

ASEA®

Effet des molécules de signalisation redox sur la voie NRF2

Résumé des études menées par: l'Université de Bath, Royaume-Uni

Université de Sydney occidentale, Australie



Introduction

Nrf2 - un facteur de transcription

Le facteur nucléaire spécifique des érythroïdes 2 (NF-E2) a été caractérisé, décrit et cloné pour la première fois chez la souris par Andrews et al. en 1993. Ce polypeptide était un nouveau membre spécifique des cellules hématopoïétiques de la famille des facteurs de transcription à motif bzip (basic region-leucine zipper) (1). NF-E2 est l'une des protéines qui se lie à la répétition tandem AP1 (activating protein 1)-NF-E2, qui représente le cœur de l'amplificateur au sein de HS2 (2).

En 1994, un membre de la famille des facteurs de transcription humains CNC-bZIP a été découvert pour la stimulation transcriptionnelle des gènes bêta-globine, le Nrf2 ou facteur 2 apparenté à NF-E2 (précédemment HEBP1) comme il était connu auparavant. Il a été cloné, sa structure génomique isolée et nommée pour la première fois Facteur Nucléaire Érythroïde 2-Apparenté, ou Nrf2. Il a été décrit comme un activateur transcriptionnel de base et de leucine semblable à Nf-E2. Il est intéressant d'observer que, contrairement à NF-E2, l'expression de Nrf2 n'est pas limitée aux tissus hématopoïétiques. À cette époque, on ne savait pas quel rôle jouait Nrf2 dans les tissus non hématopoïétiques où il était exprimé à des niveaux élevés. Le degré élevé de conservation entre les gènes Nrf2 de la souris et de l'homme suggérait qu'ils avaient, de manière intrigante, une fonction importante (2). Nrf2 est codé par le gène du facteur nucléaire (dérivé des érythroïdes 2)-like 2 (NFE2L2) situé dans la bande cytogénétique 2q31.2 du chromosome 2 chez les humains (ID du gène : 4780). Le NFE2L2 se compose de cinq exons interrompus par quatre introns, donnant naissance à 8 variantes de transcrite codant 6 isoformes de Nrf2 (3).

Des décennies plus tard, on en sait beaucoup plus sur cette protéine. Selon Cancer.gov/Institut National de la Santé, Nrf2 est une protéine qui contrôle l'expression de certains gènes. Ces gènes aident à protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène et espèces réactives de l'azote générées par notre corps par divers systèmes endogènes, 4).

Decembre 2023

Effet des molécules de signalisation redox sur la voie NRF2

Ces radicaux libres sont des composés importants car ils peuvent jouer un rôle essentiel dans le développement de certaines conditions et sont également liés au processus de vieillissement (5). Les preuves actuelles ont montré que NRF2 se situe au cœur d'un réseau régulateur complexe, établissant Nrf2 comme un facteur de transcription vraiment pléiotropique (6).

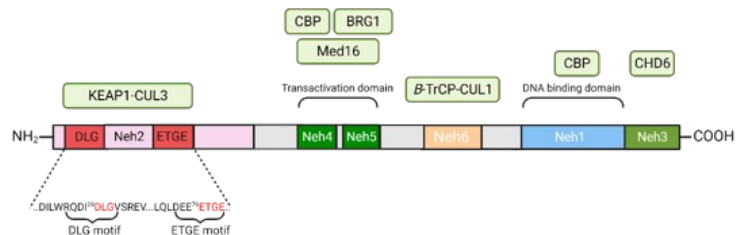
Nrf2 est un régulateur principal de la réponse antioxydante et du métabolisme des xénobiotiques par la régulation d'une vaste gamme de gènes antioxydants et de détoxification de phase II. En conséquence, Nrf2 protège les cellules contre différents types de stress, des substances endogènes et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) aux agressions environnementales (7).

L'activité de Nrf2 est régulée par Keap1 (protéine associée à l'ECH de type Kelch 1) – une sous-unité adaptatrice de la ligase ubiquitine E3 basée sur Cullin 3 – et agit comme un capteur des stress oxydatifs et électrophiles (8). Keap1 agit comme un capteur clé du stress oxydatif et électrophile. Dans des conditions d'homéostasie, KEAP1 fait partie d'une ligase ubiquitine E3, qui régule étroitement l'activité du facteur de transcription NRF2 en le ciblant pour l'ubiquitination et la dégradation dépendante du protéasome. En réponse au stress, un mécanisme moléculaire complexe facilité par les cystéines capteurs au sein de KEAP1 permet à NRF2 d'échapper à l'ubiquitination, de s'accumuler dans la cellule et de se transloquer dans le noyau, où il peut promouvoir son programme de transcription antioxydante, régulant l'expression des gènes cytoprotecteurs (9)

Figure 1:

Structures de domaine de NRF2 (A) et KEAP1 (B). Les molécules interagissant avec NRF2 sont indiquées dans des cadres verts et positionnées au-dessus de leurs domaines d'interaction (Adapté et modifié à partir de la référence 10).

NRF2 Domain



KEAP1 Domain



La conservation phylogénétique de la structure de NRF2 parmi les espèces révèle la présence de six domaines fonctionnels : Neh1 (domaine d'homologie NRF2-ECH-1) à Neh6. Neh1 contient les domaines CNC et bZIP qui médient la liaison à l'ADN et la formation de dimères, tandis que Neh3, Neh4 et Neh5 sont des domaines de transactivation. Parmi les domaines de transactivation, Neh4 et Neh5 contribuent significativement à l'activation transcriptionnelle en recrutant l'histone acétyltransférase, la protéine de liaison à l'élément de réponse au cAMP et le complexe médiateur (9).

KEAP1 agit comme un capteur riche en thiols de cystéine des insultes redox, tandis que NRF2 est un facteur de transcription qui transduit de manière robuste les signaux chimiques pour réguler une batterie de gènes cytoprotecteurs. KEAP1 réprime l'activité de NRF2 dans des conditions quiescentes, tandis que NRF2 est libéré de la répression médiée par KEAP1 lors de l'exposition à des stress. The KEAP1-NRF2 system is an effective apparatus

Effet des molécules de signalisation redox sur la voie NRF2

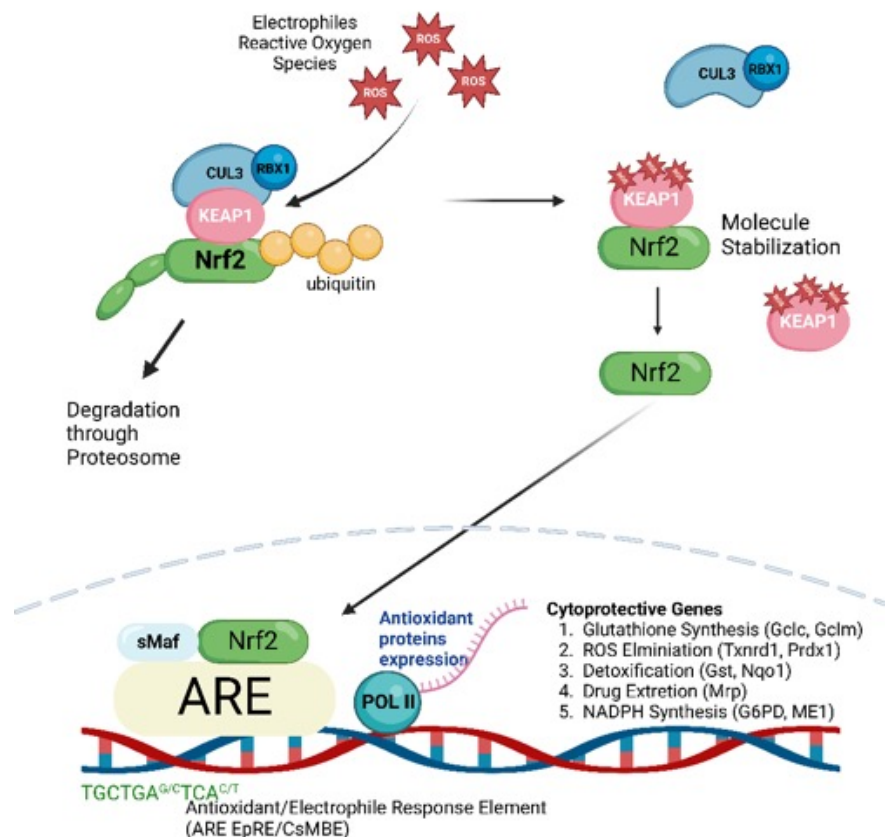
Figure 2:

KEAP1-NRF2 est un système à deux composants. Dans le cytoplasme, NRF2 est ubiquitiné par le complexe ligase E3 ubiquitine KEAP1-CUL3 pour marquer sa dégradation par le protéasome. Lorsque les cellules sont exposées à des électrophiles ou des espèces réactives de l'oxygène, KEAP1 est modifié et l'activité de la ligase E3 ubiquitine KEAP1-CUL3 diminue, ce qui entraîne la stabilisation de NRF2. NRF2 stabilisé et accumulé se transloque dans le noyau et active une batterie de gènes cytoprotecteurs (Adapté et modifié à partir de la référence 10).

Le système KEAP1-NRF2 est un appareil efficace pour maintenir l'homéostasie redox et le mécanisme de défense contre les agressions environnementales (10). Des recherches approfondies sur le système KEAP1-NRF2 ont démontré l'importance critique de l'activité de NRF2 et de ses mécanismes de régulation pour le maintien de notre santé. Il est important de souligner que la dysrégulation de ce système sous-tend la pathogenèse de diverses maladies humaines (11).

La caractéristique la plus importante de NRF2 est son inductibilité. KEAP1 crée la nature inductible de la fonction de NRF2 en servant de composant de reconnaissance des substrats du complexe de ligase ubiquitine E3 en collaboration avec CUL3 et RBX. Dans des conditions normales, NRF2 ubiquitiné subit une dégradation protéasomique, et c'est cette dégradation constitutive de NRF2 qui maintient la quantité et l'activité de NRF2 à un faible niveau. L'activité de la ligase ubiquitine E3 du complexe KEAP1-CUL3 est perturbée lors de l'exposition à des électrophiles et aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui modifient les résidus de cystéine de KEAP1, permettant au NRF2 nouvellement synthétisé de s'accumuler dans le noyau et d'activer la transcription. Ainsi, la possession de résidus de cystéine hautement réactifs rend KEAP1 un biosenseur efficace et sensible des perturbations redox en activant ou désactivant l'activité de ligase ubiquitine E3 du complexe KEAP1-CUL3 (10).

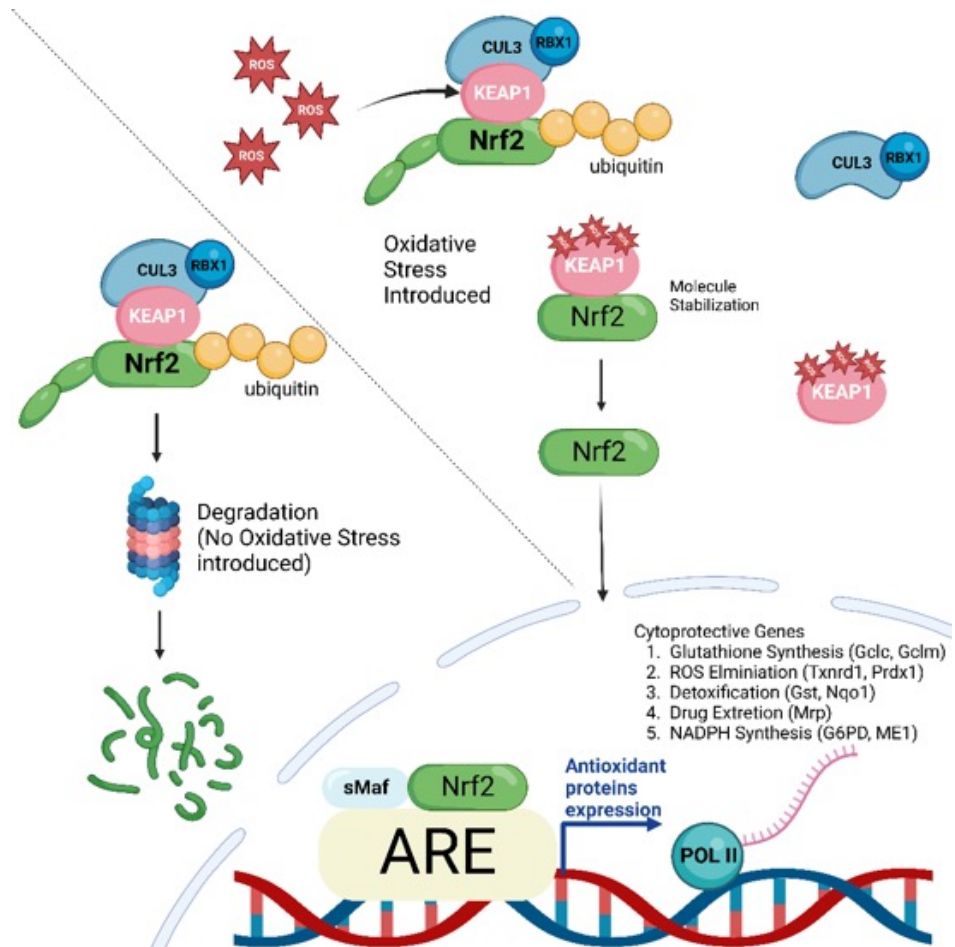
Lorsque les cellules sont exposées au stress oxydatif ou à des composés chimio-préventifs, Nrf2 se transloque dans le noyau, forme un hétérodimère avec son partenaire obligatoire Maf, et se lie à la séquence ARE pour activer la transcription de différents types de gènes. La majorité des gènes régulés par Nrf2 contiennent une séquence ARE dans le promoteur (12).



Effet des molécules de signalisation redox sur la voie NRF2

Figure 3:

Le système KEAP1-NRF2. Dans des conditions normales, Nrf2 est constamment ubiquitiné par Keap1 et dégradé dans le protéasome. Suite à une exposition aux électrophiles ou au stress oxydatif, Keap1 est inactivé. Nrf2 stabilisé s'accumule dans le noyau et active de nombreux gènes cytoprotecteurs (Adapté et modifié à partir de la référence 13).



À la fin de l'histoire, le système KEAP1-Nrf2 est un appareil efficace pour maintenir l'homéostasie redox. C'est une combinaison parfaite où KEAP1 agit comme un capteur des agressions redox et Nrf2 agit comme un facteur de transcription qui transmet de manière robuste des signaux chimiques pour réguler une batterie de gènes cytoprotecteurs. La relation entre eux se résume de telle manière que KEAP1 réprime l'activité de NRF2 dans des conditions quiescentes, tandis que NRF2 est libéré de la répression médiée par KEAP1 lors de l'exposition aux stress (10).

La voie et la régulation Nrf2-KEAP1

La voie Nrf2-KEAP1 est fondamentale pour détecter et répondre au stress oxydatif et électrophile. Dans la voie de signalisation classique Nrf2-KEAP1,

Effet des molécules de signalisation redox sur la voie NRF2

Keap1 est un répresseur clé de Nrf2 et joue un rôle central dans la régulation de la voie de signalisation Nrf2. Keap1 sert de lien entre Nrf2 et la ligase ubiquitine Cullin-3. Les agents de stress oxydatif ou les électrophiles inhibent la dégradation dépendante de l'ubiquitination et augmentent l'accumulation nucléaire de Nrf2. En tant que protéine riche en cystéine, Keap1 est un excellent capteur d'inducteurs chimiques (14).

