par plusieurs auteurs (Stark *et al.*, 1993 ; Glass and Stark, 1997).

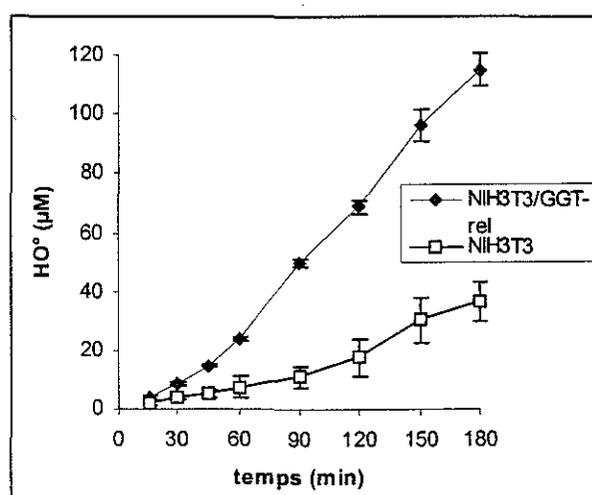


Figure 18 : Cinétique de la production de HO[•] par les cellules NIH3T3/GGT-rel et NIH3T3.

Les suspensions cellulaires contenant 10⁶ cellules/ml ont été incubées en présence de 2,5 mM GSH, 25 mM glygly, 150:165 µM Fe³⁺-EDTA et 250 µM DHR-123. Significativité statistique des différences entre NIH3T3/GGT-rel et NIH3T3 : p<0,05 pour les temps 15 à 60 min, p<0,01 pour les temps 90 à 180 min.

De manière similaire au mécanisme décrit pour la GGT, qui implique la réduction du Fe^{3+} pour l'initiation de l'oxydation des lipides (Paolicchi *et al.*, 1999), nous avons démontré à l'aide du modèle cellulaire NIH3T3GGT-rel/NIH3T3, qu'un processus de **réduction du Fe^{3+}** (mesurée par la réaction spécifique du Fe^{2+} avec la bathophénanthroline) est également associé au stress oxydant induit par la GGT-rel. En outre, l'évaluation de la **peroxydation lipidique** par la mesure CLHP du MDA libéré dans le milieu extracellulaire des cellules incubées en présence de GSH/ Fe^{3+} (2,5 mM GSH, 25 mM glygly et 150 : 165 μM Fe^{3+} -EDTA) a montré que le processus pro-oxydant initié par la GGT-rel peut induire un dommage oxydatif au niveau des lipides membranaires.

Les résultats que nous venons de résumer, ainsi que la discussion de ceux-ci sont présentés en détail dans notre *publication n° 1*, dont le texte est joint ci-après. Dans l'ensemble, **nos résultats confirment l'hypothèse de départ concernant une implication possible de la GGT-rel dans les phénomènes liés au stress oxydant, de façon similaire à la GGT.**

M. Enoiu, H. Aberkane, J.-F. Salazar, P. Leroy, J. Groffen, G. Siest and M. Wellman.

Evidence for the pro-oxidant effect of γ -glutamyltranspeptidase-related enzyme

Free Radic. Biol. Med., 2000, **29**, 825-833.

EVIDENCE FOR THE PRO-OXIDANT EFFECT OF γ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE-RELATED ENZYME

MILICA ENOIU,^{*,†} HAYET ABERKANE,^{*} JEAN-FRÉDÉRIC SALAZAR,^{*} PIERRE LEROY,^{*} JOHN GROFFEN,[‡]
GÉRARD SIEST,^{*} and MARIA WELLMAN^{*}

^{*}Centre du Médicament, UPRES EA 3117, Faculty of Pharmacy, University Henri Poincaré, Nancy Cedex, France; [†]Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University Carol Davila, Bucharest, Romania; and [‡]Section of Molecular Diagnosis, Division of Hematology/Oncology, Children's Hospital of Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

(Received 19 January 2000; Revised 13 June 2000; Accepted 29 June 2000)

Abstract—It has been previously reported that the metabolism of reduced glutathione (GSH) by γ -glutamyltranspeptidase (GGT) in the presence of chelated metals leads to free radical generation and lipid peroxidation (LPO). The present study demonstrates for the first time that an established cell line expressing GGT-related enzyme, metabolizes extracellular GSH to cysteinylglycine (CysGly) in a time-dependent manner when cells were incubated in a medium containing 2.5 mM GSH and 25 mM glycylglycine. Supplementation with 150–165 μ M Fe^{3+} -EDTA resulted in a reactive oxygen species (ROS) generation process. The resulting data showed a significantly higher level (7.6-fold) of ROS production in the GGT-rel positive cells in comparison with the GGT-rel negative control cells. CysGly and Cys, but not GSH, were responsible for the observed ROS production, as we confirmed by measuring the same process in the presence of Fe^{3+} -EDTA and different thiols. A higher iron reduction and an increased LPO level determined by malondialdehyde HPLC measurement were also found in GGT-rel-overexpressing cells compared to GGT-rel negative cells. Our data clearly indicate that in the presence of iron, not only GGT, but also GGT-rel has a pro-oxidant function by generation of a reactive metabolite (CysGly) and must be taken into account as a potential physiopathological oxidation system. © 2000 Elsevier Science Inc.

Keywords—Gamma-glutamyltransferase-related enzyme, Glutathione, Cysteinylglycine, Free radicals, Lipid peroxidation

INTRODUCTION

Reduced glutathione (GSH), the major intracellular non-protein thiol is mainly known as an important protector against free radical damages by providing reducing equivalents for several key antioxidant enzymes and also by scavenging hydroxyl radicals and singlet oxygen. The plasma membrane-bound enzyme γ -glutamyl transpeptidase [GGT (5-glutamyl)-peptide: aminoacid 5-glutamyltransferase E.C. 2.3.2.2] initiates the breakdown of GSH by removing the γ -glutamyl moiety and therefore providing amino acid precursors for the intracellular de novo synthesis of GSH. However, recent studies have

shown that in the presence of chelated transition metals (iron or copper), pro-oxidant species can originate during the GGT-mediated metabolism of GSH [1–4]. This process was explained by the autoxidation of the GGT-generated metabolite of GSH, cysteinylglycine (CysGly), which is able to form thiol and oxygen radicals by reacting with Fe^{3+} and O_2 [1,3].

In the last few years, it has been reported that the GGT/GSH/ Fe^{3+} (Cu^{2+}) oxidant system is able to induce lipid peroxidation (LPO) on different targets, e.g., polyunsaturated fatty acids [1,5], human LDL [6], hepatocytes [7], liver microsomes [8,9], HepG2 hepatoma cells [9], and also oxidative mutagenesis on DNA [2,10]. Recent biochemical and histological findings suggest that the GGT-dependent oxidation of LDL may represent a potential mechanism in atherosclerosis and that the persistent increase of serum GGT is a possible risk of reinfarction in patients with ischemic heart disease [6]. In

H. Aberkane and J. F. Salazar contributed equally to this work.

Address correspondence to: Dr. Maria Wellman, Centre du Médicament, UPRES EA 3117, Faculty of Pharmacy, University Henri Poincaré, Nancy 1, BP 403, F-54001 Nancy Cedex, France; Tel: +33 (03) 83178823; Fax: +33 (03) 83311322; E-Mail: wellman@curmed.u-nancy.fr.

situ colocalization of GGT and LPO showed an evident association between GGT activity and oxidative damage in preneoplastic lesions from carcinogen-treated rats [7]. High levels of GGT expression were also reported in several human and mammalian cancers (liver, colon, ovary, prostate) suggesting that GGT is a marker of tumor progression, which could be mediated also by the oxidative damage linked to GGT activity [11].

On the other hand, it was shown that GGT-mediated metabolism of GSH leads to production of low levels of H_2O_2 , which is essential to prevent apoptosis and maintain cell proliferation in U937 cells [4]. Furthermore, GGT-generated H_2O_2 and reactive thiol metabolites of GSH are involved in redox modulation of cell surface protein thiols by sulfhydryl oxidation and protein S-thiolation reactions, with possible consequences on cell resistance to pro-oxidant drugs and radiation therapy, as recently demonstrated by Dominici *et al.* [12].

In addition to GGT, another human GGT-related (GGT-rel) enzyme able to catalyze the cleavage of GSH has been identified [13,14]. This enzyme, initially cloned from a human placental cDNA library, exhibited an overall similarity of 40% with human GGT. Similar to GGT, GGT-rel is also a membrane-bound dimer; the molecular weights of glycosylated heavy and light chains in HepG2 are 55 and 42 kDa, respectively [13]. Relatively little is known about the expression of GGT-rel in humans; most of the examined mouse tissues and human cell lines such as lymphoblast cell lines, pulmonary fibroblasts, kidney carcinoma (A498), lung carcinoma (ChaGo), and glioblastoma (A172) lacked abundant expression of GGT-rel. In contrast, GGT-rel expression was found in K562 and HepG2 cells and was inducible by dexamethasone [13].

Recently, a homologue of GGT-rel with 79% identity to human GGT-rel was identified in rat tracheal epithelial cells. Its expression was found to be induced by epidermal growth factor and increased in lung adenomas and carcinomas from rats chronically exposed to isobutyl nitrite [15]. GGT-rel shows a substrate specificity different from GGT; it cannot cleave the common synthetic chromogenic substrates of GGT, e.g., L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide or γ -glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamide. The GGT-rel activity was determined in the GGT-rel transfected NIH3T3 cell line by degradation of extracellular GSH and was further confirmed by conversion of leukotriene C4 to leukotriene D4 [13]. However, the products of the enzymatic degradation of GSH (such as CysGly) have not been identified yet.

Although GGT is apparently much more abundant than GGT-rel, an important and particular physiological role of GGT-rel cannot be excluded. It was suggested that GGT-rel may be involved during particular stages of development, such as pregnancy or in specialized cell

types [13], as well as a protective mechanism against oxidative stress or other toxic injuries [15]. One of the hypotheses proposed by Laouar *et al.* [16,17] is devoted to the proteolytic function of GGT-related activities. In fact, these authors postulated that GGT-related proteins participate in the regulation of IL-6 and IGF1 metabolism. IL-6 dimerization was shown to be due to the membrane-bound GGT-related activity present in hematopoietic cells, as well as IGF-1, which was found to be a specific substrate for cathepsin D and GGT-related enzymes [16,17]. Recent findings describe also the presence of GGT-rel genes in low-copy repeats, which mediate the common 3-MB deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome [18].

In analogy with GGT, we assumed that GGT-rel might have also pro-oxidant properties resulting from the generation of a reactive metabolite of GSH (CysGly) in the presence of chelated iron. Our present work clearly demonstrates that a GGT-rel-transfected cell line metabolizes the extracellular GSH to CysGly and that this reaction is involved in a free radical generation process and consecutive induction of LPO, in the presence of chelated iron.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and standards

All reagents were of analytical or cell culture grade. Dihydrorhodamine 123 (DHR-123), rhodamine 123 (Rh-123), holo-transferrin, and tested thiols were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Solutions were prepared using Milli-Q water (18.2 M Ω .cm).

GGT-rel expressing cells

The murine fibroblast NIH3T3 cell line stably expressing GGT-rel cDNA (3T3/GGT-rel) and NIH3T3 mock-transfected cells (3T3) were established by Heisterkamp *et al.* [13]. The cells were cultured in DMEM medium (Sigma Cell Culture) added with 10% fetal calf serum (Boehringer Mannheim; Mannheim, Germany), 100 units penicillin, 100 μ g streptomycin, and 0.25 μ g amphotericin B per ml of medium and 2 mM L-glutamine (Sigma Cell Culture). Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air.

Cell membrane-enriched fractions were prepared according to Battaglia *et al.* [19] from PBS-washed cell pellets sonicated in 50 mM phosphate buffer pH 7.4, to which 0.25 M sucrose was added. After 10 min centrifugation at 10,000 \times g (4°C), the supernatant was centrifuged for 60 min at 100,000 \times g (4°C), and the resulting pellet was used as membrane-enriched fraction.

For Western blot analysis, cell pellets or membrane-

enriched fractions were solubilized in SDS buffer (0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8 containing 8% SDS, 8% sucrose, and 20% β -mercaptoethanol). The resulting samples were submitted to electrophoresis on 12% SDS-PAGE according to Laemmli [20]. Anti-GGT-rel heavy subunit specific antibodies [13] (at a dilution of 1:500) and antirabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase were used for immunodetection by enhanced chemiluminescence.

HPLC measurement of extra- and intracellular thiols

Adherent 3T3/GGT-rel and 3T3 cells (seeded at 4×10^6 /10 cm dish 24 h before experiments) were incubated in serum-free DMEM medium containing 2.5 mM GSH and 25 mM glycylglycine (GlyGly) at pH 7.4. For the extracellular thiols measurement, 200 μ l aliquots of medium were sampled after selected culture periods and mixed with 200 μ l of a 3.3% (w/v) perchloric acid solution. Prior to HPLC analysis, samples were diluted 10-fold in 0.9% NaCl containing 4 mM EDTA.

For the measurements of intracellular thiols, the cells were incubated in the same conditions as above, then washed twice with 5 ml cold PBS, scraped in 1.2 ml of 3.3% (w/v) perchloric acid, and centrifuged at $12,000 \times g$ for 5 min at 4°C. The supernatant was used for thiol measurements and the pellet for protein determination [21], using bovine serum albumin as standard.

Both extracellular and intracellular samples were kept at -80°C until HPLC analysis.

The thiol measurements were performed using a reversed phase HPLC method including a reduction step of disulfide bonds with tri-*n*-butylphosphine (TBP) and pre-column derivatization with a thiol-selective fluorogenic reagent, 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide (ABDF). To 100 μ l of the above-described samples, 50 μ l of the internal standard (thioglycolic acid at 300 μ M), 20 μ l of 0.5 M NaOH (100 μ l in the case of intracellular medium), 250 μ l of 0.2 M borate buffer pH 9, 50 μ l TBP 5% (v/v), and 50 μ l of 2.3 mM ABDF were added. The resulting mixture was incubated at 50°C for 20 min; then the derivatization reaction was stopped by adding 50 μ l of 1.0 M HCl. HPLC analysis was performed as described previously [22].

Monitoring of reactive oxygen species production

Quantification of reactive oxygen species (ROS) was performed using the DHR-123 probe, which is oxidized by various ROS to fluorescent Rh-123 [26]. A stock solution was made of DHR-123 containing 10 mM in dimethylformamide.

Cells, seeded in 6-well plates (Corning Costar Corp;

Cambridge, MA, USA) at 5×10^5 per well 24 h before experiments, were gently washed twice with 2 ml of PBS at 37°C and cultured for 1 h in PBS containing 2.5 mM GSH and 25 mM GlyGly at pH 7.4 at 37°C in a CO₂ incubator. Then DHR-123 and Fe³⁺-EDTA were added to concentrations of 25 μ M [23] and 150–165 μ M, respectively. Fluorescence was measured after 60 min incubation at room temperature, using a microplate fluorimeter (Cytofluor 2350; Millipore; Bedford, MA, USA) at an excitation and emission wavelength of 485 and 530 nm, respectively.

The time course of ROS production was monitored using a 10⁶ cells pellet suspended in 1 ml PBS at pH 7.4 in the presence of GSH, GlyGly, and Fe³⁺-EDTA at the same concentrations as above, and 250 μ M DHR-123. During a 3 h incubation, aliquots were taken out at various time intervals and fluorescence of Rh-123 was measured.

In acellular experiments, thiol-dependent ROS generation was measured in reaction mixtures containing 2.5 mM thiol (GSH, CysGly, Cys), 150–165 μ M Fe³⁺-EDTA, and 250 μ M DHR-123 in 50 mM phosphate buffer pH 7.4. The reaction was started by adding the thiol solution. Fluorescence intensity was monitored during a 2 h incubation at 37°C.

Measurement of iron reduction and lipid peroxidation

3T3/GGT-rel and 3T3 cells were cultured for 24 h, then the medium was replaced by PBS containing 1 mM GSH and 10 mM GlyGly at pH 7.4. After 4 h of incubation at 37°C, 80 μ M transferrin [3] or 0.15–1.5 mM Fe³⁺-ADP was added ("oxidation conditions"), and cells were further incubated at 37°C for 1 h.

The reduction of iron was measured by the specific reaction of Fe²⁺ with bathophenanthroline [6]. To 0.9 ml extracellular medium obtained after incubation of cells in the described oxidation conditions (using the Fe³⁺-ADP complex), 0.1 ml of 2.5 mM bathophenanthroline solution was added. Absorbance was measured at 534 nm ($\epsilon = 22.14 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) using a UV/visible spectrophotometer (Uvikon 932; Kontron Instruments; Basel, Switzerland).

LPO was monitored using a reverse-phase HPLC method for measurement of malondialdehyde (MDA) as thiobarbituric acid (TBA) derivative [24]. A 50 μ l aliquot of extracellular medium diluted 5-fold was added to 0.25 ml of 1.22 mM H₃PO₄ and 0.25 ml of 0.67% TBA. The mixture was heated for 60 min at 95°C in vials closed under nitrogen. To 200 μ l of the resulting mixture, 340 μ l of methanol and 60 μ l of 1 mM NaOH were added and samples were centrifuged at $9500 \times g$ for 5 min at 4°C. The HPLC system consisted of an autosampler Model AS-48 (Biorad; Hercules, CA, USA) with a

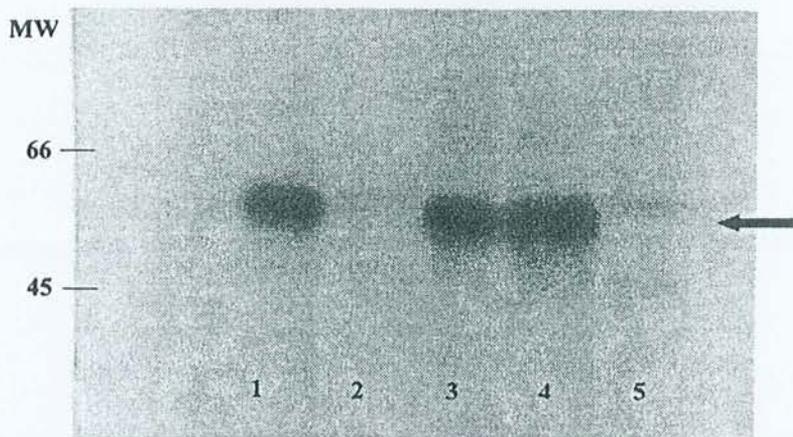


Fig. 1. Western blot analysis of GGT-rel expression. Membrane-enriched fractions (10 μg) of NIH3T3/GGT-rel (lane 1) and of NIH3T3 (lane 2) and cellular extracts: NIH3T3/GGT-rel 25 μg (lane 3) or 50 μg (lane 4), NIH3T3 50 μg protein (lane 5). The position of molecular weight standards are indicated to the left. The arrow indicates the 55 kDa heavy chain of GGT-rel.

20 μl loop, coupled to a HPLC pump Model 655A-11 (Merck; Darmstadt, Germany). Chromatography was performed with a Nucleosil 100A C18 (5 μM) 125 \times 4 mm ID (Macherey-Nagel; Düren, Germany) column equipped with a LiChrospher RP-18 end-capped (5 μm) 4 \times 4 mm ID (Merck) precolumn at 35°C. The mobile phase was 25 mM phosphate buffer pH 6.5–methanol (60:40, v/v) at a flow rate of 0.8 ml/min. Spectrofluorimetric detection was operated at an excitation and emission wavelength of 532 and 553 nm, respectively. For quantification, the calibration curve was made with MDA prepared from 1,1,3,3-tetraethoxypropane hydrolyzed in acidic medium.

Statistical analysis

Statistical significance of data was assessed by the Student's *t* test; differences with $p < .05$ were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

GSH metabolism by GGT-rel

The statement that GGT is the only enzyme able to initiate GSH breakdown by cleavage of γ -glutamyl moiety has to be reviewed since Heisterkamp *et al.* [13] have discovered a GGT homologue protein able to catalyze the degradation of GSH and conversion of leukotriene C4 to leukotriene D4. However, at the present time, no study has clearly identified the GSH metabolites resulting from GGT-rel activity.

Our previous findings demonstrated that the GGT-dependent generation of ROS in the presence of transferrin (as iron source) was closely related to the formation of CysGly from GSH [3]. Thus, we postulated that

GGT-rel-dependent breakdown of GSH, may result in continuous production of CysGly, and can also lead to ROS generation in the presence of iron, and account for another pro-oxidant partner.

The first step in our study was to confirm the GGT-rel stable expression in the cellular model we used. The Western blot analysis (Fig. 1) demonstrates the presence of the expected 55 kDa glycosylated heavy-chain polypeptide both in total cellular extracts and in membrane-enriched fractions, but only from 3T3/GGT-rel cells.

GGT-rel-mediated metabolism of GSH was studied by HPLC measurement of thiols (GSH, CysGly and Cys). The monitoring of GSH metabolism in the extracellular medium of 3T3/GGT-rel and 3T3-growing cells was performed in the presence of 2.5 mM GSH and 25 mM GlyGly at pH 7.4, in similar incubation conditions as described for GGT [3]. The obtained results (Fig. 2A) showed a time-dependent linear increase of CysGly concentration from 0 to 600 μM during 10 h incubation in the 3T3/GGT-rel cells, whereas CysGly was not detectable in the 3T3 negative control cells. In addition, CysGly formation in the extracellular medium of 3T3/GGT-rel cells was perfectly correlated ($r = 0.993$) with the number of cells (data not shown). A 10 h incubation of 3T3/GGT-rel cells with 2.5 mM GSH resulted in a significant consumption of extracellular GSH, which decreased from 2.5 to 1.9 mM. By contrast, in 3T3 cells not expressing GGT-rel, the decrease of GSH was not significant.

Cys, the concentration of which includes cystine contained in the culture medium (cystine is reduced to Cys during the sample treatment for HPLC analysis), slightly decreased in both cell lines (data not shown). Taken together, these data show that a 10 h incubation of

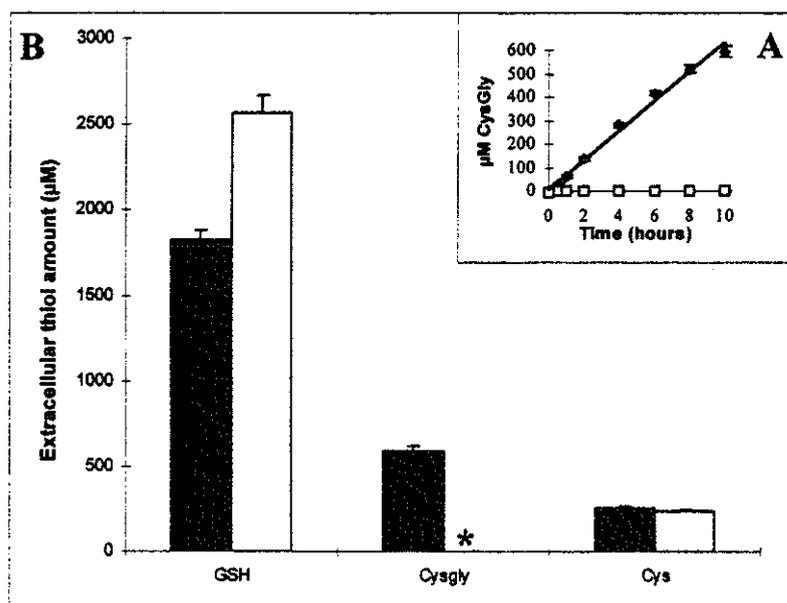


Fig. 2. Extracellular thiol concentrations in 3T3/GGT-rel and 3T3 cells incubated at 37°C in DMEM medium supplemented with 2.5 mM GSH and 25 mM GlyGly. (A) Time course of CysGly formation in 3T3/GGT-rel (◆) and 3T3 cells (□). (B) Results corresponding to 10 h incubations of 3T3/GGT-rel (black columns) and 3T3 (white columns) cells. *Not detected. Results from three independent experiments are expressed as means \pm SD.

GGT-rel positive cells in the presence of 2.5 mM GSH leads to a 25% consumption of this tripeptide, and results in an extracellular level of CysGly of approx. 600 μ M (Fig. 2B).

The intracellular level of thiols after 2 h incubation in the presence of GSH and GlyGly were similar in both cell lines except for CysGly, which was found only in 3T3/GGT-rel cells (not detected in the initial state). These data suggest a metabolic role of GGT-rel in the balance of intracellular thiols (Table 1). Other intermediate thiols of GSH synthesis such as the dipeptide γ -glutamylcysteine (γ -GluCys) were not found inside the cells, but further investigations should be devoted to the GSH synthesis cycle as a particular field in this cellular model.

Table 1. Comparison of Intracellular Thiol Concentrations in GGT-rel-Expressing and -Nonexpressing Cells

Thiol	NIH3T3/GGT-rel (nmoles/mg protein)	NIH3T3 (nmoles/mg protein)
GSH	52.9 \pm 1.9	57.3 \pm 1.5
CysGly	5.3 \pm 0.9	< 0.1
Cys	9.6 \pm 0.5	12.1 \pm 0.7

NIH3T3/GGT-rel and NIH3T3 cells were incubated for 2 h in the presence of 2.5 mM GSH and 25 mM GlyGly. Results from three independent experiments are expressed as means \pm SD. Detection limit for CysGly, defined as a signal to noise ratio of 3, is 0.1 nmole/mg protein.

The quantification of CysGly resulting from GGT-rel/GSH reaction was used in a preliminary characterization of GGT-rel activity, and a study of this enzyme's affinity for GSH and the influence of the acceptor substrate was performed. Thus, the specific GGT-rel activity in 3T3/GGT-rel cells (incubated in the presence of GSH and GlyGly) was 9.1 ± 0.3 mU (1 mU corresponds to 1 nmole CysGly/mg protein/min). The presence of an acceptor substrate seems to be important for the GGT-rel activity: addition of 25 mM GlyGly increased the production of CysGly 2-fold, as compared to the assay performed in the absence of any acceptor. The catalytic features were measured at pH 7.4 using 50 μ g membrane proteins/ml, 25 mM GlyGly and GSH concentration ranging from 5 μ M to 2.5 mM. In these experimental conditions, we obtained an apparent Michaelis constant (K_m GSH) of 0.146 ± 0.02 μ M and an apparent maximal velocity (V_{max}) of 22.02 ± 2.07 nmoles CysGly/mg membrane protein/min. The obtained values ascertain that the GSH concentration (2.5 mM) used in our experiments provides a maximal rate of CysGly production, without any inhibition by substrate excess.

The present data clearly demonstrate that GGT-rel metabolizes extracellular GSH to CysGly. We have verified that no GGT activity can be detected in 3T3/GGT-rel and 3T3 cell lines with γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide, the substrate commonly used for GGT; thus, the cleavage of γ -glutamyl moiety of GSH that we mea-

sured in this cellular model is only due to the GGT-rel activity.

ROS generation during GGT-rel metabolism of GSH in the presence of iron

According to our previous hypothesis and literature data concerning pro-oxidant properties of thiols [1,3,9, 25], we further studied the relationship between CysGly formation and ROS generation in the presence of iron.

For this purpose, we selected DHR-123, a membrane-permeable leucodye that is unspecifically oxidized by various ROS to the fluorescent Rh-123 [26]. It has been reported that DHR-123 reacts with H_2O_2 in the presence of peroxidase, cytochrome *c*, or ferrous iron [26] as well with $O_2^{\cdot-}$ [27] and peroxynitrite radicals [28]. The reactivity of DHR-123 was previously tested in our laboratory with different ROS: HO^{\cdot} in a Fenton-like reaction, $O_2^{\cdot-}$ in a hypoxanthine/xanthine-oxidase reaction, and H_2O_2 or *tert*-butylhydroperoxyde in the presence of peroxidase. In all these cases, DHR-123 was converted to Rh-123, which demonstrates that DHR-123 is a good indicator for a global production of ROS in cells [29].

Measurement of ROS generation in 3T3/GGT-rel and 3T3 growing cells was performed after preliminary incubation of cells in the presence of GSH and GlyGly in order to produce a sufficient level of CysGly. ROS production initiated by Fe^{3+} -EDTA and measured using DHR-123 oxidation, showed a 7.6-fold higher amount of probe oxidation in 3T3/GGT-rel cells as compared to 3T3 cells (3.35 ± 0.14 and 0.44 ± 0.01 nmoles Rh-123/ 10^6 cells, respectively). Moreover, addition of CysGly to 3T3 control cells at a level ($120 \mu M$) similar to the concentration produced by GGT-rel cleavage of GSH during a 2 h incubation generated a higher level of ROS (2.13 ± 0.02 nmoles Rh-123/ 10^6 cells) than in the absence of this reactive metabolite.

The kinetics of ROS production using cellular pellets as source of enzyme showed a very high level and time-dependent ROS production in the GGT-rel-transfected cells as compared to the 3T3/GGT-rel-nonexpressing cells (Fig. 3). ROS production in control experiments without GSH or iron was negligible.

We demonstrated using the present cellular model that the generation of CysGly during the metabolism of GSH by GGT-rel induces a ROS production. Moreover, using salicylic acid hydroxylation as a probe for the specific measurement of HO^{\cdot} , we obtained a comparable level and a similar kinetic profile as for total ROS (data not shown). We can conclude that the GGT-rel-initiated free radical chain reactions involve production not only of $O_2^{\cdot-}$ (as demonstrated for thiols autoxidation) [25] and H_2O_2 (measured during GGT activity) [4,12], but also the production of the powerful oxidant HO^{\cdot} , and support

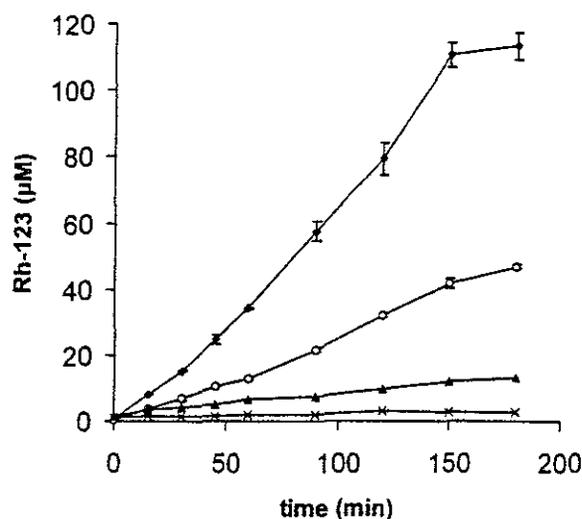


Fig. 3. Kinetics of ROS production by NIH3T3/GGT-rel and NIH3T3 cells, measured as DHR-123 oxidation; 10^6 cells/ml were incubated with 2.5 mM GSH, 25 mM GlyGly, 150–165 μM Fe^{3+} -EDTA in the presence of 250 μM DHR-123 at 37°C (pH 7.4). 3T3/GGT-rel/GSH/ Fe^{3+} (\blacklozenge), 3T3/GSH/ Fe^{3+} (\circ), 3T3/GGT-rel/ Fe^{3+} (\blacktriangle), 3T3/GGT-rel/GSH (\times). Statistical significance of differences between 3T3/GGT-rel and 3T3-treated cells: $p < .05$ for times 0–30 min, $p < .01$ for times 45–120 min, and $p < .001$ for times 150–180 min of incubation.

the mechanism proposed by Drozd *et al.* in the case of GGT-mediated ROS generation. The high reactivity of HO^{\cdot} among different ROS [30] is well documented and suggests that the free radical process initiated by GGT-rel, if not efficiently scavenged by cellular antioxidant defense mechanisms, can result in oxidative damage in cellular environment of the primary free radical event.

To confirm the hypothesis that CysGly is the key metabolite responsible for free radical generation, we further investigated the generation of ROS in an acellular system containing different thiols (GSH, CysGly, or Cys) and Fe^{3+} -EDTA. Significantly higher values of DHR-123 oxidation were found in the presence of equal molar concentrations of Cys or CysGly, than in samples containing GSH (Fig. 4); these data confirm once more that thiol metabolites of GSH (CysGly and Cys), but not GSH itself, are responsible for the free radical production in the presence of iron. The present results were obtained using a relatively high concentration of thiols (2.5 mM), as we used for GSH in cellular experiments in order to stimulate the GGT-rel activity.

Although such a concentration can be locally reached for GSH under different physiological conditions, the physiological amounts of GSH breakdown products (CysGly and Cys) are much lower and Cys concentration may even be the limiting factor for the intracellular synthesis of GSH. Using a lower concentration of thiols (400 μM), the ratio of ROS production in the presence of either CysGly or Cys to ROS production in the presence

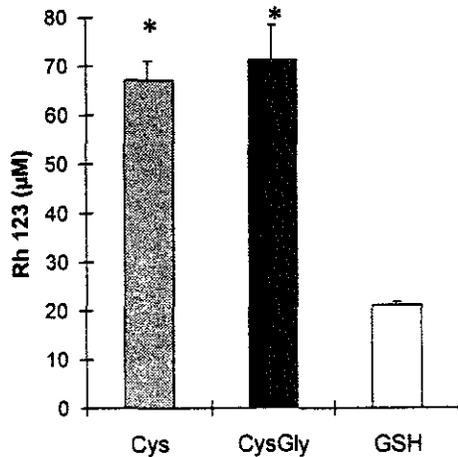


Fig. 4. ROS generation by the thiol/Fe³⁺ system. To mixture containing Fe³⁺-EDTA at 150–165 μM, 250 μM DHR-123 in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 2.5 mM thiol was added. Results from three experiments are expressed as means ± SD. *Significantly different from GSH ($p < .01$).

of GSH was further enhanced 2-fold than when 2.5 mM thiols were used (data not shown). These results suggest that physiologically low levels of CysGly and Cys, which can occur following GGT-rel (GGT) activity, are sufficient to induce a pro-oxidant event via a metal-catalyzed reaction.

Different reactivities of GSH and CysGly were previously explained by the higher reactivity of thiol group in CysGly ($pK_a = 6.4$) than in GSH ($pK_a = 8.5$) at physiological pH [1]. The dissociation of -SH being the primary step in thiols autoxidation, the rate of this process is much slower for GSH than for CysGly [1,3]. By contrast, the enzymatic cleavage of γ -glutamyl moiety considerably enhances dissociation of thiol group with subsequent thiol and oxygen radicals formation in reaction with transition metals [3].

GGT-rel-dependent iron reduction and lipid peroxidation

It was reported that autoxidation of thiols in the presence of chelated iron is a potential source of LPO [31, 32]. The role of GGT in LPO induced during GSH metabolism was demonstrated with different lipid substrates: polyunsaturated fatty acids [1,5], human LDL [6], liver microsomes [8,9], and cells [7,9]. We aimed at verifying, in the particular case of GGT-rel, that the GGT-rel-initiated free radical process can also result in oxidative damage of cellular lipids.

It is known that LPO initiated by thiols and iron proceeds through the reduction of Fe³⁺ [32]. To confirm that the oxidative stress that is linked to GGT-rel-mediated metabolism of GSH involves iron reduction, we measured Fe²⁺ formation in the GGT-rel cells incubated with GSH, GlyGly, and Fe³⁺-ADP ("oxidation conditions"). ADP was chosen as chelating agent according to previously described conditions leading to a maximal GGT-dependent LPO [1]. In these experimental conditions, we found a significantly higher (2.8-fold) amount of Fe²⁺ measured in extracellular medium of 3T3/GGT-rel cells as compared to the control cells (Table 2). CysGly, a more potent iron reductant than GSH, accounts for the important level of Fe²⁺ in the GGT-rel positive cell line and obtained data confirm that iron reduction is a necessary step in the mechanism of GGT-rel induced oxidative stress.

We also compared the LPO in 3T3/GGT-rel and 3T3 cells exposed to above-described oxidation conditions using either Fe³⁺-ADP complex or transferrin as a physiological source of iron. In both conditions, LPO evaluated as MDA production was significantly higher in the extracellular medium of GGT-rel positive cells, as compared to the medium of 3T3 cells (Table 2). However, the increase in intracellular MDA level in 3T3/GGT-rel

Table 2. Extracellular Malondialdehyde (MDA) and Iron Reduction in GGT-rel-Expressing and -Nonexpressing Cells

Incubation system	Extracellular MDA (μM)	Iron reduction (μM Fe ²⁺)
3T3/GGT-rel + GSH + GlyGly + Fe ³⁺ -ADP	0.32 ± 0.06*	10.15 ± 0.11***
3T3/GGT-rel + GSH + GlyGly + transferrin	0.23 ± 0.04**	n.d.
3T3/GGT-rel	0.04 ± 0.02	1.60 ± 0.03
3T3 + GSH + GlyGly + Fe ³⁺ -ADP	0.18 ± 0.02	3.71 ± 0.09
3T3 + GSH + GlyGly + transferrin	0.08 ± 0.02	n.d.
3T3	0.01 ± 0.02	1.02 ± 0.18

To 3T3/GGT-rel and 3T3 control cells that were preincubated for 4 h at 37°C in PBS supplemented with 1 mM GSH and 10 mM GlyGly, 0.15–1.5 mM Fe³⁺-ADP or 80 μM transferrin was added and extracellular medium analyzed for MDA and Fe²⁺ after 60 min incubation at 37°C. Data are means ± SD of three independent experiments.

* Significantly different from 3T3 cells ($p < .05$).

** Significantly different from 3T3 cells ($p < .01$).

*** Significantly different from 3T3 cells ($p < .001$).

n.d. = not determined.

cells was not statistically significant compared to the 3T3 cells (data not shown). The extracellular, but not intracellular accumulation of LPO products can be explained by the plasma membrane localization of GGT-rel. Thiol metabolites of GSH, prior to their penetration into the cells, can participate in the generation of ROS and subsequent peroxidation of membrane lipids, which are well-known vulnerable targets of free radical attack. LPO products of membranes are mainly released in extracellular medium similar to the GGT-dependent LPO process previously shown [9].

The present results provide evidence for a link between GGT-rel activity and induction of peroxidation on cellular membrane lipids via the reduction of iron.

In conclusion, we demonstrated, using a cellular model, that the GGT-rel enzyme has pro-oxidant properties. The GGT-rel pro-oxidant effect proceeds through the reaction of GGT-rel-generated metabolite (CysGly) with iron, which induces a production of free radicals and consecutive LPO. The relatively high concentrations of substrates (GSH and GlyGly) used in our experiments provide a maximal GGT-rel activity as we found by measuring catalytical features of the enzyme (K_m GSH and V_{max}). We therefore obtained a maximal CysGly formation and also an important and easily quantifiable ROS level production via the reduction of iron. These conditions were optimal for the *in vitro* study of the pro-oxidant properties of GGT-rel. Nevertheless, similar processes may also arise under physiological conditions involving the presence of GSH and a physiological source of iron. As previously demonstrated for GGT, GGT-rel may participate in the pro-oxidant-antioxidant balance and this fact has to be taken into account as one of the physiological roles of this enzyme, which remains to be elucidated in greater detail.

Acknowledgements — The International Federation of Clinical Chemistry is gratefully acknowledged for the Professional Scientific Exchange scholarship provided to M. Enouï for the research training in Centre du Médicament in Nancy. This work was partially supported by a grant from l'Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique et Technologique en Champagne-Ardenne (ARERS). We thank Delphine Marcus and Caroline Sandre for their helpful contributions to experiments, Haline Bodaud for technical assistance, and Professor Nils-Erik Huseby for manuscript reading.

REFERENCES

- [1] Stark, A. A.; Zeiger, E.; Pagano, D. A. Glutathione metabolism by γ -glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 14:183-189; 1993.
- [2] Stark, A. A.; Glass, G. A. Role of copper and ceruloplasmin in oxidative mutagenesis induced by the glutathione- γ -glutamyltranspeptidase system and by other thiols. *Environ. Mol. Mutagen.* 29:63-72; 1997.
- [3] Drozd, R.; Parmentier, C.; Hachad, H.; Leroy, P.; Siest, G.; Wellman, M. Gamma-glutamyltransferase-dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. *Free Radic. Biol. Med.* 25:786-792; 1998.
- [4] Del Bello, B.; Paolicchi, A.; Comporti, M.; Pompella, A.; Maellaro, E. Hydrogen peroxide produced during γ -glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J.* 13:69-79; 1999.
- [5] Glass, G. A.; Stark, A. A. Promotion of glutathione- γ -glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation by copper and ceruloplasmin: the requirement for iron and the effects of antioxidants and antioxidant enzymes. *Environ. Mol. Mutagen.* 29:73-80; 1997.
- [6] Paolicchi, A.; Minotti, G.; Tonarelli, P.; Tongiani, R.; De Cesare, D.; Mezzeti, A.; Dominici, S.; Comporti, M.; Pompella, A. Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation: a potential mechanism in atherosclerosis. *J. Invest. Med.* 47:151-160; 1999.
- [7] Stark, A. A.; Russel, J. J.; Langenbach, R.; Pagano, D. A.; Zeiger, E.; Huberman, E. Localization of oxidative damage by a glutathione- γ -glutamyl transpeptidase system in preneoplastic lesions in sections of livers from carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis* 15:348; 1994.
- [8] Zalit, I.; Glass, G. A.; Stark, A. A. The role of chelators in the catalysis of glutathione- γ -glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation by transition metals. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40:1123-1133; 1996.
- [9] Paolicchi, A.; Tongiani, R.; Tonarelli, P.; Comporti, M.; Pompella, A. Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* 22:853-860; 1997.
- [10] Milne, L.; Nicotera, P.; Orrenius, S.; Burkitt, M. J. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 304:102-109; 1993.
- [11] Hanigan, M. H. Gamma-glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chem.-Biol. Interact.* 111-112:333-342; 1998.
- [12] Dominici, S.; Valentini, M.; Maellaro, E.; Del Bello, B.; Paolicchi, A.; Lorenzini, E.; Tongiani, R.; Comporti, M.; Pompella, A. Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: the role of γ -glutamyl transpeptidase-dependent H_2O_2 production and S-thiolation. *Free Radic. Biol. Med.* 27:623-635; 1999.
- [13] Heisterkamp, N.; De Meyts, E. R.; Uribe, L.; Forman, H. J.; Groffen, J. Identification of a human γ -glutamyl-cleaving enzyme related to, but distinct from, γ -glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6303-6307; 1991.
- [14] Morris, C.; Courtay, C.; Van Kessel, A. G.; Hoeve, J.; Heisterkamp, N.; Groffen, J. Localization of a γ -glutamyl-transferase-related gene family on chromosome 22. *Hum. Genet.* 91:31-36; 1993.
- [15] Potdar, P. D.; Andrews, K. L.; Nettesheim, P.; Ostrowski, L. E. Expression and regulation of γ -glutamyl transpeptidase-related enzyme in tracheal cells. *Am. J. Physiol.* 273:L1082-L1089; 1997.
- [16] Laouar, A.; Villiers, C.; Sancéau, J.; Maison, C.; Colomb, M.; Wietzerbin, J.; Bauvois, B. Inactivation of interleukin-6 *in vitro* by monoblastic U937 cell plasma membranes involves both protease and peptidyl-transferase activities. *Eur. J. Biochem.* 215:825-831; 1993.
- [17] Laouar, A.; Wietzerbin, J.; Bauvois, B. Protease-catalyzed conversion of insulin-like growth factor-1 and interleukin-6 into high-molecular mass species through the sequential action of hematopoietic surface-associated cathepsin G and γ -glutamyl transpeptidase-related activities. *Eur. J. Biochem.* 223:617-624; 1994.
- [18] Edelmann, L.; Pandita, R. K.; Morrow, B. E. Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 64:1076-1086; 1999.
- [19] Battaglia, E.; Pritchard, M.; Ouzzine, M.; Fournel-Gigleux, S.; Radomska, A.; Siest, G.; Magdalou, J. Chemical modification of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1* by diethyl pyro-

- carbonate: possible involvement of a histidine residue in the catalytic process. *Arch. Biochem Biophys.* **309**:266–272; 1994.
- [20] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–686; 1970.
- [21] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265–275; 1951.
- [22] Salazar, J.-F.; Schorr, H.; Herrmann, W.; Herberth, B.; Siest, G.; Leroy, P. Measurement of thiols in human plasma using liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr. Sci.* **37**:469–476; 1999.
- [23] Cool, R. H.; Merten, E.; Theis, C.; Acker, H. Rac1, and not Rac2, is involved in the regulation of the intracellular hydrogen peroxide level in HepG2 cells. *Biochem. J.* **332**:5–8; 1998.
- [24] Brown, R. K.; Kelly, F. J. Peroxides and other products: detection of malondialdehyde by HPLC. In: PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J., eds. *Free radicals: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1996:128–130.
- [25] Misra, H. P. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J. Biol. Chem.* **249**:2151–2155; 1974.
- [26] Royall, J.; Ischiropoulos, H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine-123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **302**:348–355; 1993.
- [27] Bueb, J. L.; Gallois, A.; Schneider, J. C.; Parini, J. P.; Tschirhart, E. A double-labeling fluorescent assay for concomitant measurements of [Ca²⁺]_i and O₂^{•-} production in human macrophages. *Biochem. Biophys. Acta* **1244**:79–84; 1995.
- [28] Crow, J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* **1**:145–157; 1997.
- [29] Parmentier, C.; Wellman, M.; Nicolas, A.; Siest, G.; Leroy, P. Simultaneous measurement of reactive oxygen species and reduced glutathione using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection in cultured cell lines. *Electrophoresis* **20**:2938–2944; 1999.
- [30] Sawyer, D. T. Reactivity of oxygen radicals. In: *Oxygen chemistry*. Oxford: Oxford University Press; 1991:120–131.
- [31] Schöneich, C.; Asmus, K. D.; Dillinger, U.; Bruchhausen, F. Thiol radical attack on polyunsaturated fatty acids: a possible route to lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**:113–120; 1989.
- [32] Tien, M.; Bucher, J. R.; Aust, S. D. Thiol-dependent lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**:279–285; 1982.