Nrf2 est un facteur de transcription qui affecte l'expression de nombreux gènes différents impliqués dans le stress antioxydant et le métabolisme des médicaments. Ainsi, la régulation de l'expression de Nrf2 est une cible importante pour le traitement ou la prévention des maladies, et cette régulation a été rapportée comme étant influencée par l'épigénétique (15).

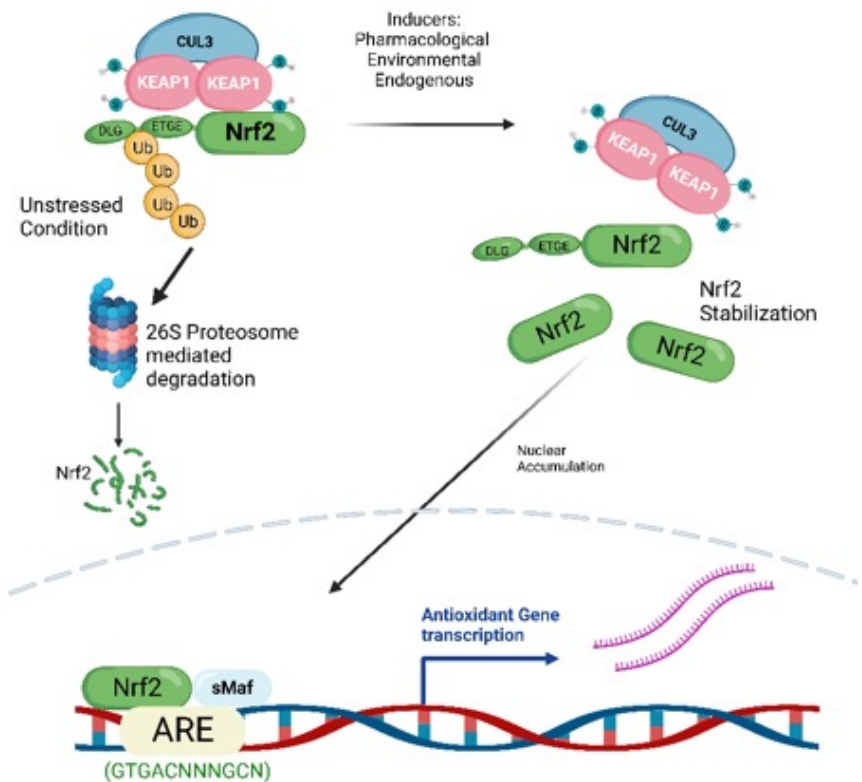


Figure 4:

Schéma du parcours de signalisation de la voie Nrf 2 (Adapté et modifié à partir de la référence 16)

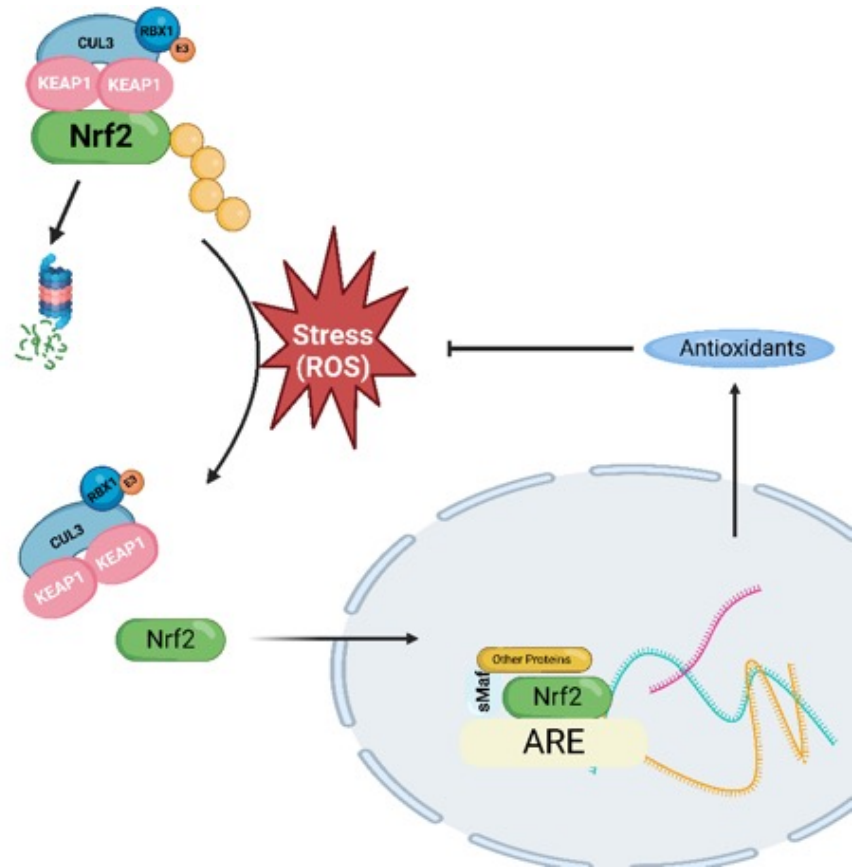
L'expression de Nrf2 est inhérente aux cellules, assurant ainsi une réponse protectrice au stress oxydatif et à l'inflammation. Dans des conditions physiologiques, Nrf2 a une rotation rapide en raison du système ubiquitine-protéasome. La stabilité de Nrf2 est contrôlée par KEAP-1, connue en tant que capteur redox pour les signaux oxydatifs endogènes et environnementaux ainsi que pour les réactions électrophiles (17). Nrf2 peut également être régulé au niveau transcriptionnel. Le promoteur du gène NFE2L2 présente plusieurs séquences régulatrices (18). Il est intéressant de noter que les activateurs dits de Nrf2 devraient être appelés des inhibiteurs de "KEAP1". Dans des circonstances normales, Keap1 existe sous forme de dimères à l'intérieur des cellules, fonctionnant comme une protéine de liaison de substrat pour l'interaction du complexe ligase ubiquitine E3 Cul3/Rbx1 avec Nrf2, ce qui entraîne l'ubiquitination continue de Nrf2 et sa dégradation protéasomale ultérieure. Cela maintiendrait des niveaux basaux faibles des antioxydants régulés par Nrf2.

Effet des molécules de signalisation redox sur la voie NRF2

Figure 5:

Keap1 en tant que principal régulateur de l'activation de Nrf2 et de l'expression conséquente des gènes antioxydants induits par ARE (Adapté et modifié à partir de la référence 19).

Sous un stress cellulaire ou une exposition à un stress oxydatif léger, Nrf2 se dissocie de Keap1, devient stabilisé, se transloque dans les noyaux où il interagit avec d'autres facteurs protéiques et se lie à l'ARE, entraînant une augmentation de la transcription des gènes antioxydants (10). Chez les mammifères, y compris les humains, l'axe Keap1-Cul3-Rbx1 est connu comme le mécanisme régulateur le plus critique de l'activité de Nrf2 (19).