ABBREVIATIONS

- CysGly—cysteinylglycine
 DHR-123—dihydrorhodamine 123
 GlyGly—glycylglycine
 GSH—reduced glutathione
 LPO—lipid peroxidation
 MDA—malondialdehyde
 Rh-123—rhodamine 123
 ROS—reactive oxygen species

Si l'on compare les résultats obtenus dans le cas des deux enzymes (GGT et GGT-rel), on observe que les niveaux de production d'ERO sont relativement proches dans les lignées V79GGT et NIH3T3/GGT-rel. Ainsi, après 60 min d'incubation de culots de 1 million de cellules en présence du système oxydant GSH/Fe³⁺, la concentration de Rh-123 formée est de 45,1 ± 1,2 µM dans les cellules V79GGT et de 34,3 ± 0,1 µM dans les cellules NIH3T3/GGT-rel. Ceci ne reflète pas la différence d'activité spécifique vis-à-vis du GSH entre les cellules V79GGT (243,0 ± 3,9 mU) et NIH3T3/GGT-rel (9,1 ± 0,3 mU). Ces résultats suggèrent l'implication d'autres facteurs qui limiteraient l'ampleur du processus d'oxydation, tels que le statut des enzymes antioxydantes, probablement différent dans les deux modèles cellulaires.

Nous avons confirmé, en utilisant un modèle cellulaire, que le métabolisme du GSH par la GGT conduit, en présence de fer, à un processus de production d'ERO. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois, que dans des conditions similaires, la GGT-rel peut aussi avoir un rôle pro-oxydant. Enfin, nos résultats constituent une validation des modèles cellulaires utilisés pour d'autres études concernant les conséquences au niveau cellulaire du processus d'oxydation dépendant de la GGT ou de la GGT-rel.

Nous nous sommes ensuite attachée à l'analyse plus approfondie de la peroxydation lipidique, processus déjà décrit comme étant une des conséquences du stress oxydant induit par la GGT ou la GGT-rel (*publication n°1*). Les résultats de ce travail font l'objet du chapitre n° II.

CHAPITRE II

Le système d'oxydation GGT/GSH/Fe³⁺ dans un modèle d'étude de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique implique des réactions complexes et la compréhension de celles-ci a été nettement facilitée par les résultats acquis à partir de substrats plus simples comme les acides gras plus ou moins insaturés. Lors de l'auto-oxydation, l'introduction de l'oxygène qui mène à la formation de peroxydes comme produits primaires, entraîne également un remaniement du système de doubles liaisons par déplacement et/ou isomérisation cis-trans. Par fission de ces structures, on aboutit ensuite à la formation de produits secondaires extrêmement variés comme des hydrocarbures saturés, des diènes conjugués ou non, des aldéhydes plus ou moins substitués. Parmi ces derniers, se trouvent des composés hautement toxiques vis-à-vis de fonctions cellulaires importantes (synthèse de protéines et d'acides nucléiques, fonctions enzymatiques, etc.), comme le 4-hydroxynonanal dont le mode de formation à partir de l'acide linoléique est illustré ci-dessous :

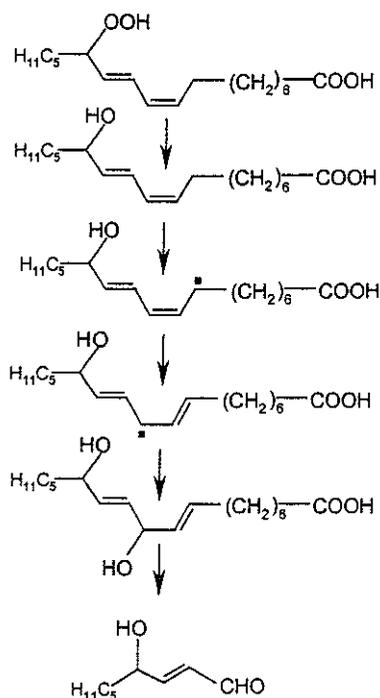


Figure 19 : Formation du 4-hydroxynonanal à partir d'acide linoléique.

Ainsi que nous l'avons décrit dans l'introduction, plusieurs travaux ont montré que le système GGT/GSH/Fe³⁺ est capable d'induire la peroxydation des acides gras insaturés (Stark et al., 1993, Glass and Stark, 1997) et ce, dans différentes cibles comme les LDL humaines (Paolicchi et al., 1999), et les cellules d'hépatome HepG2 (Paolicchi et al., 1997). Cette constatation n'est toutefois basée que sur la mise en évidence de façon peu spécifique de la formation d'aldéhyde malonique (MDA) en utilisant le test du TBARs ("thiobarbituric acid reactive substances"). En revanche, la formation de 4-hydroxynonéal ou celle d'autres hydroxyaldéhydes n'a jamais été signalée au cours des réactions d'oxydation auxquelles participe la GGT.

Il nous a donc semblé qu'une étude analytique approfondie des aldéhydes formés au cours de l'action du système GGT/GSH/Fe³⁺ sur la peroxydation des acides gras insaturés pourrait apporter une meilleure connaissance, à la fois, du mécanisme d'oxydation et des conditions requises par l'enzyme dans ce processus. De plus, en fonction de la nature des composés formés, l'étude des conséquences de la peroxydation lipidique dépendante de la GGT au niveau cellulaire pourrait être envisagée.

Une partie du travail que nous avons réalisé pour le développement analytique a fait l'objet de notre *publication n°2* insérée ci-après :

M. Enoiu, M. Wellman, P. Leroy, J.-M. Ziegler, N. Mitrea and G. Siest.

Gas and liquid chromatography-mass spectrometry of aldehydic products from lipid peroxidation.

Analisis, 2000, **28**(4), 285-290.

Gas and liquid chromatography-mass spectrometry of aldehydic products from lipid peroxidation

M. Enoiu^{1,3}, M. Wellman^{1,*}, P. Leroy¹, J.-M. Ziegler², N. Mitrea³ and G. Siest¹

¹ Centre du Médicament, UPRES EA 3117, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy 1, B.P. 403, 54001 Nancy Cedex, France

² Service Commun de Spectrométrie de Masse, Université Henri Poincaré Nancy 1, B.P. 403, 54001 Nancy Cedex, France

³ Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy-University Carol Davila, 6 Traian Vuia, 70139 Bucarest, Romania

* Corresponding author: wellman@ctrmed.u-nancy.fr

The present report describes the identification of aldehydic products of lipid peroxidation by two chromatographic methods coupled to mass spectrometry, GC/EI-MS and LC/ESI-MS. The easy detection of molecular ions in LC/ESI-MS and fragmentation pattern in GC/EI-MS illustrate the complementarity of these two techniques. Several carbonyl compounds, other than the usual reported breakdown products of lipid peroxidation, e.g. malondialdehyde and 4-hydroxynonenal, were identified as 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives in the Fe²⁺/ascorbate-catalyzed peroxidation of linoleic and linolenic acids.

Introduction

Reactive species, especially those deriving from oxygen, produced during either physiological enzymatic reactions or particular conditions involving xenobiotics metabolism and pathological disorders, generate oxidative stress when physiological antioxidant defense mechanisms are overloaded. Oxidative stress leads to damages of biomolecules, such as lipids, proteins and nucleic acids. Lipid peroxidation is a degradation chain reaction of polyunsaturated fatty acids, which are easy targets of free radical attack. It further leads to conjugated dienes, hydroperoxides and aldehydes [1]. Aldehydes are secondary products of peroxidation, more stable and diffusible than hydroperoxides. Their composition is very complex and depends on the fatty acid content of the lipids and on the free radical generating system [2]. Aldehydes act as "second toxic messengers", responsible for damage of targets which are distant from the initial free radical event [3,4]. Among them, 4-hydroxyalkenals, in particular 4-hydroxynonenal, were found to have high toxic effects on cell membranes and on numerous cell functions, being involved in the aetiology of many human diseases, e.g. atherosclerosis and cancer [3,5].

The present study is focused on the development of methods devoted to the identification of aldehydes resulting from polyunsaturated fatty acids oxidation. Lipid peroxidation is usually monitored by colorimetric reaction of thiobarbituric acid with malondialdehyde, a dicarbonyl compound produced in relatively high amount during autoxidation of fatty acids. Nevertheless, the thiobarbituric acid-reactive substances assay is criticized because of many interfering side reactions [6]. Moreover, major products of lipid peroxidation, such as alkanals and 4-hydroxyalkenals, are not detected by the thiobarbituric acid-reactive substances assay; thus, it is not a reliable index of peroxidation and toxicity [7].

Further, analysis of 4-hydroxynonenal has been performed by HPLC [8] or by GC/MS after derivatization [8,9,10]. As a result, 4-hydroxynonenal being a better indicator than malondialdehyde, it was assumed as a model molecule for oxidative stress [3,5].

Characterization of individual breakdown products of lipid peroxidation requires high sensitive derivatization methods of carbonyl groups and the use of mass spectrometry (MS) techniques for their identification. Among various derivatization techniques, reaction with 1,3-cyclohexanedione produces fluorescent dehydroacridine derivatives which are separated by HPLC. Such a method is sensitive, but has a low specificity [11]. Oxime derivatives, obtained with either hydroxylamine or pentafluorobenzylhydroxylamine, were successfully used for carbonyl products identification by GC/MS, directly or after trimethylsilylation [12, 13]. However, these derivatives are colourless and some difficulties arise for their specific detection during the preliminary thin layer chromatography (TLC) step. 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization presents several advantages: high reaction specificity, sensitive UV detection (λ_{\max} : 360-380 nm, ϵ : 25.000-28.000 M⁻¹ cm⁻¹), good stability and easy visualisation of dinitrophenylhydrazones by TLC [14]. Moreover, these derivatives can be analysed either by HPLC or GC coupled to MS. Despite the interferences of traces of contaminating aldehydes from solvents, from reagents and from laboratory air, they have been extensively used for the characterization of lipid peroxidation products.

Concerning structural studies of DNPH derivatives by MS, chemical [15] and electrospray [16] ionization (CI and ESI) easily supply molecular ions, but fragments are not sufficiently abundant for their precise identification. In order to assess structures by fragmentation, electron impact (EI) [17] or MS/MS [18] techniques have to be tested.

Therefore, we selected in the present work the DNPH derivatization method followed by TLC separation and LC/ESI-MS and GC/EI-MS analysis of the corresponding derivatives. Two fatty acids were selected as peroxidation substrates, linoleic and linolenic acids, because of their wide distribution in biological samples and their high susceptibility to autoxidation.

Materials and methods

Chemicals and standards

Linoleic (9,12-octadecadienoic) and linolenic (9,12,15-octadecatrienoic) acid methylesters and aldehyde standards were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France) and used without further purification. 2,4-dinitrophenylhydrazine (Merck, Darmstadt, Germany) was purified by recrystallisation (*n*-butanol).

Oxidation of polyunsaturated fatty acids

20 mg linoleic or linolenic acid methylester was suspended in 30 mL 0.1 M Tris buffer pH 7.4 and 60 mL 0.15 M KCl. Autoxidation was started by adding 5 mL 20 mM ascorbic acid and 5 mL 0.8 mM FeSO₄ [19]; the resulting mixture was incubated at room temperature for either 24 h (linolenic acid) or 48 h (linoleic acid). Aldehydes were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 20 mL), then organic layers were concentrated to dryness under a gentle nitrogen stream (≤ 35 °C).

Derivatization of aldehydes with DNPH

10 mL 2.5 mM DNPH in 1 M HCl was added to the above residue then incubated for 24 h in the dark at room temperature under nitrogen atmosphere stirring gently during the first 2 h. Derivatives were extracted with CH₂Cl₂ (3 × 20 mL), then organic layers were concentrated to dryness under nitrogen (≤ 35 °C).

Thin layer chromatography

DNPH derivatives were dissolved in 1 mL CH₂Cl₂, applied on a home made TLC plate (silica gel G 60 Merck, layer thickness 0.25 mm), then successively developed with CH₂Cl₂ (5 cm) and toluene (15 cm). Three zones with different R_f: 0-0.2 (zone I), 0.3-0.5 (zone II) and 0.6-0.8 (zone III) or well defined bands in each zone were scraped off and eluted with CH₃OH (2 × 1 mL). The methanolic extracts were dried under nitrogen and the resulting residue was dissolved in 0.5 mL CH₃CN.

LC/ESI-MS

Mass spectrometry was carried out using a Micromass Platform II (Micromass Ltd., Manchester, UK). Cone voltage was set at 30 V and the temperature source was 80 °C. Data were collected in negative mode and reprocessed by means of Mass Lynx software (Micromass). The HPLC system coupled to the electrospray mass spectrometry consisted of a solvent delivery pump (model PU 980; Jasco, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), an injection valve (model 7725i, Rheodyne) fitted with a 20-μL loop, an analytical column (125 × 2 mm i.d.) prepacked with LiChrospher RP 18 end-capped (5 μm; Merck) and a UV spectrophotometric detector (model UV 975; Jasco) set at 360 nm. Elution was operated using CH₃CN-H₂O with a linear gradient (50 to 95 % CH₃CN in 30 min), at a flow rate 0.2 mL.min⁻¹. A postcolumn 1:20 splitter reduced the eluent flow rate entering the mass spectrometry source.

GC/MS

A GC (Carlo Erba) apparatus was equipped with a methylsilicone SE-30 capillary column (25 m × 0.32 mm i.d., 0.20 μm). Injector and interface temperatures were 250 °C; column oven temperature: 200 °C to 250 °C (5 °C/min); helium gas carrier (0.2 mL.min⁻¹). The GC system was coupled to EI-MS (Nermag R 10-10c) set at an electron energy of 70 eV.

Results and discussion

Oxidation of polyunsaturated fatty acids produces a great number of carbonyl products with different chain lengths, unsaturation degrees and substitutions, even when a single and pure fatty acid is used as an oxidation substrate. Therefore, the complex mixture of 2,4-dinitrophenylhydrazones requires preliminary TLC separation. We focused on the identification of compounds from zones I and III, which are hereinafter designed as "polar" and "non-polar" fractions, respectively. Zone II, according to literature data [2,7,14], contains osazones and was not presently studied. GC and HPLC analysis of zones I and III, even when considering individual bands, showed an important number of components. Moreover, as shown by MS, some compounds coelute in HPLC.

Non-polar aldehyde derivatives

The GC/MS analysis of the non-polar fraction (TLC zone III) of oxidized linolenic acid allowed to identify dinitrophenylhydrazones of alkanals, alkenals and alkadienals, using the following molecular ions: acetaldehyde (224), propanal (238), butanal (252), pentanal (266), hexanal (280), hexenal (278), hexadienal (276) heptadienal (290), octadienal (304) and nonadienal (318) (Fig. 1). Typical fragments corresponding to the DNPH residue were observed: M-30 (NO), M-46 (NO₂) and the ion *m/z* 182 ascribed to the cleavage of the nitrogen-nitrogen bond in DNPH moiety.

GC/MS of a non-polar TLC fraction

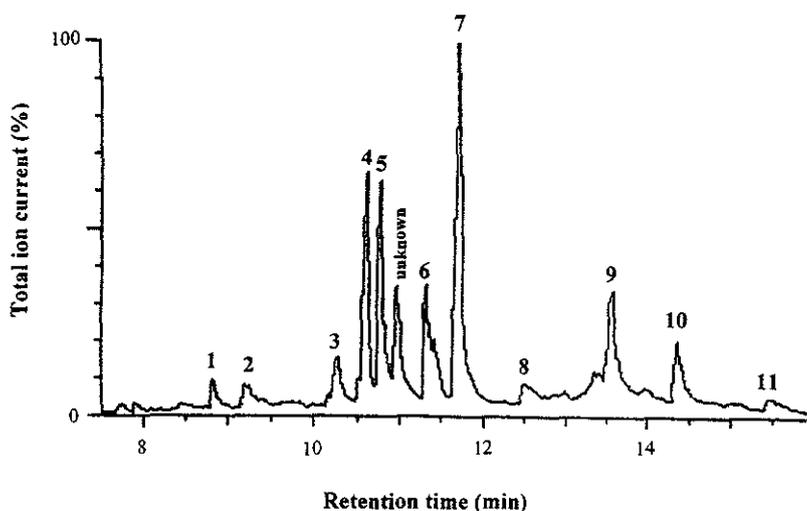


Figure 1. GC/EI-MS of a non-polar TLC fraction (zone III; R_f 0.7) of DNPH carbonyls resulting from oxidized linolenic acid: 1: pentanone; 2: butanal; 3: hexanal (*syn*); 4: hexanal (*anti*); 5: 2-hexenal; 6: 3-hexenal (*syn*); 7: 3-hexenal (*anti*); 8: hexadienal; 9: heptadienal; 10: octadienal; 11: nonadienal.

LC/ESI-MS of a non-polar TLC fraction

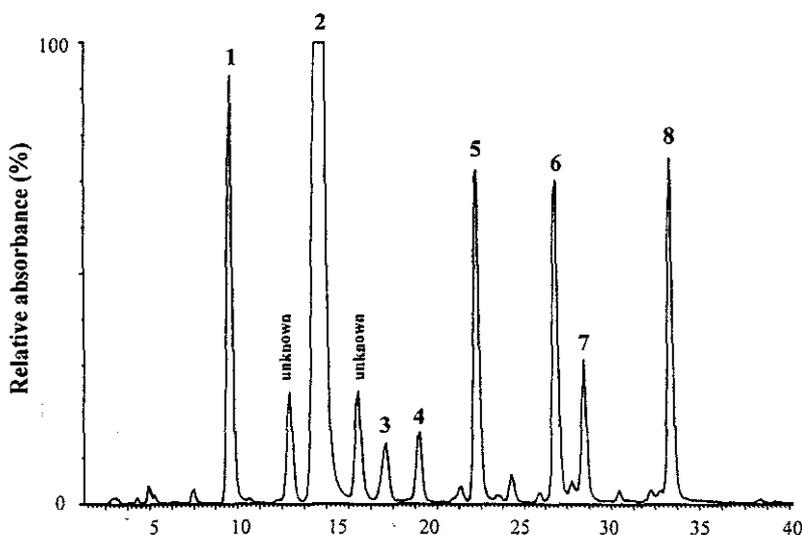


Figure 2. DNPH derivatives of aldehydes identified using LC/ESI-MS and monitored by UV detection ($\lambda = 360$ nm) in a non-polar TLC fraction (zone III; R_f 0.6) of oxidized linolenic acid: 1: acetaldehyde; 2: propanal; 3: butanal; 4: butanal; 5: pentanal; 6: hexenal; 7: heptadienal; 8: nonadienal.

This indicates the presence of DNPH carbonyls as described previously [15,18]. Ions corresponding to fragmentation of the side chain are also useful.

Since DNPH derivatives exist as *syn* and *anti* isomers, they appear as double GC peaks. Their identification relied upon literature data indicating successive elution of *syn* and *anti* isomers [20]. The isomerization is promoted by increasing the column temperature (elevation of *syn/anti* ratio), whereas LC/ESI-MS supplies simpler chromatograms by avoiding formation of *syn* isomers. The identification of products cited above was also performed using LC/ESI-MS technique (Fig. 2).

Similarly, using GC/MS and LC/ESI-MS, we identified in the case of linoleic acid a wide number of saturated and unsaturated aldehydes with C_3 to C_{10} side-chain in the non-polar zone; m/z values of molecular ions are for acetaldehyde: 224, propanal: 238, butanal: 252, butenal: 250, pentanal: 266, hexenal: 280, heptanal: 294, heptenal: 292, octanal: 308, octenal: 306, nonanal: 322, nonenal: 320, nonadienal: 318, decenal: 334 and decadienal: 332. Ketones, such as butanone and pentanone, which are also formed as secondary products of lipid peroxidation, give the same m/z values of molecular ions as the corresponding aldehydes. Their identification can be ascertained by comparison with HPLC profiles of standards.

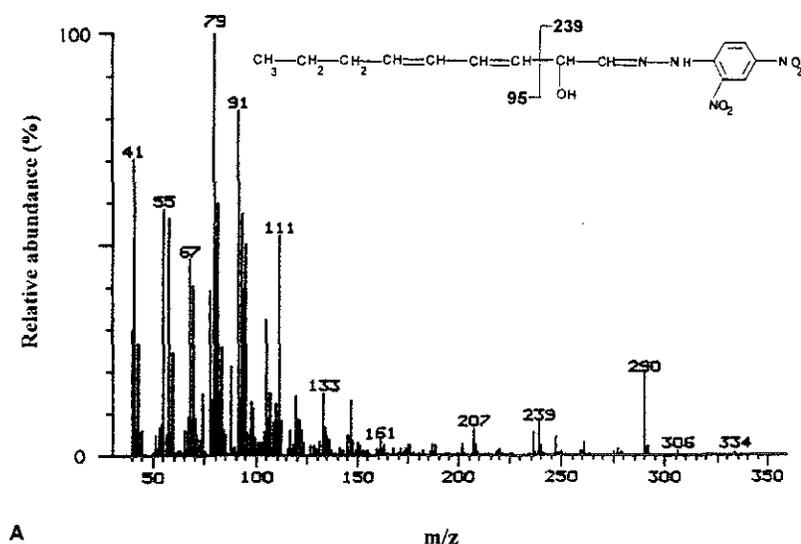
The most abundant non-polar aldehydes were propanal (60 % of the fraction Rf 0.6) and hexanal (68 % of the fraction Rf 0.7), for linolenic acid and linoleic acid oxidation, respectively, as already reported [1,7].

Polar aldehyde derivatives

Identification of 2,4-dinitrophenylhydrazones in the polar fraction (TLC zone I) is very important because they might

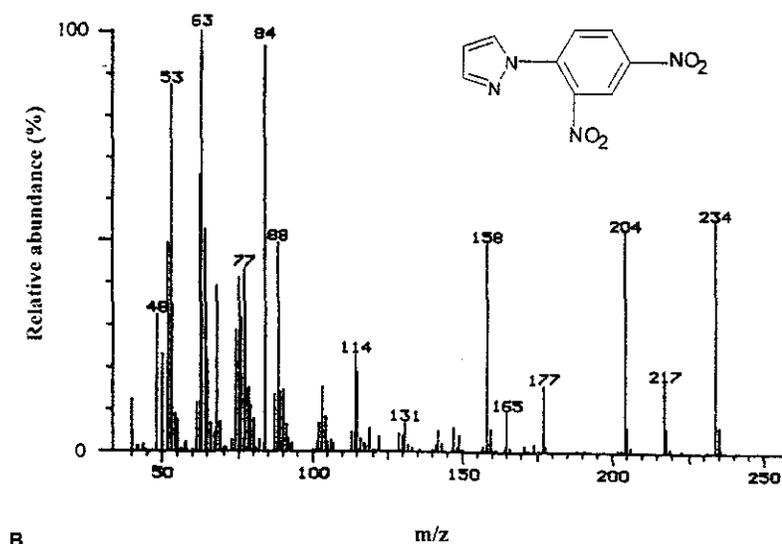
be hydroxyaldehydes, which show a high toxicity. Their identification is however more difficult using GC/MS because molecular ions are frequently unseen. Nevertheless, when the molecular ion can be detected, EI-MS supplies useful data to assess structures. For example, Fig. 3A represents the EI-MS of the dinitrophenylhydrazone derived from 2-hydroxy-nona-3,5-dienal (m/z 334); the localization of the OH group relied upon the ion m/z 239. Only few α -hydroxyalcanals have been described as lipid peroxidation secondary products. It was suggested that most α -hydroxyaldehydes react with biomolecules due to their high

EI-MS of 2-hydroxy-nona-3,5-dienal-DNPH



A

EI-MS of malondialdehyde-DNPH



B

Figure 3. EI-MS of 2,4-dinitrophenylhydrazones of: A: 2-hydroxy-nona-3,5-dienal (m/z 334). The fragment at m/z 239 is essential for the localization of OH group. The fragment at m/z 290 corresponds to M-17-27 (OH, HCN). B: malondialdehyde (m/z 234). Key fragments correspond to M-17 (OH), M-30 (NO), M-30-27 (NO, HCN), M-30-46 (NO, NO₂).

reactivity and thus escape detection [12,19]. Owing to its structure, such as OH in α position which considerably enhances the reactivity of carbonyl and conjugated double bonds, the α -hydroxyalkadienal has probably a very high reactivity and toxic effects similar to 4-hydroxyalkenals.

In order to improve thermal stability of hydroxyaldehydes, we performed trimethylsilylation of the OH group. Indeed, it was reported that DNPH derivatives of hydroxyaldehydes can be trimethylsilylated without altering their recovery [15]. As N-methyltrimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) was successfully used for the trimethylsilylation of oxime derivatives [12,19], we used this reagent in the case of DNPH-carbonyls. We obtained a derivative resulting from the replacement of the DNPH residue with formation of a typical aldehyde-MSTFA adduct, as in the case of direct MSTFA derivatization of aldehydes [21]. Such an adduct gave an abundant fragment (m/z 228) corresponding to the MSTFA derivatized carbonyl group after α cleavage of the side chain (data not shown). However, molecular ions are frequently missing in MSTFA derivatives.

Hydroxyaldehydes were mainly detected using LC/ESI-MS and in part confirmed using GC/EI-MS, because of difficulties exposed above. For example, oxidation of linoleic acid resulted in a wide range of mono- and dihydroxy-substituted alkanals (1), alkenals (2) and alkadienals (3). The $[M-H]^-$ values of their pseudomolecular ions are (1) hydroxyhexanal: 295; hydroxyheptanal: 309; hydroxydecanal: 351; hydroxyundecanal: 365; dihydroxyheptanal: 325; dihydroxyoctanal: 339; dihydroxydecanal: 367; dihydroxyundecanal: 381; dihydroxydodecanal: 395; (2) hydroxyheptenal: 307; hydroxynonenal: 335; hydroxydecanal: 349; dihydroxyundecenal: 379; dihydroxydodecenal: 393; dihydroxytetradecenal: 421 and (3) hydroxynonadienal: 333; dihydroxyundecadienal: 377, dihydroxydodecadienal: 391; dihydroxytetradecadienal: 419. 4-hydroxynonenal was a main hydroxyaldehyde originated from the linoleic acid oxidation, as already reported [1,3]. In the zone I, we also found DNPH derivatives corresponding to the fatty acid long chain substituted with polar groups (hydroxy, keto), *i.e.* 9-oxo-13-hydroxy-10-octadecenoic acid methylester (m/z 506).

Malondialdehyde was found to be a major product resulting from linolenic, but not linoleic acid oxidation. It does not form a dinitrophenylhydrazone, but a cyclic and colourless pyrazole derivative (λ_{\max} : 307 nm [22]; m/z : 234 [23]) (Fig. 3B).

Conclusion

Analysis of aldehydic breakdown products reflects the balance between the rate of lipid peroxidation and the metabolism of peroxidized products. It is therefore the most reliable indicator for the measurement of the *in vivo* occurrence of lipid peroxidation [1]. Contrary to the currently used thiobarbituric acid-reactive substances assay, which affords a

global evaluation of peroxidation, the reported methods including DNPH derivatization allow the identification of individual aldehydes and a better estimation of its toxicological consequences.

MS techniques presently used are complementary for the identification of DNPH derivatives of aldehydes. The GC/MS technique allows to assign structures in numerous cases. Nevertheless, difficulties in identification of high molecular mass and polar compounds and frequent absence of molecular ions limit this technique. ESI-MS easily supplies molecular ions and enables an accurate study of aldehydes resulting from lipid peroxidation. Both MS techniques permit the single ion monitoring. Correlation between EI-MS and ESI-MS data led us to the identification of most of aldehydic products of linoleic and linolenic acids oxidation. The peroxidation breakdown products are very complex. We found numerous compounds corresponding to previously described categories: *n*-alkanals, 2-alkenals, 2,4-alkadienals, α -hydroxyaldehydes, 4-hydroxyalkenals, MDA, ketones [1,2,7]. In addition, the two MS techniques permitted us to identify an important number of carbonyl products substituted with OH group, which possess high reactivity and may contribute to damages during lipid peroxidation, as described for 4-hydroxynonenal.

These preliminary experiments permitted to define a useful tool to study lipid peroxidation resulting from a specific enzymatic reaction (GGT), *i.e.* cleavage of glutathione by gamma-glutamyltransferase in the presence of iron. As a matter of fact, we have recently demonstrated that this enzyme located in cell membrane has a prooxidant effect by producing reactive oxygen species during glutathione metabolism [24]. The analysis of lipid peroxidation products generated by GGT/glutathione system is under current study, using mainly LC/ESI-MS. Furthermore, comparison of HPLC retention times of these products with chromatograms of DNPH aldehydes identified during oxidation by Fe^{2+} /ascorbate is quite useful, especially in the case of compounds produced in very small amounts. We detected thus an important number of non-polar, as well as polar dinitrophenylhydrazones of aldehydes which are formed in GGT-dependent oxidation of linoleic and linolenic acids [25], most of them being common to the Fe^{2+} /ascorbate-catalyzed lipid peroxidation. The analysis of products formed with the enzymatic system will now be performed using a simpler methodology, *i.e.* HPLC with UV detection. Their respective proportion will be determined using an internal standardization method, because DNPH derivatives have very similar molar absorbance.

Acknowledgments

We are very grateful to Dr. Jean Villoutreix for his valuable scientific advices and high competent assistance in mass spectra interpretation.

International Federation of Clinical Chemistry is gratefully acknowledged for the Professional Scientific Exchange scholarship provided to M. Enoiu for research training in Centre du Médicament in Nancy (France).

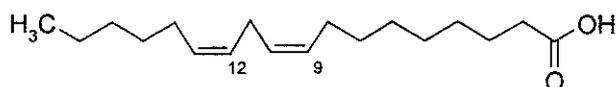
References

1. Rice-Evans, C.A.; Diplock, A.T.; Symons, M.C.R. In *Techniques in free radical research*, Burdon, R.H., Van Knippenberg, P.H., Ed.; Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, volume 22, Elsevier, 1991, chapter 5.
2. Poli, G.; Dianzani, M.U.; Cheeseman, K.H.; Slater, T.F.; Lang, J.; Esterbauer, H. *Biochem. J.* **1985**, *227*, 629-638.
3. Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. *Free Rad. Biol. Med.* **1991**, *11*, 81-128.
4. Uchida, K.; Shiraishi, M.; Naito, Y.; Torii, Y.; Nakamura, Y.; Osawa, T. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2234-2242.
5. Comporti, M. *Free Rad. Res.* **1998**, *28*, 623-635.
6. Lefèvre, G.; Beljean-Leymarie, M.; Beyerle, F.; Bonnefont-Rousselot, D.; Cristol, J.-P.; Thérond, P.; Toreilles, J. *Ann. Biol. Clin.* **1998**, *56*, 305-319.
7. Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H.; Dianzani, M.U.; Poli, G., Slater, T.F. *Biochem. J.* **1982**, *208*, 129-140.
8. Lang, J.; Celotto, C.; Esterbauer, H. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 369-378.
9. Van Kujik, F.; Thomas, D.; Stephens, R.; Dratz, E. In *Methods in Enzymology*, Packer, L.; Glazer, A.N. Ed.; Academic Press, New York, 1990, volume 186, part B, pp 399-406.
10. Selley, M. *J. Chromatogr. B* **1997**, *691*, 263-268.
11. Holley, A.E.; Walker, M.K.; Cheeseman, K.H.; Slater, T.F. *Free Rad. Biol. Med.* **1993**, *15*, 281-289.
12. Loidl-Stahlhofen, A.; Kern, W.; Spiteller, G. *J. Chromatogr. B* **1995**, *673*, 1-14.
13. Höög, C.N.; Cronholm, T. *Anal. Biochem.* **1990**, *189*, 131-137.
14. Van Kujik, F.; Thomas, D.; Stephens, R.; Dratz, E. In *Methods in Enzymology*, Packer, L.; Glazer, A.N. Ed.; Academic Press, New York, 1990, volume 186, part B, pp 415-419.
15. Thomas, M.; Robison, T.; Samuel, M.; Forman, H.J. *Free Rad. Biol. Med.* **1995**, *18*, 553-557.
16. Deighton, N.; Magill, W.; Bremner, D.; Benson, E. *Free Rad. Res.* **1997**, *27*, 255-265.
17. Liedtke, R.J.; Duffield, A.M.; Djerassi, C. *Org. Mass Spectrom.* **1970**, *3*, 1089-1092.
18. Kölliker, S.; Oehme, M.; Dye, C. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1979-1985.
19. Loidl-Stahlhofen, A.; Spiteller, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1211*, 156-160.
20. Uralets, V.P.; Rijks, J.A.; Leclercq, P.A. *J. Chromatogr.* **1980**, *194*, 135-144.
21. Ende, M.; Luftmann, H. *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 5167-5070.
22. Cordis, G.A.; Das, D.K.; Riedel, W. *J. Chromatogr. A* **1998**, *798*, 117-123.
23. Ekström, T.; Garberg, P.; Egestad, B.; Högberg, J. *Chem.-Biol. Interactions* **1988**, *66*, 177-187.
24. Drozd, R.; Parmentier, C.; Hachad, H.; Leroy, P.; Siest, G.; Wellman, M. *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, *25*, 786-792.
25. Enoiu, M.; Aberkane, H.; Drozd, R.; Wellman, M.; Galteau, M.M.G.; Siest, G. *Clin. Chem. Lab. Med.* **1999**, *37*, S259.

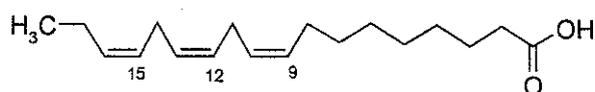
2.1. Mise en évidence des aldéhydes formés au cours de l'oxydation des acides gras polyinsaturés

Lors d'expériences préliminaires nous avons rapidement constaté que les quantités d'aldéhydes formés dans le système GGT/GSH/Fe³⁺ (conditions d'incubation décrites p. 95) nécessitaient la mise au point de méthodes analytiques particulièrement sensibles. De plus, l'absence quasi totale de ces aldéhydes au niveau commercial nous a obligée, afin d'obtenir des témoins, d'identifier ces substances à partir d'un système d'oxydation à rendement beaucoup plus élevé. C'est pourquoi, dans un premier temps nous avons utilisé un système d'oxydation purement chimique car il semble en effet évident que des quantités beaucoup plus importantes d'acides gras peuvent être mises en œuvre dans un tel système par rapport à un système enzymatique. Nous avons eu recours au **système ascorbate/Fe²⁺** en raison de la facilité de son emploi et des nombreuses études dont il a été l'objet (Miller and Aust, 1989, Herbert *et al.*, 1996).

L'acide α -linoléique (9,12,15-octadécatriénoïque) et l'acide α -linoléique (9,12-octadécadiénoïque) ont été choisis comme substrats en raison de leur sensibilité connue à l'oxydation :



Acide linoléique (9,12-octadécadiénoïque)



Acide linoléique (9,12,15-octadécatriénoïque)

Ils ont été utilisés soit sous forme libre soit, le plus souvent sous forme d'esters méthyliques. Cette dernière permet en effet une meilleure élimination de l'excès d'acide gras non transformé, en fin de réaction.

La méthode la plus souvent utilisée pour l'estimation de la peroxydation lipidique est basée sur la réaction colorée donnée par la condensation de l'aldéhyde malonique avec l'acide

thiobarbiturique. Or de nombreux aldéhydes, notamment les alcanals, produits majoritaires de la peroxydation lipidique et les 4-hydroxycénales, qui présentent par ailleurs un intérêt toxicologique particulier, ne sont pas détectés par cette méthode. De plus, celle-ci manque beaucoup de spécificité (Lefèvre *et al.*, 1998).

Il est par ailleurs bien connu que l'instabilité ou la volatilité de certains aldéhydes nécessite pour leur caractérisation la formation de composés beaucoup plus stables et le choix, ainsi que la mise au point d'une méthode de dérivation, se sont avérés indispensables.

Plusieurs réactifs ont été proposés dans la littérature pour la dérivation des groupes carbonyle et certains, comme les oximes, présentent de grands avantages, à savoir une bonne stabilité à température élevée et une très grande sensibilité de détection (Norsten-Höög and Cronholm, 1990, Loidl-Stahlhofen *et al.*, 1995). En revanche, ils ne possèdent aucune coloration propre et se prêtent difficilement à la chromatographie surtout en phase liquide.

Nous avons donc préféré la 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) pour les avantages que ce réactif présente : haute spécificité, bonne stabilité des dérivés et repérage facile de ceux-ci grâce à leur coefficient d'absorption élevé dans la région 360-380 nm (ϵ : 25000-28000 M⁻¹ cm⁻¹).

2.1.1. Formation des 2,4-dinitrophénylhydrazones

La 2,4-dinitrophénylhydrazine constitue un piège très sensible pour tous les composés carbonylés et de ce fait, n'est jamais obtenue du commerce sous une forme suffisamment pure. Nous avons donc procédé à différentes reprises à une recristallisation dans le n-butanol. Le produit ainsi purifié est dissous dans de l'acide chlorhydrique 1 M et constitue le réactif que nous avons utilisé tout au long de ce travail. Sa durée de conservation est supérieure à un mois, mais son emploi nécessite beaucoup de précautions. En effet, sa sensibilité aux dérivés carbonylés et notamment à ceux toujours présents dans l'atmosphère d'un laboratoire (formaldéhyde, acétaldéhyde, acroléine, etc.) (Goelen *et al.*, 1997) entraîne l'obligation d'extraire avant emploi, les 2,4-dinitrophénylhydrazones contaminatrices. Après plusieurs essais, le dichlorométhane s'est

avéré être le meilleur solvant pour cette opération car il permet une extraction efficace des 2,4-diphénylhydrazones sans trop entraîner de réactif.

Les conditions d'emploi du réactif et la technique d'isolement des 2,4-dinitrophénylhydrazones (décrites dans la *publication n°2*) ont été déterminées par des essais effectués au préalable sur 6 aldéhydes du commerce : hexanal (Sigma), heptanal (Aldrich), trans-4-décenal (Fluka), trans-2-décenal (Fluka), MDA (préparé par hydrolyse acide du 1,1,3,3-tétraéthoxypropane, Sigma) et 4-hydroxy-2,3-trans-nonéal (OXIS). Ceci nous a permis de plus, l'obtention des 2,4-dinitrophénylhydrazones témoins.

2.1.2. Séparation des 2,4-dinitrophénylhydrazones

Grâce à leur coefficient d'absorption élevé en UV, les 2,4-dinitrophénylhydrazones peuvent être facilement détectées et le choix de la chromatographie liquide haute performance (CLHP) s'est imposé d'emblée.

Les figures 20 A et B montrent les résultats obtenus dans le cas d'une oxydation respectivement du linoléate et du linoléate de méthyle. La complexité du mélange de 2,4-dinitrophénylhydrazones dans chaque cas est évidente et ne semble pas permettre l'identification ultérieure des composés par simple mesure du temps de rétention. Dans un cas elle est cependant possible. Il s'agit du MDA qui, sous l'action de la DPNH, ne fournit pas l'hydrazone correspondante mais un dinitrophénylpyrazole absorbant à 307 nm. Il possède, dans nos conditions expérimentales, un temps de rétention de 3,9 minutes (fig. 20 C).

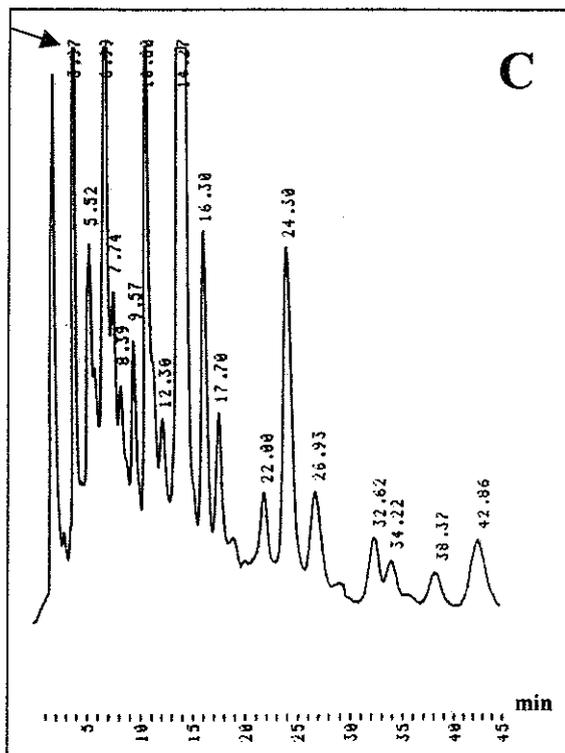
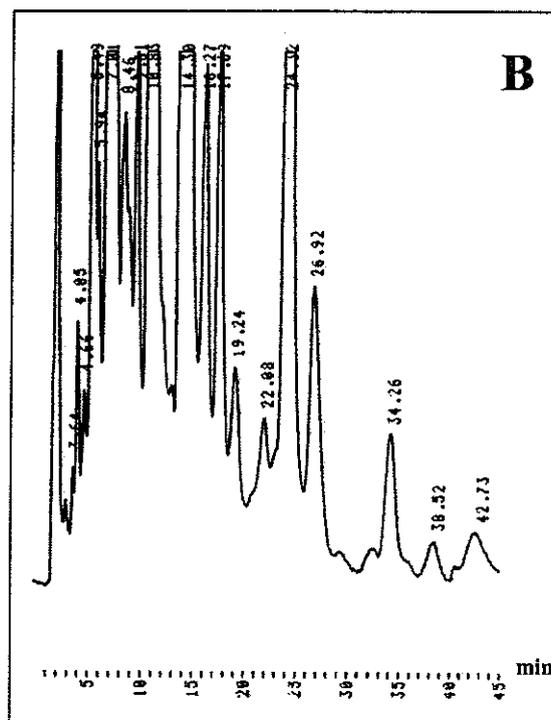
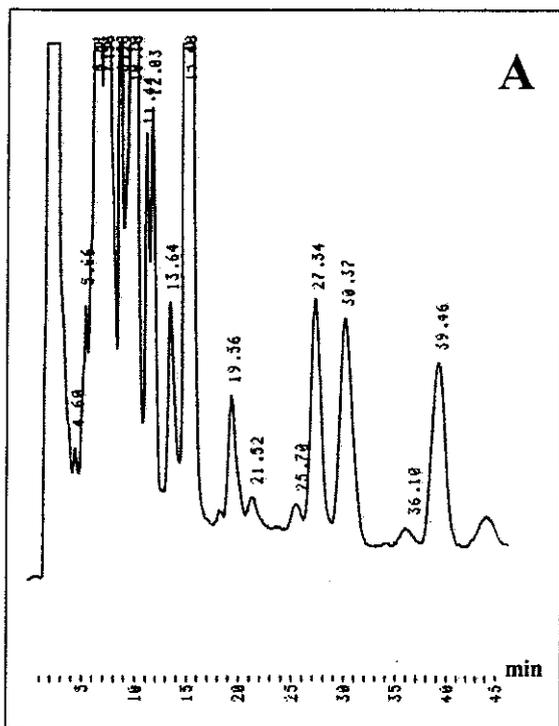


Figure 20 : Chromatogrammes types des produits d'oxydation totaux (dérivés DNPH) du linoléate de méthyle (A) et linoléate de méthyle (B et C).

Conditions CLHP : colonne Lichrosorb RP 18, 7 μ m, 4 x 250 mm, phase mobile : acétonitrile - eau 2:1(v/v); débit : 1 ml/min
 La détection est réalisée à 360 nm (A et B). Dans le cas du linoléate de méthyle, la détection à 307 nm (C) met en évidence le dérivé du MDA (temps de rétention : 3,9 min, pic indiqué par une flèche).

2.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Afin de limiter la complexité des profils CLHP, nous avons procédé à une séparation préalable des 2,4-dinitrophénylhydrazones par chromatographie sur couche mince de gel de silice (mode opératoire décrit dans la *publication n°2*). Bien que très incomplète au niveau de la séparation des entités chimiques, elle présente cependant deux avantages majeurs, à savoir : la séparation des composés selon une polarité décroissante allant de la ligne de dépôt vers le front et de plus, elle favorise une concentration non négligeable des composés présents en faible quantité dans la solution de départ.

Trois zones de polarité différente ont été définies : zone I (Rf 0-0,2) et zone II (Rf 0,3-0,5), appelées « polaires » et zone III (Rf 0,6-0,8), « non-polaire ».

Les taches de couleur jaune ou rosé sont aisément repérées. L'adsorbant correspondant à chaque zone est gratté puis élué par du méthanol pur. Ce dernier permet une élution totale des hydrazones, mais présente cependant l'inconvénient d'extraire également le liant de nature organique qui assure au gel de silice son adhésion dans le cas des plaques prêtes à l'emploi. Nous avons donc dû préparer nos plaques nous-mêmes à partir de gel de silice Merck dont le liant est du plâtre (Stahl, 1962). La figure 21 représente la séparation des 2,4-dinitrophénylhydrazones provenant d'acides gras oxydés par le système chimique, par le système GGT/GSH/Fe³⁺, ainsi que celles provenant d'aldéhydes témoins.

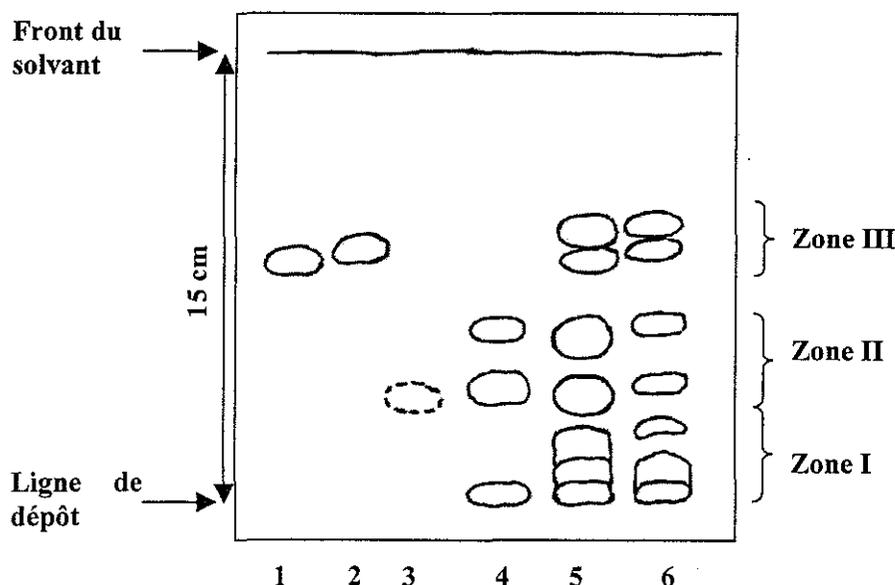


Figure 21 : Chromatographie sur couche mince.

Dérivés DNPH des aldéhydes témoins : hexanal (1), 4-décenal (2), MDA (3) et extraits du linoléate de méthyle témoin (4) et oxydé par le système ascorbate/Fe²⁺ (5) ou GGT/GSH/Fe³⁺ (6).

2.1.2.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Elle constitue la technique de base utilisée tout au long de ce travail. L'extrait provenant de chaque zone définie ci-dessus en CCM a été analysé par cette technique dont les conditions sont décrites dans la légende de la figure 20.

Les figures 22 montrent les chromatogrammes CLHP obtenus pour chaque zone CCM indiquée dans la figure 21 et concernant les produits d'oxydation du linoléate de méthyle par le système ascorbate-Fe²⁺ (dépôt 5). On peut observer que même après séparation sur couche mince le profil reste complexe. Plus d'une dizaine de composés sont mis en évidence dans chaque zone. On note également l'existence ou la prépondérance de certains pics dans une zone donnée et ceci illustre bien tout l'intérêt de la CCM en première étape.

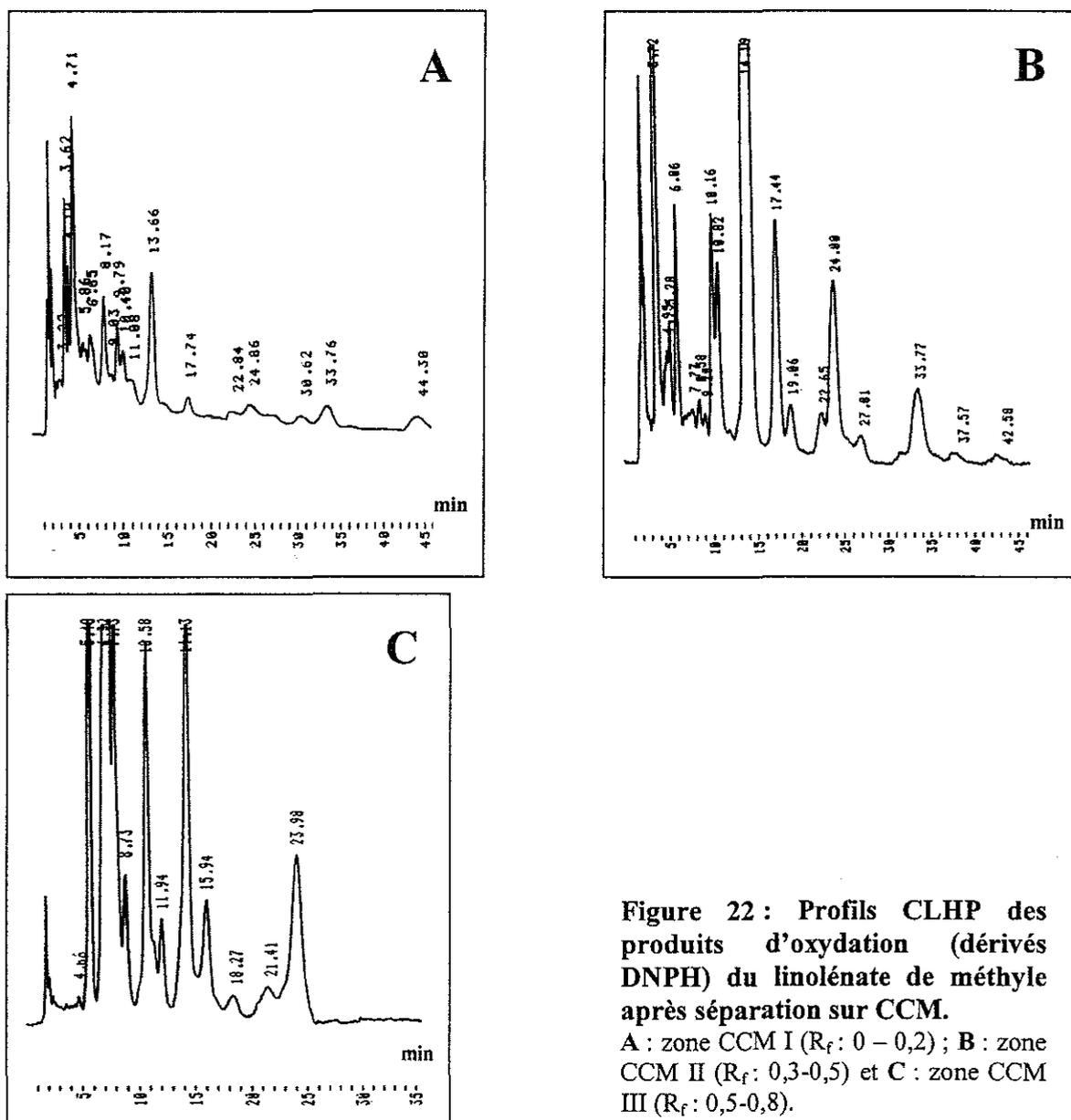


Figure 22 : Profils CLHP des produits d'oxydation (dérivés DNPH) du linoléate de méthyle après séparation sur CCM. A : zone CCM I (R_f : 0 – 0,2) ; B : zone CCM II (R_f : 0,3-0,5) et C : zone CCM III (R_f : 0,5-0,8).

Nous avons même tenté la récupération de bandes relativement bien séparées, en particulier dans les zones I et III [voir fig. 20(5)]. Les figures 23 A et B représentent les profils obtenus. Même dans ce cas la séparation est loin d'être parfaite, un même composé étant retrouvé dans des bandes voisines. Cette technique n'a toutefois été utilisée qu'au début de notre travail et uniquement à des fins d'identification pour la constitution de témoins.

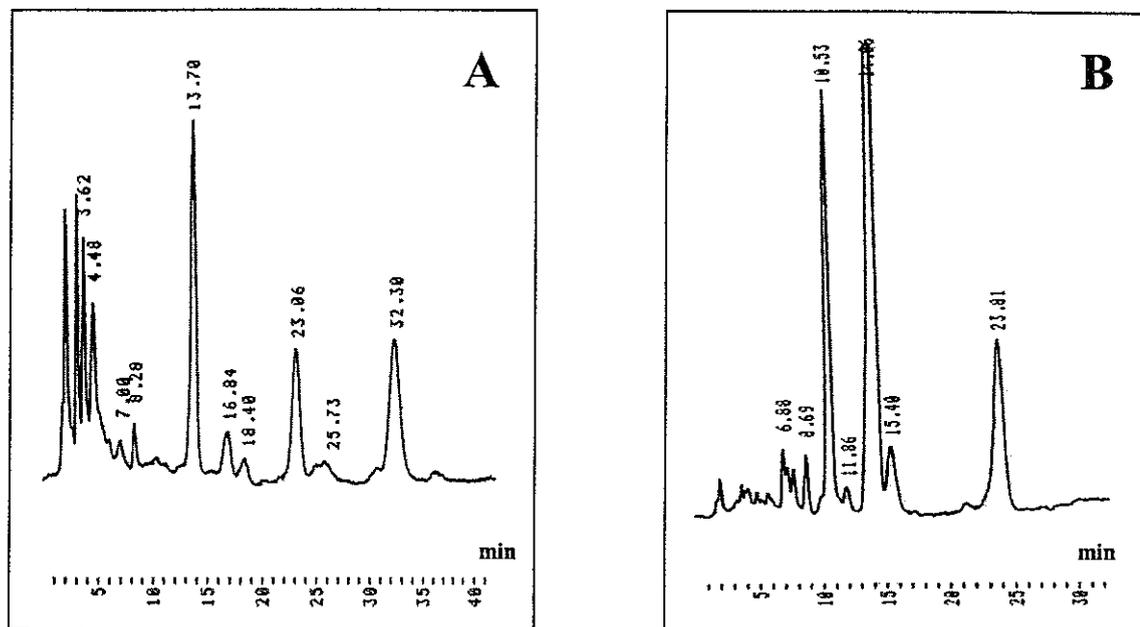


Figure 23 : Profils CLHP des bandes isolées en CCM.

A : bande $R_f = 0,12$ et B : bande $R_f = 0,70$ des zones CCM respectivement I et III.

Tous ces résultats ont été obtenus en phase isocratique et afin d'améliorer encore les séparations, nous avons mis au point une technique d'éluion par gradient (conditions opératoires décrites dans la *publication n°2*).

Les figures 24 A et B permettent d'apprécier la différence de performance des deux techniques. L'utilisation du gradient a été réservée aux séparations destinées à une identification des composés par spectrométrie de masse LC-MS. Le mode isocratique a été préféré dans l'analyse de routine et principalement pour la comparaison des produits d'oxydation obtenus pour un même acide gras traité par des systèmes d'oxydation différents.

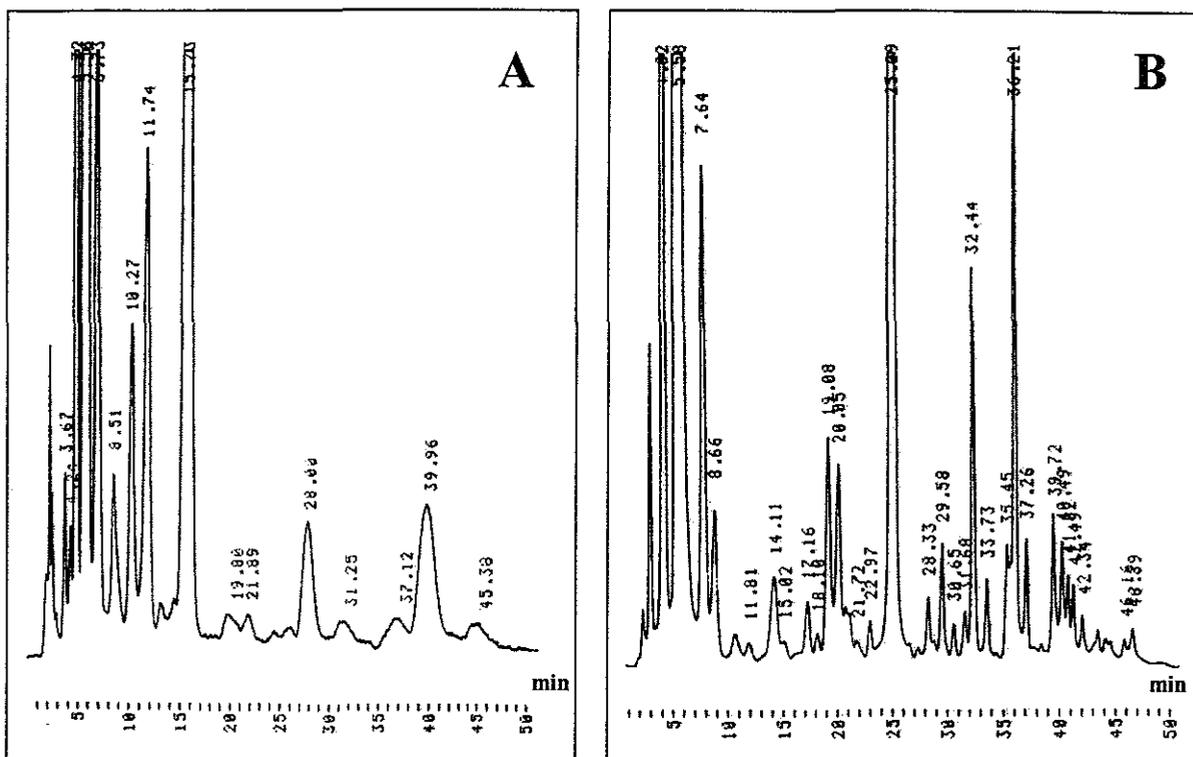


Figure 24 : Comparaison des profils CLHP en mode isocratique (A) et en mode gradient (B).
 Les profils représentent une fraction non-polaire (zone III CCM, $R_f = 0,6$) du linoléate de méthyle oxydé.

2.1.3. Méthodes d'identification

Parmi les moyens matériels dont nous disposons, seule la spectrométrie de masse a pu être envisagée pour l'identification des composés.

Deux méthodes différentes ont été utilisées à savoir : la spectrométrie de masse avec ionisation par impact électronique (EI) et ionisation en « électrospray » (ESI), couplées respectivement à la chromatographie en phase gazeuse (GC) et à la CLHP.

2.1.3.1. Spectrométrie de masse par couplage à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS)

Cette technique nous a permis de déterminer la structure de nombreux composés. Les expériences ont été réalisées dans les conditions décrites (*publication n°2*) et qui ont été fixées à partir des résultats obtenus pour des aldéhydes témoins.

Connue pour son efficacité souvent plus grande que celle obtenue en CLHP, la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire est particulièrement bien adaptée à la spectrométrie de masse puisque celle-ci, au moins dans un premier temps, consiste à obtenir la volatilisation de la substance à analyser. Dans un second temps, les électrons émis par un filament chauffé et accélérés vers une anode, entrent en collision avec les molécules gazeuses de la source. Il en résulte la formation d'ions moléculaires qui vont se fragmenter et tous ces ions sont ensuite canalisés vers un analyseur (De Hoffman *et al.*, 1999). Toute la difficulté d'interprétation du spectre obtenu réside alors dans la reconstitution théorique de la molécule à partir de ces fragments et de l'ion moléculaire (lorsqu'il est présent).

Malgré ses limites, l'ionisation par impact électronique (EI) est la méthode qui fournit les spectres les plus aisément comparables. Ceci explique d'ailleurs pourquoi les collections de spectres utilisés pour les identifications par comparaison reposent majoritairement sur l'impact électronique.

A titre d'exemple, les dérivés carbonylés sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazones provenant d'une oxydation de linoléate de méthyle et formant 2 bandes dans la zone III en CCM [voir fig. 21(5)] se sont révélés être au nombre de 9 à savoir, dans l'ordre d'élution : pentanone (M=266), butanal (M=262), hexanal (M=280), 2-hexénal (M=278), 3-hexénal (M=278), hexadiéнал (M=276), 2,4-heptadiéнал (M=290), octadiéнал (M=304), 3,6-nonadiéнал (M=318).

L'interprétation des spectres de masse n'est toutefois pas toujours d'une grande évidence et nécessite une connaissance du mode de fragmentation des 2,4-diphénylhydrazones. A titre d'exemple, nous reproduisons dans la figure 25 le spectre du **4-décéнал-DNPH** témoin et l'interprétation qui peut être faite :

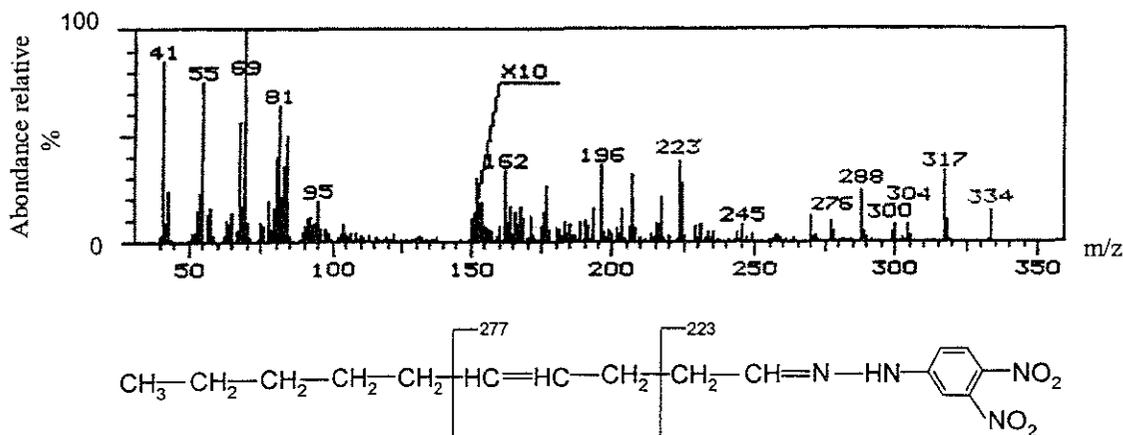


Figure 25 : Spectre EI du 4-décéнал-DNPH (M=334).

L'ion moléculaire $M^+=334$ correspond à la masse attendue pour ce composé, les ions à m/z 317 ($M-17$) à la perte d'un hydroxyle (OH), 304 ($M-30$) à la perte de NO, 300 ($M-34$) à la perte de (O + H₂O), 288 ($M-46$) à la perte de NO₂. Bien que très classique mais non constante, la perte de ces fragments ne fait que confirmer qu'il s'agit bien d'une 2,4-dinitrophénylhydrazone. En revanche les ions 277, 223 et bien évidemment 334 sont propres à la structure de cet aldéhyde.

Les difficultés d'interprétation grandissent souvent avec l'allongement de la chaîne, l'augmentation de l'insaturation ou l'introduction de substituants. Les deux exemples suivants (fig. 26 et fig. 27) montrent combien il est parfois délicat d'assurer non seulement la structure correspondant au spectre mais aussi la certitude que cette structure est bien celle du composé soumis à l'analyse. La figure 26 représente le spectre de masse de la 2,4-dinitrophénylhydrazone du **4-hydroxyheptanal**, identifié parmi les produits d'oxydation du linoléate de méthyle. Les ions à m/z 267, 238, 223 et 167 sont explicités dans la formule. On peut alors noter l'importance des ions à m/z 267 et 238 ($237+H$) car ils permettent de localiser la position du substituant.

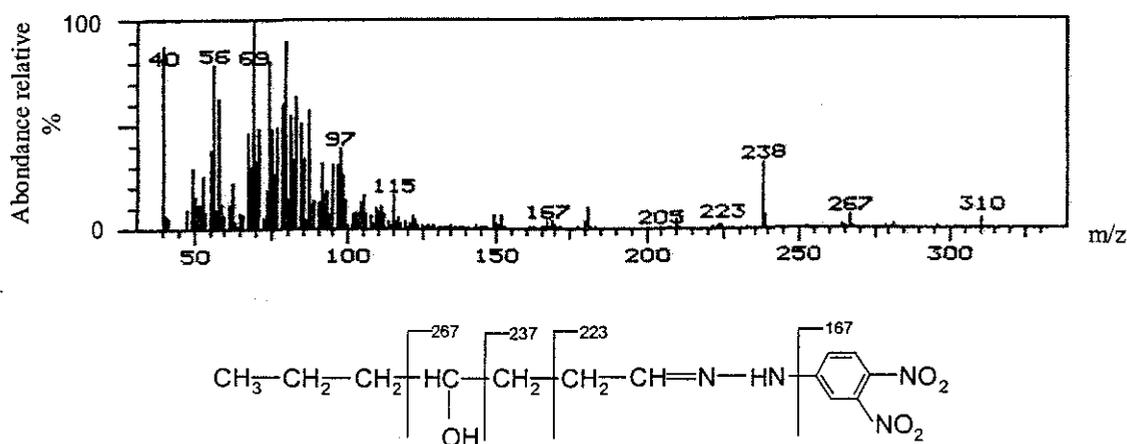


Figure 26 : Spectre EI du 4-hydroxyheptanal-DNPH ($M=310$).

Le spectre suivant (fig. 27) pourrait être attribué à la 2,4-dinitrophénylhydrazone d'un nonadienal ($M=318$). Or dans ce cas précis le composé analysé est en fait la 2,4-dinitrophénylhydrazone du **4-hydroxynonéal** que nous avons préparé à partir de l'aldéhyde témoin.

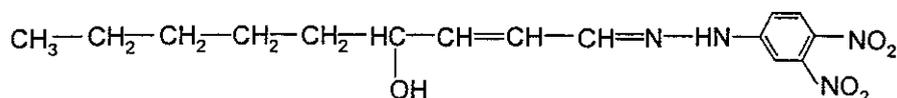
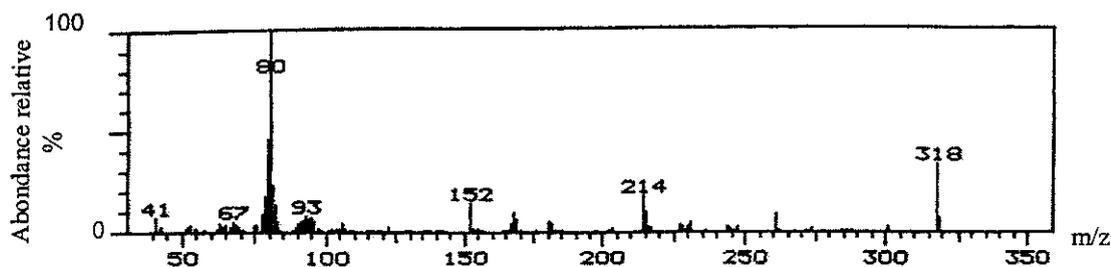


Figure 27 : Spectre EI du 4-hydroxynonanal-DNPH (M=336).

Il est aisé de dire dans ces conditions qu'il y a eu déshydratation mais il faut bien reconnaître qu'en l'absence de toute autre donnée concernant la molécule analysée, l'interprétation du spectre de masse peut conduire à une identité erronée.

La déshydratation est un phénomène très connu en spectrométrie de masse mais cependant déroutant car parfois imprévisible. C'est ainsi que malgré une masse moléculaire élevée et la présence de trois groupes hydroxyle, nous avons obtenu par oxydation du linoléate de méthyle le composé suivant :

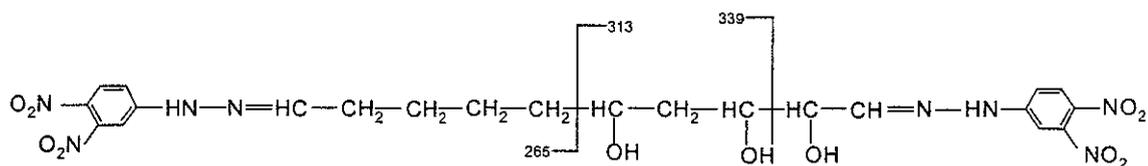
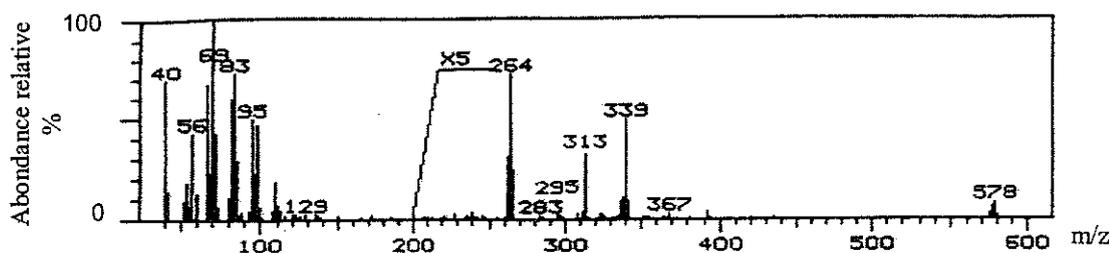


Figure 28 : Spectre EI du 2,3,5-trihydroxy-1,10-décanedial-DNPH (M=578).

Par la suite, nous avons tenté de protéger les groupes hydroxyle par **silylation** à l'aide de méthyltriméthylsilyl-trifluoroacétamide (MSTFA). Ce réactif, utilisé avec succès pour la silylation d'hydroxyaldéhydes sous forme d'oximes (Loidl-Stahlhofen and Spiteller, 1994 ; Loidl-Stahlhofen *et al.*, 1995) s'est révélé assez décevant dans notre cas. Il présente bien sûr

l'inconvénient d'augmenter de façon importante la masse moléculaire mais surtout il occasionne avec les 2,4-dinitrophénylhydrazones la formation de nombreux produits secondaires que nous n'avons pas étudiés de façon approfondie. Toutefois, nous avons pu mettre en évidence que parmi ceux-ci, certains proviennent d'une réaction qui ne semble pas, à notre connaissance, avoir été décrite dans le cas des 2,4-dinitrophénylhydrazones. Elle est en revanche signalée dans le cas où la fonction aldéhydique est libre (Ende and Luftman, 1984). Les figures 29 et 30 montrent deux exemples de ce type de transformation où le reste DNPH a été totalement remplacé.

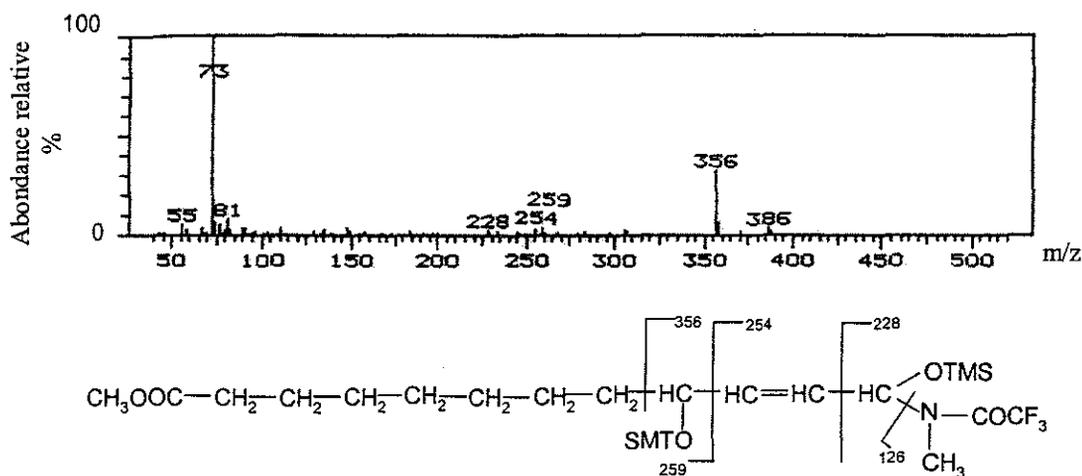


Figure 29 : Spectre EI du 9-hydroxy-12-oxo-dodécanoate de méthyle (silylé) (M=513).
TMS = -Si(CH₃)₃.

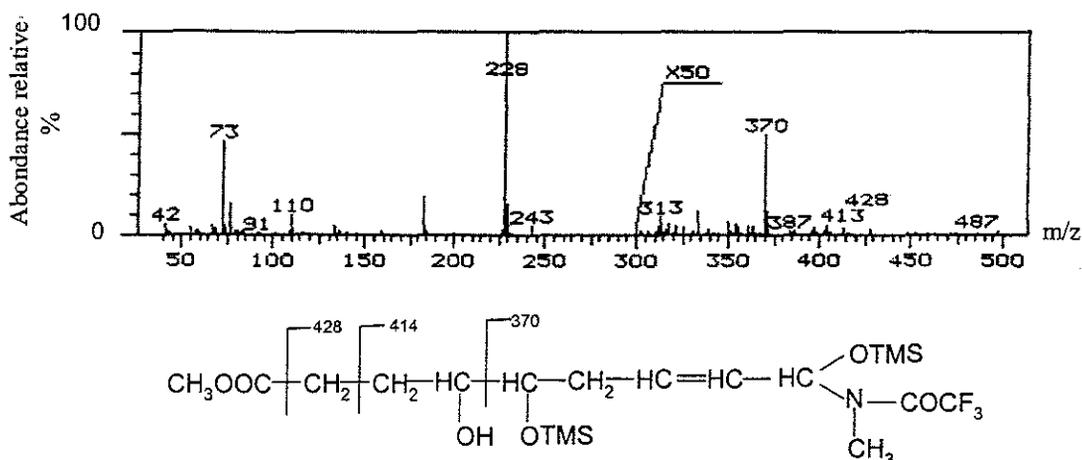


Figure 30 : Spectre EI du 4,5-dihydroxy-9-oxo-nonanoate de méthyle (silylé) (M=487).
TMS = -Si(CH₃)₃.

La GC-MS nous a été d'un grand secours pour l'analyse, dans un premier temps, des substances éluées directement à partir de CCM. Il faut toutefois souligner que les temps de rétention et même l'ordre d'éluion des composés d'un mélange sont très différents en phase gazeuse et en CLHP. Il existe donc une impossibilité de transposer les résultats acquis par une méthode vers l'autre. C'est pourquoi nous avons eu recours de façon plus systématique à la spectrométrie de masse couplée à CLHP.

2.1.3.2. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide haute performance (LC-MS)

De la même manière que dans le cas du couplage GC-MS, nous avons procédé à l'analyse des produits d'oxydation des acides gras séparés préalablement par CCM en plusieurs fractions. Les échantillons repris par de la phase mobile sont injectés dans le chromatographe couplé au dispositif d'ionisation en électrospray (ESI). Cette dernière consiste à appliquer à un liquide (éluat de la colonne) circulant à faible débit dans un tube capillaire, un champ électrique de plusieurs kV. L'accumulation des charges à la surface du liquide provoque à la sortie du capillaire la formation de gouttelettes hautement chargées. L'évaporation du solvant contenu dans les gouttelettes conduit à une diminution de leur volume jusqu'à leur explosion. Il en résulte des gouttelettes plus petites jusqu'au moment où le champ électrique à leur surface est suffisant pour amener la désorption des ions acheminés ensuite vers l'analyseur (De Hoffman *et al.*, 1999).

Nous avons pu ainsi analyser toutes les fractions tant polaires que non polaires séparées par CCM.

L'exemple illustré par la figure 2 de notre *publication n°2* montre le résultat d'analyse d'une fraction non polaire provenant de l'oxydation de linoléate de méthyle.

Dans le cas du linoléate de méthyle, les produits identifiés dans la **fraction non-polaire** font l'objet du tableau V.

Tableau V : Produits d'oxydation (dérivés DNPH) non-polaires du linoléate de méthyle.

Aldéhyde	Masse moléculaire (dérivé DNPH)	Temps de rétention (min)	
		Mode gradient	Mode isocratique
acétaldéhyde	224	5,5	5,5
propanal	238	7,6	6,7
buténal	250	15,2	8,2
butanone	252	14,1	8,5
butanal	252	17,2	8,9
penténal	264	17,1	8,5
pentanone	266	20,1	11,6
pentanal	266	22,6	11,7
hexanal	280	25,1	15
hepténal	292	30,1	19,9
heptanal	294	29,5	21,7
octénal	306	33,9	28
nonadiénal	318	35,1	31,2
nonénal	320	36,2	39,9

Les conditions CLHP sont décrites dans la légende de la figure 20 (mode isocratique) et dans la *publication n°2* (mode gradient).

Un des avantages de cette méthode de spectrométrie de masse réside également dans la possibilité d'analyser des **dérivés polaires** généralement très instables en GC-MS. Ainsi, dans l'oxydation du linoléate de méthyle, un grand nombre d'aldéhydes mono- et dihydroxylés et possédant un degré variable d'insaturation ont été caractérisés (tableau VI).

Tableau VI : Composés hydroxyaldéhydiques (dérivés DNPH) identifiés parmi les produits d'oxydation du linoléate de méthyle.

Aldéhyde	Masse moléculaire (dérivé DNPH)	Temps de rétention (min)	
		Mode gradient	Mode isocratique
<i>Hydroxycanals</i>			
hydroxyhexanal	296	5,7	5,7
hydroxyheptanal	310	15,3	7,2
hydroxydécaneal	352	21,4	10,1
hydroxyundécaneal	366	25,3	14,2
<i>Dihydroxycanals</i>			
dihydroxyheptanal	326	4,9	4
dihydroxyoctanal	340	7	4,7
dihydroxydécaneal	368	21,2	9,9
dihydroxyundécaneal	382	5,7	5,7
dihydroxydodécaneal	396	14,6	6,8
dihydroxytridécaneal	410	19,3	8,5
<i>Hydroxycénals</i>			
hydroxyhepténal	308	20,5	10
4-hydroxynonénal	336	19,6	9,1
hydroxydécénal	350	19,3	8,5
<i>Dihydroxycénals</i>			
dihydroxyundécénal	380	28,5	18,5
dihydroxydodécénal	394	25,8	14,2
dihydroxytétradécénal	422	19,3	8,5
<i>Hydroxycadiénals</i>			
Hydroxynonadiénal	334	24,1	12,2
dihydroxyundécadiénal	378	27,7	18
dihydroxydodécadiénal	392	31	24,1
dihydroxytétradécadiénal	420	23,2	11,5

Nous présentons dans la figure 31 les résultats obtenus en LC-MS à partir d'une fraction CCM (R_f : 0-0,1) provenant de l'oxydation de linoléate de méthyle. Les spectres correspondant à quelques-uns des composés identifiés sont donnés à titre d'exemple dans les figures 32 et 33.

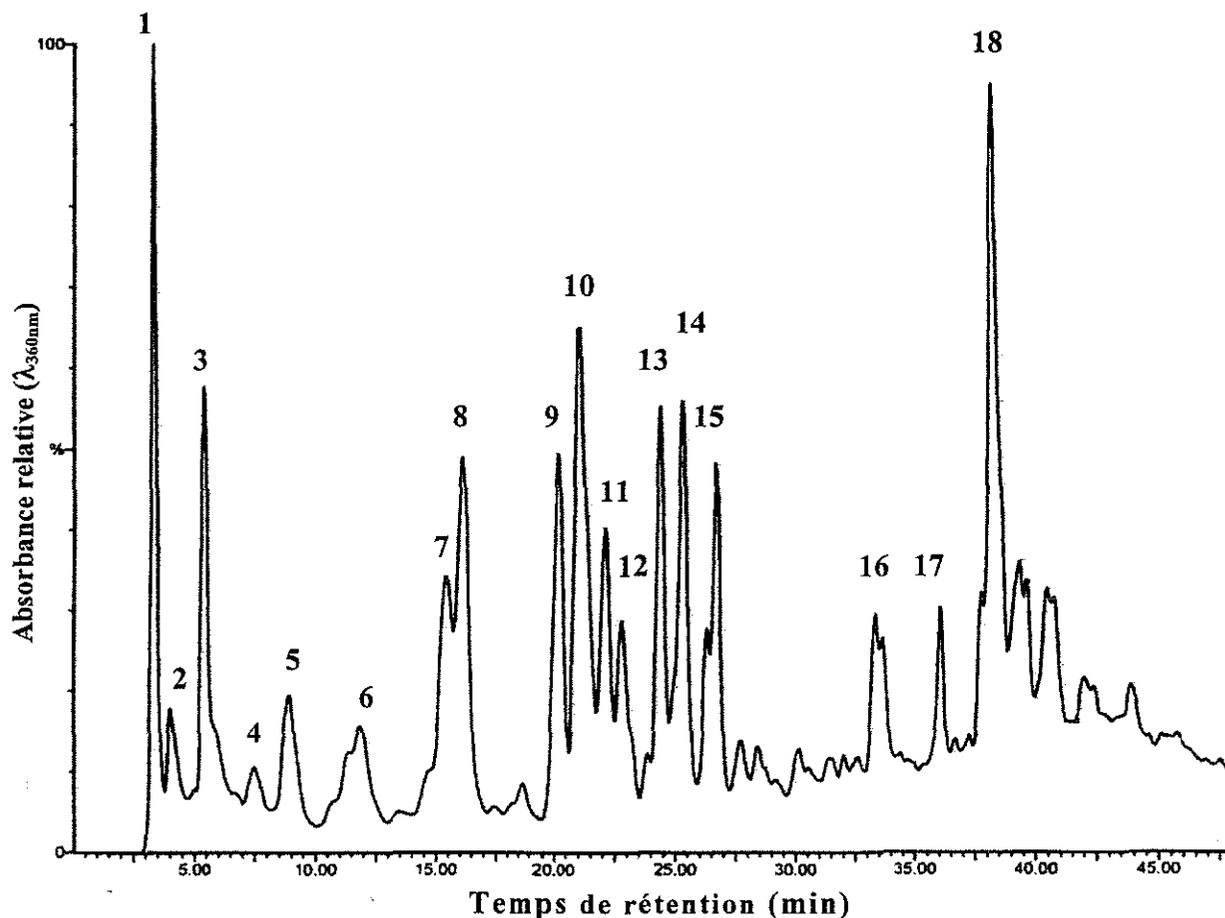


Figure 31 : Profil chromatographique des composés carbonylés (dérivés DNPH) identifiés par LC-MS dans une fraction polaire (R_f : 0 - 0,1) de linoléate de méthyle oxydé (détection UV λ_{360} nm).

1 à 3 : inconnus ; 4 : hydroxyhexanal et 6-hydroxy-9-oxo-nonanoate de méthyle ; 5 : dihydroxyoctanal et dihydroxytétradécadiénal ; 6 : dihydroxyoctanal, dihydroxypentadécanal ; 7 : dihydroxydodécanal ; 8 : hydroxyheptanal ; 9 : hydroxydécenal, dihydroxytridécanal, et dihydroxytétradécenal ; 10 : 4-hydroxynonéal ; 11 : hydroxyheptéal, dihydroxydécenal ; 12 : hydroxydécenal, dihydroxydécenal, 13 : dihydroxytétradécadiénal ; 14 : hydroxynonadiénal ; 15 : hydroxyundécenal et dihydroxydodécenal ; 16 : hydroxy-oxo-octadécadiénoate de méthyle et dihydroxy-oxo-octadécadiénoate de méthyle ; 17 : 9-hydroxy-10-oxo-décanoate de méthyle (osazone) ; 18 : hydroxy-oxo-décénoate de méthyle.