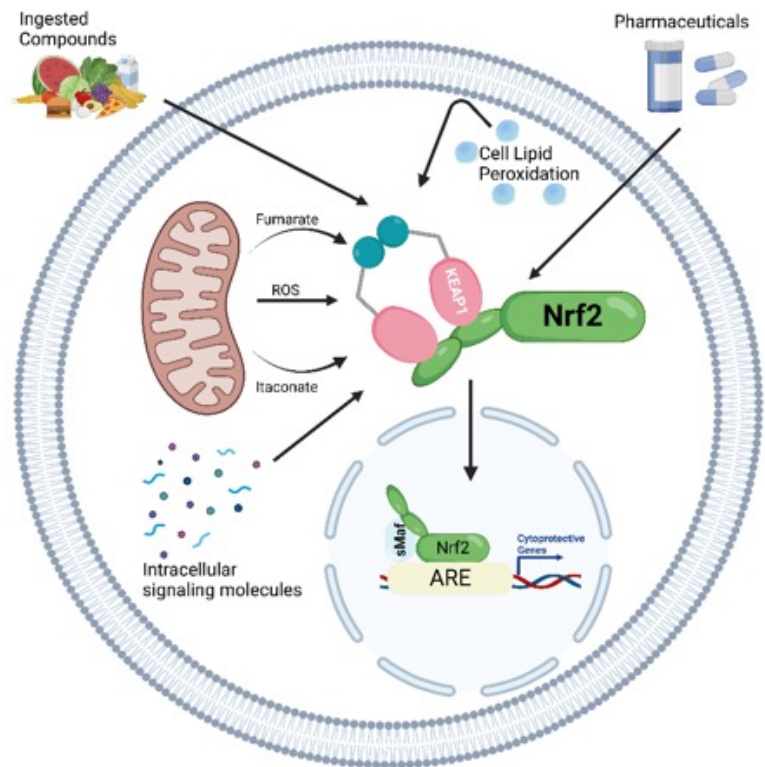
Les mécanismes prédominants par lesquels des conditions de stress (telles que le stress oxydatif et électrophile) et des inducteurs chimiques provoquent la dissociation de Nrf2 de Keap1 sont l'oxydation des résidus de cystéine de Keap1. Les groupes sulfhydryles de cystéine peuvent être oxydés pour former un pont disulfure, un acide sulfénique ou un acide sulfonique. Ces modifications redox provoquent la séparation de Keap1 de Nrf2, entraînant la stabilisation de Nrf2 et sa translocation nucléaire (19). La dérégulation de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 a été décrite dans la pathogenèse de multiples maladies, et l'axe Nrf2/Keap1 a émergé en tant que modulateur crucial de l'homéostasie cellulaire. Alors que l'importance de Nrf2 dans la modulation des processus biologiques a été bien établie et largement discutée en détail, l'accent sur Keap1 dépasse rarement la régulation de l'activité de Nrf2 et la détection redox (20). Il est important de considérer que l'alimentation humaine fournit un large ensemble de composés actifs qui peuvent influencer et activer la voie de signalisation Nrf2 (52). Parmi eux, certains sont même considérés comme des activateurs puissants de Nrf2.

Effet des molécules de signalisation redox sur la voie NRF2

Figure 6:

La voie KEAP1-NRF2 intègre la détection d'une large gamme de stress cellulaires à la régulation à la hausse de l'expression génique cytoprotectrice. Les molécules de stress endogènes et exogènes peuvent se lier directement aux résidus de cystéine réactifs au sein de KEAP1, entraînant la stabilisation de NRF2 et la régulation à la hausse de son programme de transcription cytoprotecteur (Adapté et modifié à partir de la référence 21).

Ces composés naturellement présents peuvent stimuler diverses kinases en amont, interférer avec l'interaction Keap1-Nrf2 et/ou perturber l'équilibre redox cellulaire, entraînant l'activation de la voie Nrf2 (14). Des composés tels que la curcumine, présente dans le curcuma, et le sulforaphane, trouvé dans les légumes crucifères tels que le brocoli, activent directement la voie Nrf2-Keap1 (22).



Nrf2 et les protéines de détoxification

Glutathion, GCLC/GCLM

Le glutathion a été découvert par J. de Rey-Paihade en 1888 à partir d'extraits de levure et de nombreux tissus animaux, ainsi que dans le blanc d'œuf frais. de Rey-Paihade a nommé cette substance philothion, signifiant amour et soufre en grec. En 1921, Hopkins a suggéré que le philothion isolé du foie, du muscle squelettique et de la levure est un dipeptide composé de cystéine et de glutamate, mais ces auteurs ont négligé la présence de glycine dans le philothion, peut-être en raison d'une mauvaise interprétation des données amino N de Van Slyke. En hommage à l'histoire de la découverte du philothion, Hopkins a nommé la substance "glutathion" (23). Le glutathion, également appelé GSH, est un composant endogène du métabolisme cellulaire, un tripeptide composé de glycine, de cystéine et d'acide glutamique. La conjugaison au glutathion contribue à la détoxification en liant les électrophiles qui pourraient autrement se lier aux protéines ou aux acides nucléiques, entraînant des dommages cellulaires et des mutations génétiques (24).

Il se trouve dans de nombreux tissus à des concentrations relativement élevées, soit 1 à 10 mM dans les cellules, de manière similaire au glucose, au potassium et au cholestérol, jouant un rôle crucial dans plusieurs processus physiologiques tels que la préservation de l'équilibre redox, la réduction du stress oxydatif par la détoxification des composés xénobiotiques et endogènes, et la modulation du système immunitaire. L'action du glutathion sur le stress oxydatif a suscité des spéculations sur le rôle thérapeutique possible de cette molécule pour plusieurs maladies chroniques avec un équilibre redox altéré (25). Le GSH est impliqué dans plusieurs fonctions, notamment la défense antioxydante avec la réduction du stress oxydatif et le maintien de l'équilibre redox, la détoxification métabolique des xénobiotiques et des composés exogènes, la régulation du cycle cellulaire, la modulation du système immunitaire, ainsi que la fibrogenèse (26). Son rôle principal est de protéger les macromolécules cellulaires contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'azote (RNS) endogènes et exogènes. En particulier, le GSH détoxifie catalytiquement les hydroperoxydes, le peroxyde d'azote et les peroxydes lipidiques et capture directement diverses molécules oxydantes, telles que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, l'oxyde nitrique et les radicaux carbonés (26; 27).

Fondamentalement, le GSH neutralise les ROS en donnant des H⁺ et maintient la cystéine protéique sous forme réduite active en offrant des e⁻. La capacité du GSH en tant qu'agent réducteur dépend du rapport GSH/GSSG et de la concentration totale de glutathion, qui sont négativement affectés par des conditions de stress (28). Le GSH maintient l'état redox cellulaire, affecte la signalisation redox, la prolifération cellulaire, la mort cellulaire et l'homéostasie du GSH est régulée par la synthèse de novo ainsi que par l'état redox du GSH. De cette manière, Nrf2 est essentiel pour maintenir l'état redox du GSH via la régulation transcriptionnelle de GSR et protéger les cellules contre le stress oxydatif (29). La glutamate cystéine ligase (GCL) est une enzyme qui joue un rôle critique dans la synthèse du GSH. La sous-unité catalytique de la GCL est un composant clé de cette enzyme. De plus, la première étape de la synthèse du GSH est réalisée par la GCL, qui est composée de sous-unités catalytiques (GCLC) et de sous-unités modifiantes (GCLM) (30). Ainsi, la ligase glutamate-cystéine, également connue sous le nom de synthétase gamma-glutamylcystéine, est l'enzyme limitante du taux de synthèse du glutathion (31).

Heme Oxygenase 1

La hème oxygénase-1 (HO-1) est une enzyme cytoprotectrice qui réagit aux stimuli oxydatifs et/ou inflammatoires, et elle a la capacité de réduire le stress oxydatif. Une fonction majeure de la HO-1 est de métaboliser la hème qui s'accumule dans les tissus en raison du renouvellement des globules rouges (32). La HO-1 est un gène régulé par Nrf2, car elle fait partie de ces gènes cibles de Nrf2 qui sont significativement exprimés dans différents types de cellules (33). Dans des conditions d'homéostasie, l'expression de la HO-1 est faible ou absente dans la plupart des cellules et des tissus.