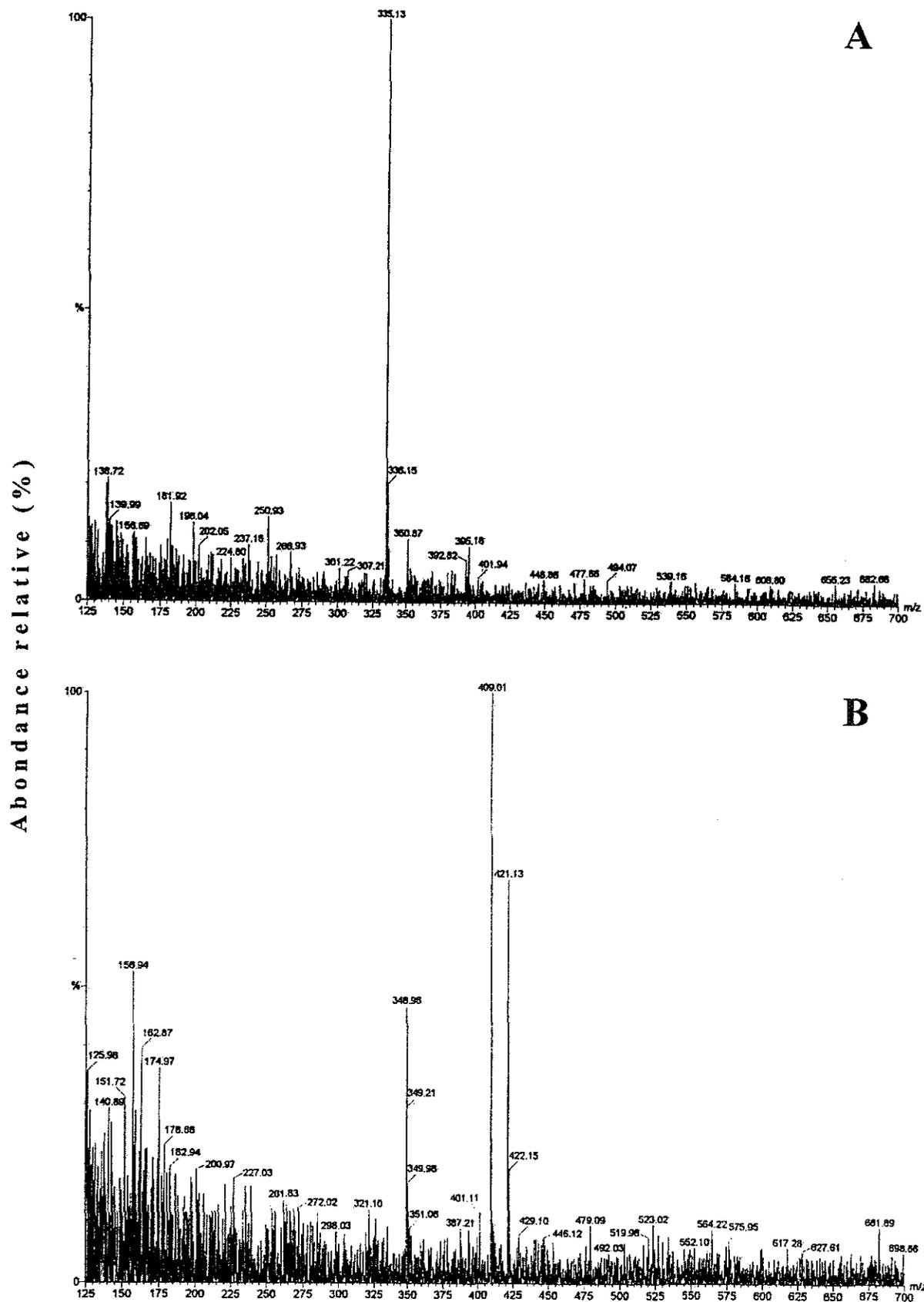


Figure 32 : Spectres ESI : (A) : 4-hydroxynonéal-DNPH, $[M-H]^- = 335$; (B) : hydroxydécéal-DNPH, $[M-H]^- = 349$, dihydroxytridécéal-DNPH, $[M-H]^- = 409$, dihydroxytétradécéal-DNPH, $[M-H]^- = 421$.

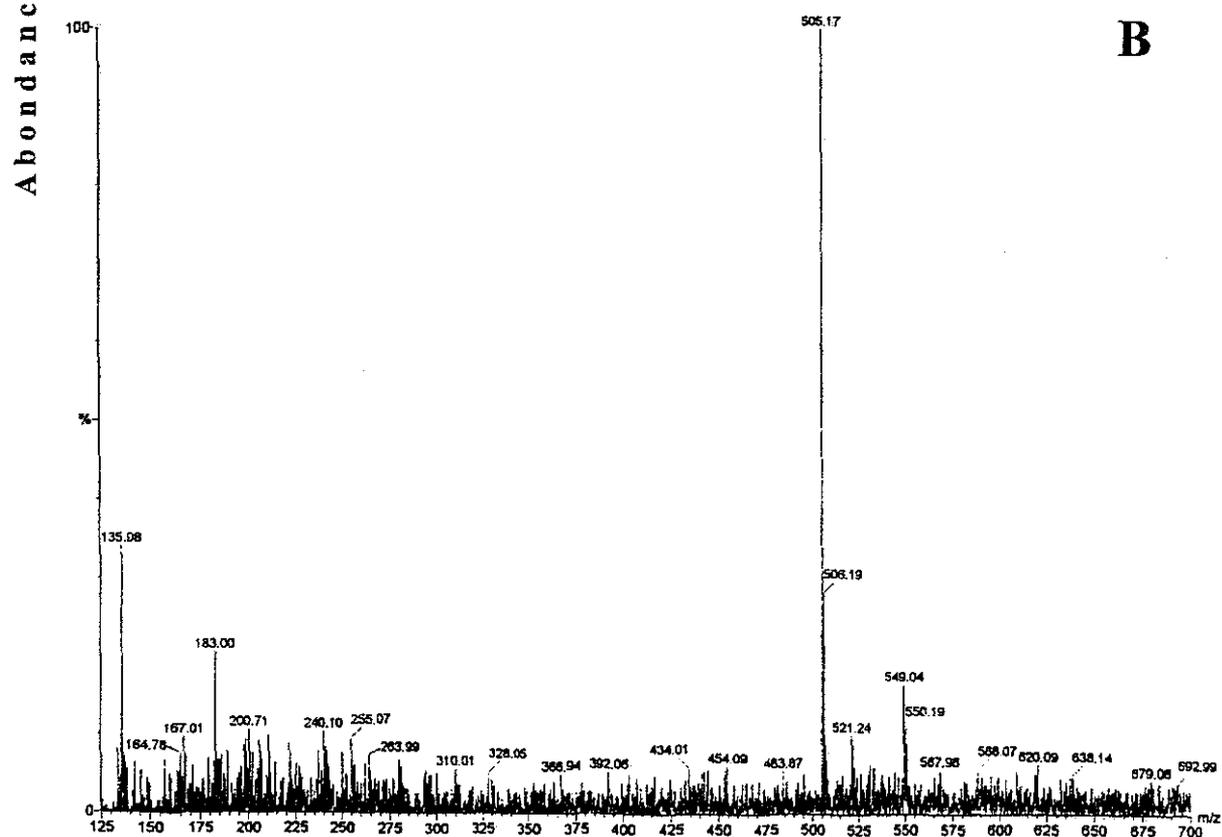
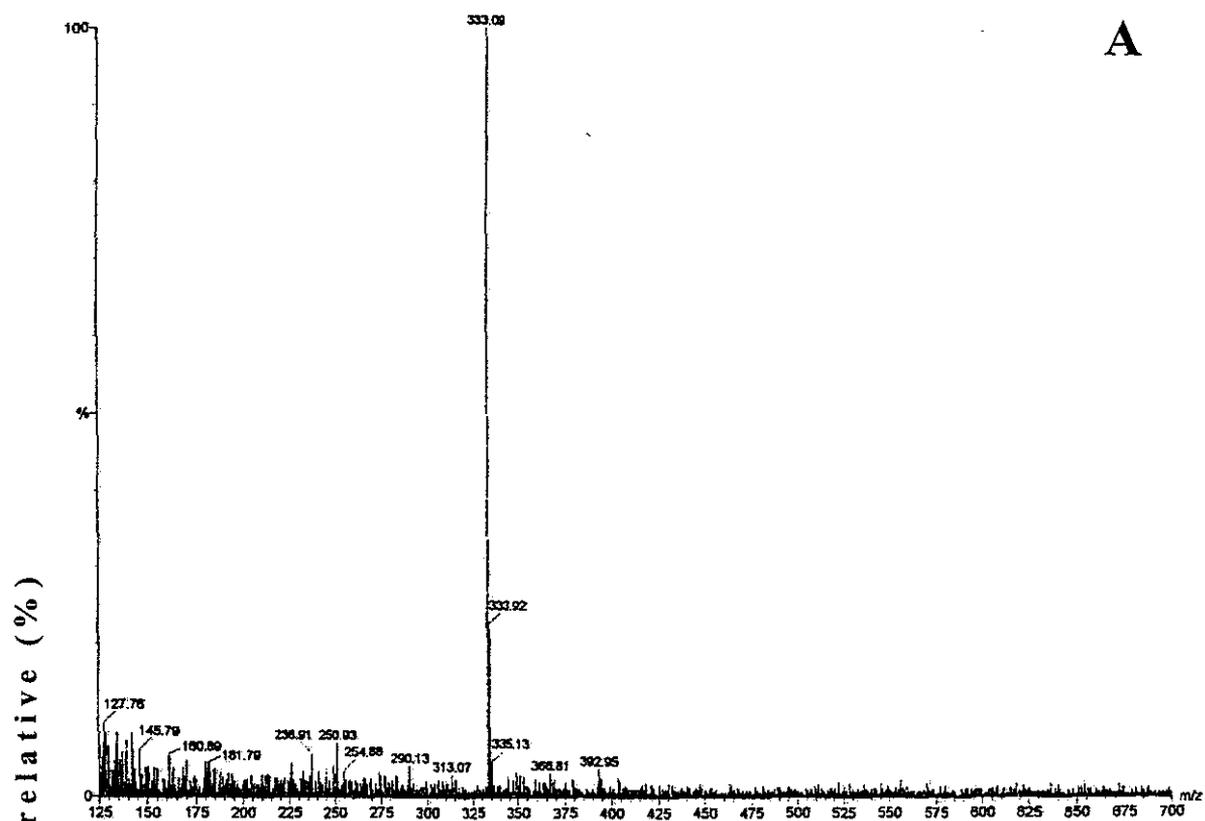
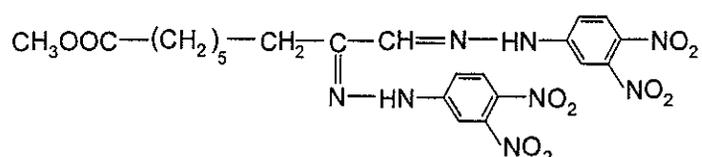


Figure 33 : Spectres ESI : (A) : 4-hydroxynonadiénal-DNPH, $[M-H]^- = 333$; (B) : hydroxy-oxo-décénoate de méthyle-DNPH, $[M-H]^- = 505$.

Il est à noter que si la presque totalité des composés identifiés est constituée par les hydroxyaldéhydes et, parmi eux le 4-hydroxynonanal majoritaire, la présence d'hydroxyoxoacides ou d'hydroxydialdéhydes doit aussi être soulignée. D'ailleurs, la complexité de la fraction analysée est encore beaucoup plus grande que ne le laisse paraître le profil CLHP ci-dessus puisque, ainsi que le montre par exemple la fig. 32 B, l'analyseur de masse détecte encore plusieurs composés sous le même pic.

Enfin, l'analyse d'une fraction appartenant à la zone II d'une CCM (R_f 0,3) s'est avérée être surtout constituée par des **osazones** ainsi que le laissait soupçonner le passage du jaune au violet de la zone après pulvérisation d'une solution de potasse alcoolique. La formation d'osazones à partir de produits résultant de l'oxydation lipidique a été déjà signalée à différentes reprises (Esterbauer *et al.*, 1982, Poli *et al.*, 1985), mais leur structure est restée indéterminée jusqu'à assez récemment (Loidl-Stahlhofen and Spiteller, 1994, Loidl-Stahlhofen *et al.*, 1994). Elle résulte, comme dans le cas des oses, de la présence d'un hydroxyle en position α par rapport à la fonction aldéhyde et non comme on pouvait l'envisager d'un groupe α,β -dicétone.

Pour notre part, nous avons caractérisé trois osazones homologues en C₉, C₁₀ et C₁₁ ayant pour masse moléculaire respectivement 560, 574, 588. L'osazone en C₉ est représentée ci-dessous :



Osazone de 8-hydroxy-9-oxo-nonanoate de méthyle (M=560)

2.2. Oxydation des acides gras par le système GGT/GSH/Fe³⁺

Nous tenons à souligner tout particulièrement, ainsi que nous l'avons déjà fait dans l'introduction de ce chapitre, que tout le développement analytique que nous venons d'exposer n'avait pas d'autre but que de permettre, par comparaison des profils HPLC, l'identification des produits d'oxydation obtenus par action du système GGT/GSH/Fe³⁺ sur des acides gras polyinsaturés.

L'utilisation de l'enzyme purifiée et non pas d'un système cellulaire comme dans le chapitre I a été dictée par la nécessité d'un modèle simple d'étude de ce processus complexe qui est la peroxydation lipidique.

Les conditions d'oxydation par ce système ont été les suivantes : acide linoléique ou linoléique (esters méthyliques) 1 mM, GSH 2 mM, gly-gly 20 mM, Fe³⁺-EDTA 150 : 165 µM, GGT (Sigma) 200mU/ml, tampon phosphate 50 mM pH 7,4. La réaction est déclenchée par l'addition du GSH et poursuivie à 37°C durant 2 heures, avec agitation. Des témoins privés soit de GGT soit de GSH soit de Fe³⁺ sont préparés également. La réaction est arrêtée par l'addition du réactif de dérivation (1 ml DNPH/HCl 1M) et fermeture des tubes sous azote.

Du fait que dans ces conditions les acides gras sont soumis à la fois à une auto-oxydation accélérée sous l'influence de l'agitation et de la température et à l'action du système GGT/GSH/Fe³⁺, il est important de déterminer la part que le système enzymatique représente dans la formation des produits d'oxydation.

Grâce à l'établissement d'une gamme à partir de 2,4-dinitrophénylhydrazone d'heptanal nous avons pu doser de façon globale par spectrophotométrie UV ($\lambda_{360 \text{ nm}}$) les dérivés carbonylés en fin d'incubation.

De la comparaison des valeurs obtenues par l'oxydation du linoléate de méthyle en présence du système GGT/GSH/Fe³⁺ et des témoins dépourvus de GGT et/ou de GSH et Fe³⁺(tableau VII) il ressort sans ambiguïté que la GGT joue un rôle dans l'oxydation des acides gras insaturés dans ce modèle *in vitro*. Dans ces conditions, on peut assurer que même dans le cas du plus mauvais rendement, au moins 50% des produits aldéhydiques totaux formés proviennent de l'activité du système GGT/GSH/Fe³⁺.

Tableau VII : Estimation de la quantité totale des dérivés DNPH formés par l'oxydation GGT/GSH/Fe³⁺ du linoléate de méthyle.

Système d'oxydation	Dérivés carbonylés totaux (nmoles)
GGT/GSH/Fe ³⁺	568,7 ± 45,5
GSH/Fe ³⁺	197,3 ± 20,3
Fe ³⁺	153,0 ± 9,9
GSH	115,0 ± 12,7

L'identification des produits d'oxydation a été effectuée selon le même schéma que décrit précédemment et en particulier la séparation de leur 2,4-diphénylhydrazones en fraction polaire et non polaire par chromatographie sur couche mince.

A partir du linoléate de méthyle, nous avons ainsi pu identifier dans une fraction non polaire 9 aldéhydes de C₄ à C₁₀ (fig. 34 A). A titre de comparaison, la figure 34 B reproduit le profil CLHP d'une fraction également non polaire provenant de l'oxydation du linoléate de méthyle par le système ascorbate/Fe²⁺.

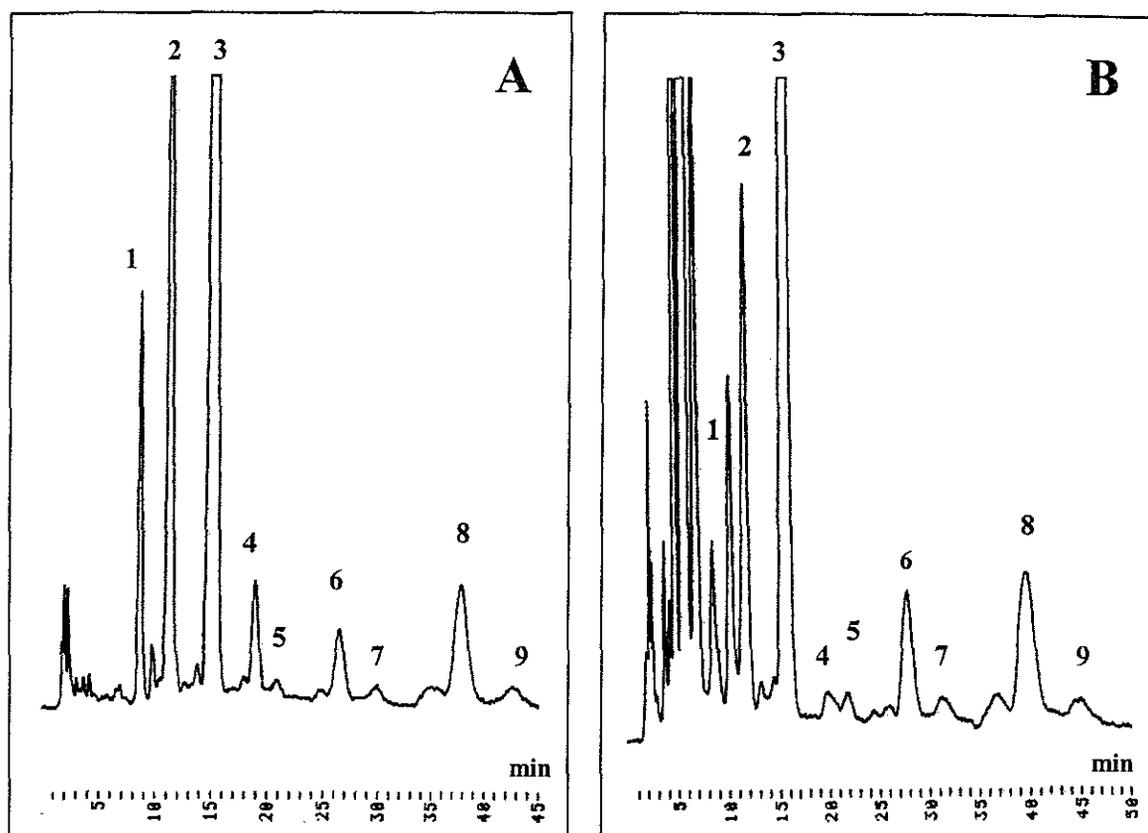


Figure 34 : Comparaison des profils CLHP de la fraction non-polaire (R_f 0,6) obtenue par l'oxydation du linoléate de méthyle par le système GGT/GSH/Fe³⁺ (A) et par le système ascorbate/Fe²⁺ (B). Produits d'oxydation communs (dérivés DNPH) : 1 : butanal ; 2 : pentanal ; 3 : hexanal ; 4 : heptanal ; 5 : heptenal ; 6 : octenal ; 7 : nonadienal ; 8 : nonenal ; 9 : dècadienal.

On constate alors que pratiquement tous les composés sont communs aux deux systèmes d'oxydation et que l'hexanal représente de loin le composé majeur dans les deux cas. Ces faits ont été largement confirmés par d'autres expériences dont deux parmi elles sont représentées dans le tableau VIII. On peut noter toutefois certaines différences parfois importantes entre les deux systèmes mais l'interprétation de ces différences reste difficile et ne semble pas devoir conduire à envisager un mécanisme d'action différent du système GGT/GSH/Fe³⁺ par rapport au système ascorbate/Fe²⁺.

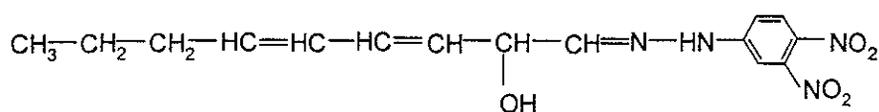
Tableau VIII : Comparaison des produits d'oxydation non-polaires formés par l'oxydation du linoléate de méthyle par les systèmes GGT/GSH/Fe³⁺ et ascorbate/Fe²⁺.

Pic N°	Aldéhyde	Système d'oxydation	
		GGT/GSH/Fe ³⁺	Ascorbate/Fe ²⁺
1	Butéanal	6,4	3,6
2	Pentanal	19,5	14,5
3	Hexanal	62,0	62,2
4	Heptéanal	2,4	0,2
5	Heptanal	0,3	0,1
6	Octéanal	2,5	6,5
7	Nonadiéanal	0,4	1,5
8	Nonéanal	5,6	10,6
9	Décadiéanal	0,5	0,5

Les quantités correspondant à chaque pic sont exprimées en % du total.

En ce qui concerne les fractions polaires, plusieurs hydroxyaldéhydes ont pu être caractérisés : hydroxypentéanal, hydroxyhexanal, hydroxyheptanal, hydroxyheptéanal, hydroxynonéanal, hydroxynonadiéanal, dihydroxydécanal, dihydroxyundécéanal. Quelques exemples sont représentés dans les profils CLHP illustrés par les figures 35 (A à C). On remarque en particulier la présence du dérivé du HNE (fig. 35A), bien séparé dans une des fractions analysées, ainsi que celle d'une osazone, à savoir l'osazone correspondant au 2-hydroxyhexanal (fig. 35 C).

L'identification des hydroxyaldéhydes comme produits d'oxydation par le système GGT/GSH/Fe³⁺, et particulièrement de ceux qui comme le 2-hydroxynona-3,5-diéanal possèdent une insaturation élevée revêt un caractère d'une grande importance.



2-hydroxy-nona-3,5-diéanal DNPH (M=334)

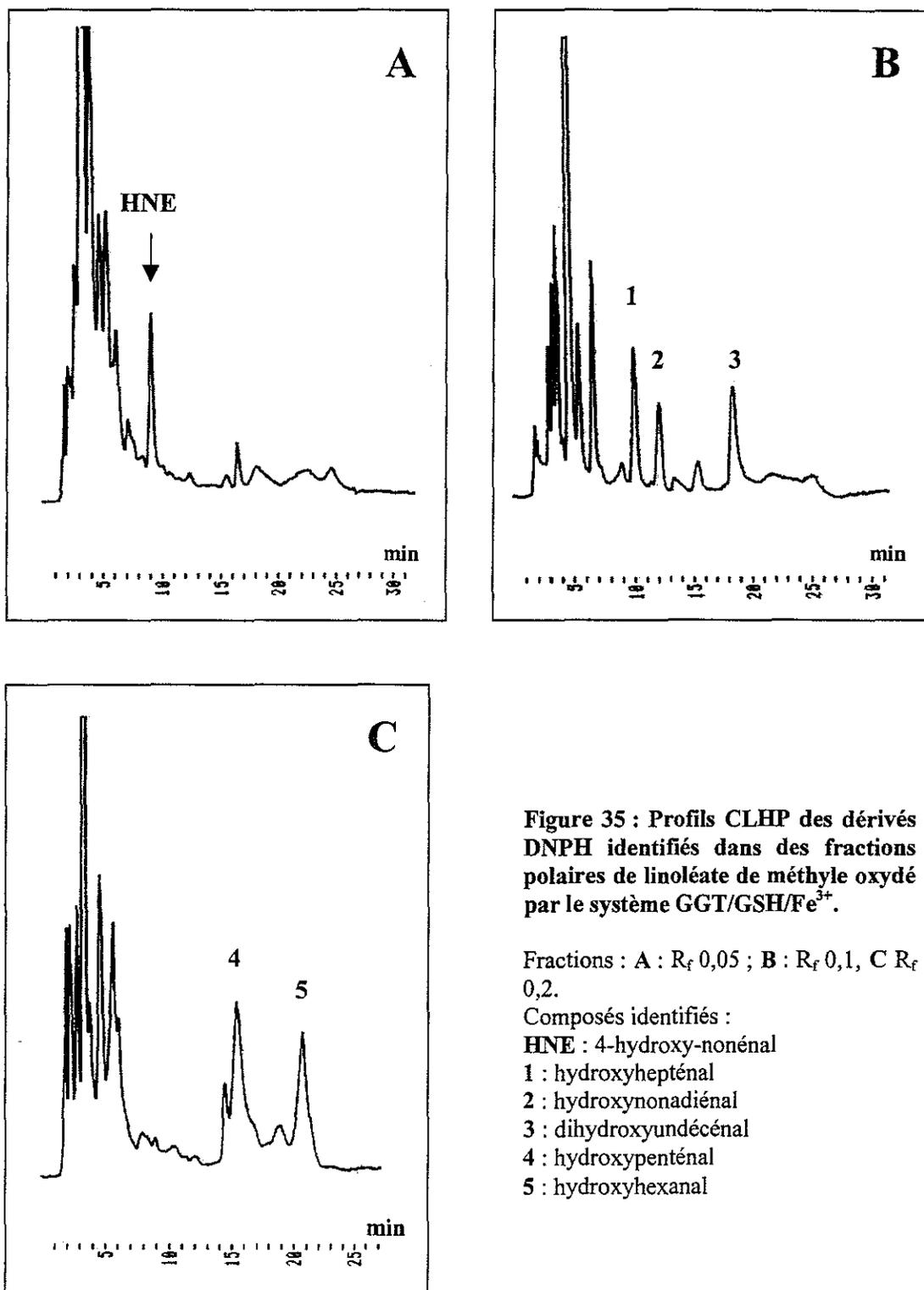


Figure 35 : Profils CLHP des dérivés DNPH identifiés dans des fractions polaires de linoléate de méthyle oxydé par le système GGT/GSH/Fe³⁺.

Fractions : A : R_f 0,05 ; B : R_f 0,1, C R_f 0,2.

Composés identifiés :

HNE : 4-hydroxy-nonéanal

1 : hydroxyheptéanal

2 : hydroxynonadiéanal

3 : dihydroxyundécéanal

4 : hydroxypentéanal

5 : hydroxyhexéanal

En effet, de tels composés présentent sur le groupe carbonyle une charge positive plus élevée que les aldéhydes non substitués et ils tendent à réagir spontanément avec des biomolécules. On peut donc envisager de leur part des effets toxiques similaires à ceux attribués à l'HNE.

Cette réactivité élevée peut également expliquer les faibles quantités que l'on détecte. En effet, lors de la CCM une partie des composés ne peut pas être éluée du gel de silice malgré l'utilisation de différents solvants. Ce phénomène qui n'a pas lieu lorsque l'oxydation est obtenue par le système ascorbate/ Fe^{2+} , nous amène à penser qu'une partie des produits d'oxydation forme des adduits avec les composants du milieu d'incubation, qui restent fortement liés à l'adsorbant. Il est connu que les 2-alcénals et les 4-hydroxyalcénals réagissent avec les thiols et les protéines par une réaction de type Michael (voir introduction). La présence des thiols (GSH et CysGly formée à partir du GSH), ainsi que d'une protéine (GGT) dans le système enzymatique d'oxydation serait favorable à la formation de tels adduits. Puisque nous avons identifié l'HNE parmi les produits d'oxydation en présence du système GGT/GSH/ Fe^{3+} et que celui-ci, à l'opposé d'autres hydroxyaldéhydes insaturés, est disponible en tant que réactif commercial, nous l'avons utilisé par la suite en tant que molécule modèle de l'oxydation induite par la GGT sur les lipides. Une étude plus approfondie de l'adduit du HNE avec les thiols (GSH, CysGly) et leur relation avec la GGT fait l'objet du chapitre suivant.

En conclusion, nos résultats apportent la preuve que le système GGT/GSH/ Fe^{3+} est capable d'oxyder les acides gras insaturés et confirment pleinement l'implication de la GGT dans la peroxydation lipidique. L'oxydation des acides gras par le système GGT/GSH/ Fe^{3+} conduit à une grande complexité de produits carbonylés : alcanals, alcénals, alcadiénals, α -hydroxyaldéhydes, 4-hydroxyalcénals, cétones. De plus, la formation des hydroxyaldéhydes insaturés hautement réactifs comme l'HNE et possédant des effets toxiques connus sur différentes fonctions cellulaires, suggère que le métabolisme du GSH par la GGT en présence de fer pourrait conduire à un processus toxique de peroxydation lipidique.

CHAPITRE III

Rôle de la GGT et de la GGT-rel dans le métabolisme de l'adduit glutathion-4-hydroxynonéal

La conjugaison du HNE avec le GSH est connue comme étant une voie importante de détoxification de ce produit hautement réactif issu de la peroxydation lipidique. Cette réaction, dont le mécanisme est décrit dans la figure 36 peut avoir lieu spontanément, mais la présence *in vivo* des enzymes GST, et surtout de celles qui manifestent une affinité élevée vis-à-vis du HNE (voir introduction) augmente de 300 à 600 fois sa vitesse. Le produit initial de la réaction est un thio-éther (1) qui subit ensuite un réarrangement pour former un hémiacétal cyclique (2), plus stable (Esterbauer *et al.*, 1975a). D'autres thiols réagissent également avec le HNE. Dans le cas de la cystéine, l'adduit formé initialement (3) réagit avec une deuxième molécule de cystéine conduisant ainsi à un diadduit (5) (dérivé de la thiazolidine) quand le thiol est présent en excès (Esterbauer *et al.*, 1975b).

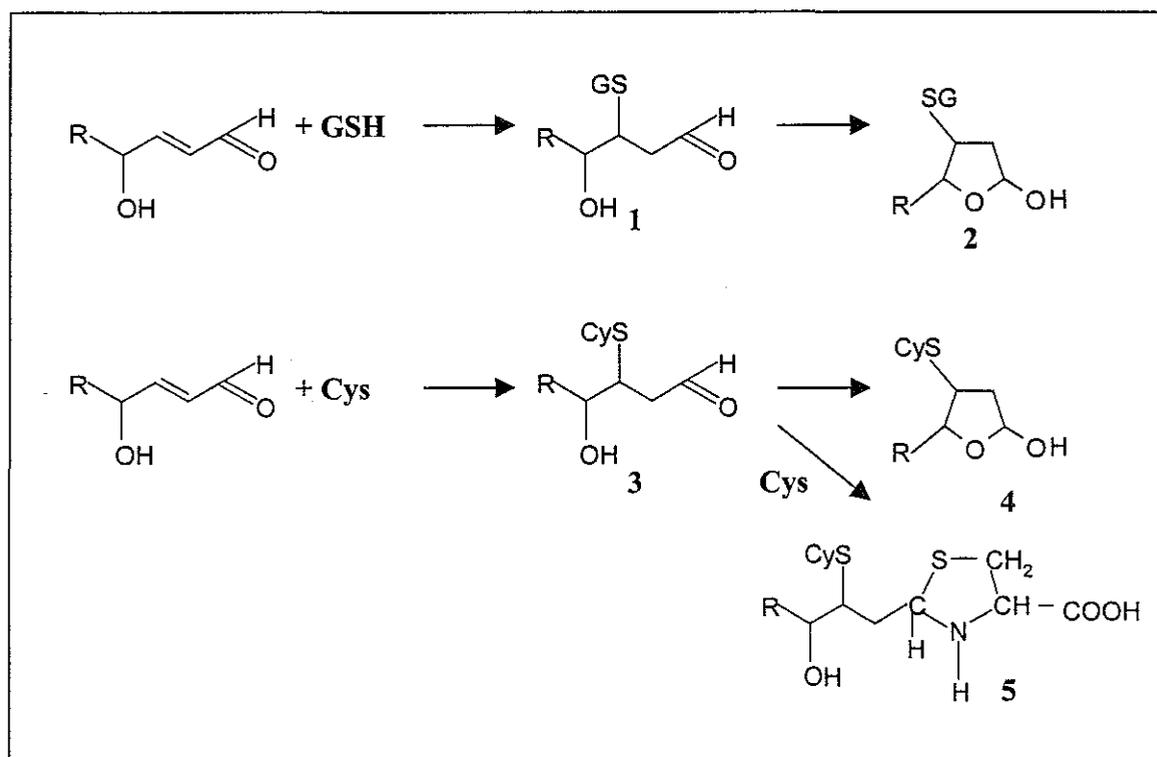


Figure 36 : Réaction du glutathion et de la cystéine avec les 4-hydroxyalcénals (d'après Esterbauer *et al.*, 1991).

Des réactions similaires ont lieu entre les aldéhydes α,β -insaturés et les thiols, mais à l'exception de l'acroléine, les adduits des aldéhydes α,β -insaturés sont nettement moins stables que les adduits des hydroxycénales. En solution aqueuse ils se dissocient, libérant les composés parentaux. (Esterbauer *et al.*, 1975a).

In vivo, le conjugué GS-HNE est ensuite métabolisé en un produit final dérivé de l'acide mercapturique (HNE-MA), qui a été identifié dans l'urine chez le rat (Alary *et al.*, 1995 ; Petras *et al.*, 1995).

D'autre part, dans le cas de certains composés, le métabolisme de leurs conjugués au GSH par la voie de l'acide mercapturique conduit à la formation de métabolites toxiques (Commandeur *et al.*, 1995).

Bien que d'une manière générale l'implication de la GGT dans la voie de biosynthèse des acides mercapturiques soit connue (Curthoys and Hughey, 1979), son rôle dans le métabolisme du conjugué GS-HNE n'a pas été jusqu'à présent étudié et, à notre connaissance, il n'existe dans la littérature aucune donnée concernant les effets biologiques éventuels des métabolites intermédiaires du GS-HNE formés par la voie de l'acide mercapturique.

Nous nous sommes donc proposé d'étudier dans un modèle cellulaire d'une part, le rôle éventuel de la GGT ainsi que celui de la GGT-rel dans le métabolisme du GS-HNE et d'autre part, d'étudier les conséquences que ce métabolisme peut entraîner au niveau cellulaire et plus particulièrement en ce qui concerne la cytotoxicité.

De plus, nous nous proposons de mettre en évidence la formation et éventuellement le métabolisme de l'adduit GS-HNE au cours de la peroxydation lipidique dépendante de la GGT.

3.1. Rôle de la GGT dans le métabolisme et la cytotoxicité de l'adduit glutathion-4-hydroxynonéal

Dans le cas de la GGT, l'étude que nous avons réalisée pour répondre aux objectifs énoncés ci-dessus a fait l'objet de la *publication n°3* :

M. Enoiu, R. Herber, R. Wennig, C. Marson, H. Bodaud, P. Leroy, N. Mitrea, G. Siest and M. Wellman

γ-glutamyltranspeptidase-dependent metabolism of 4-hydroxynonenal-glutathione conjugate and resulting cytotoxicity

Free Radic. Biol. Med., soumis.

Les résultats obtenus dans cette étude nous ont permis de montrer que :

- a) **la GGT purifiée ainsi que l'enzyme exprimée par les cellules V79GGT sont capables de métaboliser le GS-HNE**
- b) **le seul métabolite qui en résulte est l'adduit CysGly-HNE dont la structure a été confirmée par spectrométrie de masse**
- c) **le métabolisme du GS-HNE par les cellules V79GGT provoque une augmentation de la cytotoxicité par rapport aux cellules V79Cl qui ne métabolisent pas le GS-HNE**

**γ -glutamyltranspeptidase-dependent metabolism of
4-hydroxynonenal-glutathione conjugate and resulting cytotoxicity**

Milica Enoiu^{†,§}, Régine Herber[†], Robert Wennig[‡], Claude Marson[‡], Haline Bodaud[†], Pierre Leroy[†], Niculina Mitrea[§], Gérard Siest[†] and Maria Wellman[†]

[†] EA 3117, Faculty of Pharmacy, University Henri Poincaré Nancy 1, BP 403, 54001 Nancy Cedex, FRANCE.

[‡] Department of Toxicology, National Laboratory of Health, University Center of Luxembourg, BP 1102, 1011 Luxembourg, LUXEMBOURG

[§] Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University Carol Davila, 6, Traian Vuia, 70139 Bucarest, ROMANIA

Acknowledgements:

We thank Dr. Jean Villoutreix for his valuable advices on development of analytical procedures and helpful contribution to manuscript editing, and Professor Nils Erik Huseby (Tromso, Norway) for his critical reading of the manuscript. This work was partially supported by a grant from l'Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique et Technologique en Champagne-Ardennes (ARERS). The financial support accorded by Le Ministère des Affaires Etrangères de France for research training of M. Enoiu in Nancy is gratefully acknowledged.

Corresponding author : Maria Wellman, EA 3117, Faculty of Pharmacy, BP 403, F-54001 NANCY Cedex, FRANCE, Phone : 33 03 83 17 88 23, Fax : 33 03 83 31 13 22, E-mail : wellman@ctrmed.u-nancy.fr

Running title: GGT-dependent metabolism and cytotoxicity of GS-HNE

Abstract

A major pathway for detoxication of the highly reactive lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2,3-*trans*-nonenal (HNE) is through the conjugation with glutathione (GSH). We have studied the metabolism of GS-HNE conjugate by the enzyme gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), which is catalysing the first step of the mercapturic acid pathway. We found that purified GGT, as well as a GGT-overexpressing fibroblast cell line (V79 GGT) metabolized GS-HNE in a time-dependent manner. Using mass spectrometry analysis we demonstrated for the first time that cysteinylglycine-HNE (CysGly-HNE) is the GGT metabolite of GS-HNE. Furthermore, the GGT-dependent metabolism of GS-HNE in the V79 GGT cell line expressing GGT was associated with a considerable increase of cytotoxicity as compared to a control cell line which is not expressing GGT (V79 Cl). The cytotoxic effect was dose- and time- dependent (100% cellular death at 200 μ M GS-HNE after 24 h incubation) in V79 GGT cells, whereas no decrease of viability was observed in V79 Cl cells. A similar cytotoxic effect was obtained when cells were incubated directly with CysGly-HNE, demonstrating that this GGT-dependent metabolite unlike GS-HNE, exhibits cytotoxic properties. Based on the present results, the metabolism of GS-HNE has to be reconsidered, since GGT transforms it into a reactive metabolite. The biological significance of this metabolic activation is discussed.

Keywords: 4-hydroxynonenal, glutathione-4-hydroxynonenal conjugate, cysteinylglycine-4-hydroxynonenal conjugate, γ -glutamyltranspeptidase, metabolism, cytotoxicity.

Introduction

4-Hydroxy-2,3-*trans*-nonenal (HNE) is a highly reactive lipid peroxidation product (LPO) generated during peroxidation of *n*-6 polyunsaturated fatty acids such as linoleic and arachidonic acids [1]. Numerous studies have associated damage induced by oxidative stress with the formation of HNE, which presents cytotoxic and genotoxic effects and interferes with a broad number of cellular functions: gene expression, protein and nucleic acids synthesis, cell proliferation and enzymatic activities [2,3]. The toxicity of HNE is correlated with its high chemical reactivity, which is determined by the presence of 3 functional groups: the aldehyde group, the ethylene bond and the hydroxyl group. HNE easily reacts under physiological conditions with biomolecules with sulphydryl groups by a Michael addition reaction [4]. Such a reaction takes place with endogenous low molecular mass thiols such as glutathione (GSH), coenzyme A, cysteine [4,5] and also with the thiol groups of proteins. The formation of covalent protein adducts is correlated with inactivation of several enzymes [6,7] and with the atherogenicity of HNE [8]. HNE may also form adducts with DNA by reacting with deoxyguanosine [9].

In mammalian cells, HNE is metabolized very rapidly to less reactive compounds. The effective detoxification of HNE represents an antioxidative defense which protects proteins against damage induced by LPO aldehydic products. In the last few years, much attention has been paid to the identification of HNE metabolic products. *In vitro* studies carried out with cells [10-13], subcellular fractions [14-15] and isolated perfused organs [16-17] have pointed out three main pathways of HNE metabolism. These are: (i) oxidation to 4-hydroxynonenic acid (HNA) by aldehyde dehydrogenase, (ii) reduction to 1,4-dihydroxynonene (DHN) by alcohol dehydrogenase and aldose reductase and (iii) conjugation with GSH. The conjugation with GSH seems to be the major antioxidative defense system. The spontaneous reaction of HNE with GSH, the major intracellular thiol, is accelerated 300-600 fold by the glutathione transferase (GST) enzymes [18]. Several GSTs including human GST A4-4 [19], GST 5.8 [20] and rat GST 8-8 [21] show a high catalytic activity towards HNE. End metabolites of HNE in rat urine were identified as mercapturic acid (MA) conjugates of HNE, DHN, HNA and HNA lactone [22, 23] and, more recently, dicarboxylic acids and related mercapturic acid conjugates [24].

It is well known that the metabolic pathway for the renal transformation of GSH conjugates to mercapturic acids involves cleavage of γ -glutamyl moiety by gamma-glutamyltranspeptidase

(GGT), followed by cleavage of glycine by dipeptidase and N-acetylation by cysteine conjugate-N-acetyltransferase [25]. Although the HNE-mercapturic acid was identified as an end metabolite of HNE [22, 23], the involvement of GGT in the metabolism of GS-HNE (or other HNE metabolites conjugated with GSH) has not been directly demonstrated.

In a recent study [26] supplying direct evidence for the *in vivo* formation of GS-HNE, purified GGT was used to further confirm the GSH conjugate nature of GS-HNE formed spontaneously or enzymatically: GGT transformed the 3 diastereoisomers of GS-HNE conjugates as indicated by the modification of HPLC retention times. Nevertheless, no data clearly identified the products formed after GGT reaction on GS-HNE.

On the other hand, although GSH conjugation is mainly known as an important detoxification pathway, there are evidence indicating that several classes of compounds are converted, via conjugation with GSH, to cytotoxic, genotoxic or mutagenic metabolites. GSH conjugates of a variety of chemicals including many halogenated hydrocarbons are nephrotoxic [27]. Several studies demonstrated that formation of toxic intermediates from GSH conjugates requires processing through GGT-catalyzed reaction, which initiates the mercapturic acid synthesis pathway. This is the case of GSH conjugates of dichlorovinyl [28], bromobenzene [29], 2-bromohydroquinone [29, 30], hydroquinone [31], polyphenols [32], 17- β -estradiol and corresponding catechol estrogen metabolites [33] and also acrolein, an α,β -unsaturated aldehyde [34]. An inhibitor of GGT, acivicin, inhibited in most of cases the nephrotoxicity induced by the metabolism of these adducts.

In the present study we aimed to demonstrate the involvement of GGT in the GS-HNE metabolism, to identify the resulting metabolite and finally to verify if this metabolic step may result in an increase of toxicity of this compound as known for other GSH conjugates.

Materials and methods

Chemicals

HNE diethyl acetal purchased from OXIS International, Inc. (Portland, OR, USA) was hydrolyzed (0.02 mmol) just prior to use in 1 ml of 1 mM HCl (1h, 37°C). Free HNE was extracted by chloroform. After evaporation of the organic layer to dryness, the residue was

dissolved in water and HNE concentration was determined spectrophotometrically at 223 nm ($\epsilon=13750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

GSH, GGT (from bovine kidney) and *ortho*-phthalaldehyde (OPA) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); cysteinylglycine (CysGly) was from Bachem (AG, Bubendorf, Switzerland) and 2-mercaptoethanol (ME) was from Merck (Darmstadt, Germany).

All reagents and solvents were of analytical, HPLC or cell culture grade. Solutions were prepared using Milli-Q water (18.2 M Ω .cm).

Synthesis of GS-HNE

To obtain a complete transformation of HNE to GS-HNE adduct, 1 mM HNE was incubated with 10 mM GSH in 50 mM phosphate buffer (pH 7.8) at room temperature for 2 to 3 h. The reaction was monitored by following the decrease of absorbance at 223 nm. The absence of unreacted HNE was also verified using HPLC. GS-HNE adduct was stored in aqueous solution under nitrogen at -20°C .

For mass spectrometry (MS) analysis of the adduct, excess of GSH was removed by solid phase extraction (SPE) through a SEP-PAK C₁₈ cartridge (Waters, Millipore Corporation, Milford, Mass., USA). The cartridge was prewetted with methanol and equilibrated with water. After deposit of sample, the cartridge was rinsed with 5 ml 0.1 M sodium acetate buffer pH 5, 5 ml hexane and the adduct was eluted with 3 ml methanol. The SPE methanolic fraction was evaporated to dryness under nitrogen at a temperature which did not exceed 30°C and used for MS analysis.

Similar incubation conditions were used for the synthesis of the adduct of CysGly with HNE.

Enzymatic synthesis of CysGly-HNE

Samples containing 200 nmoles GS-HNE were incubated with 250 mU GGT in 50 mM phosphate buffer (pH 7.8) at 25°C . The conversion of GS-HNE into the corresponding CysGly-HNE conjugate was achieved after 150 min incubation, as indicated by HPLC

monitoring. For MS analysis of the resulting metabolite, its purification was performed by SPE as described above.