Cependant, la HO-1 est fortement régulée à la hausse par la plupart des cellules en réponse à un grand nombre de stimuli pro-oxydants et offre une protection contre les dommages oxydatifs. L'expression de la HO-1 est largement sous le contrôle du Nrf2 sensible à la redox, qui se lie à l'élément de réponse aux antioxydants (ARE) dans la région promotrice de nombreux gènes antioxydants, y compris HMOX1 (HO-1 codée par le gène HMOX1 chez l'homme) (34).

Signalisation REDOX

La transduction du signal par transfert d'électrons, ou la signalisation redox, nécessite un électrophile (une molécule qui attire les électrons) réagissant avec un nucléophile (une molécule qui cédera des électrons). La signalisation redox implique des réactions où un électrophile prend des électrons, laissant le nucléophile dans un état plus oxydé (réaction d'oxydation). Dans cette situation, l'électrophile est appelé un oxydant (35). En résumé, l'oxydation et la réduction par perte ou gain d'un électron induisent des changements dans les caractéristiques structurales et fonctionnelles des molécules, modifiant ainsi les processus de signalisation (36).

La signalisation redox fait partie de la physiologie normale de toutes les cellules, y compris la croissance stimulée par le flux des cellules endothéliales, et joue un rôle significatif dans les réponses physiopathologiques telles que celles qui se produisent dans les lésions d'ischémie/reperfusion. Contrairement à la signalisation par des seconds messagers tels que le cAMP, la signalisation par des espèces réactives implique une modification chimique d'un résidu cystéine cible de la protéine de signalisation plutôt qu'une liaison non covalente à une protéine (35). Les événements liés à la signalisation redox sont déclenchés sous des niveaux physiologiques de stress oxydatif et nitrosatif, et les flux temporels dans l'homéostasie sont restaurés par déglutathionylation des capteurs redox et une augmentation des niveaux de GSH/GSSG (37). Les principales molécules qui participent à la signalisation redox sont les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (36). Les ROS sont des composés générés en tant que sous-produits de la phosphorylation oxydative (métabolisme aérobie) dans les mitochondries ou via des NADPH oxydases induites par la signalisation cellulaire dans le cytosol (38). Cela inclut des molécules comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles, qui ont des propriétés chimiques inhérentes conférant une réactivité à différentes cibles biologiques. Les ROS sont souvent associés au stress oxydatif, ce qui suggère qu'ils induisent des dommages dans les lipides, les protéines et l'ADN. Cependant, au cours des deux dernières décennies, il est devenu évident que les ROS servent également de molécules de signalisation pour réguler des processus biologiques et physiologiques. Il semble qu'au début de l'évolution, la nature a sélectionné les ROS en tant que mécanisme de transduction du signal pour permettre une adaptation aux changements dans les

éléments nutritifs environnementaux et à l'environnement oxydatif. En effet, chez les procaryotes, il existe des mécanismes bien décrits selon lesquels les ROS activent directement les facteurs de transcription pour l'adaptation au stress (39).

Études sur les molécules de signalisation redox

Un essai clinique humain en double aveugle, contrôlé par placebo, d'une durée de 8 semaines, a démontré que la consommation de molécules de signalisation redox (RSM) jouait un rôle dans la modulation de l'expression génique, la liant à des fonctions clés et à des voies importantes dans les cellules. Quelques-uns de ces gènes ont été montrés comme étant surexprimés et liés à la transcription de gènes cruciaux. Après une analyse du profil transcriptionnel, il a été observé que cinq gènes présentaient un changement significatif dans leur expression par rapport aux sujets qui n'avaient pas reçu de RSM : KCTD12, EGR1, PYROXD1, IRAK3 et CCR10.

Il est intéressant de noter que l'expression de ces gènes est revenue à la normale lorsque la consommation de RSM a été arrêtée, suggérant que l'utilisation continue de ces molécules est nécessaire pour maintenir une modulation continue du profil transcriptionnel.

Les gènes KCTD12, EGR1, PYROXD1, IRAK3 et CCR10 ont été analysés à l'aide de PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) et de Wikipathways pour identifier leur relation avec différentes voies. Certaines des voies comprennent la voie de signalisation du facteur neurotrophique dérivé du cerveau, la voie de signalisation de l'hormone thyroïdienne humaine, la voie NRF2, la voie de signalisation VEGFA - VEGFR2, et d'autres. Ces voies, ainsi que d'autres liées à ces gènes, sont cruciales pour la santé et la fonction cellulaires.

En ce qui concerne la voie Nrf2, il a été découvert que cette voie est responsable d'activer et de désactiver des gènes essentiels à la production de protéines protectrices, comme la glutathion, qui combattent les composés nocifs dans le corps. Cette voie est capable de réguler l'expression génique (40; 41; 42).

Il est également compris que Nrf2 est un régulateur crucial de la réponse antioxydante (43; 42), favorisant la résilience cellulaire au stress (44; 45). Lorsque cette voie est activée, les cellules peuvent être confrontées à des insultes, y répondre et restaurer leurs fonctions, car l'activation de la voie Nrf2 favorise l'homéostasie cellulaire (46; 47; 48).

De plus, les gènes qui répondent à la voie Nrf2 sont impliqués dans la protection des cellules contre le stress oxydatif (43). En fait, la voie Nrf2 est l'une des principales voies impliquées dans l'adaptation au stress (49; 50).

Lorsque Nrf2 est activé, davantage de protéines antioxydantes sont produites dans le corps pour lutter contre le stress oxydatif (51).

La fonction des molécules de signalisation redox dans AREC32

Lignée cellulaire rapporteur dérivée du sein humain (MCF7) ET CELLULES HEPG2 (Lignée cellulaire hépatomate humain, non tumorigène)

1- Méthode

Culture cellulaire sur les cellules AREc32 et HepG2

La lignée cellulaire AREc32 est une lignée cellulaire MCF7 transfectée de manière stable qui contient un vecteur génique de luciférase sous le contrôle de huit copies de l'ARE (élément de réponse à l'antioxydant) du rat Gsta2. Les cellules hépatiques humaines HepG2 possèdent de nombreuses fonctions spécialisées caractéristiques des hépatocytes humains normaux. Les deux types de cellules ont été cultivés dans un milieu de culture modifié d'aigle de Dulbecco (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Australie) complété de 10 % de sérum de veau foetal (FBS, Sigma-Aldrich, Australie), 1 % de pénicilline (Sigma-Aldrich, Australie) dans un environnement de culture à 37 °C avec 5 % de CO2. Les cellules cultivées avec plus de 90 % de confluence ont été digérées avec 0,25 % de trypsine (Thermo Fisher Scientific, Australie) pour les bioessais suivants.

Préparation de la solution d'eau électrolysée

Les molécules de signalisation redox (RSM) ont été générées et stabilisées selon un processus breveté d'électrolyse utilisant du sel pur et de l'eau. La présence de RSM a été vérifiée à l'aide de méthodes analytiques appropriées. Différents échantillons de RSM ont été préparés et testés pour leur activité Nrf2 (Tableau 1).

Table 1. RSM samples provided.

Label	Information
Control	0.27% NaCl
V10 v1	Regular, current ARS, sample #1
V10 v2	Regular, current ARS, sample #2
V10 v3	Regular, current ARS, sample #3

Essai luciférase Nrf2 sur les cellules AREc32

Des échantillons de RSM ont été soumis à un essai luciférase Nrf2 en utilisant les cellules AREc32 pour l'examen de l'activité Nrf2, où l'expression de la luciférase est induite via un vecteur génique de rapporteur Nrf2 transfecté de manière stable. Le tert-butylhydroquinone (tBHQ), un additif alimentaire synthétique activant puissamment Nrf2, a été utilisé comme contrôle positif. Le contrôle utilisé consistait en un mélange de 0,27 % de NaCl, collecté avant l'électrolyse.