HPLC analysis of free HNE

The HPLC system consisted of a gradient pump Model L-6200 (Merck), a LiChrospher RP 18 end-capped column (125x4mm) and a L-4000 UV detector (Merck). Mobile phase was methanol-water (50:50 v/v) at a flow rate of 1 ml/min and the loop volume was 100 μ l. UV detection was done at 223 nm and the retention time of free HNE was *ca.* 7.5 min.

HPLC analysis of GS-HNE and CysGly-HNE as OPA-ME derivatives

The precolumn derivatization of amino group with OPA and ME was performed as follows : to 25 μ l of sample, 25 μ l of OPA-ME derivatization reagent was added, vortex-mixed and injected into the HPLC system after exactly 2 min. The derivatization reagent was prepared by dissolving 27 mg OPA in 0.5 ml ethanol and then adding 5 ml of 0.1 M sodium tetraborate and 50 μ l ME. This solution was kept at 4°C up to one week [35].

HPLC analysis was performed using the system described above equipped with a 20 μ l loop. Mobile phase A consisted of methanol - 0.15 M sodium acetate buffer pH 7 (40:60 v/v) and mobile phase B of methanol - sodium acetate buffer (70:30 v/v). Flow rate was 1 ml/min. A linear gradient from 100% A to 100% B during 30 min followed by a 5 min isocratic elution with 100% B permitted a good separation of OPA-ME derivatives of GS-HNE and CysGly-HNE, which were detected at 338 nm.

HPLC - Mass spectrometry of GS-HNE and Cys-Gly-HNE conjugates

The HPLC system consisted of a Finnigan TSP P4000 pump and a Waters XTerra MS C₁₈ 5 μ m (150x3.9 mm) column using a mobile phase of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The best separation was obtained using a linear gradient

changing from 5 to 20% B in 50 min, followed by a 10 min isocratic elution with 20% B. The flow rate was 0.2 ml/min.

The MS system consisted of a mass spectrometer LCQ-Duo equipped with an ion trap ThermoQuest Finnigan (San José, CA, USA). Mass spectral analyses were performed using electrospray ionization (ESI). The source voltage was 4.5 kV, the capillary voltage 20 V, the capillary temperature 200°C and the sheath gas flow 70 units (1.1 l/min).

Collision-induced dissociation (CID) spectra were recorded by applying a 20 V voltage in the first octapole region (ion source fragmentation). MS/MS spectra were recorded by applying kinetic energy to the ions in the trap, in order to induce collisions with helium damping gas (mass analyzer CID).

Cell lines

V79 Chinese hamster lung fibroblast cells transfected with human GGT cDNA and highly expressing GGT (V79 GGT) and V79 mock-transfected cells, exhibiting non-detectable endogenous GGT activity (V79 Cl) [36] were cultured in RPMI 1640 Gibco medium (Grand Island, NY, USA) supplemented with 5% fetal calf serum (Boehringer Mannheim; Mannheim, Germany), 100 units penicillin, 100 µg streptomycin and 0.25 µg amphotericin B per ml of medium, and 2 mM L-glutamine (Sigma Cell Culture). Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂/95% air.

For all experiments, cells were seeded in 24-well plates (Corning Costar Corp.; Cambridge, MA, USA) at 10⁵ cells per well 24 h before experiments, and were then at about 90% confluency.

Metabolism of GS-HNE in cells in culture

Adherent V79 GGT and V79 Cl control cells were gently washed with PBS and incubated for 3 h in PBS containing 200 µM GS-HNE at pH 7.4 in a CO₂ incubator. For kinetic measurements of GS-HNE and CysGly-HNE, aliquots of 25 µl medium were taken out at predetermined times and analyzed by HPLC.

For MS analysis of the GGT-metabolite of GS-HNE, medium of V 79 GGT cells incubated for 3 h in the presence of GS-HNE was collected and purified by SPE.

Cytotoxicity assays

For cytotoxicity assays, medium of 24 h cultured cells was replaced with 400 μ l RPMI medium containing 0.5% fetal calf serum and supplemented with 50 to 200 μ M GS-HNE, or 200 μ M CysGly-HNE. Incubations were performed for 3 to 24 h at 37°C in a CO₂ incubator. Cell viability was measured using MTT and Trypan Blue assays. For MTT assay, a volume of 40 μ l MTT (at a concentration of 5 mg/ml) was added to the medium of cells after incubation, and the cells were further incubated at 37°C for 30 min. Live cells transform yellow MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] into purple formazan, which was dissolved in 400 μ l DMSO after removing of medium and quantified by absorbance measurement ($A_{550\text{ nm}} - A_{690\text{ nm}}$) as an index of the relative number of live cells [37].

In the Trypan Blue exclusion test, only viable cells which do not take up the Trypan Blue stain were counted. In both assays, all individual values were related to the control values (=100%) obtained from untreated cells.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity released from the cytosol of damaged cells was measured using the LDH cytotoxicity detection kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), a colorimetric assay for the quantification of cell death and cell lysis. At the end of incubation, aliquots of cell-free medium were sampled and analysed for LDH activity according to the procedure of the manufacturer. A coupled enzymatic reaction leads to the reduction of tetrazolium salt INT to formazan, which is quantified spectrophotometrically ($A_{490\text{ nm}} - A_{690\text{ nm}}$). Results are expressed as absorbance values obtained after subtraction of corresponding untreated controls.

Statistical analysis

Statistical significance of data was assessed by the Student's *t* test; differences with $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Synthesis, HPLC and structural studies of GS-HNE and CysGly-HNE

GS-HNE conjugate was synthesized by direct reaction of HNE with GSH at pH 7.8. The HPLC analysis with OPA-ME precolumn derivatization showed a double peak for GS-HNE isoindolic adduct (retention times: 13.9 and 14.7 min), as already reported by Siems *et al* [10] (Fig. 1A). The response was linear in the examined concentration range (5 – 800 μ M); and the equation of regression line was $y = 133346x + 30144$ and correlation coefficient $r^2 = 0.998$. The detection limit for OPA derivative of GS-HNE was 25 pmoles per injection measured as a signal-to-noise ratio of *ca.* 3.

The identity of GS-HNE was confirmed by LC/MS analysis. The HPLC system used (acidic mobile phase) separated four peaks (Fig. 2, inset), each corresponding to the expected molecular mass of the conjugate ($[M+H]^+$ at m/z 464). The ESI-MS spectrum showed a pseudomolecular ion at m/z 486, corresponding to the adduct with sodium ($M+23$). The CID spectrum showed (Fig. 2), in addition to pseudomolecular ions $[M+H]^+$ (m/z 464) and $[M+Na]^+$, a fragmentation pattern in accordance with the structure of GS-HNE: a fragment at m/z 446 arising from the loss of water from the parent ion and fragments at m/z 308, 233, 179, and 139 corresponding to GSH, glutamylcysteine, CysGly and nonyl moieties, respectively, and in agreement with previous work of Boon *et al* [26].

In order to obtain a high yield of transformation of HNE into CysGly-HNE, we tried a direct synthesis of this adduct at the same conditions as for GS-HNE (10x excess of CysGly). The MS analysis of the obtained compound showed a pseudomolecular ion $[M+H]^+$ at m/z 495 which corresponds very likely to a diadduct of HNE with 2 molecules of CysGly. Such a reaction was described for cysteine (Cys); the monoadduct Cys-HNE condenses with a second molecule of Cys forming a thiazolidine derivative in the presence of a thiol excess [38]. However, the diadduct of CysGly with HNE obtained by direct synthesis with an excess of CysGly did not correspond to the structure of the expected adduct resulting from GGT-cleavage of γ -glutamyl moiety of GS-HNE.

An equimolar non-enzymatic synthesis of CysGly-HNE monoadduct should be possible in analogy with the synthesis of Cys-HNE [39], but expectedly with a lower efficiency.

We therefore prepared the CysGly-HNE monoadduct by enzymatic conversion of GS-HNE in the presence of purified GGT. The HPLC analysis with OPA-ME derivatization showed the complete disappearance of GS-HNE and the apparition of 4 new uncompletely separated peaks, with retention time between 23 and 27 min (Fig. 1 B). For quantification, the area of the fused peaks was used. In the examined range of concentrations (50 to 400 μ M), the response was linear (equation of regression line: $y = 45502x - 491,3$; coefficient of correlation $r^2 : 0.997$). The detection limit for OPA-ME derivative of CysGly-HNE was 250 pmoles per injection measured at a signal-to-noise ratio of *ca.* 3. CysGly-HNE obtained by enzymatic synthesis was used as standard for further experiments.

The CID spectrum of the underivatized metabolite showed a pseudomolecular ion $[M+H]^+$ at m/z 335, an ion $[M+H]^+ -18$ at m/z 317 and fragments at 179 and 139 corresponding, as in the case of GS-HNE, to CysGly and HNE moieties, respectively; these data correspond to the expected CysGly-HNE monoadduct. The MS/MS of the parent ion at m/z 335 exhibited characteristic fragments at m/z 317 and 179 and further confirms its structure (Fig. 3). The HPLC analysis showed several uncompletely separated peaks at m/z 335 (Fig. 3, inset), suggesting that GGT cleaves the different diastereoisomers of GS-HNE to the diastereoisomers of CysGly-HNE.

The HPLC and MS analysis demonstrated that GS-HNE is indeed a substrate of the GGT enzyme, which transforms it to CysGly-HNE by removing the γ -glutamyl moiety (Fig. 4).

Metabolism of GS-HNE in V79 GGT cell lines

Incubation of V79 GGT cells in medium containing 200 μ M GS-HNE resulted in metabolism of GS-HNE with the corresponding formation of CysGly-HNE, as shown by HPLC analysis of their OPA-ME derivatives. The resulting metabolite exhibited the same HPLC profile and retention time as the adduct synthesized from GS-HNE in the presence of GGT. The HPLC monitoring of the two adducts in the extracellular medium showed that the transformation of GS-HNE to CysGly-HNE is time-dependent in V79 GGT cells, being complete after 2 h incubation (Fig. 5). In V79 Cl cells, GS-HNE remained untransformed during the same incubation time and no CysCly-HNE could be detected.

The identity of the resulting metabolite was further confirmed by MS analysis of the SPE methanolic fraction obtained from medium of V79 GGT cells incubated 3 h in the presence of

200 μM GS-HNE. The ESI and CID spectra showed the same molecular ion and fragmentation pattern as in the case of CysGly-HNE enzymatically synthesized.

Cys-HNE or other metabolites originated from GS-HNE were not detected in medium of cells incubated in the above described conditions, using described HPLC and MS techniques. The cellular model we used is therefore appropriate to study the GGT metabolism of GS-HNE conjugate and to point out its biological significance.

Cytotoxicity associated with GGT metabolism of GS-HNE

Cytotoxicity of GS-HNE in V79 GGT and V79 Cl cells was evaluated based on its effects on cell viability (MTT and Trypan Blue exclusion assays) and on LDH release, as an index of cell death and cell lysis. A 24 h incubation in the presence of 50 to 200 μM GS-HNE showed a considerably higher degree of cytotoxicity in V79 GGT as compared to V79 Cl cells. The cytotoxicity was dose-dependent and 100% cellular death was observed at the concentration of 200 μM GS-HNE in V79 GGT cells (Fig. 6). In V79 Cl cells, no significant cytotoxic effect was observed for any concentration of GS-HNE we tested, as compared to the untreated control. The LDH release increased linearly with concentration of GS-HNE in V79 GGT cells (Fig. 7). These results, confirmed by the three different assays we used, showed clearly that cytotoxicity of GS-HNE depends on the GGT activity.

The cytotoxic effect of GS-HNE is also time-dependent in V79 GGT cells, as shown by continuous decrease of cell viability during 24 h incubation of cells in the presence of 200 μM GS-HNE (Fig. 8). The same treatment had no significant cytotoxic effect in V79Cl cells.

To further demonstrate that CysGly-HNE, the GGT-generated metabolite of GS-HNE, was responsible for the observed cytotoxicity, we performed incubations of V79 Cl cells with CysGly-HNE adduct. After 12 h incubation, 200 μM CysGly decreased viability of V79Cl cells to $20.2 \pm 1.4 \%$ ($25 \pm 2.5 \%$ in V79GGT cell line) as compared to the control (MTT assay), which confirms the hypothesis that CysGly-HNE, but not GS-HNE itself, is a toxic metabolite.

The cytotoxicity of free HNE was also tested in V79 GGT and V79 Cl cells and we obtained a total cell death at 50 μM HNE for 24 h incubation in the two cell lines. After 12 h incubation the cell viability measured by MTT assay was $25.3 \pm 1.1 \%$ and $19.3 \pm 2.2 \%$, in V79GGT and V79Cl respectively.

Discussion

Conjugation of GSH seems to be a major pathway for the detoxication of HNE produced during LPO. A recent work supplied direct evidence for the *in vivo* formation of GS-HNE, in which the liver may play an important role [26]. Generally, GSH conjugates are exported from the liver to the kidney and excreted in the urine as mercapturic acid conjugates. It is known that mercapturic acid pathway is initiated by GGT-cleavage of γ -glutamyl moiety of the GSH conjugate, followed by removal of glycine residue by CysGly dipeptidase. The resulting Cys conjugate is afterwards N-acetylated by cysteine conjugate N-acetyltransferase, with formation of the mercapturic acid conjugate [25]. In the particular case of GS-HNE, its further metabolite HNE-MA has been found in urine together with several other mercapturic acid conjugates of DHN, HNA, HNA lactone and dicarboxylic acids [22-24]. DHN-mercapturic acid has been reported to be even a physiological component of rat and human urine as a consequence of a low level of LPO [40]. An intermediate of mercapturic acid pathway, Cys-HNE, has recently been found during metabolism of HNE in rat precision-cut liver slices which, unlike isolated hepatocytes, exhibit GGT and dipeptidase activities on the luminal surface of canalicular membranes and bile ductal cells [41].

However, little is known about the reaction catalyzed by GGT in the mercapturic acid pathway of GS-HNE conjugate, and even less concerning the biological significance of this metabolic step.

Considering these data, we wanted to demonstrate the involvement of GGT in the metabolism of GS-HNE and to study the biological effect of the resulting metabolite.

Therefore, we incubated the GS-HNE conjugate with purified GGT and analyzed the obtained metabolite. The identity of GS-HNE synthesized by direct reaction between HNE and GSH was at first confirmed by MS (Fig. 2). The HPLC profile of GS-HNE, obtained in a coupled HPLC-MS system, shows 4 peaks which correspond to (at least) four diastereoisomers (Fig. 2, inset). Boon *et al.* previously separated three peaks for GS-HNE, but theoretically 8 diastereoisomers can be formed, due to the three chiral carbon centers: one is present in HNE, another is due to the thio-ether linkage with GSH, and a third one results from the cyclization of the adduct to its hemiacetal form [18]. We identified the metabolite obtained after GGT reaction on GS-HNE as CysGly-HNE by MS analysis (Fig. 3). Moreover, its HPLC profile shows also several uncompleted separated peaks (Fig. 3, inset), indicating that all

diastereoisomers of non-enzymatically synthesized GS-HNE were recognized and transformed by GGT, without any stereospecificity towards the different stereoisomers.

We studied also the metabolism of GS-HNE by GGT in a cellular model, consisting of a couple of cells expressing or not expressing human GGT. Incubation of these cells in the presence of GS-HNE resulted in a time-dependent transformation of GS-HNE to CysGly-HNE only in V79 GGT cells, proving that GGT of cells in culture acts similarly to the purified GGT (Fig. 5). The MS analysis of the cellular medium after purification with SPE showed no other metabolites derived from transformation of HNE moiety in GS-HNE, such as GSH-DHN, GSH-HNA or intermediates of mercapturic acid pathway (Cys-HNE, HNE-MA), susceptible to be formed in cells containing complex enzymatic equipments. Moreover, we previously demonstrated by HPLC analysis of GSH metabolites in V79 GGT cells, that CysGly is the single breakdown product of GSH, the subsequent formation of Cys being not observed, probably due to the absence of a quantifiable dipeptidase activity in V79 cells (unpublished results). These results ensure that the two cell lines V79 GGT and V79 Cl provide a cellular model quite suitable for studying the biological consequences of the GGT reaction on GS-HNE.

Generally, GSH conjugates are less toxic than their parent compounds and easy to eliminate in urine after biotransformation to mercapturic acids. However, GSH conjugates of several compounds including some polyphenols [32], halogenated hydrocarbons [28-30] and acrolein [34] are nephrotoxic. The nephrotoxicity of such metabolites is a consequence of the relatively high activity of GGT within the renal proximal tubular epithelial cells, which initiates the metabolism of GSH conjugates via the mercapturic acid pathway [27]. Such a reaction allows the cellular uptake of subsequent breakdown products, which are in several cases more reactive than their precursors GSH-conjugates. In other cases, GSH can act as a transporter for reactive metabolites, permitting their delivery to target tissues distal to the site of the initial conjugation [42].

Since we demonstrated that GGT metabolizes GS-HNE, we further aimed to verify if the GGT metabolism of GS-HNE has toxicological implications as in the case of above cited compounds. Using the same cellular model, we found that incubation with GS-HNE results in a significant increase in cytotoxicity, but only in V79 GGT cells. The cytotoxicity of GS-HNE was GGT-, time- and dose-dependent, as confirmed by three different tests (Fig. 6 to 8). Because the single difference between the two cell lines consists of the presence or not of GGT and we demonstrated that V79 GGT metabolized GS-HNE to CysGly-HNE, we

concluded that the observed cytotoxic effect is associated with GS-HNE metabolism by GGT. We further confirmed this hypothesis by inducing cytotoxicity in V79 Cl cells by direct treatment with CysGly-HNE, proving that unlike GS-HNE, its metabolite CysGly-HNE being generated by GGT, is cytotoxic.

An important question is by which mechanism the GGT-dependent metabolism of GS-HNE induces cytotoxicity. A possible mechanism consists of the dissociation of the CysGly-HNE adduct to the reactive toxic parent hydroxyalkenal. The stability of GS-HNE adduct *in vitro* is high (half life for the reverse reaction 6.3 – 19.2 days) [4], but no data is available on the rate of dissociation of the CysGly-HNE adduct. We thus performed incubations of GS-HNE and CysGly-HNE adducts (200 μM) in conditions comparable to those used for cell treatments (37°C, PBS) and we tested the adduct recoveries and HNE release after 12 h. Contrary to GS-HNE, which shows a good recovery ($96.5 \pm 0.2 \%$) and low levels of free HNE ($11.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$), in the case of CysGly-HNE the recovery is much less ($41.8 \pm 3.35 \%$) and relatively high amounts of HNE are released ($92.5 \pm 3.0 \mu\text{M}$). We can suppose that a similar release of HNE from CysGly-HNE arises in medium of V79 GGT cells treated with GS-HNE, although that is more difficult to demonstrate due to the high reactivity of HNE towards cellular proteins and other components of the complex incubation medium. As free HNE shows cytotoxic effects on both V79 GGT and V79 Cl cells at lower concentrations than CysGly-HNE itself, we think that release of HNE from CysGly-HNE is very likely a mechanism responsible for its cytotoxicity.

A direct cytotoxicity of CysGly-HNE itself could also be possible, but difficult to prove because of the limited stability of the adduct during a long incubation period, within which the cytotoxicity continuously increases. As already suggested for acrolein-GSH adduct [34], the mechanism of a putative direct cytotoxicity could be based for example on the reaction of the adduct with another thiol moiety, with formation of a mixed diadduct (including a thiazolidine ring). The reaction of the aldehyde group of CysGly-HNE adduct with another molecule of thiol seems possible, since we synthesized a diadduct of CysGly with HNE using an excess of thiol. Such a reaction, if it takes place with a cysteine moiety of a protein, could lead to protein modifications with consequences for their structure and function, depending on the importance of thiol group for the activity of protein. The aldehyde group of the monoadduct could also react with amino groups of proteins resulting in Schiff-base products.

Finally, we have shown that within at least a 3 h incubation of V79 GGT cells in the presence of GS-HNE, no other metabolites than CysGly-HNE appeared, supporting the hypothesis that

the cytotoxicity we observed can be attributed to the formation of CysGly-HNE. However, during longer incubations periods, formation of other metabolites with putative effects on cell viability must not be excluded.

In conclusion, the present study is the first to clearly demonstrate that GGT converts GS-HNE to CysGly-HNE, and to show a cytotoxic effect linked to the GS-HNE metabolism through this first step of the mercapturic acid pathway. The mechanism of the GGT-induced cytotoxicity seems very likely to proceed through release of HNE from the CysGly-HNE metabolite. It becomes clear from our results that GS-HNE should not be considered as a harmless metabolite, since the GGT-initiated breakdown of this conjugate leads to a considerable increase of biological reactivity. Such a metabolic activation could account for subsequent late toxic effects of the LPO product, HNE, targeted to GGT-rich tissues. Our results were obtained using an *in vitro* cellular model and could not be extrapolated directly to *in vivo* conditions. However, it would be interesting to study whether such a process could occur and have implications for *in vivo* nephrotoxicity. In addition, it would be also interesting to study the effect of CysGly-HNE on cell proliferation, since some aldehyde-thiol adducts, much less toxic than HNE, keep inhibitory effects on cellular growth [39]. As for GGT, another possible physiological role of this enzyme, has to be taken into account.

Bibliography

- [1] Rice-Evans, C.A.; Diplock, A.T.; Symons, M.C.R. Investigations of the consequences of free radical attack on lipids. In: Burdon, R.H.; van Knippenberd, P.H., eds. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, vol. 22: Techniques in free radical research*. Amsterdam: Elsevier; 1991.
- [2] Comporti, M. Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology. *Free Radic. Res.* **28**: 623-635; 1998.
- [3] Parola, M.; Bellomo, G.; Robino, G.; Barrera, G.; Dianzani, M.U. 4-hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxidants & Redox Signaling* **1**: 255-284; 1999.
- [4] Esterbauer, H.; Zollner, H.; Scholz, N. Reaction of glutathione with conjugated carbonyls. *Z. Naturforsch.* **30 c**: 466-473; 1975.
- [5] Esterbauer, H. Kinetics of the reaction of sulfhydryl compounds with alpha-beta-unsaturated aldehydes in aqueous system. *Monatsh. Chem.* **101**: 782-810; 1970.
- [6] Humphries, K.M.; Szveda, L.I. Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* **37**: 15835-15841; 1998.
- [7] Buko, V.U.; Artsukevich, A.A.; Ignatenko, K.V. Aldehydic products of lipid peroxidation inactivate cytochrome P-450. *Exp. Toxicol. Pathol.* **51**: 294-298; 1999.
- [8] Uchida, K.; Toyokuni, S.; Nishikawa, K.; Kawakishi, S.; Oda, H.; Hiai, H.; Stadtman, E.R. Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. *Biochemistry* **33**: 12487-12494; 1994.
- [9] Chung, F.L.; Nath, R.G.; Ocando, J.; Nishikawa, A.; Zhang, L. Deoxyguanosine adducts of t-4-hydroxy-2-nonenal are endogenous DNA lesions in rodents and humans: detection and potential sources. *Cancer Res.* **60**: 1507-1511; 2000.
- [10] Siems, W.G.; Zollner, H.; Grune, T.; Esterbauer, H. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product. *J. Lipid Res.* **38**: 612-622; 1997.
- [11] Hartley, D.P.; Ruth, J.A.; Petersen, D.R. The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **316**: 197-205; 1995.
- [12] Grune, T.; Siems, W.; Kowalevski, J.; Zollner, H.; Esterbauer, H. Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by enterocytes of rat small intestine. *Biochem. Int.* **25**: 963-971; 1991.
- [13] Srivastava, S.; Dixit, B.L.; Cai, J.; Sharma, S.; Hurst, H.E.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S.K. Metabolism of lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal (HNE) in rat erythrocytes: role of aldose reductase. *Free Radic. Biol. Med.* **29**: 642-651; 2000.
- [14] Esterbauer, H.; Zollner, H. and Lang, J. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions. *Biochem. J.* **228**: 363-373; 1985.
- [15] Ullrich, O.; Grune, T.; Henke, W.; Esterbauer, H.; Siems, W.G. Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by mitochondria isolated from rat kidney cortex. *FEBS Lett.* **352**: 84-86; 1994.
- [16] Srivastava, S.; Chandra, A.; Wang, L.F.; Seifert, W.E., DaGue, B.B.; Ansari, N.H.; Srivastava, S.K.; Bhatnagar, A. Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal, in isolated perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* **273**: 10893-10900; 1998.

- [17] Grune, T.; Siems, W.G.; Petras, T. Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in in situ perfused rat kidney. *J. Lipid Res.* **38**: 1660-1665; 1997.
- [18] Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**: 81-128; 1991.
- [19] Hubatsch, I.; Ridderström, M.; Mannervik, B. Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem. J.* **330**: 175-179; 1998.
- [20] Singhal, S.S.; Zimniak, P.; Awasthi, S.; Piper, J.T.; He, N.G.; Teng, J.I.; Petersen, D.R.; Awasthi, Y.C. Several closely related glutathione S-transferase isozymes catalyzing conjugation of 4-hydroxynonenal are differentially expressed in human tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**: 242-250; 1994.
- [21] Stenberg, G.; Ridderström, M.; Engström, A.; Pemble, S.E.; Mannervik, B. Cloning and heterologous expression of cDNA encoding class Alpha rat glutathione transferase 8-8, an enzyme with high catalytic activity towards genotoxic α,β -unsaturated carbonyl compounds. *Biochem. J.* **284** : 313-319; 1992.
- [22] Alary, J.; Bravais, F.; Cravedi, J.P.; Debrauwer, L.; Rao, D.; Bories, G. Mercapturic acid conjugates as urinary end metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in the rat. *Chem. Res. Toxicol.* **8**: 34-39; 1995.
- [23] Petras, T.; Siems, W.G.; Grune, T. 4-hydroxynonenal is degraded to mercapturic acid conjugate in rat kidney. *Free Radic. Biol. Med.* **19**: 685-688; 1995.
- [24] Alary, J.; Debrauwer, L.; Fernandez, Y.; Paris, A.; Cravedi, J.P.; Dolo, L.; Rao, D.; Bories, G. Identification of novel urinary metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in rats. *Chem. Res. Toxicol.* **11**: 1368-1376; 1998.
- [25] Curthoys, N.P.; Hughey, R.P. Characterization and physiological function of rat renal γ -glutamyltranspeptidase. *Enzyme* **24**: 383-403; 1979.
- [26] Boon, P.J.M.; Marinho, H.S.; Oosting, R.; Mulder, G.J. Glutathione conjugation of 4-hydroxy-*trans*-2,3-nonenal in the rat *in vivo*, the isolated perfused liver and erythrocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **159**: 214-223; 1999.
- [27] Commandeur, J.N.M.; Stijntjes, G.J.; Vermeulen, N.P.E. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Pharmacol. Rev.* **47**: 271-330; 1995.
- [28] Elfarra, A.A.; Anders, M.W. Renal processing of glutathione conjugates. Role in nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 3729-3732; 1984.
- [29] Monks, T.J.; Lau, S.S.; Highet, R.J.; Gillette, J.R. Glutathione conjugates of 2-bromohydroquinone are nephrotoxic. *Drug Metab. Dispos.* **13**: 553-559; 1985.
- [30] Lau, S.S.; Monks, T.J. The *in vivo* disposition of 2-bromo- ^{14}C hydroquinone and the effect of γ -glutamyl transpeptidase inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **103**: 121-132; 1990.
- [31] Peters, M.M.; Jones, T.W.; Monks, T.J.; Lau, S.S. Cytotoxicity and cell proliferation induced by the nephrocarcinogen hydroquinone and its nephrotoxic metabolite 2,3,5-(tris-glutathion-S-yl)hydroquinone. *Carcinogenesis* **18**: 2393-2401; 1997.
- [32] Monks, T.J.; Lau, S.S. The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 229-255; 1998.
- [33] Butterworth, M.; Lau, S.S.; Monks, T.J. Formation of catechol estrogen glutathione conjugates and gamma-glutamyl transpeptidase-dependent nephrotoxicity of 17-beta-estradiol in the golden Syrian hamster. *Carcinogenesis* **18**: 561-567; 1997.
- [34] Horvath, J.J.; Witmer, C.M.; Witz, G. Nephrotoxicity of the 1:1 acrolein-glutathione adduct in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **117**: 200-207; 1992.

- [35] Tsikas, D.; Sandmann, J.; Holzberg, D.; Pantazis, P.; Raida, M.; Frölich, J.C. Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* **273**: 32-40; 1999.
- [36] Visvikis, A.; Thioudellet, C.; Oster, T.; Fournel-Gigleux S.; Wellman, M.; Siest, G. High level expression of enzymatically active mature human gamma-glutamyltransferase in transgenic V79 Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7361-7365; 1991.
- [37] Pagé, M.; Bejaoui, N.; Cinq-Mars, B.; Lemieux, P. Optimization of the tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity. *Int. J. Immunopharmac.* **10**: 785-793; 1988.
- [38] Esterbauer, H.; Ertl, A.; Scholz, N. The reaction of cysteine with α,β -unsaturated aldehydes. *Tetrahedron* **32**: 285-289; 1975.
- [39] Hauptlorenz, S.; Esterbauer, H.; Moll, W.; Pümpel, R.; Schauenstein, E.; Puschendorf, B. Effects of the lipidperoxidation product 4-hydroxynonenal and related aldehydes on proliferation and viability of cultured Erlich ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* **34**: 3803-3809; 1985.
- [40] Alary, J.; Debrauwer, L.; Fernandez, Y.; Cravedi, J.P.; Rao, D.; Bories G. 1,4-Dihydroxynonene mercapturic acid, the major end metabolite of exogenous 4-hydroxy-2-nonenal, is a physiological component of rat and human urine. *Chem. Res. Toxicol.* **11**: 130-135; 1998.
- [41] Laurent, A.; Perdu-Durand, E.; Alary, J.; Debrauwer, L.; Cravedi, J.P. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation, in rat precision-cut liver slices. *Toxicol. Lett.* **114**: 203-214; 2000.
- [42] Monks, T.J.; Anders, M.W.; Dekant, W.; Stevens, J.L.; Lau, S.S.; van Bladeren, P.J. Contemporary issues in toxicology: Glutathione conjugate mediated toxicities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **106** : 1-19; 1990.

Abbreviations : CID, collision-induced dissociation, CysGly, cysteinylglycine, DHN, 1,4-dihydroxynonene, DMSO, dimethylsulfoxide, ESI, electrospray ionization, GGT, gamma-glutamyltranspeptidase, GSH, reduced glutathione, HNA, hydroxynonenoic acid, HNE, 4-hydroxy-2,3-*trans*-nonenal, HPLC, high performance liquid chromatography, LDH, lactate dehydrogenase, LPO, lipid peroxidation, MA, mercapturic acid, OPA, *ortho*-phthalaldehyde, ME, 2-mercaptoethanol, MS, mass spectrometry, MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, SPE, solid phase extraction.

Figure 1

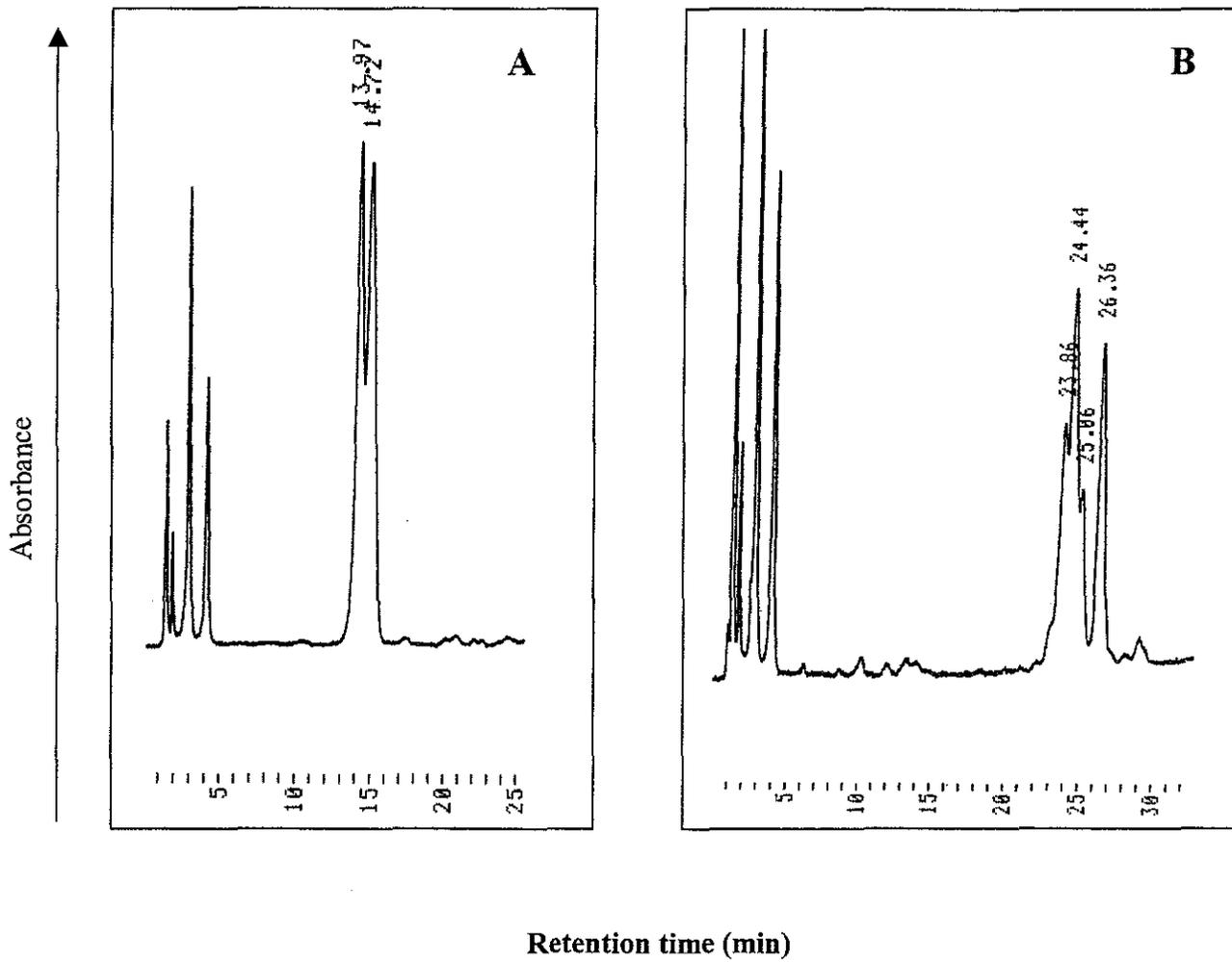


Figure 1.

HPLC chromatograms of GS-HNE (A) and CysGly-HNE (B) as OPA-ME derivatives (UV detection at λ_{338} nm).

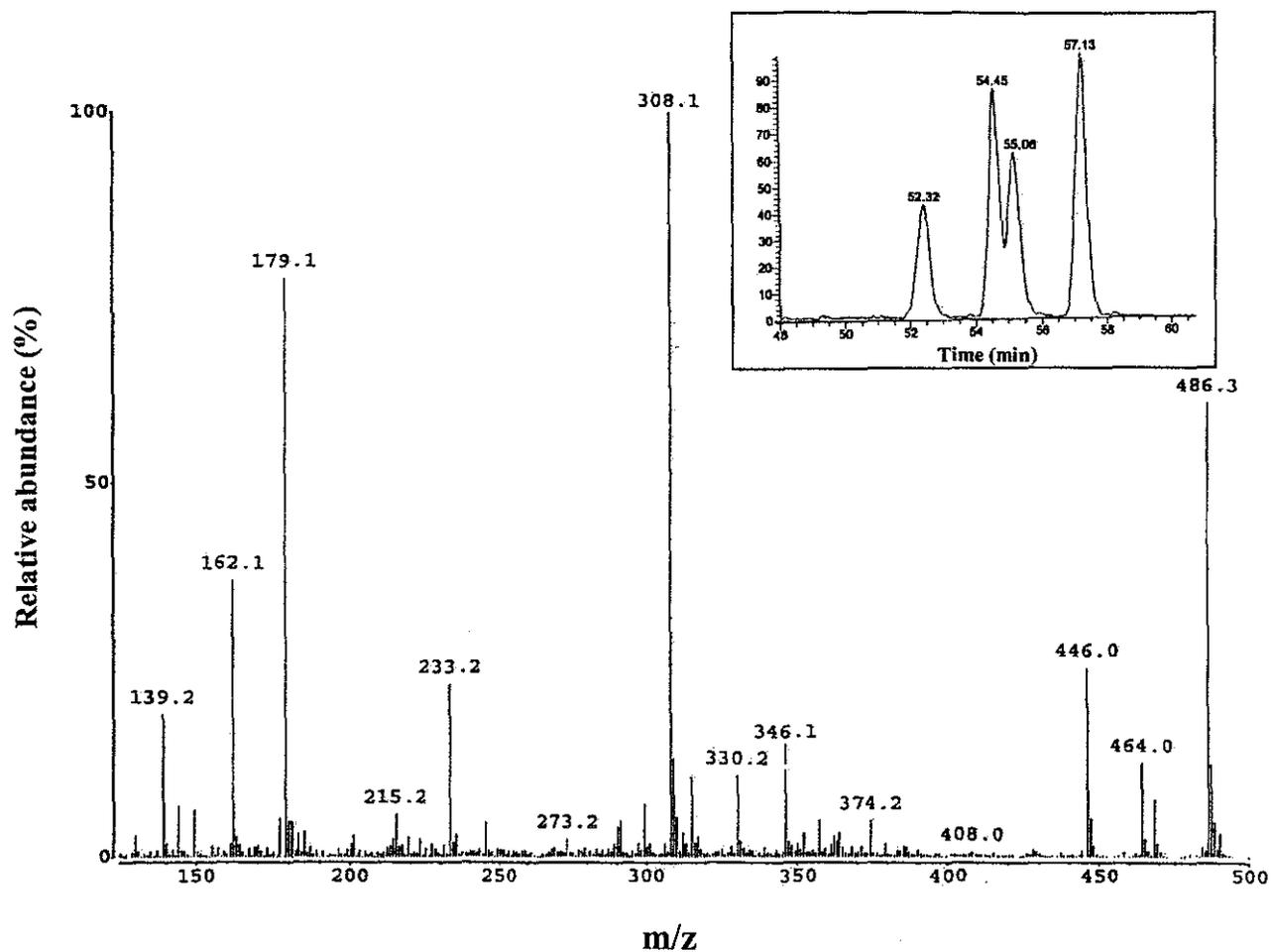


Figure 2.

The CID spectrum of m/z 464, the $[M+H]^+$ ion of the GS-HNE conjugate.

Inset shows the HPLC separation of four peaks at m/z 464.

Figure 3

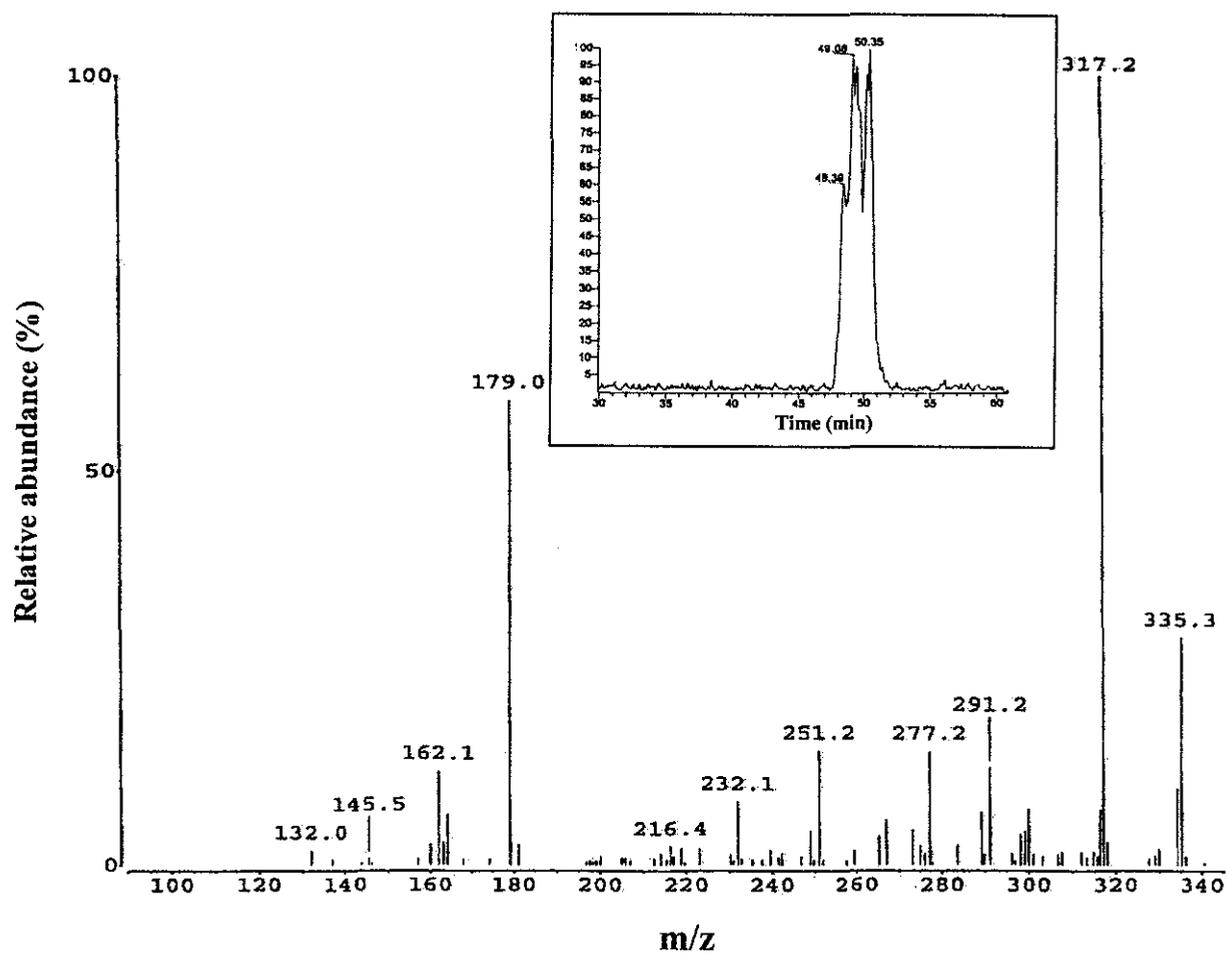


Figure 3.

The MS/MS spectrum of m/z 335, the $[M+H]^+$ ion of CysGly-HNE conjugate.

Inset shows the HPLC separation of peaks at m/z 335.