Les cellules AREc32 ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits à une densité de 1 x 10⁶ cellules/puits et ont été traitées avec des échantillons de RSM lorsqu'elles ont atteint une confluence de 90 %. Après 24 heures, tous les surnageants ont été transférés dans de nouvelles plaques de 96 puits pour l'essai de glutathion. Les cellules dans les plaques d'origine ont été mélangées avec un tampon de lyse au triton (20 µL). Les lysats cellulaires ont été obtenus en agitant la plaque pendant 10 minutes à température ambiante et congelés pendant 20 minutes à -20 °C. Enfin, les lysats cellulaires ont été collectés (15 µL) et transférés dans une plaque à microtitre blanche de 96 puits. Le tampon de luciférase (100 µL) a été ajouté à la plaque de 96 puits et la bioluminescence a été enregistrée dans les 5 minutes [19]. L'activation de Nrf2 a été calculée par le changement relatif par rapport à celui du témoin négatif (cellules avec seulement du milieu).

Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire des cellules AREc32 après le traitement par des échantillons de RSM pendant 24 heures a été surveillée par l'essai Alamar Blue, largement utilisé pour les tests de viabilité cellulaire. Après le retrait des surnageants, les cellules AREc32 ont été exposées à 100 µL de solution de colorant Alamar Blue. La plaque a ensuite été incubée pendant 2 heures supplémentaires dans un incubateur humidifié à 37 °C. La densité optique de chaque puits a été déterminée en mesurant l'excitation à 545 nm et l'émission à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. L'absorbance dans le groupe témoin (cellules avec seulement du milieu) a été considérée comme une viabilité cellulaire de 100 %, et la viabilité cellulaire après le traitement a été calculée en normalisant l'absorbance par rapport au témoin pour déterminer le pourcentage.

Mesure du glutathion par chromatographie liquide haute performance et détection par fluorescence

La dérivation du glutathion dans les échantillons et les étalons avec le 4-fluoro-7-aminosulfonylbenzofurazan (ABD-F) a été réalisée comme décrit dans Steele et al., 2012 et Afzal et al., 2023.

Une solution étalon composée de 800 mM de cystéine, et 50 mM de cystéine-glycine, d'homocystéine et de glutathion (GSH) a été préparée, puis diluée séquentiellement deux fois six fois dans de l'eau ou du DMEM.

Chaque solution a été mélangée avec un volume égal d'acide 5-sulfosalicylique à 1%

contenant 1 mM d'éthylènediaminetétraacétate (EDTA), avant centrifugation à 14 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant a ensuite été transféré dans des tubes frais et stocké à -80 °C avant utilisation dans les réactions de dérivation à l'ABD-F.

Le surnageant collecté des cellules AREc32 après différents traitements a été retiré du stockage au congélateur et laissé atteindre la température ambiante. Les flacons ont été placés dans un bloc chauffant réglé à 35 °C, et 50 µL du surnageant ont ensuite été ajoutés. La réduction des liaisons sulfure a été réalisée avec l'ajout de 30 µL de tris (2-carboxyéthyl) phosphine hydrochloride à 1 mM, et 30 µL de N-acétyl cystéine à 50 mM ont été ajoutés ensuite pour servir de témoin interne. Cela a été suivi par une incubation à 35 °C pendant 5 minutes. 100 µL de tampon borate suivi de 30 µL d'ABD-F ont été ajoutés à l'échantillon. L'échantillon a ensuite été incubé à 35 °C pendant 10 minutes supplémentaires, avant que la réaction de dérivation ne soit stoppée par l'ajout de 50 µL d'acide chlorhydrique à 2 M. Pour éliminer toute particule, les flacons de microcentrifugeuse ont été centrifugés à 14 000 g pendant 5 minutes à 4 °C.

Les solutions mélangées ont ensuite été placées dans des flacons de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et chargées dans l'autosampler d'un système CLHP Dionex comprenant un injecteur automatique WPS-3000, des pompes ultimes 3000, un autosampler ACC-3000, un compartiment de colonne et un détecteur de fluorescence FLD-3100. Le système était équipé d'une colonne Luna RP-18 protégée par un cartouche SecurityGuard C18 dans un porte-cartouche SecurityGuard fourni par Phenomenex. Le système Chromeleon 7.0 Chromatography Data de Dionex a été utilisé pour contrôler les instruments, acquérir des données et quantifier les aires des pics.

Analyse par Western Blot

Les cellules HepG2 ont été cultivées dans des flacons cellulaires T75 jusqu'à la confluence. Les cellules ont ensuite été traitées avec du milieu, 50 µM de tBHQ, V10 v1, V10 v2 à une concentration efficace pour l'activation de Nrf2. Après une incubation de 24 heures, les culots cellulaires ont été récoltés par centrifugation à 500 g pendant 5 minutes à 4 °C. Les culots cellulaires ont été mélangés avec un tampon d'analyse d'immunoprécipitation radioactif avec 1% d'inhibiteurs de protéase, et leurs concentrations ont été élucidées à l'aide du kit d'analyse de protéines Pierce™ BCA. Les protéines totales de chaque échantillon à 10 mg/mL ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE, puis les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF par le dispositif de transfert de gel iBlot 2. Les membranes ont été incubées avec 3% d'albumine sérique bovine (BSA) dissoute dans PBST [tampon PBS plus 1% Tween 20 pendant 1 heure à température ambiante. Les membranes ont été incubées avec des anticorps primaires contre GCLC, HO-1 pendant la nuit à 4 °C.

GAPDH a été utilisé comme témoin de charge. Les anticorps primaires ont été sondés avec des anticorps secondaires anti-rabbit HRP conjugués à température ambiante pendant 2 heures. Tous ces anticorps ont été achetés chez Cell Signaling Technology. Les bandes d'immunoréactivité sur les membranes ont été incubées avec le kit SuperSignal West Pico Plus ECL et visualisées par le iBright CL750. Les bandes spécifiques ont été analysées, et l'intensité a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., États-Unis). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM) à partir d'au moins trois expériences individuelles. La comparaison statistique entre les groupes a été réalisée par un test ANOVA à un facteur avec le test de Tukey, et une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

2- Résultats et conclusions

Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été initialement évaluée pour une réponse dose-réponse afin de comprendre comment les cellules AREc32 réagiraient à des concentrations variables de molécules de signalisation. Cela a permis de déterminer la concentration à laquelle les RSM pourraient être toxiques pour les cellules et d'identifier la plage de dosage optimale pour les tests.

Le test évalue la capacité des cellules à survivre et à fonctionner lorsqu'elles sont exposées à des molécules de signalisation redox (échantillons V10 v1 et V10 v2). Les résultats ont démontré que les cellules étaient en vie et capables de maintenir leur intégrité structurale et fonctionnelle tout au long de l'expérience.