Figure 4

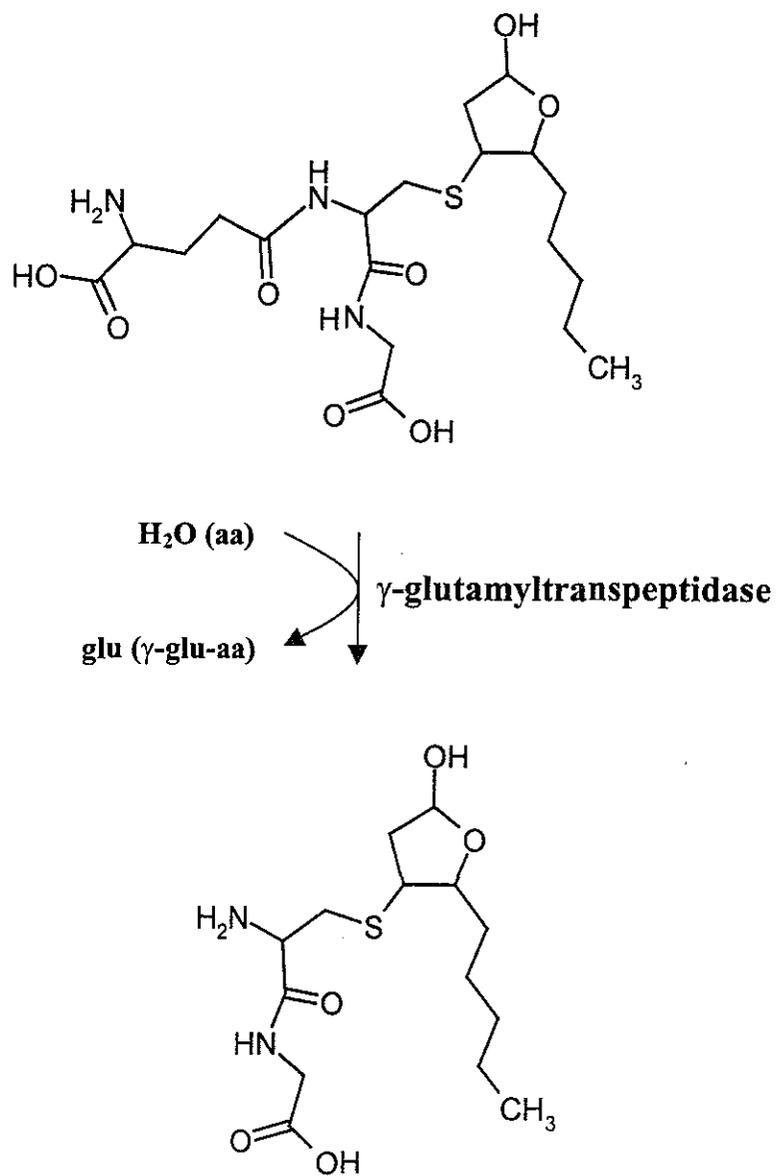
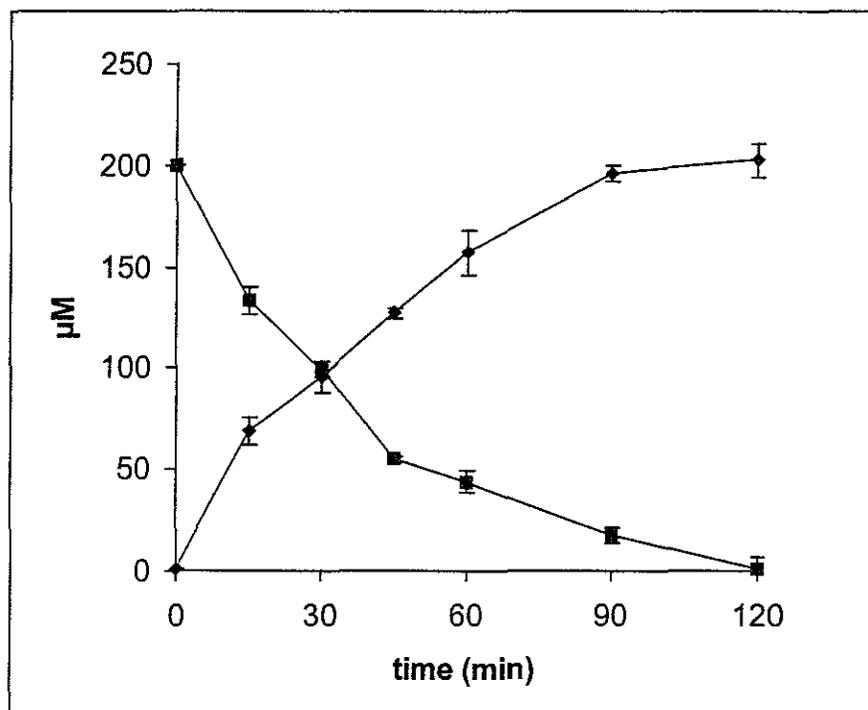


Figure 4.

Reaction scheme of GGT-catalyzed transformation of GS-HNE to CysGly-HNE.

aa: aminoacid; glu: glutamic acid

Figure 5

**Figure 5.**

Kinetics of metabolism of GS-HNE and formation of CysGly-HNE in V79GGT cells. Medium of cells incubated in PBS containing 200 μM GS-HNE, was analyzed by HPLC for GS-HNE and CysGly-HNE concentration measurement. Results expressed as μM GS-HNE (■) and CysGly-HNE (◆) are means of three independent experiments \pm SD.

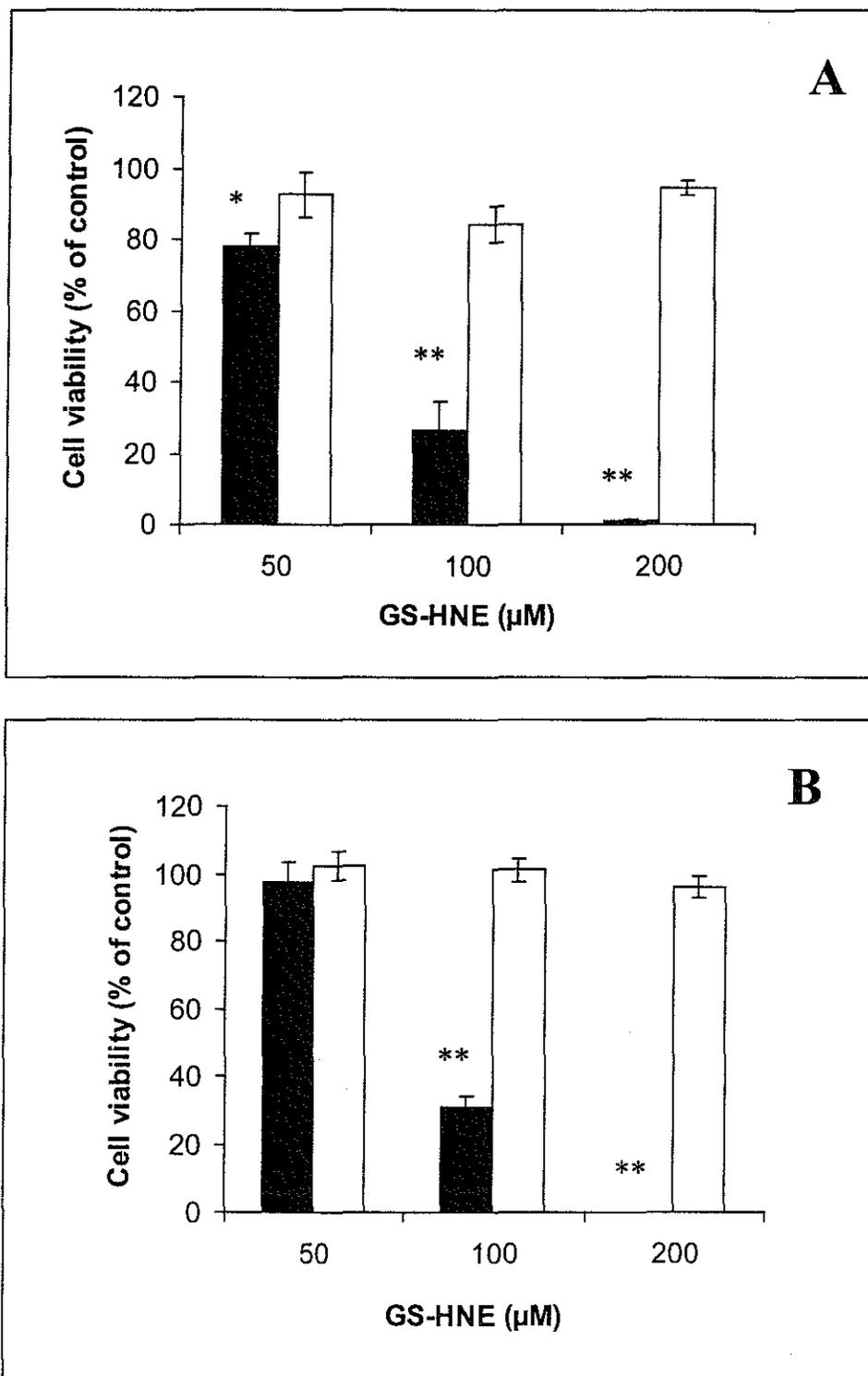


Figure 6.

Dose dependence of GS-HNE effect on cell viability (A: MTT assay, B: Trypan Blue exclusion assay) in V79GGT (■) and V79 (□) cells. Cells were incubated 24 h in the presence of indicated concentrations. Results expressed as % of untreated control are means \pm SD of three independent experiments. Statistical significance of differences between V79 GGT and V79 Cl cell lines: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Figure 7

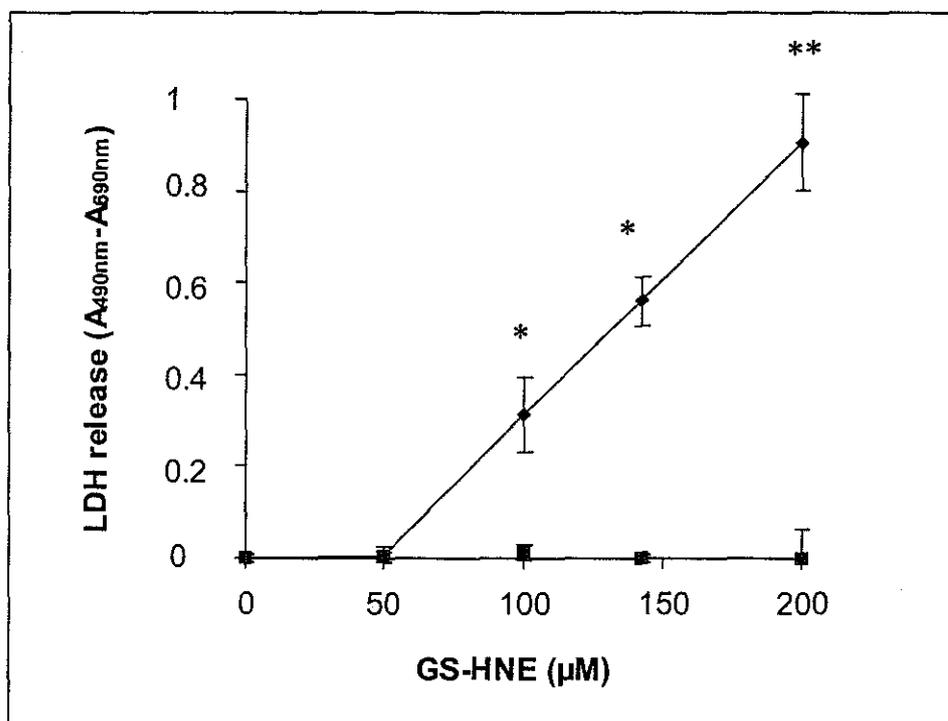


Figure 7.

Dose dependence of GS-HNE effect on LDH release in V79 GGT (◆) and V79 Cl (■) cells after 24 h incubation. Cells were incubated 24 h in the presence of indicated concentrations. Data expressed as absorbance ($A_{490nm}-A_{690nm}$) (average values of corresponding untreated control cells are subtracted from each absorbance value) are means \pm SD of three independent experiments.

Statistical significance of differences between V79 GGT and V79 Cl cell lines: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

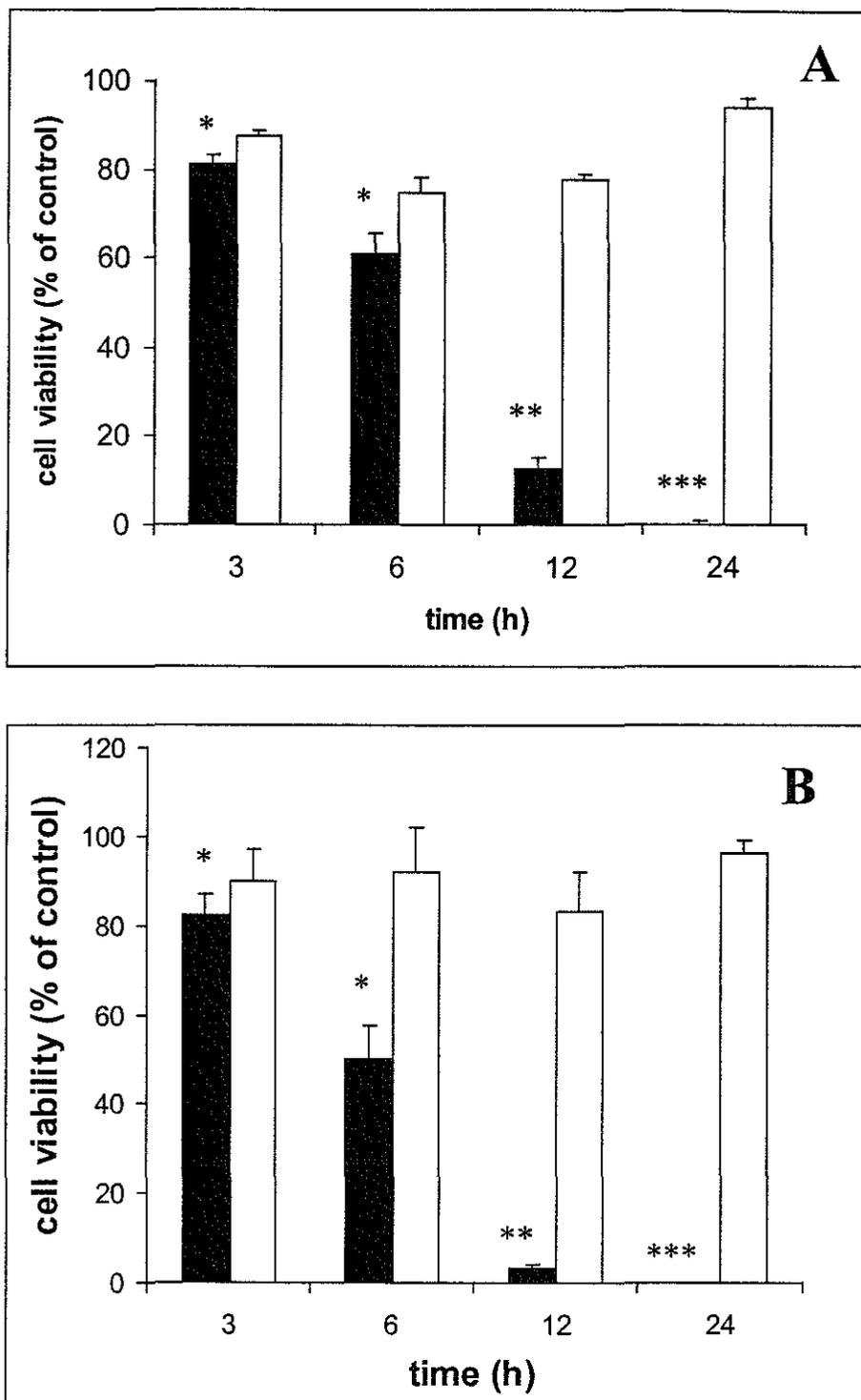


Figure 8.

Time dependence of GS-HNE (200µM) effect on cell viability (A : MTT assay ; B : Trypan Blue assay) in V79GGT (■) and V79 (□) cells. Results expressed as % of untreated control are means ± SD of three independent experiments. Statistical significance of differences between V79 GGT and V79 Cl cell lines: * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001.

3.2. Rôle de la GGT-rel dans le métabolisme et la cytotoxicité de l'adduit glutathion-4-hydroxynonéal

Nous avons tout d'abord recherché si, comme pour la GGT, le GS-HNE est un substrat de la GGT-rel. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire NIH3T3/GGT-rel précédemment décrite (voir chapitre I). Les cellules sont ensemencées sur des plaques de 24 puits et lorsqu'elles sont à confluence (après 24 heures), le milieu de culture est remplacé par une solution de PBS contenant 200 μ M de GS-HNE. L'analyse CLHP des adduits (conditions opératoires *publication n°3*) montre que la GGT-rel est capable aussi de métaboliser le GS-HNE, car l'adduit CysGly-HNE peut être détecté seulement dans la lignée NIH3T3/GGT-rel (fig. 37) et non dans la lignée témoin dépourvue de GGT-rel.

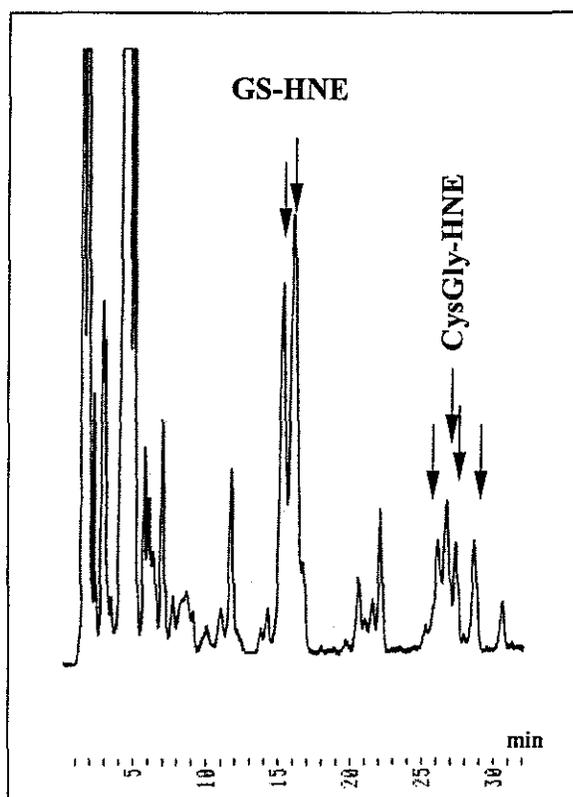


Figure 37 : Profil CLHP des adduits GS-HNE et CysGly-HNE dans le milieu des cellules NIH3T3/GGT-rel.

Les cellules sont incubées dans du PBS en présence de 200 μ M GS-HNE et le milieu est analysé en CLHP après dérivation OPA-ME ; temps d'incubation : 6 h.

Cependant, à l'inverse des cellules V79GGT qui métabolisent complètement 200 μM de GS-HNE en 2 h d'incubation, dans les mêmes conditions, le métabolisme du GS-HNE par les cellules NIH3T3/GGT-rel est nettement plus lent. Ainsi, dans le cas de ces dernières, la concentration de CysGly-HNE formée atteint la valeur de $125,5 \pm 3,5 \mu\text{M}$ après 6 h d'incubation et il reste encore $74,4 \pm 3,6 \mu\text{M}$ d'adduit GS-HNE non transformé. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'activité de clivage du reste γ -glutamyle beaucoup plus faible dans les cellules NIH3T3/GGT-rel que dans les cellules V79GGT, ainsi que nous l'avons déjà établi pour le GSH (chapitre I).

En revanche, la mesure de la cytotoxicité du GS-HNE dans les cellules exprimant la GGT-rel, se révèle être après 24 heures beaucoup plus élevée que dans les cellules témoins et ce, pour des concentrations en GS-HNE comprises entre 25 et 100 μM . Ces résultats ont été confirmés par les trois tests de cytotoxicité que nous avons utilisés : MTT, Bleu de Trypan et LDH (fig 38 et 39) (techniques décrites dans la *publication n°3*).

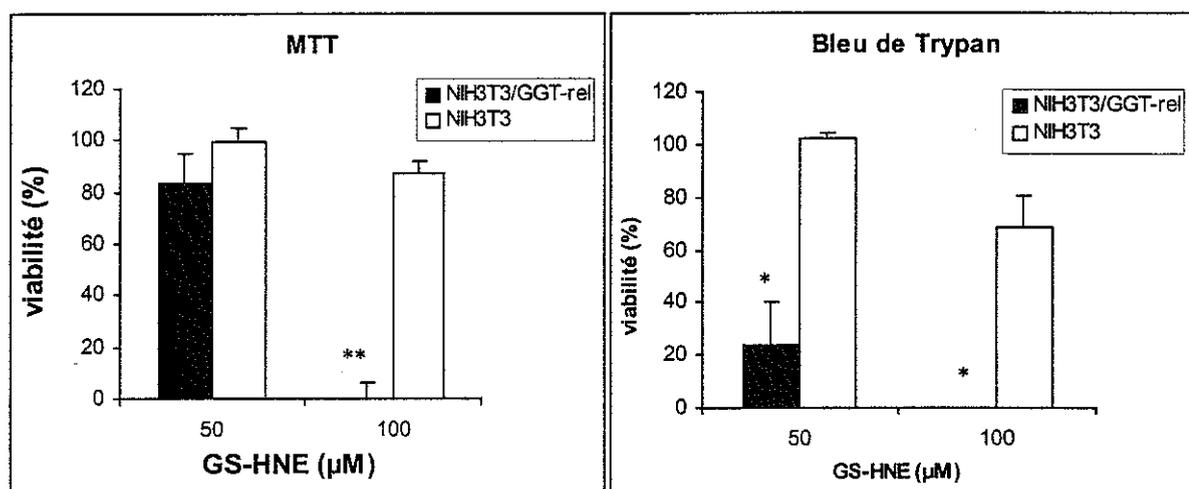


Figure 38 : Cytotoxicité de l'adduit GS-HNE dans les lignées cellulaires NIH3T3/GGT-rel et NIH3T3 déterminée par les tests MTT et Bleu de Trypan.

Les cellules ont été incubées en présence de 50 ou 100 μM GS-HNE pendant 24 h dans du milieu de culture DMEM supplémenté par 0,5% serum de veau fœtal. Les résultats sont exprimés en % par rapport aux contrôles non-traités. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (significativité statistique des différences entre les cellules NIH3T3/GGT-rel et NIH3T3)

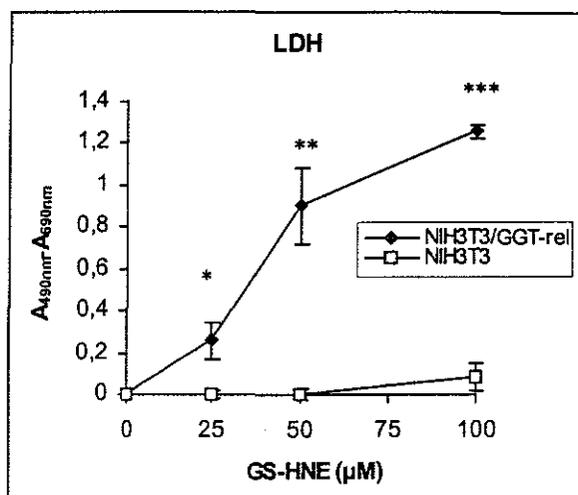


Figure 39 : Libération de LDH dans le milieu extracellulaire des cellules NIH3T3/GGT-rel et NIH3T3 incubées en présence de GS-HNE.

Les cellules ont été incubées en présence de 25 à 100 µM GS-HNE pendant 24 h dans le milieu de culture DMEM supplémenté par 0,5% de sérum fœtal de veau. Les résultats sont exprimés en valeurs d'absorbance ($A_{490nm} - A_{690nm}$) après soustraction de la valeur moyenne du contrôle correspondant non-traité. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (significativité statistique des différences entre les cellules NIH3T3/GGT-rel et NIH3T3)

Pour des concentrations telles que celles que nous avons utilisées pour les cellules V79GGT et V79CI (200 µM), la mortalité après 24 heures atteint 100% aussi bien pour les cellules NIH3T3/GGT-rel que NIH3T3 (témoins). Il est à noter cependant qu'il semble exister une différence de sensibilité vis-à-vis du GS-HNE entre le couple de cellules NIH3T3/GGT-rel et NIH3T3 et le couple V79GGT/V79CI. En effet, à la dose 100 µM, GS-HNE montre un effet cytotoxique supérieur dans les cellules NIH3T3/GGT-rel (100% de mort cellulaire) à celui constaté pour les cellules V79GGT (viabilité cellulaire de $26,1 \pm 5,1$ %) (test MTT).

Nos résultats montrent que non seulement la GGT, mais également la GGT-rel est capable de métaboliser le GS-HNE et que ce métabolisme s'accompagne aussi d'un effet cytotoxique. Ce phénomène est d'autant plus marqué que, dans des conditions identiques d'incubation, aucun effet cytotoxique n'a été observé dans les cellules NIH3T3 dépourvues de GGT-rel.

3.3. Formation des adduits GS-HNE et CysGly-HNE au cours de la peroxydation lipidique induite par le système GGT/GSH/Fe³⁺ ou GGT-rel/GSH/Fe³⁺

Nous avons démontré précédemment que la peroxydation lipidique par le système GGT/GSH/Fe³⁺ conduit à la formation de HNE, ainsi que d'autres hydroxyaldéhydes insaturés et de 2-alcénals (chapitre II). Or, comme nous l'avons déjà mentionné, la récupération de ces composés s'est avérée particulièrement difficile dans certains cas et nous avons supposé que ce phénomène est lié à la formation d'adduits avec des thiols présents ou se formant au cours de l'oxydation.

Afin de vérifier si les adduits GS-HNE et CysGly-HNE peuvent être formés au cours de la peroxydation lipidique dépendante de la GGT (ou de la GGT-rel), nous avons réalisé des incubations de cellules V79GGT et NIH3T3/GGT-rel en présence de GSH/Fe³⁺ (2 mM GSH, 20 mM glygly, 150 :165 µM Fe³⁺-EDTA) et 2 mM d'acide linoléique ou arachidonique en tant que substrat d'oxydation, dans du PBS pH 7,4. Le mélange en fin d'incubation (5h à 37°C) a été purifié sur cartouche SepPak et analysé en CLHP après dérivation OPA-ME des adduits (voir conditions CLHP dans la *publication n°3*).

Malgré la purification préalable, le profil CLHP est très complexe et n'est pas sans rappeler les profils chromatographiques obtenus au cours de la caractérisation des aldéhydes issus de la peroxydation lipidique dépendante de la GGT. Cependant, nous avons pu détecter l'adduit CysGly-HNE dans le milieu des cellules V79GGT (fig. 40 A) incubées en présence aussi bien d'acide linoléique qu'arachidonique. L'adduit CysGly-HNE se forme certainement à partir de GS-HNE sous l'action de la GGT, car son profil CLHP correspond au monoadduit CysGly-HNE dont la formation résulte de la réaction enzymatique, et non au diadduit qui se forme directement à chaque fois que le HNE réagit avec un excès de CysGly (voir *publication n°3*). Enfin, si dans les cellules V79GGT, l'adduit GS-HNE est absent ou seulement présent en très faible quantité par rapport à l'adduit CysGly-HNE, il représente, en revanche, dans les cellules V79Cl incubées dans les mêmes conditions (fig. 40 B), le seul adduit (parmi les deux adduits recherchés) qui peut être détecté.

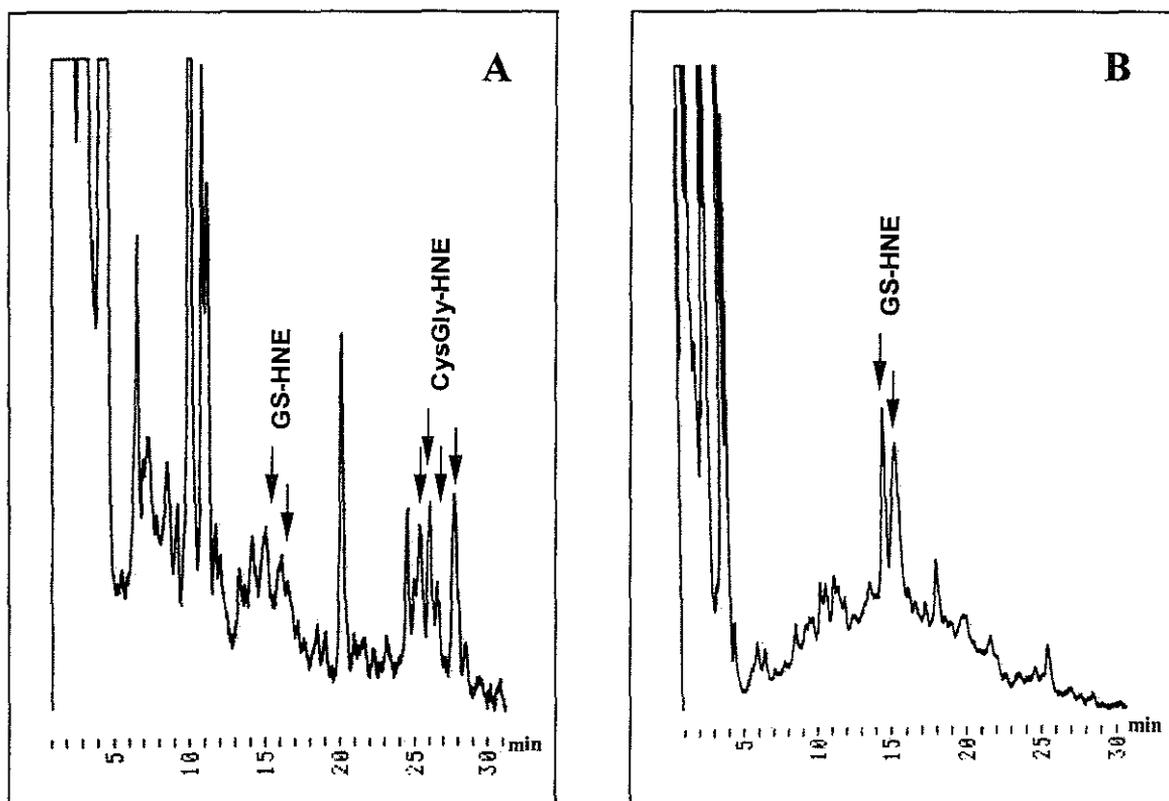


Figure 40 : Profils CLHP des adduits HNE-thiol formés lors de la peroxydation lipidique dépendante de la GGT.

A : lignée V79GGT ; B : lignée V79Cl ; substrat : acide arachidonique

Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules NIH3T3 et NIH3T3/GGT-rel. En effet, uniquement dans le milieu d'incubation de ces dernières, l'adduit CysGly-HNE (fig. 41 A) a pu être retrouvé, alors que le GS-HNE reste le seul adduit présent dans les cellules NIH3T3 (fig. 41 B).

Bien que la quantification des pics correspondant aux adduits soit difficile, à cause de la complexité des profils CLHP, nous pouvons cependant assurer que dans tous les cas le GS-HNE, formé par auto-oxydation des acides gras dans les cellules témoins V79Cl ou NIH3T3 représente moins de 50% de la totalité des adduits produits respectivement par les cellules V79GGT et NIH3T3/GGT-rel.

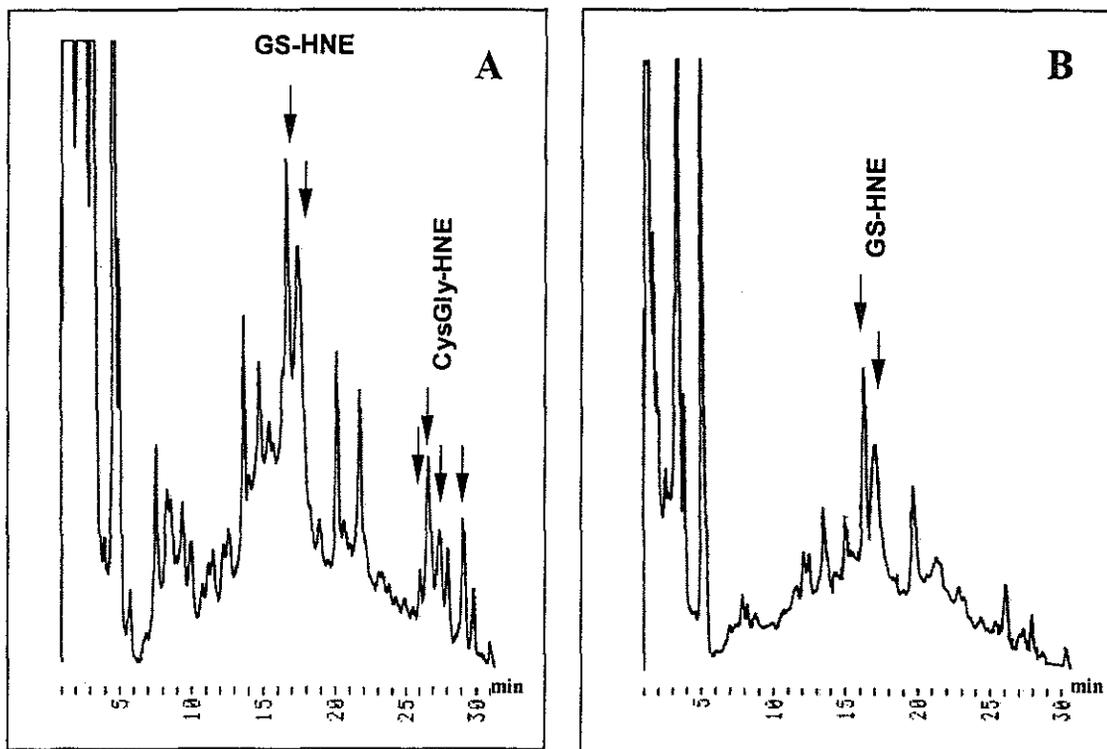


Figure 41 : Profils CLHP des adduits HNE-thiol formés lors de la peroxydation lipidique dépendante de la GGT-rel.

A : lignée NIH3T3/GGT-rel ; B : lignée NIH3T3 ; substrat : acide arachidonique

Le plus haut rendement en adduits a été obtenu en utilisant l'acide arachidonique. Ceci ne fait que confirmer la plus grande sensibilité de cet acide vis à vis de l'oxydation par rapport à l'acide linoléique.

Par ailleurs, ces résultats apportent la preuve que la GGT-rel est capable également d'induire la formation de HNE au cours de la peroxydation lipidique, ce qui n'avait pas pu être réalisé dans le modèle utilisé au cours du chapitre II de notre travail, l'enzyme n'étant pas disponible sous forme purifiée.

Nous avons démontré que la GGT ainsi que la GGT-rel métabolisent le GS-HNE en CysGly-HNE qui a été identifiée par spectrométrie de masse. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois que le métabolisme du GS-HNE conduit à une cytotoxicité élevée qui est directement liée à l'activité de ces deux enzymes. Bien que tous ces résultats soient obtenus *in vitro* dans des modèles cellulaires et ne permettent pas de conclure à la possibilité d'un effet toxique *in vivo*, ils doivent cependant être pris en compte pour une meilleure connaissance de la signification biologique du métabolisme du conjugué GS-HNE.

En effet, le conjugué GS-HNE est considéré jusqu'à présent comme un métabolite inoffensif destiné seulement à favoriser l'élimination de HNE. Or, dans la mesure où le métabolisme *in vivo* conduirait également à la formation de CysGly-HNE, ceci pourrait être à l'origine des effets toxiques tardifs du HNE ciblés vers les cellules riches en GGT ou en GGT-rel.

En outre, le même processus métabolique pourrait avoir pour conséquence l'augmentation de la toxicité de la peroxydation lipidique initiée par le système GGT(GGT-rel)/GSH/Fe³⁺.

La GGT et la GGT-rel interviendraient alors comme des amplificateurs des dommages liés à la peroxydation lipidique.

CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES

La GGT est impliquée dans le stress oxydant de manière ambivalente, par ses effets anti- et pro-oxydant, les deux étant corrélés à la capacité de cette enzyme de métaboliser le GSH. Ce métabolisme est nécessaire à l'approvisionnement des cellules en acides aminés précurseurs de la synthèse *de novo* du GSH, dont le rôle antioxydant est bien connu. D'autre part, à l'extérieur de la cellule, le métabolite CysGly peut initier, en présence de fer, une chaîne de réactions produisant des espèces réactives. L'étude de ce processus pro-oxydant présente un intérêt certain, qui découle de l'importance même de la connaissance des systèmes physiologiques pouvant contribuer aux déséquilibres de la balance anti-/pro-oxydant. Cela permettrait donc de mieux comprendre les conséquences que ce processus peut entraîner au niveau cellulaire et de saisir ses éventuelles implications dans des pathologies liées au stress oxydant.

La GGT-rel est une enzyme capable également de métaboliser le GSH, mais son éventuelle implication dans un processus pro-oxydant analogue à celui de la GGT, n'a jamais été étudié.

L'objectif général de ce travail était d'appréhender le rôle pro-oxydant de la GGT et de vérifier si la GGT-rel possède également un rôle pro-oxydant. Pour cela nous avons utilisé des modèles simples, dans la plupart des cas, cellulaires, permettant d'apprécier la contribution soit de la GGT, soit de la GGT-rel aux variations des paramètres du stress oxydant suivis.

L'étude réalisée a nécessité dans la plupart des cas le développement ou l'adaptation de plusieurs méthodes aux modèles expérimentaux choisis.

Dans la première partie de notre travail, nous avons étudié la relation entre le métabolisme du GSH par la GGT ou par la GGT-rel et la production d'espèces réactives de l'oxygène quand ce processus se déroule en présence de fer. Cette étude a été facilitée par la disponibilité de deux modèles cellulaires, à savoir les lignées fibroblastiques V79 transfectées par l'ADNc de la GGT humaine (V79GGT) ou à blanc (V79Cl). De même, dans le cas de la GGT-rel, des cellules fibroblastiques NIH3T3 transfectées par l'ADNc de la GGT-rel

d'origine humaine (NIH3T3/GGT-rel) ainsi que les cellules transfectées à blanc (NIH3T3) ont été utilisées. A chaque fois, la démarche expérimentale a visé d'abord l'étude du métabolisme du GSH, par un dosage CLHP des thiols extra- et intracellulaires après incubation des cellules en présence du GSH surajouté au milieu de culture. Cette démarche s'est avérée d'autant plus nécessaire dans le cas des cellules NIH3T3/GGT-rel, que, si le métabolisme du GSH dans les cellules V79GGT a déjà fait l'objet d'autres études, dans le cas de la GGT-rel, la formation de CysGly n'a jamais été mise en évidence. Ainsi, en utilisant les cellules NIH3T3/GGT-rel, nous avons démontré que la GGT-rel transforme le GSH en CysGly, tandis que les cellules NIH3T3 sont incapables de métaboliser le GSH. Cette transformation, mesurée dans les milieux d'incubation, s'accompagne également d'une augmentation de la concentration intracellulaire en CysGly.

Une fois la formation de CysGly démontrée, nous nous sommes préoccupée de la mesure de la production d'ERO liée à ce métabolisme en présence de fer, car il est connu que la CysGly, contrairement au GSH, est un métabolite plus réactif dont l'auto-oxydation en présence de métaux est responsable de la production d'espèces réactives. Pour ce faire, nous avons adapté à nos modèles une méthode spectrofluorimétrique reposant sur l'oxydation par les ERO de la sonde non-fluorescente DHR-123 en un dérivé fluorescent Rh-123. La variation des conditions nous a permis de discerner l'importance de chaque facteur dans le processus pro-oxydant et sa quantification, à savoir : l'enzyme (GGT ou GGT-rel), le GSH, le Fe^{3+} , l'agent complexant de celui-ci et la nature du milieu d'incubation. Nous avons démontré que le système GGT/GSH/ Fe^{3+} , ainsi que GGT-rel/GSH/ Fe^{3+} conduisent à la formation d'espèces réactives. Dans le cas de la GGT nos résultats confirment son rôle pro-oxydant démontré par d'autres auteurs dans différents modèles, car une production d'ERO dépendante de la GGT a pu être mise en évidence et quantifiée dans notre modèle cellulaire. En revanche, notre étude est la première, en ce qui concerne la GGT-rel, à démontrer un rôle pro-oxydant de cette enzyme, basé également sur le métabolisme du GSH en CysGly et l'auto-oxydation de cette dernière en présence de fer. Les deux systèmes enzymatiques (GGT/GSH/ Fe^{3+} et GGT-rel/GSH/ Fe^{3+}) peuvent donc représenter des sources physiologiques de radicaux libres et intervenir dans la balance anti-/pro-oxydant. De plus, les résultats obtenus constituent une validation des modèles cellulaires utilisés, pour d'autres études ayant pour but la mise en évidence des conséquences au niveau cellulaire du processus d'oxydation dépendant de la GGT ou de la GGT-rel.

On sait par ailleurs toute l'importance que représente le taux de radicaux libres quant à ses conséquences au niveau cellulaire, en général modulation des différentes fonctions par un processus de signalisation redox (concentrations faibles) ou dommage oxydatif des biomolécules (concentrations élevées). Nous avons ainsi établi les conditions adéquates pour des applications biologiques différentes, et en particulier pour l'étude de l'activation des facteurs de transcription (collaboration avec l'équipe de biologie moléculaire) et de la peroxydation lipidique. Ainsi il a été possible de démontrer que le métabolisme du GSH dans la lignée cellulaire V79GGT induit une activation du facteur de transcription NF- κ B qui n'est pas constatée dans la lignée V79Cl. Cet effet a pu être reproduit par H₂O₂ et inhibé par la catalase, démontrant ainsi que H₂O₂ est l'espèce responsable de l'activation du facteur NF- κ B dépendante de GGT/GSH.

Dans une deuxième partie de notre travail, nous nous sommes préoccupée tout particulièrement de la peroxydation lipidique (LPO) induite par le système GGT/GSH/Fe³⁺. On sait que la LPO est un processus complexe, conduisant à la formation d'une grande variété de produits, dont certains, comme le 4-hydroxynonénal, présentent une toxicité élevée. Si la LPO a été mise en évidence par d'autres auteurs comme étant une conséquence du rôle pro-oxydant de la GGT, et ceci dans des modèles de peroxydation des acides gras polyinsaturés, des microsomes, des cellules ou des LDL, en dehors de la formation de MDA (détecté par le test du TBARS), aucune étude n'a montré la formation de HNE ou d'autres aldéhydes. Nous avons donc réalisé une étude analytique approfondie des produits aldéhydiques issus de la LPO dépendante de la GGT. Pour ce faire nous avons eu recours à un modèle simple, consistant en l'utilisation d'acides gras polyinsaturés (acide linoléique ou acide linoléique) et de la GGT purifiée afin de faciliter l'analyse des composés formés. Cependant, l'utilisation d'un système d'oxydation chimique (ascorbate/fer) s'est avérée nécessaire dans un premier temps pour la mise au point des techniques. Ces dernières ont consisté en la dérivation des composés carbonyles par la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), l'extraction des dérivés et leur séparation par chromatographie sur couche mince suivie d'une seconde séparation par CLHP. L'identification des dérivés DNPH a été réalisée en utilisant deux techniques complémentaires de spectrométrie de masse, à savoir l'impact électronique couplé à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) et l'électrospray couplé à la chromatographie en phase liquide (LC-MS). Ces méthodes nous ont permis d'identifier un grand nombre de composés aldéhydiques formés lors de l'oxydation des acides gras insaturés

par le système GGT/GSG/Fe³⁺ et appartenant aux classes suivantes : alcanals, alcénals, alcadiénals, α -hydroxyaldéhydes, 4-hydroxyalcénals, cétones. En plus de la confirmation de l'implication de la GGT dans la peroxydation lipidique, l'intérêt de ces résultats réside surtout dans l'identification de produits hautement réactifs comme les hydroxyaldéhydes insaturés formés au cours de ce processus. En effet le HNE, et par analogie les composés présentant aussi une réactivité chimique comparable, présentent des effets toxiques sur un nombre important de fonctions cellulaires. Nos résultats suggèrent donc que dans la mesure où la LPO dépendante de la GGT conduit également *in vivo* à la formation de ces aldéhydes réactifs, ceci pourrait constituer un processus toxique.

On sait par ailleurs que les aldéhydes de type HNE réagissent avec certaines biomolécules, en particulier avec les thiols par une réaction d'addition de type Michael, pour former des adduits. Or nous avons rencontré au cours de nos expériences de peroxydation lipidique par le système GGT/GSH/Fe³⁺ des indices de formation de tels composés et nous nous sommes attachée par la suite à l'étude des adduits GS-HNE et CysGly-HNE en relation avec la GGT.