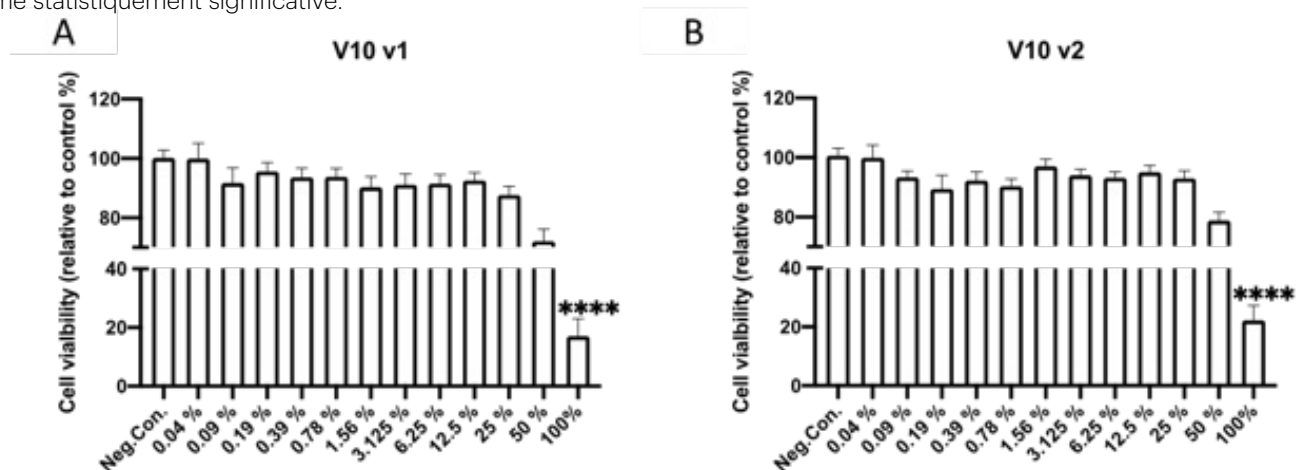


Figure 7:

Viabilité cellulaire sur les cellules AREc32 (A, B). **** $p < 0,0001$ vs. Témoin (cellules avec milieu seul), par analyse de variance à un facteur (ANOVA) dans GraphPad Prism 9.

Activation de Nrf2

La plupart des échantillons ont montré une activation légère de Nrf2 (environ 2 fois plus élevée) par rapport aux cellules inactivées. On a observé une activation légère mais perceptible de la voie de Nrf2 dans les cellules traitées par ARS. Les cellules exposées à RSM ont montré une augmentation de l'activation de Nrf2, suggérant que le supplément présentait un potentiel pour induire une réponse antioxydante cellulaire par le biais de la voie de Nrf2, contribuant à la défense cellulaire contre le stress oxydatif et favorisant la santé cellulaire globale.

Des tests sur V10 v2 ont été réalisés pour le comparer à l'échantillon précédent V10 v1 afin d'évaluer la possibilité d'obtenir des résultats cohérents, en particulier une activation modérée de Nrf2. Comme le montre la figure ABC, l'activation de Nrf2 semblait comparable entre V10 v1 et V10 v2 avec une activation maximale de Nrf2 de $1,63 \pm 0,52$ fois et $1,69 \pm 0,80$ fois, respectivement. Aucune des solutions n'a entraîné de toxicité cellulaire évidente. Ainsi, des résultats cohérents ont été obtenus.

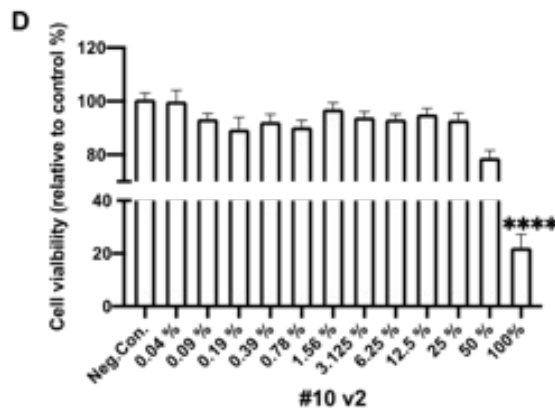
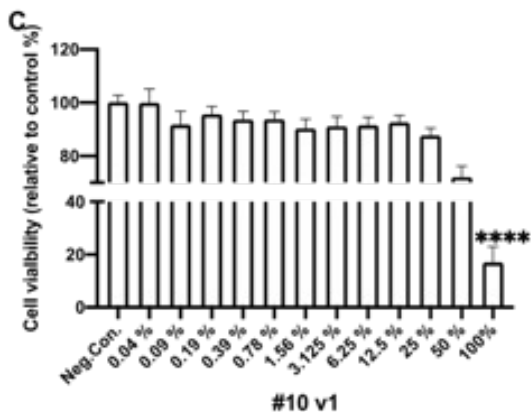
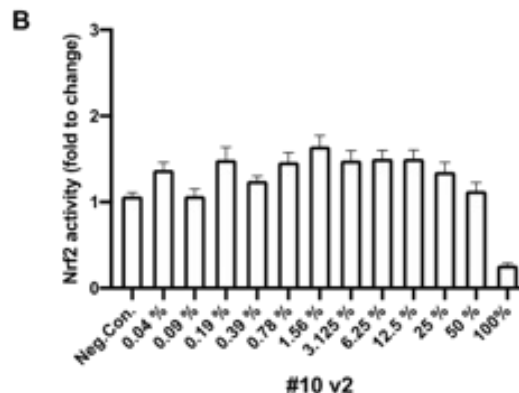
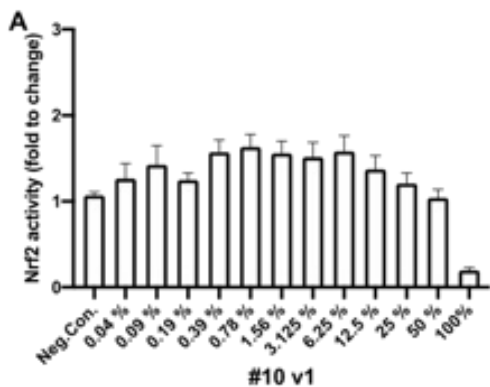
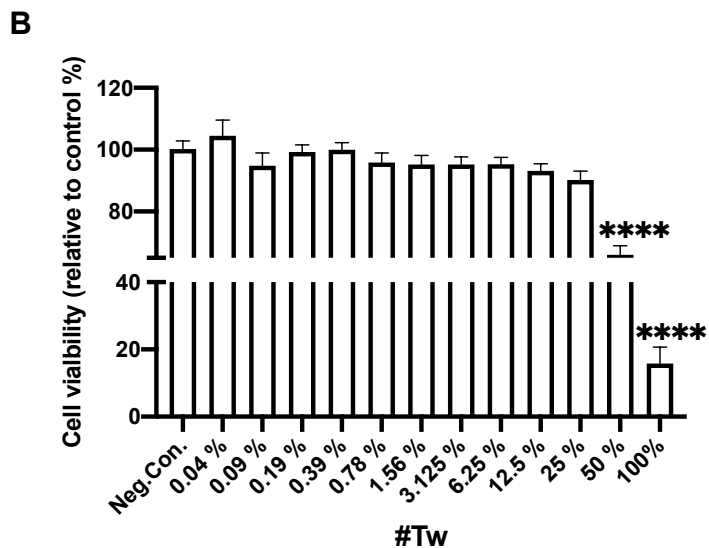
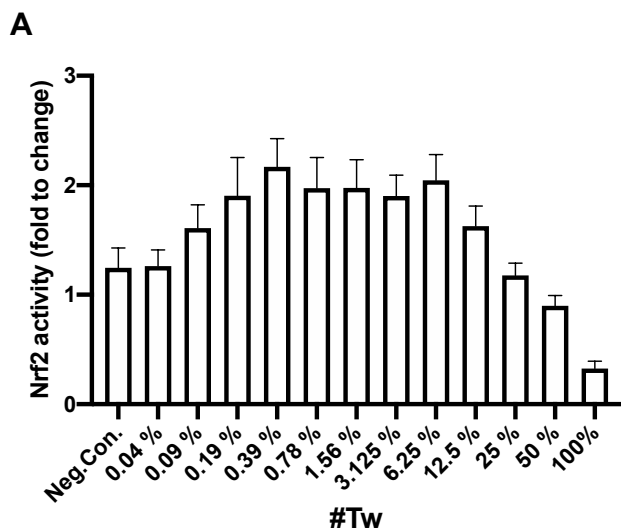


Figure 8:

L'activation de Nrf2 par RSM V10v1 (A) et V10 v2 (B). La viabilité cellulaire est présentée dans (C) et (D). **** p<0.0001 par rapport au témoin (cellules avec uniquement du milieu), selon l'analyse de variance à un facteur (ANOVA) dans GraphPad Prism 9.