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons étudié le métabolisme du conjugué GS-HNE par la GGT et par la GGT-rel. En effet, la conjugaison du HNE au GSH est connue comme étant une voie de détoxification du HNE. Le conjugué GS-HNE est ensuite métabolisé en dérivé de l'acide mercapturique qui a été par ailleurs identifié dans l'urine chez le rat et chez l'homme. La voie de synthèse des acides mercapturiques est connue comme faisant intervenir plusieurs enzymes, dont la première est la GGT. De plus, dans le cas de certains composés, elle peut conduire à l'augmentation de la néphrotoxicité de leurs conjugués au GSH, suite à l'action de la GGT dont le taux d'expression au niveau rénal est particulièrement élevé. Cependant, le métabolisme du GS-HNE par la GGT et ses éventuelles conséquences n'ont fait l'objet d'aucune étude jusqu'à présent.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la GGT purifiée pour démontrer que l'enzyme reconnaît le GS-HNE synthétisé chimiquement en tant que substrat. Ce fait s'est révélé exact puisque l'analyse CLHP par une méthode de dérivation pré-colonne OPA-ME montre la disparition des pics correspondant aux diastéréoisomères de l'adduit GS-HNE et l'apparition d'autres pics à des temps de rétention différents. L'analyse par spectrométrie de masse (LC-MS) du métabolite formé, après purification, montre que celui-ci correspond à l'adduit CysGly-HNE.

Nous avons pu ensuite démontrer que la GGT des cellules V79GGT et la GGT-rel des cellules NIH3T3/GGT-rel sont capables de métaboliser ce conjugué. A noter toutefois que dans les cellules NIH3T3/GGT-rel ce métabolisme est plus lent.

Nous nous sommes consacrée par la suite à l'analyse des conséquences potentielles de ce métabolisme au niveau cellulaire, en particulier en ce qui concerne la cytotoxicité. Cette hypothèse s'est imposée par analogie avec les conjugués GSH connus pour être transformés en métabolites toxiques sous l'action de la GGT, ce qui est en particulier le cas du conjugué de l'acroléine, aldéhyde α,β -insaturé issu également de la LPO. L'incubation des cellules en présence de GS-HNE a conduit à l'augmentation de la cytotoxicité seulement dans les cellules V79GGT et NIH3T3/GGT-rel capables de métaboliser le conjugué en CysGly-HNE et non dans les cellules V79 et NIH3T3 témoins. Cette cytotoxicité a été mesurée par trois méthodes différentes : test MTT, Bleu de Trypan et dosage de la LDH. Elle s'est montrée dépendante à la fois de la dose en GS-HNE et du temps d'incubation. De plus, l'incubation des cellules V79Cl en présence de CysGly-HNE a conduit aussi à une cytotoxicité élevée, ce qui démontre donc que la CysGly-HNE en est la responsable. Bien que le mécanisme précis de cette cytotoxicité ne soit pas connu, l'étude de la stabilité des adduits GS-HNE et CysGly-HNE que nous avons réalisée, suggère que ce mécanisme pourrait avoir pour origine une libération de HNE à partir de CysGly-HNE. En effet, si le GS-HNE présente une stabilité élevée, celle de la CysGly-HNE est beaucoup plus faible et des quantités relativement importantes de HNE ont pu être mises en évidence au cours de l'incubation à 37°C.

Nos résultats montrent pour la première fois que le métabolisme du GS-HNE par la GGT et par la GGT-rel s'accompagne d'une augmentation de la cytotoxicité. Ce processus démontré *in vitro* rend concevable la transformation du GS-HNE *in vivo* par la voie de l'acide mercapturique avec des conséquences similaires. D'une part, le GS-HNE formé suite à la LPO à différents niveaux dans l'organisme pourrait être transporté puis transformé en un métabolite toxique par les cellules riches en GGT. Il pourrait en être ainsi pour les cellules rénales ou les cellules tumorales exprimant de hauts niveaux en GGT. D'autre part, au cours de la LPO induite par GGT/GSH/Fe³⁺, la formation de HNE pourrait être également suivie de la transformation du GS-HNE en CysGly-HNE plus toxique.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence la formation d'adduits de HNE au cours de la peroxydation des acides linoléique et arachidonique induite par les cellules V79GGT et NIH3T3/GGT-rel lorsqu'elles sont incubées en présence de GSH/Fe³⁺. Il faut toutefois souligner que seuls ces deux types cellulaires exprimant respectivement la GGT ou la

GGT-rel sont capables de former la CysGly-HNE. Dans le cas des cellules dépourvues de ces enzymes et dans les mêmes conditions, il se forme exclusivement du GS-HNE.

On peut alors conclure que la GGT et la GGT-rel pourraient intervenir au niveau cellulaire comme des amplificateurs des dommages de la LPO.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette étude répondent aux objectifs que nous nous étions fixés, mais soulèvent à la fois certaines hypothèses et questions qui mériteraient de faire l'objet d'études complémentaires.

Ainsi une étude comparative du statut d'autres systèmes enzymatiques anti- et pro-oxydants dans les cellules V79GGT et NIH3T3/GGT-rel pourrait apporter une explication en ce qui concerne les niveaux de la production d'ERO dépendante respectivement de la GGT et de la GGT-rel. En effet, nous avons constaté qu'en plus de l'activité de clivage du résidu γ -glutamyle du GSH, d'autres facteurs semblent influencer cette production d'ERO.

En outre, la mesure de la concentration d'ERO par comparaison avec d'autres systèmes d'oxydation physiologiques serait intéressante pour apprécier la place que le système GGT (GGT-rel)/GSH/Fe³⁺ peut jouer dans la génération du stress oxydant.

La démonstration du métabolisme du GS-HNE par la GGT et la GGT-rel et de la cytotoxicité qui en découle ouvre de nombreuses perspectives et parmi elles des études destinées à clarifier le mécanisme exact de la cytotoxicité que nous avons constatée. Nous avons en effet montré que la faible stabilité de l'adduit CysGly-HNE conduit à une libération de HNE, qui pourrait être responsable de l'effet cytotoxique observé. La mise en évidence de HNE libre dans le milieu des cellules métabolisant le GS-HNE, ainsi que celle d'adduits HNE-protéines (par une technique Western blot) constituerait une réponse à cette hypothèse.

Dans ces conditions, des travaux pourraient être envisagés afin de préciser les différents effets, toxiques ou modulateurs, que HNE libéré à partir de la CysGly-HNE peut induire au niveau cellulaire. L'étude des conséquences éventuelles du métabolisme du GS-HNE par la GGT ou la GGT-rel, peut en effet viser des aspects aussi variés que la

prolifération cellulaire, l'apoptose, l'inactivation de différentes enzymes ainsi que la transduction du signal et l'activation des gènes.

Enfin, des études *in vivo* semblent indispensables pour une meilleure connaissance de la signification biologique du métabolisme du GS-HNE par la GGT. En particulier, des expériences destinées à la mise en évidence d'une éventuelle toxicité du conjugué GS-HNE au niveau rénal semblent pleines de promesses.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Accaoui M.-J., Enoiu M., Mergny M., Masson C., Dominici S., Wellman M. and Visvikis A.**
Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent glutathione catabolism results in activation of NF-kB.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, **276**, 1062-1067.
- Alary J., Bravais F., Cravedi J.P., Debrauwer L., Rao D. and Bories G.**
Mercapturic acid conjugates as urinary end metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in the rat.
Chem. Res. Toxicol., 1995, **8**, 34-39.
- Alary J., Debrauwer L., Fernandez Y., Cravedi J.-P., Rao D. and Bories G.**
1,4-Dihydroxynonene mercapturic acid, the major end metabolite of exogenous 4-hydroxy-2-nonenal, is a physiological component of rat and human urine.
Chem. Res. Toxicol., 1998b, **11**, 130-135.
- Alary J., Debrauwer L., Fernandez Y., Paris A., Cravedi J.P., Dolo L., Rao D. and Bories G.**
Identification of novel urinary metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in rats.
Chem. Res. Toxicol., 1998a, **11**(11), 1368-1376.
- Allen R.G. and Tresini M.**
Oxidative stress and gene regulation.
Free Radic. Biol. Med., 2000, **28**, 463-499.
- Allevi P., Anastasia M., Cajone F., Ciuffreda P. and Sanvito A.M.**
Structural requirements of aldehydes produced in LPO for the activation of the heat-shock genes in HeLa cells.
Free Radic. Biol. Med., 1995, **18**, 107-116.
- Anderson M.E. and Meister A.**
Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, **80**, 707-711.
- Arrigo A.-P.**
Gene expression and the thiol redox state.
Free Radic. Biol. Med., 1999, **27**, 936-944.
- Bauerle P.A., Rupec R.A. and Pahl H.L.**
Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response.
Path. Biol., 1996, **44**, 29-35.
- Bains J.S. and Shaw C.A.**
Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death.
Brain Res. Brain Res. Rev., 1997, **25**, 335-358.
- Barrera G., Pizzimenti S., Serra A., Fazio V.M., Canuto R.A. and Dianzani M.U.**
Effect of bioactive aldehydes on cell proliferation and c-myc expression in HL-60 human leukemic cells.
Cancer Detect. Prev., 2000, **24**, 244-251.
- Bellomo G., Vairetti M., Stivala L., Mirabelli F., Richelmi P. and Orrenius S.**
Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, **89**, 4412-4416.
- Benedetti A., Barbieri L., Ferrali M., Casini A.F., Fulceri R. and Comporti M.**
Inhibition of protein synthesis by carbonyl compounds (4-hydroxyalkenals) originated from the peroxidation of liver microsomal lipids.
Chem. Biol. Interact., 1981, **35**, 331-340.
- Bestervelt L.L., Vaz A.D. and Coon M.J.**
Inactivation of ethanol-inducible cytochrome P450 and other microsomal P450 isozymes by trans-4-hydroxy-2-nonenal, a major product of membrane lipid peroxidation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, **92**, 3764-3798.

Boon P.J.M., Marinho H.S., Oosting R. and Mulder G.J.

Glutathione conjugation of 4-hydroxy-*trans*-2,3-nonenal in the rat *in vivo*, the isolated perfused liver and erythrocytes.

Toxicol. Appl. Pharmacol., 1999, **159**, 214-223.

Brattström L. and Wilken D.

Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect ?

Am. J. Clin. Nutr., 2000, **72**, 316-323.

Brigelius-Flohé R.

Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases.

Free Radic. Biol. Med., 1999, **27**, 951-965.

Brown K.E., Kinter M.T., Oberley D., Freeman M.L., Frierson H.F., Ridnour L.A., Tao Y., Oberley L.W. and Spitz D.R.

Enhanced γ -glutamyl transpeptidase expression and selective loss of CuZn superoxide dismutase in hepatic iron overload.

Free Radic. Biol. Med., 1998, **24**, 545-555.

Buechter D.D.

Free radicals and oxygen toxicity.

Pharm. Res., 1988, **5**, 253-260.

Buko V.U., Artsukevich A.A. and Ignatenko K.V.

Aldehydic product of lipid peroxidation inactivate cytochrome P-450.

Exp. Toxicol. Pathol. 1999, **51**, 294-298.

Burkitt M.J. and Gilbert B.C.

The autoxidation of iron(II) in aqueous systems: the effects of iron chelation by physiological, non-physiological and therapeutic chelators on the generation of reactive oxygen species and the inducement of biomolecular damage.

Free Radic. Res. Commun., 1991, **14**, 107-123.

Butler A.R. and Rhodes P.

Chemistry, analysis, and biological roles of *S*-nitrosothiols.

Anal. Biochem., 1997, **249**, 1-9.

Butterworth M., Lau S.S. and Monks T.J.

Formation of catechol estrogen glutathione conjugates and gamma-glutamyl transpeptidase-dependent nephrotoxicity of 17 β -estradiol in the golden Syrian hamster.

Carcinogenesis, 1997, **18**, 561-567.

Cajone F. and Crescente M.

In vitro activation of heat shock transcription factor by 4-hydroxynonenal.

Chem. Biol. Interact., 1992, **84**, 97-112.

Camandola S., Scavazza A., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarpotto E., Azzi A. and Poli G.

Biogenic 4-hydroxy-2-nonenal activates transcription factor AR-1 but not NF- κ B in cells of the macrophage lineage.

Biofactors, 1997, **6**, 173-179.

Carvalho V.M., Asahara F., Di Mascio P., de Arruda Campos I.P., Cadet J. and Medeiros M.H.

Novel 1,N(6)-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products.

Chem. Res. Toxicol., 2000, **13**, 397-405.

Chaudière J.

Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in living cells.

In : Free Radical Damage and its Control / ed. par Rice-Evans C.A. and Burdon R.H.

Elsevier, 1994, p 25-66.

Chen J., Robinson N.C., Schenker S., Frosto T.A. and Henderson G.I.
Formation of 4-hydroxynonenal adducts with cytochrome c oxidase in rats following short-term ethanol intake.
Hepatology, 1999, **29**, 1792-1798.

Chisolm G.M. and Steinberg D.
The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview.
Free Radic. Biol. Med., 2000, **28**, 1815-1826.

Choi J., Liu R.-M. and Forman H.J.
Adaptation to oxidative stress: quinone-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells ;
Biochem. Pharmacol., 1997, **53**, 987-993.

Chung F.L., Nath R.G., Ocando J., Nishikawa A. and Zhang L.
Deoxyguanosine adducts of t-4-hydroxy-2-nonenal are endogenous DNA lesions in rodents and humans: detection and potential sources.
Cancer Res., 2000, **60**, 1507-1511.

Commandeur J.N.M., Stijntjes G.J. and Vermeulen N.P.E.
Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates.
Pharmacol. Rev., 1995, **47**, 271-330.

Comporti M.
Lipid peroxidation and biogenic aldehydes : from identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology.
Free Radic. Res., 1998, **28**, 623-635.

Courtay C., Heisterkamp N., Siest G. and Groffen J.
Expression of multiple γ -glutamyltransferase genes in man.
Biochem. J., 1994, **297**, 503-508.

Curthoys N.P. and Hughey R.P.
Characterization and physiological function of rat renal γ -glutamyltranspeptidase.
Enzyme, 1979, **24**, 383-403.

Cutrin J.C., Zingaro B., Camandola S., Boveris A., Pompella A. and poli G.
Contribution of gamma glutamyl transpeptidase to oxidative damage of ischemic rat kidney.
Kidney Int., 2000, **57**, 526-533.

De Hoffman E., Charrette J. et Stroobant V.
Spectrométrie de masse. Cours et exercices corrigés. 2^{ème} ed.
Paris, Dunod, 1999, p.105-110.

De Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M. and Vermeulen N.P.E.
Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans.
Free Radic. Biol. Med., 1999, **26**, 202-226.

Del Bello B, Paolicchi A., Comporti M., Pompella A and Maellaro E.
Hydrogen peroxide produced during γ -glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells.
FASEB J., 1999, **13**, 69-79.

Del Corso A., Dal Monte M., Vilaro P.G., Cecconi L., Moschini R., Banditelli S., Cappiello M., Tsai L. and Mura U.
Site-specific inactivation of aldose reductase by 4-hydroxynonenal.
Arch. Biochem. Biophys., 1998, **350**, 245-248.

Dianzani M.U., Barrera G. and Parola M.
4-hydroxy-2,3-nonenal as a signal for cell function and differentiation.
Acta Biochim. Pol., 1999, **46**, 61-75.

Diplock A. T.

Antioxidants and free radical scavengers.

In : Free Radical Damage and its Control/ ed. par Rice-Evans C.A. and Burdon R.H.
Elsevier, 1994, p 113-130.

Dominici S., Valentini M., Maellaro E., Del Bello B., Paolicchi A., Lorenzini E., Tongiani R., Comporti M. and Pompella A.

Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: the role of γ -glutamyl transpeptidase-dependent H_2O_2 production and S-thiolation.
Free Radic. Biol. Med. 1999, 27, 623-635.

Drozd R., Parmentier C., Hachad H., Leroy P., Siest G. and Wellman, M.

γ -Glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system.
Free Radic. Biol. Med., 1998, 25, 786-792.

Dygas A., Makowski P. and Pikula S.

Is the glutathione conjugate of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal transported by the multispecific organic anion transporting-ATPase of human erythrocytes?
Acta Biochim. Pol., 1998, 45, 59-65.

Eaton P., Li J.M., Hearse D.J. and Shattock M.J.

Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart.
Am. J. Physiol., 1999, 276, H935-H943.

Eckl P.M., Ortner A. and Esterbauer H.

Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes.
Mutat. Res., 1993, 290, 183-192.

Elfarra A.A. and Anders M.W.

Renal processing of glutathione conjugates. Role in nephrotoxicity.
Biochem. Pharmacol., 1984, 33, 3729-3732.

Ende M. and Luftmann H.

Unerwartete reaktionsprodukte von *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) mit aldehyden.
Tetrahedron, 1984, 40, 5167-5070.

Esterbauer H., Zollner H. and Scholz N.

Reaction of glutathione with conjugated carbonyls.
Z. Naturforsch., 1975a, 30 c, 466-473.

Esterbauer H., Ertl A. and Scholz N.

The reaction of cysteine with α,β -unsaturated aldehydes.
Tetrahedron, 1975b, 32, 285-289.

Esterbauer H., Cheeseman K.H., Dianzani M.U., Poli G. and Slater T.F.

Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP- Fe^{2+} in rat liver microsomes.
Biochem. J., 1982, 208, 129-140.

Esterbauer H., Zollner H. and Lang J.

Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions.
Biochem. J., 1985, 228, 363-373.

Esterbauer H., Schaur R.J. and Zollner H.

Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.
Free Radic. Biol. Med., 1991, 11, 81-128.

Esterbauer H.

Estimation of peroxidative damage.
Path. Biol., 1996, 44, 25-28.

Favier A.

Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur.
Ann. Biol. Clin., 1997, 55, 9-16.

Fazio V.M., Barrera G., Martinotti S., Farace M.G., Giglioni B., Frati L., Manzari V. and Dianzani M.U.
4-hydroxynonenal, a product of cellular lipid peroxidation, which modulates c-myc and globin gene expression in K562 erythroleukemic cells.
Cancer Res., 1992, 52, 4866-4871.

Forman H.J. and Skelton D.C.

Protection of alveolar macrophages from hyperoxia by gamma-glutamyl transpeptidase.
Am. J. Physiol., 1990, 259, L102-L107.

Fridovich I.

Oxygen toxicity: a radical explanation.
J. Exp. Biol., 1998, 201, 1203-1209.

Fukuda A., Osawa T., Hitomi K. and Uchida K.

4-Hydroxy-2-nonenal cytotoxicity in renal proximal tubular cells: protein modification and redox alteration.
Arch. Biochem. Biophys., 1996, 333, 419-426.

Gérard-Monnier D. and Chaudière J.

Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion.
Path. Biol., 1996, 44, 77-85.

Giannessi M., Del Corso A., Cappiello M., Voltarelli M., Marini I., Barsacchi D., Garland D., Camici M. and Mura U.

Thiol-dependent metal-catalyzed oxidation of bovine lens aldose reductase. I. Studies on the modification process.
Arch. Biochem. Biophys., 1993, 300, 423-429.

Glass G.A. and Stark A.A.

Promotion of glutathione- γ -glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation by copper and ceruloplasmin: The requirement for iron and the effects of antioxidants and antioxidant enzymes.
Environ. Mol. Mutagen, 1997, 29, 73-80.

Glatt H.

Mutagenicity spectra in *Salmonella typhimurium* strains of glutathione, L-cysteine and active oxygen species.
Mutagenesis, 1989, 4, 221-227.

Goelen E., Lambrechts M. and Geyskens F.

Sampling intercomparison for aldehydes in simulated workplace air.
Analyst, 1997, 122, 411-419.

Grant C.M., MacIver F.H. and Dawes I.W.

Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine.
Mol. Biol. Cell., 1997, 8, 1699-1707.

Griffith O.W. and Tate S.S.

The apparent glutathione oxidase activity of γ -glutamyltranspeptidase.
J. Biol. Chem., 1980, 255, 5011-5014.

Griffith O.W.

Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis.
Free Radic. Biol. Med., 1999, 27(9/10), 922-935.

Grune T., Siems W., Kowalewski J., Zollner H. and Esterbauer H.

Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by enterocytes of rat small intestine.
Biochem. Int., 1991, 25, 963-971.

Grune T., Siems W.G. and Petras T.

Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in in situ perfused rat kidney.
J. Lipid Res., 1997, 38, 1660-1665.

Guérad F., Alary J., Costet P., Debrauwer L., Dolo L., Pineau T. and Paris A.

In vivo involvement of cytochrome P450 4A family in the oxidative metabolism of the lipid peroxidation product *trans*-4-hydroxy-2-nonenal, using PPAR α -deficient mice.
J. Lipid. Res., 1999, 40, 152-159.

Gutierrez-Correa J. and Stoppani A.O.

Inactivation of myocardial dihydrolipoamide dehydrogenase by myeloperoxidase systems: effect of halides, nitrite and thiol compounds.
Free Radic. Res., 1999, 30, 105-117.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.

Lipid peroxidation: a radical chain reaction.
In : Free Radicals in Biology and Medicine, 2^e ed.
Oxford, Clarendon Press, 1989, p 188-218.

Hannigan M.H.

γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis.
Chem. Biol. Interact., 1998, 111-112, 333-342.

Hartley D.P., Ruth J.A. and Petersen D.R.

The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase.
Arch. Biochem. Biophys., 1995, 316, 197-205.

Hauptlorenz S., Esterbauer H., Moll W., Pümpel R., Schauenstein E. and Puschendorf B.

Effects of the lipidperoxidation product 4-hydroxynonenal and related aldehydes on proliferation and viability of cultured Erlich ascites tumor cells.
Biochem. Pharmacol., 1985, 34, 3803-3809.

Haynes R.L., Szweda L., Pickin K., Welker M.E. and Townsend A.J.

Structure-activity relationships for growth inhibition and induction of apoptosis by 4-hydroxy-2-nonenal in Raw 264.7 cells.
Mol. Pharmacol., 2000, 58, 788-794.

Heisterkamp N., De Meyts E.R., Uribe L., Forman H.J. and Groffen J.

Identification of a human γ -glutamyl cleaving enzyme related to, but distinct form, γ -glutamyl transpeptidase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 6303-6307.

Held K.D., Sylvester F.C., Hopcia K.L. and Biaglow J.E.

Role of Fenton chemistry in thiol-induced toxicity and apoptosis.
Radiat. Res., 1996, 145, 542-553.

Herbert V., Shaw S. and Jayatilleke E.

Vitamin C-driven free radical generation from iron.
J. Nutr., 1996, 126, 1213S - 1220S.

- Herbst U., Toborek M., Kaiser S., Mattson M.P. and Hennig B.**
4-hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells.
J. Cell. Physiol., 1999, **181**, 295-303.
- Horvath J.J., Witmer C.M. and Witz G.**
Nephrotoxicity of the 1:1 acrolein-glutathione adduct in the rat.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 1992, **117**, 200-207.
- Hubatsch I., Ridderström M. and Mannervik B.**
Human glutathione transferase A4-4 : an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation.
Biochem. J., 1998; **330**, 175-179.
- Humphries K.M. and Szweda L.I.**
Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase : reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal.
Biochemistry, 1998, **37**, 15835-15841.
- Ischiropoulos H., Gow A., Thom S.R., Kooy N.W., Royall J.A. and Crow J.P.**
Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123.
In : *Methods in Enzymology*.
Academic Press, New York, 1999, vol. 301, p. 367-373.
- Ishii H., Ebihara Y., Okuno F., Munakata Y., Takagi T., Arai M., Shigeta S. and Tsushiya M.**
 γ -glutamyltranspeptidase activity in liver of alcoholics and its histochemical localization.
Alcoholism, 1986, **10**, 81-85.
- Kalyanaraman B., Karoui H., Singh R.J. and Felix C.C.**
Detection of thyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols – A high resolution ESR spin trapping study at Q-band (35 GHz).
Anal. Biochem., 1996, **241**, 75-81.
- Karp D.R., Shimooku K. and Lipsky P.E.**
Expression of γ -glutamyl transpeptidase protects ramos B cells from oxidation-induced cell death.
J. Biol. Chem., 2000, in press.
- Keppler D.**
Export pumps for glutathione S-conjugates.
Free Radic. Biol. Med., 1999, **27**, 985-991.
- Keren R. and Stark A.A.**
Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent mutagenicity and cytotoxicity of gamma-glutamyl derivatives: a model for biochemical targeting of chemotherapeutic agents.
Environ. Mol. Mutagen., 1998, **32**, 377-386.
- Kugelman A., Choy H.A., Liu R., Shi M.M., Gozal E. and Forman H.J.**
Gamma-glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar epithelial cells.
Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 1994, **11**, 586-592.
- Kwon O.J., Lee S.M., Floyd R.A. and Park J.-W.**
Thiol-dependent metal-catalyzed oxidation of copper, zinc superoxide dismutase.
Biochim. Biophys. Acta., 1998, **1387**, 249-256.
- Laouar A., Villiers C., Sancéau J., Maison C., Colomb M., Wietzerbin J. and Bauvois B.**
Inactivation of interleukin-6 *in vitro* by monoblastic U937 cell plasma membranes involves both protease and peptidyl-transferase activities.
Eur. J. Biochem., 1993, **215**, 825-831.

Laouar A., Wietzerbin J. and Bauvois B.

Protease-catalyzed conversion of insulin-like growth factor-1 and interleukin-6 into high-molecular mass species through the sequential action of hematopoietic surface-associated cathepsin G and γ -glutamyl transpeptidase-related activities.

Eur. J. Biochem., 1994, **223**, 617-624.

Lau S.S. and Monks T.J.

The *in vivo* disposition of 2-bromo-[14 C]hydroquinone and the effect of γ -glutamyl transpeptidase inhibition.

Toxicol. Appl. Pharmacol., 1990, **103**, 121-132.

Laurent A., Alary J., Debrauwer L. and Cravedi J.-P.

Analysis in the rat of 4-hydroxynonenal metabolites excreted in bile: evidence of enterohepatic circulation of these byproducts of lipid peroxidation.

Chem. Res. Toxicol., 1999, **12**, 887-894.

Lee S.H., Rindgen D., Bible R.H., Hajdu E. and Blair I.A.

Characterization of 2'-deoxyadenosine adducts derived from 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation.

Chem. Res. Toxicol., 2000, **13**, 565-574.

Lefèvre G., Beljean-Leymarie M., Beyerle F., Bonnefont-Rousselot D., Cristol J.-P., Thérond P. et Toreilles J.

Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique.

Ann. Biol. Clin., 1998, **56**, 305-319.

Leonarduzzi G., Scavazza A., Biasi F., Chiarpoto E., Camandola S., Vogel S., Dargel R. and Poli G.

The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis.

FASEB J., 1997, **11**, 851-857.

Leonarduzzi G., Arkan M.C., Başağa H., Chiarpoto Z., Sevanian A. and Poli G.

Lipid oxidation products in cell signaling.

Free Radic. Biol. Med., 2000, **28**, 1370-1378.

Liu R.-M., Gao L., Choi J. and Forman H.J.

γ -Glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal.

Am. J. Physiol., 1998a, **275**, L861-L869.

Liu R.-M., Ming Shi M., Giulivi C. and Forman H.J.

Quinones increase γ -glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells.

Am. J. Physiol., 1998b, **274**, L330-L336.

Lodge J.K., Traber, M.G. and Packer L.

Thiol chelation of Cu^{2+} by dihydrolipoic acid prevents human low density lipoprotein peroxidation.

Free Radic. Biol. Med., 1998, **25**, 287-297.

Loidl-Stahlhofen A. and Spiteller G.

α -Hydroxyaldehydes, products of lipid peroxidation.

Biochim. Biophys. Acta, 1994, **1211**, 156-160.

Loidl-Stahlhofen A., Hannemann K. and Spiteller G.

Generation of α -hydroxyaldehydic compounds in the course of lipid peroxidation.

Biochim. Biophys. Acta, 1994, **1213**, 140-148.

Loidl-Stahlhofen A., Kern W. and Spiteller G.

Gas chromatographic-electron impact mass spectrometric screening procedure for unknown hydroxyaldehydic lipid peroxidation products after pentafluorobenzoyloxime derivatization.

J. Chromatogr. B 1995, **673**, 1-14.

Luperchio S., Tamir S. and Tannenbaum S.R.

NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells.
Free Radic. Biol. Med., 1996, 21, 513-519.

Lynch S.M. and Frei B.

Physiological thiol compounds exert pro- and anti-oxidant effects, respectively, on iron- and copper-dependent oxidation of human low-density lipoprotein.
Biochim. Biophys. Acta, 1997, 1345, 215-221.

Madhu C., Gregus Z., Cheng C.C. and Klaassen C.D.

Identification of the mixed disulfide of glutathione and cysteinylglycine in bile: dependence on γ -glutamyl transferase and responsiveness to oxidative stress.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1992, 262, 896-900.

Maellaro E., Dominici S., Del Bello B., Valentini M.A., Pieri L., Perego P., Supino R., Zunino F., Lorenzini E., Paolicchi A., Comporti M. and Pompella A.

Membrane gamma-glutamyl transpeptidase activity of melanoma cells: effects on cellular H₂O₂ production, cell surface protein thiol oxidation and NF-kappa B activation status.
J. Cell. Sci., 2000, 113, 2671-2678.

Marangon K., Devaraj S., Tirosh O., Packer, L. and Jialal I.

Comparison of the effect of α -lipoic acid and α -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress.
Free Radic. Biol. Med., 1999, 27: 1114-1121.

Martinez A., Urios A. and Blanco M.

Mutagenicity of thiol compounds in Escherichia coli WR2 tester strain IC203, deficient in OxyR: effects of S9 fractions from rat liver and kidney.
Mutat. Res., 1999, 446, 205-213.

Martinez-Cayuela M.

Oxygen free radicals and human disease.
Biochimie, 1995, 77, 147-161.

Meagher E.M. and Fitzgerald G.A.

Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations.
Free Radic. Biol. Med., 2000, 12, 1745-1750.

Meister A., Tate S.S. and Griffith O.W.

γ -Glutamyl transpeptidase.

In: Methods in Enzymology / ed. par Jakoby W.B.
New York, Academic Press, 1981, vol. 77, p. 237-240.

Meister A. and Anderson M.E.

Glutathione.

Ann. Rev. Biochem., 1983, 52, 711-760.

Miller D.M. and Aust S.D.

Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation.
Arch. Biochem. Biophys., 1989, 271, 113-119.

Misra H.P.

Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols.
J. Biol. Chem., 1974, 249, 2151-2155.

Monks T.J., Lau S.S., Highet R.J. and Gillette J.R.

Glutathione conjugates of 2-bromohydroquinone are nephrotoxic.
Drug Metab. Dispos., 1985, 13, 553-559.

Monks T.J. and Lau S.S.

The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates.
Annu Rev. Pharmacol. Toxicol., 1998, **38**, 229-255.

Montine K.S., Kim P.J., Olson S.J., Markesbery W.R. and Montine T.J.

4-hydroxy-2-nonenal-pyrrole adducts in human neurodegenerative disease.
J. Neuropathol. Exp. Neurol., 1997, **56**, 866-871.

Morris C., Courtay C., van Kessel A. G., Hoeve J., Heisterkamp N. and Groffen J.

Localization of a gamma-glutamyl-transferase-related gene family on chromosome 22.
Hum. Genet., 1993, **91**, 31-36.

Munday R. and Winterbourn C.C.

Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism.

Biochem. Pharmacol., 1989, **38**, 4349-4352.

Nappi A.J. and Vass E.

Comparative studies of enhanced iron-mediated production of hydroxyl radical by glutathione, cysteine, ascorbic acid, and selected catechols.

Biochim. Biophys. Acta, 1997, **1336**, 295-301.

Norsten-Höög C. and Cronholm T.

Analysis of aldehydic lipid peroxidation products in rat liver by gas chromatography and mass spectrometry of the oxime-*tert*-butyldimethylsilyl derivatives.

Anal. Biochem., 1990, **189**, 131-137.

Okamoto K., Toyokuni S., Uchida K., Ogawa O., Takenawa J., Kakehi Y., Kinoshita H., Hattori-Nakakuki Y., Hiai H. and Yoshida O.

Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma.

Int. J. Cancer, 1994, **58**, 825-829.

Palamanda J.R. and Kehrer J.P.

Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes.

Arch. Biochem. Biophys., 1992, **293**, 103-109.

Paolicchi A., Tongiani R., Tonarelli P., Comporti M. and Pompella A.

Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and HepG2 hepatoma cells.

Free Radic. Biol. Med., 1997, **22**, 853-860.

Paolicchi A., Minotti G., Tonarelli P., Tongiani R., De Cesare D., Mezzeti A., Dominici S., Comporti M. and Pompella A.

γ -Glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation - a potential mechanism in atherosclerosis.

J. Invest. Med., 1999, **47**, 151-160.

Park J.-W. and Floyd R.A.

Glutathione/ $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$ -mediated DNA strand breaks and 8-hydroxydeoxyguanosine formation.

Biochim. Biophys. Acta, 1997, **1336**, 263-268.

Parmentier C.

Métabolisme du glutathion et stress oxydant – implication de la gamma-glutamyltransferase. – 393p.

Th. : Pharma : Nancy 1 : 1998.

Parmentier C., Wellman M., Nicolas A., Siest G. and Leroy P.

Simultaneous measurement of reactive oxygen species and reduced glutathione using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection in cultured cell lines.

Electrophoresis, 1999, **20**, 2938-2944.

Parola M., Bellomo G., Robino G., Barrera G. and Dianzani M. U.

4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications.
Antiox. Redox Signal., 1999a, 1, 255-283.

Parola M., Robino G. and Dianzani M.U.

4-hydroxy-2,3-alkenals as molecular mediators of oxidative stress in the pathogenesis of liver fibrosis.
Int. J. Mol. Med., 1999b, 4, 425-432.

Parthasarathy S.

Oxidation of low-density lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl LDL receptor.
Biochim. Biophys. Acta, 1987, 917, 337-340.

Perego P., Paolicchi A., Tongiani R., Pompella A., Tonarelli P., Carenni N., Romanelli S., and Zunino F.

The cell-specific anti-proliferative effect of reduced glutathione is mediated by gamma-glutamyl transpeptidase-dependent extracellular pro-oxidant reactions.
Int. J. Cancer, 1997, 71, 246-250.

Peters M.M., Jones T.W., Monks T.J. and Lau S.S.

Cytotoxicity and cell proliferation induced by the nephrocarcinogen hydroquinone and its nephrotoxic metabolite 2,3,5-(tris-glutathion-S-yl)hydroquinone.
Carcinogenesis, 1997, 18, 2393-2401.

Petras T., Siems W.G. and Grune T.

4-hydroxynonenal is degraded to mercapturic acid conjugate in rat kidney.
Free Radic. Biol. Med., 1995, 19, 685-688.

Philipps M.J., Poucell S. and Oda M.

Biology of disease. Mechanism of cholestasis.
Lab. Invest., 1986, 54, 593-608.

Poli G., Dianzani M.U., Cheeseman K.H., Slater T.F., Lang J. and Esterbauer H.

Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions.
Biochem J., 1985, 227, 629-638.

Pompella A., Paolicchi A., Dominici S., Comporti M. and Tongiani R.

Selective colocalization of lipid peroxidation and protein thiol loss in chemically induced hepatic preneoplastic lesions: the role of γ -glutamyltranspeptidase activity.
Histochem. Cell. Biol., 1996, 106, 275-282.

Potdar P.D., Andrews K.L., Nettesheim P. and Ostrowski L.E.

Expression and regulation of γ -glutamyl transpeptidase-related enzyme in tracheal cells.
Am. J. Physiol., 1997, 273, L1082-L1089.

Puntarulo S. and Cederbaum A.I.

Comparison of the ability of ferric complexes to catalyze microsomal chemiluminescence, lipid peroxidation, and hydroxyl radical generation.
Arch. Biochem. Biophys., 1988, 264, 482-491.

Rahman I. and MacNee W.

Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches.
Free Radic. Biol. Med., 2000, 28, 1405-1420.

Reiter R.J.

Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain.
FASEB J., 1995, 9, 526-533.

Remacle J., Raes M., Toussaint O., Renard P. and Rao G.

Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function.
Mutat. Res., 1995, 316, 103-122.

Rice-Evans C.A. and Diplock A.T. and Symons M.C.R.

Investigation of the consequences of free radical attack on lipids.

In : Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Techniques in free radical research. /ed. par Burdon R.H. and van Knippenberd P.H.

Amsterdam, Elsevier, 1991, vol. 22, p. 155-157.

Rinaldi M., Barrera G., Aquino A., Spinsanti P., Pizzimenti S, Farace M.G., Dianzani M.U and Fazio V.M.

4-hydroxynonenal-induced MEL cell differentiation involves PKC activity translocation.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 272, 75-80.

Roberts L.J. and Morrow J.D.

The generation and actions of isoprostanes.

Biochim. Biophys. Acta, 1997, 1345, 121-135.

Rosenblat M. and Aviram M.

Macrophage glutathione content and glutathione peroxidase activity are inversely related to cell-mediated oxidation of LDL : in vitro and in vivo studies.

Free Radic. Biol. Med., 1998, 24, 305-317.

Rossi M.A. and Dianzani M.U.

Action of 2-nonenal and 4-hydroxynonenal on phosphoinositide-specific phospholipase C in undifferentiated and DMSO-differentiated HL-60 cells.

Cell. Biochem. Funct., 2000, 18, 209-214.

Rossi M.A., Di Mauro C., Esterbauer H., Fidale F. and Dianzani M.U.

Activation of phosphoinositide-specific phospholipase C of rat neutrophils by the chemotactic aldehydes 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal and 4-hydroxy-2,3-trans-octenal.

Cell Biochem. Funct., 1994, 12, 275-280.

Royall J.A., Ischiropoulos H.

Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells.

Arch. Biochem. Biophys., 1993, 302, 348-355.

Saez G., Thornalley P.J., Hill H.A.O., Hems R. and Bannister J.V.

The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes.

Biochim. Biophys. Acta, 1982, 719, 24-31.

Salomon R.G., Kaur K., Podrez E., Hoff H.F., Krushinsky A.V. and Sayre L.M.

HNE-derived 2-pentylpyrroles are generated during oxidation of LDL, are more prevalent in blood plasma from patients with renal disease or atherosclerosis, and are present in atherosclerotic plaques.

Chem. Res. Toxicol., 2000, 13, 557-564.

Santanam N. and Parthasarathy S.

Cellular cysteine generation does not contribute to the initiation of LDL oxidation.

J. Lipid. Res., 1995, 36, 2203-2211.

Schauenstein E., Taufer M., Esterbauer H., Kylianek A. and Seelich Th.

Über die reaktion von protein-SH-gruppen mit 4-hydroxypentenal.

Monatshefte für Chemie, 1971, 102, 517-529.

Schöneich C., Asmus K.-D., Dillinger U. and Bruchhausen F.

Thyl radical attack on polyunsaturated fatty acids: a possible route to lipid peroxidation.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989, 161, 113-120.

Sen C.K.

Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants.

Biochem. Pharmacol., 1998, 55, 1747-1758.

- Seres T., Ravichandran V., Moriguchi T., Rokutan K., Thomas J.A. and Johnston R.B.Jr.**
Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational modification with potential for buffering the effects of oxidant stress.
J. Immunol., 1996, **156**, 1973-1980.
- Siems W.G., Hapner S.J. and van Kujik F.J.**
4-hydroxynonenal inhibits Na⁺-K⁺-ATP-ase.
Free Radic. Biol. Med., 1996, **20**, 215-223.
- Siems W.G., Zollner H., Grune T. and Esterbauer H.**
Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes : 1,4-dihydroxynonene is not the main product.
J. Lipid Res., 1997, **38**, 612-622.
- Sies H.**
Glutathione and its role in cellular functions.
Free Radic. Biol. Med., 1999, **27**, 916-921.
- Singhal S.S., Zimniak P., Awasthi S., Piper J.T., He N.G., Teng J.I., Petersen D.R. and Awasthi Y.C.**
Several closely related glutathione S-transferase isozymes catalyzing conjugation of 4-hydroxynonenal are differentially expressed in human tissues.
Arch. Biochem. Biophys., 1994, **311**, 242-250.
- Sparrow C.P. and Olszewski J.**
Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions.
J. Lipid Res., 1993, **34**, 1219-1228.
- Spear N. and Aust S.D.**
Thiol-mediated NTA-Fe(III) reduction and lipid peroxidation.
Arch. Biochem. Biophys., 1994, **312**, 198-202.
- Spear N. and Aust S.D.**
Effects of glutathione on Fenton reagent-dependent radical production and DNA oxidation.
Arch. Biochem. Biophys., 1995, **324**, 111-116.
- Spear N. and Aust S.D.**
The effects of different buffers on the oxidation of DNA by thiols and ferric iron.
J. Biochem. Mol. Toxicol., 1998, **12**, 125-132.
- Spitz D.R., Malcolm R.R. and Roberts R.J.**
Cytotoxicity and metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal and 2-nonenal in H₂O₂-resistant cell lines. Do aldehydic by-products of lipid peroxidation contribute to oxidative stress ?
Biochem. J., 1990, **267**, 453-459.
- Srivastava S., Chandra A., Wang L.F., Seifert W.E.Jr., DaGue B.B., Ansari N.H., Srivastava S.K. and Bhatnagar A.**
Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-*trans*-2-nonenal, in isolated perfused rat heart.
J. Biol. Chem., 1998, **273**, 10893-10900.
- Srivastava S., Dixit B.L., Cai J., Sharma S., Hurst H.E., Bhatnagar A. and Srivastava S.K.**
Metabolism of lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal (HNE) in rat erythrocytes : role of aldose reductase.
Free Radic. Biol. Med., 2000, **29**, 642-651.
- Stahl E. (ed.)**
Dünnschicht-chromatographie
Heidelberg, Springer-Verlag, 1962, p. 7-10.

- Stamler J.S. and Slivka A.**
Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease.
Nutr. Rev., 1996, 1, 1-30.
- Stark A.A., Zeiger E. and Pagano D.A.**
Glutathione mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA100: dependence on a single enzyme, gamma-glutamyltranspeptidase.
Mutat. Res., 1987, 177, 45-52.
- Stark A.A., Zeiger E. and Pagano D.A.**
Glutathione mutagenesis in *Salmonella typhimurium* is a gamma-glutamyltranspeptidase-enhanced process involving active oxygen species.
Carcinogenesis, 1988, 9, 771-777.
- Stark A.A., Zeiger E. and Pagano D.A.**
Glutathione metabolism by γ -glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis.
Carcinogenesis 1993, 14, 183-189.
- Stark A.A., Russel J.J., Langenbach R., Pagano D.A., Zeiger E. and Huberman E.**
Localization of oxidative damage by a glutathione- γ -glutamyl transpeptidase system in preneoplastic lesions in sections of livers from carcinogen-treated rats.
Carcinogenesis, 1994, 15, 343-348.
- Stark A.A. and Glass G.A.**
Role of copper and ceruloplasmin in oxidative mutagenesis induced by the glutathione- γ -glutamyltranspeptidase system and by other thiols.
Environ. Mol. Mutagen, 1997, 29, 63-72.
- Stenberg G., Ridderström M., Engström A., Pemble S.E. and Mannervik B.**
Cloning and heterologous expression of cDNA encoding class Alpha rat glutathione transferase 8-8, an enzyme with high catalytic activity towards genotoxic α,β -unsaturated carbonyl compounds.
Biochem. J., 1992, 284, 313-319.
- Stole E. and Meister A.**
Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with glutathione involves specific arginine and lysine residues of the heavy subunit.
J. Biol. Chem., 1991, 266, 17850-17857.
- Sutton H.C.**
Efficiency of chelated iron compounds as catalysts for the Haber-Weiss reaction.
J. Free Radic. Biol. Med., 1985, 1, 195-202.
- Suzuki Y.J., Forman H.J. and Sevanian A.**
Oxidants as stimulators of signal transduction.
Free Radic. Biol. Med., 1997, 22, 269-285.
- Szabados E., Fischer G.M., Gallyas F. Jr., Kispal G. and Sumegi B.**
Enhanced ADP-ribosylation and its diminution by lipoamide after ischemia-reperfusion in perfused rat heart
Free Radic. Biol. Med., 1999, 27: 1103-1113.
- Taniguchi N. and Ikeda Y.**
 γ -Glutamyltranspeptidase : catalytic mechanism and gene expression.
In : *Advances in enzymology and related areas of molecular biology. Amino acid metabolism. Part A.* / ed. par Purich D.L.
John Willey & Sons, Inc., 1998, vol. 72, p. 239-278.
- Thomas J.A., Poland B. and Honzatko R.**
Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation.
Arch. Biochem. Biophys., 1995, 19, 1-9.

- Tien M., Bucher J.R. and Aust S.D.**
Thiol-dependent lipid peroxidation.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, 107, 279-285.
- Tjalkens R.B., Cook L.W. and Petersen D.R.**
Formation and export of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2,3-*E*-nonenal (4-HNE) in hepatoma cells.
Arch. Biochem. Biophys., 1999, 361, 113-119.
- Toyokuni S., Uchida K., Okamoto K., Hattori-Nakakuki Y., Hiai H. and Stadtman E.R.**
Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 2616-2620.
- Toyokuni S.**
Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology.
Pathol. Int., 1999, 49, 91-102.
- Tsakiris S., Angelogianni P., Schulpis K.H. and Behkaris P.**
Protective effect of L-cysteine and glutathione on rat brain Na⁺, K⁺-ATP-ase inhibition induced by free radicals.
Z. Naturforsch. [C], 2000, 55, 271-277.
- Uchida K., Toyokuni S., Nishikawa K., Kawakishi S., Oda H., Hiai H. and Stadtman E.R.**
Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis
Biochemistry, 1994, 33, 12487-12494.
- Uchida K., Shiraishi M., Naito Y., Torii Y., Nakamura Y. and Osawa T.**
Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production.
J. Biol. Chem., 1999, 274, 2234-2242.
- Ueland P.M., Refsum H., Beresford S.A.A and Vollset S.E.**
The controversy over homocysteine and cardiovascular risk.
Am. J. Clin. Nutr., 2000, 72, 324-332.
- Uhlig S. and Wendel A.**
The physiological consequences of glutathione variations.
Life Sci., 1992, 51, 1083-1094.
- Ullrich O., Grune T., Henke W., Esterbauer H. and Siems W.**
Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by mitochondria isolated from rat kidney cortex.
FEBS Lett., 1994, 352, 84-86.
- Visvikis A., Thioudellet C., Oster T., Fournel-Gigleux S., Wellman M. and Siest G.**
High level expression of enzymatically active mature human gamma-glutamyltransferase in transgenic V79 Chinese hamster cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 7361-7365.
- Wannamethee G., Ebrahim S. and Shaper A.G.**
Gamma-glutamyltransferase: determinants and association with mortality from ischemic heart disease and all causes.
Am. J. Epidemiol., 1995, 142, 699-708.
- White J.S. and Rees K.R.**
The mechanism of action of 4-hydroxynonenal in cell injury.
Chem. Biol. Interact., 1984, 52, 233-241.
- Winterbourn C.C.**
Free radical toxicology and antioxidant defence.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 1995, 22, 877-880.

Winterbourn C.C. and Brennan S.O.

Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid.
Biochem. J., 1997, **326**, 87-92.

Winterbourn C.C. and Metodiewa D.

Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide.
Free Radic. Biol. Med., 1999, **27**, 322-328.

Wood J.L. and Graham A.

Structural requirements for oxidation of low-density lipoprotein by thiols.
FEBS Lett., 1995, **366**, 75-80.

Zalit I., Glass G.A. and Stark A.A.

The role of chelators in the catalysis of glutathione- γ -glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation by transition metals.
Biochem. Mol. Biol. Int., 1996, **40**, 1123-1133.

Zarkovic N., Ilic Z., Jurin M., Schaur R.J., Puhl H. and Esterbauer H.

Stimulation of HeLa cell growth by physiological concentrations of 4-hydroxynonenal.
Cell. Biochem. Funct., 1993, **11**, 279-286.

Zarkovic N., Tillian M.H., Schaur J., Waeg G., Jurin M. and Esterbauer H.

Inhibition of melanoma B16-F10 growth by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal.
Cancer Biother., 1995, **10**, 153-156.

ANNEXE

Gamma-Glutamyltranspeptidase-Dependent Glutathione Catabolism Results in Activation of NF- κ B

Marie-José Accaoui,* Milica Enoiu,* Mojgan Mergny,† Christine Masson,*
Sylvia Dominici,‡ Maria Wellman,* and Athanase Visvikis*¹

*Centre du Médicament EA 3117, Faculty of Pharmacy, Université Henry Poincaré Nancy I, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France; †INSERM U365, Institut Curie, Recherche Section Biologie, 26 rue d'Ulm, 75231 Paris Cedex 05, France; and ‡Department of Pathophysiology and Experimental Medicine, University of Siena, Via Aldo Moro 53100 Siena, Italy

Received July 21, 2000

γ -glutamyltranspeptidase (GGT) is a key enzyme implicated in the homeostasis of intracellular reduced glutathione (GSH) and hence in the regulation of the cellular redox state. Besides, the extracellular cleavage of GSH by GGT leads to reactive oxygen species (ROS) production, depending on the generation and enhanced reactivity of cysteinylglycine (CysGly). Using a model cell line, the V79 GGT, which highly expresses a human GGT transgene, we examined whether the GGT induced oxidant stress could modulate intracellular transcription factors. For the first time, we show that GGT-dependent ROS production induces the NF- κ B-binding and transactivation activities. This induction mimicked the one observed by H₂O₂ and was inhibited by catalase, suggesting the involvement of H₂O₂ in the NF- κ B activation. © 2000 Academic Press

Key Words: gamma-glutamyltranspeptidase; reduced glutathione; nuclear factor κ B; reactive oxygen species; antioxidants.

NF- κ B is a ubiquitous transcription factor that is thought to be a pivotal regulator of early response genes, including cytokines, transcription factors, inflammatory mediators, and several structural proteins that are involved in infection, inflammation, stress responses and apoptosis (1). The exact and complex molecular mechanisms involved in the regulation of

NF- κ B remain to be elucidated (2). A state of moderate increasing the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) is referred to as oxidative stress. It is widely recognized that the ROS are involved in the activation of NF- κ B (2). They can play the role as second messengers, when they are produced in a transient manner and to intermediate concentrations. The (ROS) and particularly hydrogen peroxide (H₂O₂) possess several properties that make them good candidates for the second messenger role. They are, of small size and therefore diffuse rapidly through biological membranes, and their synthesis and degradation are fast (3). Reduced glutathione (GSH), the major intracellular non protein thiol, is mainly known as a nucleophilic scavenger and an enzyme-catalysed antioxidant in electrophilic/oxidative tissue injury (4). GSH plays an important role in the maintenance of the intracellular redox state, and the intracellular level of GSH, which differ from one cell type to another, may be crucial for ROS-induced NF- κ B response (2).

Gamma-glutamyltranspeptidase [GGT (5-glutamyl)-peptide: amino acid 5-glutamyltransferase EC 2.3.2.2] is a unique plasma membrane enzyme, which is able to initiate the degradation of extracellular GSH by cleavage of the γ -glutamyl bond, allowing the supply of extracellular cysteine for intracellular synthesis of this tripeptide (4). Therefore, GGT participates in the regulation of intracellular GSH levels and the cellular redox state (4). Previous studies have demonstrated that the extracellular GGT initiated cleavage of GSH can lead to ROS production (5–8). The GGT prooxidant effect is based on the generation of cysteinylglycine (CysGly), which contrary to GSH itself, is a redox labile metabolite (5). Autooxidation of CysGly in the presence of transition metals leads to prooxidant species such as thiyl and oxygen radicals (5–7). Consequently, the GGT initiated free radical process, if not efficiently scavenged by cellular antioxidant defense mechanisms, can result in oxidative damage on biomolecules. Thus GGT-dependent lipid peroxidation

Abbreviations used: BSA, bovine serum albumin; CysGly, cysteinylglycine; DHR-123, dihydrorhodamine 123; DTT, 1,4-dithio-1-threitol; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; GGT, γ -glutamyltranspeptidase; GlyGly, glycyl-glycine; GSH, reduced glutathione; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid; NF- κ B, nuclear factor κ B; PDTC, pyrrolidine dithiocarbamate; PMSF, phenyl-methylsulfonyl fluoride; RH-123, rhodamine 123; RLU, relative light units; ROS, reactive oxygen species; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: (+33) 3 83 32 13 22. E-mail: visvikis@ctrmed.u-nancy.fr.

was demonstrated using polyunsaturated fatty acids (5, 6), human LDL (9), liver microsomes (10, 11) or HepG2 cells (11) as a substrate. The involvement of GGT in oxidative mutagenesis (7, 12) as well as in the redox modulation of cell surface protein thiols (13) was also demonstrated.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Catalase, reduced glutathione, hydrogen peroxide, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and PDTC were obtained from Sigma (S' Quentin-Fallavier, France). Glycyl-glycine was purchased from Merck (Nogent, France), and RH-123 and DHR-123 were obtained from Sigma (France). All other reagents were of the highest purity available.

Cell culture. V79 Cl cells (chinese hamster lung fibroblast, mock transfected, exhibiting non-detectable endogenous GGT activity) and V79 GGT cells (a stable transfected V79 cell line, highly producing human GGT (14)) were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma, France) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Sigma, France), L-glutamine (2 mM) (Sigma, France) and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic (Sigma, France). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of air/CO₂ (95%:5%).

Electrophoretic mobility shift assay. The V79 Cl and V79 GGT cells were incubated in serum-free medium containing GSH [0.5–2.5 mM]/GlyGly [5–25 mM] (with constant GSH/GlyGly ratio 1:10) or H₂O₂ (300 μM). In some experiences, cells were incubated with catalase (2200 U/ml) or with PDTC (100 μM), and with GSH/GlyGly or H₂O₂. Medium samples were withdrawn at various times (0–90 min) for GSH and CysGly determinations by HPLC (15) and stored at –70°C before use. Nuclear extracts for EMSA were prepared as described by Dejardin *et al.* (16). Protein amounts were quantified with the Lowry method using a BSA standard solution (17). The nuclear extracts were stored at –70°C until use. Double-stranded oligonucleotide probes (the palindromic kB probe was 5'-TTGGCAACGGCAGGGGAATCCCTCTCCTTA-3') were prepared for the electrophoretic mobility shift assay by annealing the appropriate single-stranded oligonucleotides at 65°C for 5 min in 10 mM NaCl, followed by slow cooling to room temperature. The probes were labeled with ³²P-labeled dATP and ³²P-labeled dCTP (Dupont NEN, Paris, France) by filling in the 5' overhangs with the Klenow fragment of DNA polymerase (Boehringer Mannheim, France). For the assay of NF-κB binding, nuclear protein extracts (5 μg) were incubated with 2 μg poly(dI-dC) (Boehringer Mannheim, France) in 20 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 20% glycerol for 15 min at room temperature and then 0.2 ng of the labeled probe (approx. 100,000 cpm) was added. After a further 5 minutes incubation at room temperature, the DNA-protein complexes were separated on 4% (w/v) polyacrylamide gel, run at room temperature in 0.25× Tris-borate-EDTA (TBE). Competition assays were performed with a 30-fold excess of unlabeled probe. Bands were quantified by densitometry (Biomax 1D, Kodak) after scanning of the autoradiographs.

Monitoring of reactive oxygen species production and GSH catabolism. Quantification of reactive oxygen species (ROS) was performed using dihydrorhodamine-123 (DHR-123) probe which is oxidized by various ROS to fluorescent rhodamine 123 (RH-123) (18–19). Cells were seeded in 6-well plates (Costar Corning) at 5 × 10⁵ cells per well and allowed to attach for at least 12 h in complete RPMI medium. Sixteen hours before the experiments, medium was replaced with serum free RPMI in order to provide the same conditions as for the transcription factors analysis. The cells were then incubated at 37°C in the medium to which were added different concentrations of GSH and GlyGly as described, and 25 μM DHR-123. 200 μl aliquots of medium were sampled after 60 min incubation and fluorescence was measured using a microplate fluorimeter

(Cytofluor 2350, Millipore, France) at an excitation and emission wavelength of 485 nm and 530 nm, respectively. For quantification of DHR-123 oxidation, the calibration curve was established with RH-123 diluted in RPMI medium.

Transfection of V79 Cl and V79 GGT cells with NF-κB luciferase constructs. To measure the transactivating activity of NF-κB, cells were transfected with a luciferase reporter construct controlled by κB enhancer using LipofectAMINE (Gibco-BRL, Cergy Pontoise, France). In each experiment, 6-well plates, containing 5 × 10⁵ cells per well, were transfected with 2 μg of a DNA construct composed of a luciferase reporter gene under the control of four tandem κB (pNF-κB-Luc) binding sites upstream of the herpes simplex virus thymidine kinase minimal promoter (Clontech, Montigny-Le-Bretoneux, France) and 0.5 μg of the pSV-β-galactosidase vector (Promega, Charbonnières, France) to monitor transfection efficiency. The cells were transfected for 5 h at 37°C and 24 h after transfection, they were incubated with or without GSH/Gly-Gly or H₂O₂ for 2–4 h. Following incubation cells were washed and harvested in 500 μl of 1× Reporter Lysis Buffer (Promega, France). Lysats (10 μl) were used to determine luciferase activity using a Lumac Biocounter M2010 luminometer and the Luciferase activity assay kit (Promega, France). β-Galactosidase activity was determined in the same extracts with the β-gal assay kit (Promega, France) to correct the differences in transfection efficiency. The results are expressed in the relative light units (RLU) corresponding to the ratio between arbitrary luciferase light units and β-galactosidase activity.

Statistical analyses. Statistical analyses of mean values of multiple comparisons were made by one-way analysis of variance followed by Student's test. Results are the mean ± SD of n = 3 individual experiments. *, P < 0.05 vs control.

RESULTS

It is widely recognized that the transcription factor NF-κB is activated by oxidative stress (2). However the exact molecular mechanisms, which govern this regulation, remain to be elucidated. Several recent data support the hypothesis that GGT, under physiological conditions, is directly involved in ROS generation. Indeed, the GGT-initiated GSH catabolism leads to ROS production in the presence of an iron source like transferrin (7) and can induce lipid peroxidation (5, 6). As lipid peroxidation products can act as a signal for transcription factor activation (20), we aimed to verify the hypothesis if GGT-dependent oxidative stress can modulate NF-κB. For this we used two cell lines, previously established in our laboratory: the V79 GGT chinese hamster ovarian cells which expressed high levels of human GGT (1400 mU/mg proteins) and the V79 Cl mock transfected counterpart which exhibits low to undetectable levels of the enzyme (14).

GGT-dependent GSH catabolism and ROS production. The first step in our study was to confirm the GGT mediates catabolism of extracellular GSH and that significant amounts of CysGly can be produced. The V79 GGT and V79 Cl growing cells were incubated in the presence of 2.5 mM GSH and 25 mM GlyGly (as the acceptor of γ-glutamyl moieties for the transpeptidation reaction) at pH 7.4. The GSH and CysGly concentrations in culture medium were measured by HPLC as previously described (15). In the V79 GGT

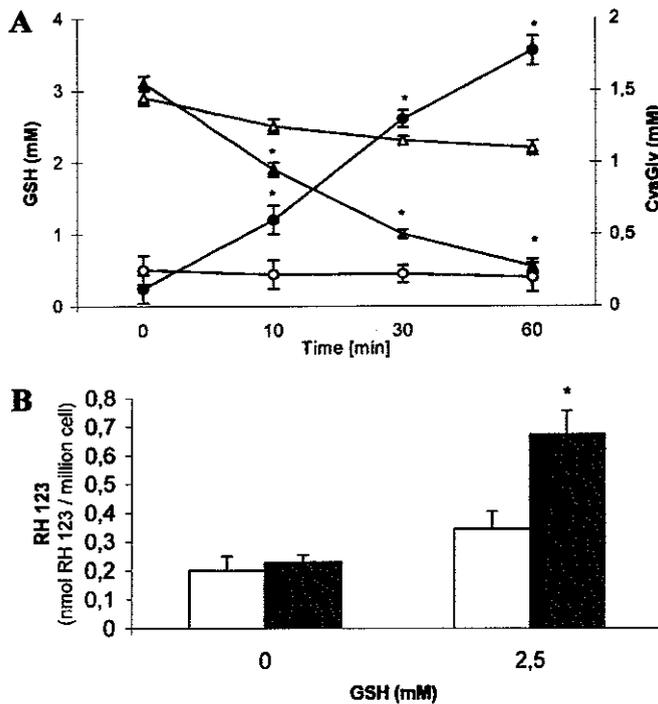


FIG. 1. Extracellular GSH catabolism and ROS production in V79 Cl and V79 GGT cells. The cells were incubated with GSH and GlyGly (2.5 mM/25 mM) or without GSH and 25 μ M DHR-123. (A) Time course of GSH catabolism (Δ : V79 Cl cells and \blacktriangle : V79 GGT cells) and CysGly formation (\circ : in V79 Cl cells and \bullet : in V79 GGT cells). Samples were withdrawn at the various times and GSH and CysGly concentration were measured by HPLC. Results shown are mean \pm SD of $n = 3$ individual experiments. Statistical significance of differences for each measurement at different time points vs time 0 for the same culture: * $P < 0.05$ vs time 0. (B) ROS production in V79 Cl cells (\square) and V79 GGT cells (\blacksquare) measured as DHR-123 oxidation. Results shown are mean \pm SD of $n = 3$ individual experiments. Statistical significance of differences between two measurements in the same cell line: * $P < 0.05$ vs time 0.

cells, we observed a time-dependent linear increase of CysGly concentration up to 1.8 nmol/ml during the 60 minutes incubation and a concomitant decrease of extracellular GSH concentration (from 3.1 to 0.5 nmol/ml) (Fig. 1A). In contrast, when the same conditions were applied to V79 Cl cells, CysGly concentration was constant during the incubation time. The decrease of GSH (from 2.9 mM to 2.2 mM) observed with the V79 Cl cells, could correspond to the oxidation of the reduced form of the tripeptide.

Thus a 60 min incubation of V79 GGT cells in the presence of 2.5 mM GSH leads to a 84% consumption of this tripeptide and results in an extracellular level of CysGly of approximately 1.8 nmol/ml (Fig. 1A). According to our previous hypothesis and to literature data concerning prooxidant properties of thiols (7), we further studied the GGT-dependent ROS generation. For this purpose we quantified ROS production in V79 GGT and V79 Cl cells cultured in medium supplemented with or without GSH and GlyGly. To measure

the ROS, we chose the DHR-123 probe which can be oxidized by various ROS, including OH^\bullet , O_2^\bullet and H_2O_2 (21). DHR-123 oxidation was measured in the extracellular medium of cells incubated during 60 min in the presence or not of GSH and GlyGly (2.5 mM/25 mM). As shown in Fig. 1B, in the absence of GSH, both cell lines produce measurable amounts of ROS as estimated by the oxidation of DHR-123. However, a significantly higher amount of RH-123 was produced only when the V79 GGT cells were incubated in the presence of GSH. No exogenous source of iron was added to the culture medium. In fact, Dominici *et al.* (13) suggested that trace amounts of iron, universally present in culture medium are sufficient to induce ROS production in the GGT-dependent catabolism of GSH. When the culture medium was supplemented with a low concentration of iron (Fe^{3+} -ADP complex at 10 μ M Fe^{3+} and 100 μ M ADP) we observed, for the V79 GGT cells, an 8.2 fold enhancement of ROS production (data not shown). The above data allow us to conclude that GSH-induced ROS production depends on GGT activity. It also allows us to show that significant quantities of extracellular ROS are produced in V79 GGT cells even in a complex culture medium, where variable components (i.e., aminoacids, vitamins...), could quench low levels of ROS. The experimental conditions that were used, were exactly the same as for the transcription factors experiments that followed. Therefore, these results allow us to correlate the transcription factor activation with the free radical generation initiated by the GGT catabolism of GSH.

Influence of the GGT-dependent GSH metabolism on NF- κ B activation. V79 Cl and V79 GGT cells were incubated with various concentrations of GSH (500 μ M to 2.5 mM) during 90 min. Nuclear extracts were prepared and the activation of NF- κ B binding was estimated by EMSA. In the V79 Cl cells, there was no NF- κ B modulation whatever the concentration of GSH used (Fig. 2A). In contrast, for the cell line expressing the GGT (V79 GGT cells), a significant activation of NF- κ B binding was observed and it was correlated with the concentration of GSH (Fig. 2B). As the only difference between the two cell lines is the presence of GGT in the latter, we can conclude that the activation of NF- κ B binding is due to the GSH catabolism by GGT and hence the concomitant production of ROS. To ascertain whether the incubation period was properly chosen, V79 GGT cells were incubated with GSH for various time periods (0–120 min), nuclear extracts were prepared and NF- κ B binding activity was evaluated. As shown in Fig. 3, NF- κ B DNA-binding was clearly induced after 60 min incubation with GSH and further enhanced after 90 and 120 min of incubation. The bands detected represented a specific NF- κ B com-

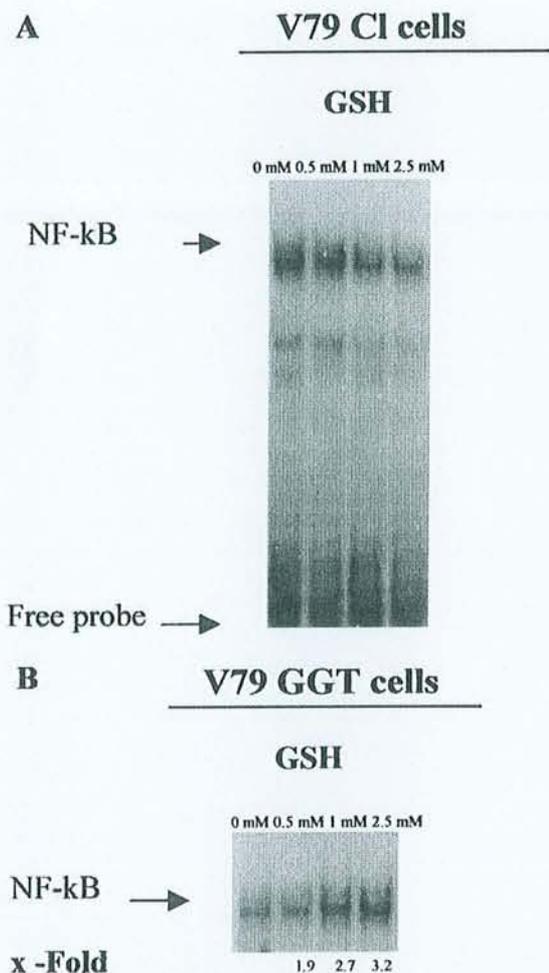


FIG. 2. GSH induced NF-kB activation in V79 GGT. V79 CI (A) and V79 GGT (B) cells were incubated for 90 min with increasing concentrations of GSH and GlyGly (1:10 ratio) as indicated. Arrows indicate the position of the specific complex. Gel-shift analysis of cellular nuclear extracts were incubated with ³²P labeled NF-kB oligonucleotide probe. Numbers on the bottom indicate the x-fold increase of the NF-kB/DNA specific band in comparison with the untreated cells, as estimated by densitometry.

plex as shown by its ability to be competed by 30-fold excess of unlabelled NF-kB oligonucleotide (Fig. 3).

GGT-dependent ROS activate NF-kB by a specific pathway. It is known that H₂O₂ can act as a common messenger of many NF-kB-inducing conditions (3) and that it could be produced during the GGT induced prooxidant reactions (7). Addition of H₂O₂ at micromolar concentrations to the cell culture medium of V79 GGT cells resulted in the activation of NF-kB binding activity (Fig. 4). This activation was suppressed when the same cells were incubated with PDTC or catalase in addition to H₂O₂, in accordance to literature data (3). In the V79 GGT cells, the presence of catalase (2200 U/ml) during the treatment with GSH (2.5 mM, 90 min), inhibited the activation of NF-kB. This result indicates that one of the ROS produced extracellularly

by the GGT/GSH system is H₂O₂, as previously shown by Dominici *et al.* (13). Indeed, catalase is not expected to enter the cells and decomposes extracellular H₂O₂ (22). Surprisingly, the incubation with PDTC (100 μM) and GSH/GlyGly (2.5 mM/25 mM) had no effect on the GGT-dependent activation of NF-kB, although PDTC inhibited the H₂O₂ activation of NF-kB. PDTC can prevent the phosphorylation of IκB-α in response to some NF-kB-inducing stimuli (3) and thus, it blocks the activation of NF-kB and the expression of NF-kB target genes (2). However, Watanabe *et al.* described recently that PDTC can also stimulate kB-dependent gene expression in a manner dependent on the concentration of the phorbol ester TPA (23).

GSH stimulates kB controlled gene expression. The above findings indicate that extracellular GSH catabolism enhanced the binding activity of NF-kB in V79 GGT cells, but this approach fails to underscore the potential of GSH to regulate gene expression. Thus, to determine whether the enhanced DNA binding of NF-kB caused by GSH could stimulate gene expression, we examined the transactivation potential of this transcription factor in V79 CI and V79 GGT cells, using a luciferase reporter gene construct containing four tandem kB binding sites upstream of the herpes simplex virus thymidine kinase minimal promoter. As the

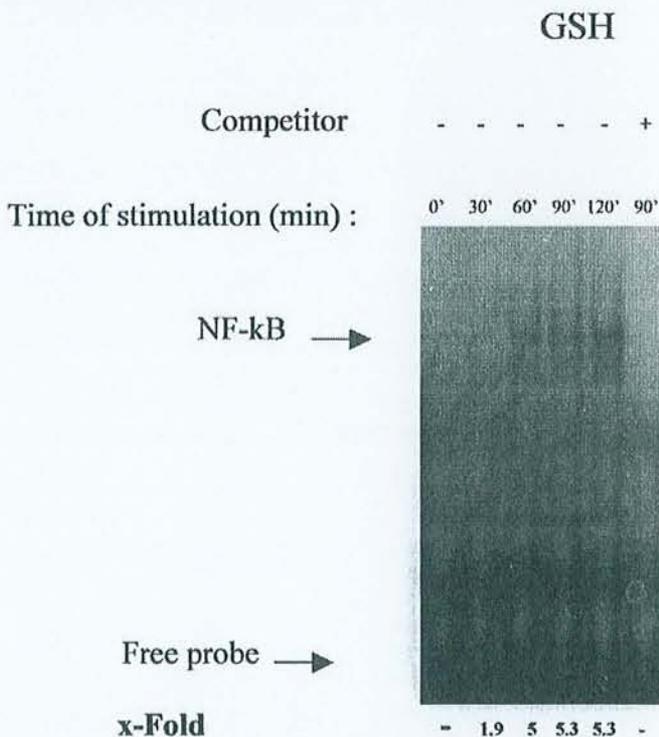


FIG. 3. Time course of NF-kB activation by GSH in V79 GGT. Cells were stimulated with 2.5 mM GSH and 25 mM GlyGly for the indicated time periods. Nuclear extracts were prepared and subjected to EMSA for NF-kB analysis. Numbers on the bottom indicate the x-fold increase of the NF-kB/DNA specific band in comparison with the untreated cells, as estimated by densitometry.

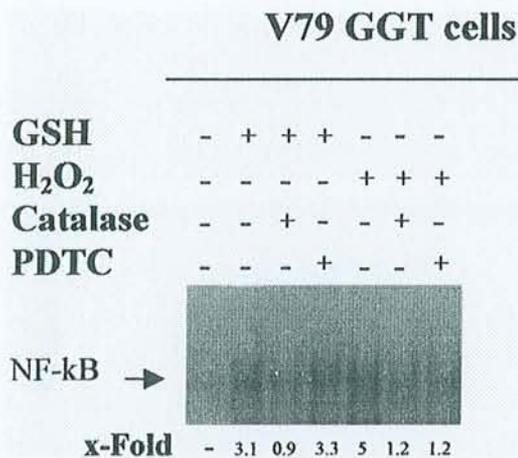


FIG. 4. Influence of catalase or PDTC on GGT/GSH dependent NF-kB activation in V79 GGT cells. The cells were incubated with catalase (2200 U/ml) or PDTC (100 μ M), and then treated with 2.5 mM GSH and 25 mM GlyGly or 300 μ M H₂O₂ for 90 min. Nuclear extracts were prepared and subjected to EMSA analysis. Numbers on the bottom indicate the x-fold increase of the NF-kB/DNA specific band in comparison with the untreated cells, as estimated by densitometry.

results showed (Fig. 5A), treatment of V79 GGT with 2.5 mM GSH/GlyGly induced the kB-dependent luciferase expression (1.3 fold) similar to 300 μ M H₂O₂, whereas no induction with GSH was observed for the V79 Cl cells treated as above (Fig. 5B). TPA treatment was used as a positive control for NF-kB induction for the V79 Cl cells as 300 μ M H₂O₂ treatment resulted unexpectedly in massive cell death, even if both cell lines exhibited the same level of intracellular catalase (data not shown).

DISCUSSION

Until recently, GGT was thought to participate only in the GSH cycling, providing the cell with the precursors needed for its synthesis. For instance, it has been reported that transfection of GGT into mouse tumor cells provides cells with a growth advantage when cultured in media containing physiological concentrations of cysteine (24). However, there is no clear relationship between the level of GGT activity and the intracellular GSH concentration or the resistance of tumor cell lines to alkylating agents (25). In contrast, there is a relationship between GGT activity and cell mutagenicity or cell proliferation (6, 8). This relationship was attributed to the prooxidant role of the enzyme. In addition, it has been reported that pretreatment of cells with a mild oxidative stress can result in their protection against apoptogenic stimuli (26). Our findings show that at least NF-kB can be induced when adequate concentrations of GSH are supplied. As GSH cleavage by GGT leads to ROS production, we can assume that the GGT-dependent oxidative stress is responsible for NF-kB activation, and that at least H₂O₂ is involved.

These findings introduce a new aspect in the function of GGT. Cells exhibiting high GGT activity can trigger signalling pathways and activate transcription factors (at least NF-kB). Alternatively by controlling the GSH export they can supply a low but continuous oxidative stress, thus maintaining a constant level of activated transcription factors. Although the GSH levels found in human plasma are relatively low (27), cells can actively secrete GSH creating a microenvironment with locales high GSH concentration.

It is also interesting that the antioxidant PDTC could not inhibit the GSH-dependent NF-kB activation. Watanabe *et al.* (23) have recently shown that PDTC alone could activate the kB dependent transcription of a reporter gene. They argued for a signalling pathway resistant to the inhibitory effect of PDTC. This pathway could be further stimulated by low concentrations of TPA. Our results also support this hypothesis. The H₂O₂ quantities produced by the GGT-dependent GSH catabolism are by far lower than the micromolar concentrations of H₂O₂ generally used [50–300 μ M] to induce NF-kB. We can

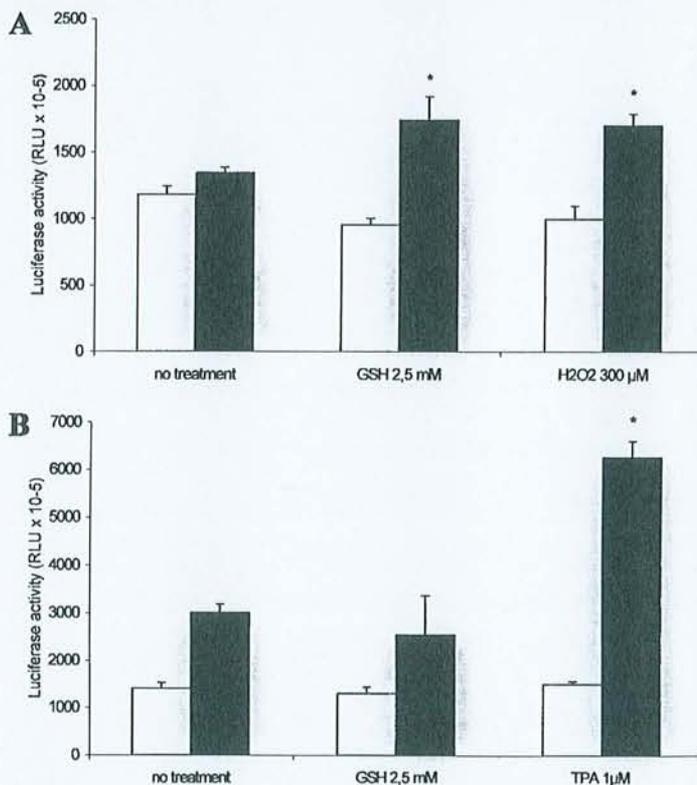


FIG. 5. Transactivation of NF-kB induced by GSH and H₂O₂ in V79 GGT cells (A) and V79 Cl cells (B). The cells were transfected with a basal (pTK: □), a kB-dependent (pNFkB: ■) reporter luciferase construct, and then treated with 2.5 mM GSH and 25 mM GlyGly or 300 μ M H₂O₂ or 1 μ M TPA for 6 h. pSV- β -galactosidase vector (1.5 μ g) (Promega) was used as control to monitor transfection efficiency. Supernatants from lysed cells were used to determine β -galactosidase and luciferase activity, and the results were expressed in RLU. Results are mean \pm SD of n = 3 individual experiments. Statistical significance of differences between untreated and treated samples: * $P < 0.05$ vs control.

speculate that low and continuous supply of H₂O₂ produced by the GGT-dependent GSH catabolism could activate a PDTC resistant signalling pathway in the same way as TPA. Our findings point to the importance of the extracellular GSH catabolism as a way for the modulation of cell signalling and transcription factors activation. Further work is in progress in order to clarify the different signaling pathways triggered by GGT prooxidant activity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by a grant from l'Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique et Technologique en Champagne-Ardenne (ARERS) and Region Lorraine. We thank Professor Nils-Erik Huseby for reading the manuscript, Dr. Pompella Alfonso for helpful discussion, and Caroline Sandre for her helpful contributions to experiments.

REFERENCES

- Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994) Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141-179.
- Nanxin, L., and Michael, K. (1999) Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* **13**, 1137-1143.
- Baeuerle, P. A., Rupec, R. A., and Pahl, H. L. (1996) Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Path. Biol.* **44**, 29-35.
- Lieberman, M. W., Wieseman, A. L., Shi, Z., Carter, B. Z., Barrios, R., and Matzuk, M. (1996) Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyltranspeptidase mice. *Proc. Natl. Acad. USA* **93**, 7923-7926.
- Stark, A. A., Zeiger, E., and Pagano, D. A. (1993) Glutathione metabolism by γ -glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: Characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **14**, 183-189.
- Stark, A. A., and Glass, G. A. (1997) Role of copper and ceruloplasmin in oxidative mutagenesis induced by the glutathione- γ -glutamyltranspeptidase system and by other thiols. *Environ. Mol. Mutagen.* **29**, 63-72.
- Drozd, R., Parmentier, C., Hachad, H., Leroy, P., Siest, G., and Wellman, M. (1998) γ -glutamyltransferase-dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. *Free Rad. Biol. Med.* **25**, 786-792.
- Del Bello, B., Paolicchi, A., Comperti, M., Pompella, A., and Maellaro, E. (1999) Hydrogen peroxide produced during γ -glutamyltranspeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J.* **13**, 69-79.
- Paolicchi, A., Minotti, G., Tonarelli, P., De Cesare, D., Mezzetti, A., Dominici, S., Comperti, M., and Pompella, A. (1999) γ -glutamyltranspeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation—A potential mechanism in atherosclerosis. *J. Invest. Med.* **47**, 151-160.
- Zalit, I., Glass, G. A., and Stark, A. A. (1996) The role of chelators in the catalysis of glutathione- γ -glutamyltranspeptidase-dependent lipid peroxidation by transition metals. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **40**, 1123-1133.
- Paolicchi, A., Tongiani, P., Comperti, M., and Pompella, A. (1997) γ -glutamyltranspeptidase-dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *Free Rad. Biol. Med.* **22**, 853-860.
- Milne, L., Nicotera, P., Orrentius, S., and Burkitt, M. J. (1993) Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 102-109.
- Dominici, S., Valentini, M., Maellaro, E., Del Bello, B., Paolicchi, A., Lorenzi, E., Tongiani, P., Comperti, M., and Pompella, A. (1999) Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: The role of γ -glutamyltranspeptidase-dependent H₂O₂ production and S-thiolation. *Free Rad. Biol. Med.* **27**, 623-635.
- Visvikis, A., Thiouellet, C., Oster, T., Fournel-Gigieux, S., Wellman, M., and Siest, G. (1991) High-level expression of enzymatically active mature human gamma-glutamyltransferase in transgenic V79 Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7361-7365.
- Salazar, J. F., Schorr, H., Herrmann, W., Herbeth, B., Siest, G., and Leroy P. (1999) Measurement of thiols in human plasma using liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatographic Science* **37**, 469-476.
- Dejardin, E., Bonizzi, G., Bellahcene, A., Castronovo, V., Merville, M. P., and Bours, V. (1995) Highly-expressed p100/p52 (NF- κ B2) sequesters other NF- κ B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene* **11**, 1835-1841.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Royall, J., and Ischiropoulos, H. (1993) Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine-123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **302**, 348-355.
- Bueb, J. L., Gallois, A., Schneider, J. C., Parini, J. P., and Tschirhart, E. (1995) A double-labelling fluorescent assay for concomitant measurements of [Ca²⁺]_i and O₂⁻ production in human macrophages. *Biochem. Biophys. Acta* **1244**, 79-84.
- Uchida, K., Shiraishi, M., Naito, Y., Torii, Y., Nakamura, Y., and Osawa, T. (1998) Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **274**, 2234-2242.
- Ischiropoulos, H., Bow, A., Thow, S. R., Kooy, N. W., Royall, J., and Crow, J. P. (1999) *in: Methods in Enzymology*, Vol. 301, pp. 370-371, Academic Press.
- Pinkus, R., Weiner, L. M., and Daniel, V. (1996) Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *J. Biol. Chem.* **271**, 13422-13429.
- Watanabe, K., Kazakova, I., Furniss, M., and Miller, S. C. (1999) Dual activity of PDTC on κ B-dependent gene expression in U937 cells: Regulation by the phorbol ester TPA. *Cell. Signal.* **11**, 479-489.
- Hanigan, M. H. (1995) γ -glutamyltranspeptidase, a glutathionase: Its expression and function in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **16**, 181-185.
- Tew, K. D., Monks, A., Barone, L., Rosser, D., Akerman, G., Montali, J. A., Wheatley, J. B., and Schmidt D. E. (1996) Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. *Mol. Pharmacol.* **50**, 149-159.
- Maellaro, E., Del Bello, B., and Comperti, M. (1996) Protection by ascorbate against apoptosis of thymocytes: Implications of ascorbate-induced nonlethal oxidative stress and poly(ADP-ribosylation). *Exp. Cell. Res.* **226**, 105-113.
- Michelet, F., Gueguen, R., Leroy, P., Wellman, M., Nicolas, A., and Siest, G. (1995) Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: Relation to sex, aging, biological variables, and life habits. *Clin. Chem.* **10**, 1509-1517.

Nom, prénom : **PANTARU épouse ENOIU Milica**



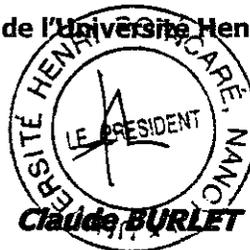
Nature de la thèse : cotutelle France Roumanie

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 27 mars 2004 n° 503

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



Rôle pro-oxydant de la gamma-glutamyltransférase et de la gamma-glutamyltransférase « related » dans la peroxydation lipidique

La gamma-glutamyltransférase (GGT) et la gamma-glutamyltransférase « related » (GGT-rel) récemment découverte sont deux enzymes capables de métaboliser le glutathion (GSH) par le clivage du résidu γ -glutamyle. Ce travail a été entrepris à la suite d'études récentes suggérant un rôle pro-oxydant de la GGT au cours du métabolisme du GSH en présence de fer. Notre objectif principal a donc été d'une part de cerner la place que peut occuper la GGT dans le stress oxydant et d'autre part vérifier dans quelle mesure la GGT-rel peut assumer un rôle similaire.

Dans la première partie du travail, nous avons démontré par spectrofluorimétrie que la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) au cours du métabolisme du GSH dans un modèle cellulaire est directement liée à l'activité soit de la GGT soit de la GGT-rel.

La deuxième partie met en évidence le rôle irréfutable de la GGT dans la peroxydation par le système GGT/GSH/Fe³⁺ d'acides gras polyinsaturés. Cette conclusion est assurée, dans le cas de l'acide linoléique ou linoléique, principalement par la caractérisation par CLHP et spectrométrie de masse de plusieurs dérivés aldéhydiques. Parmi ces derniers, nous avons identifié en plus de l'aldéhyde malonique, le 4-hydroxynonéal (HNE) ainsi que plusieurs aldéhydes insaturés et hydroxylés.

Enfin, la troisième partie de ce travail a été consacrée au rôle de la GGT et de la GGT-rel dans le métabolisme du conjugué GS-HNE (glutathion-4-hydroxynonéal) et a établi que ce dernier est ainsi transformé en CysGly-HNE qui a été identifié par spectrométrie de masse. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois que le métabolisme du GS-HNE dans les cellules exprimant soit la GGT soit la GGT-rel conduit à une augmentation de la cytotoxicité.

Rolul pro-oxidant al gamma-glutamyl-transferazei și gamma-glutamyltransferazei « related » în peroxidarea lipidică

Gamma-glutamyltransferaza (GGT) și gamma-glutamyl-transferaza « related » (GGT-rel), recent descoperită, sunt două enzime capabile să metabolizeze glutathionul (GSH) prin clivarea restului γ -glutamil. Lucrarea de față a fost întreprinsă ca urmare a unor studii recente care sugerează un rol pro-oxidant al GGT în cursul metabolizării GSH în prezență de fer. Obiectivul nostru principal este, pe de o parte, să stabilim locul pe care GGT îl ocupă în stresul oxidativ, iar pe de altă parte, să verificăm în ce măsură GGT-rel poate avea un rol similar.

În prima parte a lucrării, am demonstrat prin spectrofluorimetrie că formarea de specii reactive de oxigen în cursul metabolizării GSH într-un model celular este legată direct fie de activitatea GGT, fie de activitatea GGT-rel.

Cea de a doua parte pune în evidență rolul indiscutabil al GGT în peroxidarea acizilor grași polinesaturați de către sistemul GGT/GSH/Fe³⁺. Această concluzie este susținută prin caracterizarea în HPLC și spectrometrie de masă a mai multor compuși aldehidici formați prin oxidarea acizilor linoleic și linolenic. Printre compușii caracterizați, pe lângă aldehida malonică, am identificat 4-hidroxinonenalul (HNE) precum și mai multe aldehide nesaturate și hidroxilate.

În sfârșit, în cea de a treia parte, consacrată studierii rolului GGT și GGT-rel în metabolismul conjugatului GS-HNE (glutathion-4-hidroxinonenal), am stabilit că acesta din urmă este transformat în CysGly-HNE, compus care a fost identificat în spectrometrie de masă. În plus, pentru prima dată, am pus evidență că metabolismul GS-HNE în celulele care exprimă fie GGT, fie GGT-rel, conduce la o creștere a citotoxicității.