Figure 9:

L'activation de Nrf2 de V10 v3 (A) et la viabilité cellulaire (B). **** p<0.0001 par rapport au témoin (cellules avec uniquement du milieu), selon l'analyse de variance à un facteur (ANOVA) dans GraphPad Prism 9.



De plus, l'activité de Nrf2 des échantillons a été testée par une autre recherche dans un laboratoire différent pour vérifier les résultats. En général, les résultats de la recherche sont similaires. Les résultats détaillés et la comparaison entre les deux chercheurs pour l'activation de Nrf2 sont présentés dans le Tableau 2.

Label	NICM's Nrf2 results	SOM's Nrf2 results
Blank	1	1
V10 v1	1.63±0.52	2.25±0.19
V10 v2	1.69±0.80	2.23±0.23
V10 v3	2.04±0.91	3.5
Positive control	12.43 ± 2.93	16.89 ± 3.62

Table 2. RSM présentant des effets maximaux sur l'activation de Nrf2 à l'Institut national de médecine complémentaire (NICM) et à l'École de médecine (SOM). Les résultats représentent le changement relatif d'activation de Nrf2 par rapport au témoin (Blank), où aucun traitement n'a été ajouté à la culture. V10 v1, V10 v2 et V10 v3 ont montré une activation légère mais perceptible de la voie Nrf2 dans les cellules traitées par RSM.

Dans le Tableau 2, deux laboratoires distincts ont indépendamment obtenu des résultats comparables lors de l'analyse du même ensemble d'échantillons. En particulier, l'activité de Nrf2 est apparue de manière cohérente dans #10. Ces résultats constants ont conduit à la sélection de ces échantillons pour des expériences mécanistiques ultérieures visant à étudier le potentiel antioxydant régulé par Nrf2.

L'activation de Nrf2 semblait comparable entre V10 v1 et V10 v2 avec une activation maximale de Nrf2 de $1,63 \pm 0,52$ fois et $1,69 \pm 0,80$ fois, respectivement. Aucune des solutions n'a provoqué de toxicité cellulaire évidente. V10 v3 a provoqué une activation maximale de Nrf2 de $2,04 \pm 0,91$ fois par rapport au témoin à une concentration de 6,25 % dans le milieu, sans entraîner de toxicité cellulaire évidente.

Augmentation de l'expression régulée par Nrf2 du GSH

Pour étudier une éventuelle augmentation de la production de GSH par les molécules de signalisation redox, les niveaux extracellulaires de GSH et du thiol dérivé CysGly ont été déterminés dans les cellules AREc32 par HPLC avec détection de fluorescence. L'activation avec V10 v2 a entraîné une augmentation de 1,52 fois. Nous avons également observé une diminution significative de la production de cystéine et de CysGly par V10 v2. Ces résultats suggèrent que V10 v2 induit le métabolisme pour augmenter l'expression de GSH.

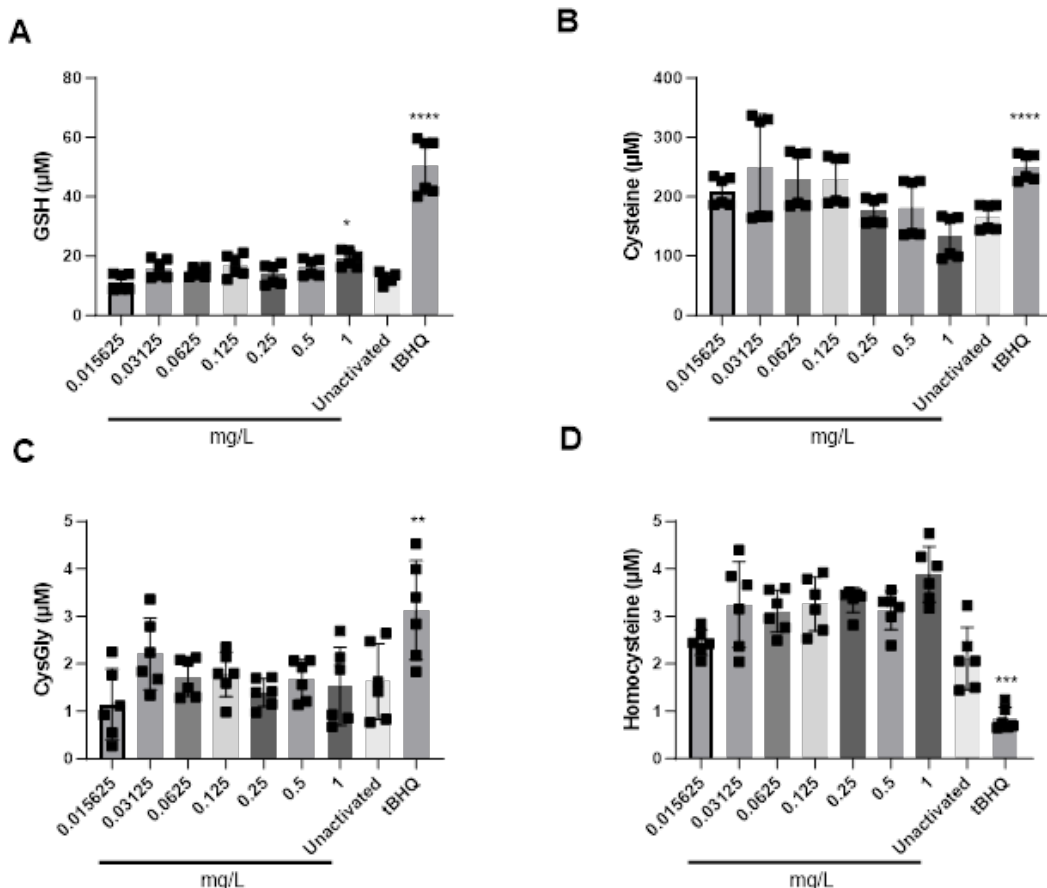


Figure 10:

Expressions de (A) GSH, (B) cystéine, (C) cysGly et (D) homocystéine induites par #10v2 sur les cellules AREc32. Non activées représentent les cellules avec uniquement du milieu. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ par rapport aux cellules non activées par l'ANOVA à une voie.

Expressions accrues de GCLC et HO-1 régulées par Nrf2

Pour compléter la mesure de l'activité luciférase de Nrf2, l'effet de V10 v2 sur l'expression des protéines cibles régulées par Nrf2, GCLC et HO-1, a été étudié par immunobuvardage. Une lignée cellulaire hépatique humaine, les cellules HepG2, a été utilisée pour ces expériences. HepG2 est une lignée cellulaire d'hépatome humain couramment utilisée dans les études de métabolisme des médicaments et de toxicité hépatique.

Le contrôle positif tBHQ (50 µM) a régulé de manière significative à la hausse l'expression de GCLC et de HO-1 (Figure 11 et 12). L'analyse par Western blot de l'expression des protéines antioxydantes GCLC a montré que #10 v2 présentait des expressions plus élevées de cette protéine par rapport au témoin (contrôle négatif, $p < 0.01$). De plus, V10 v2 (0.25 mg/L) a induit une augmentation significative de HO-1, suggérant des activités antioxydantes marquées.

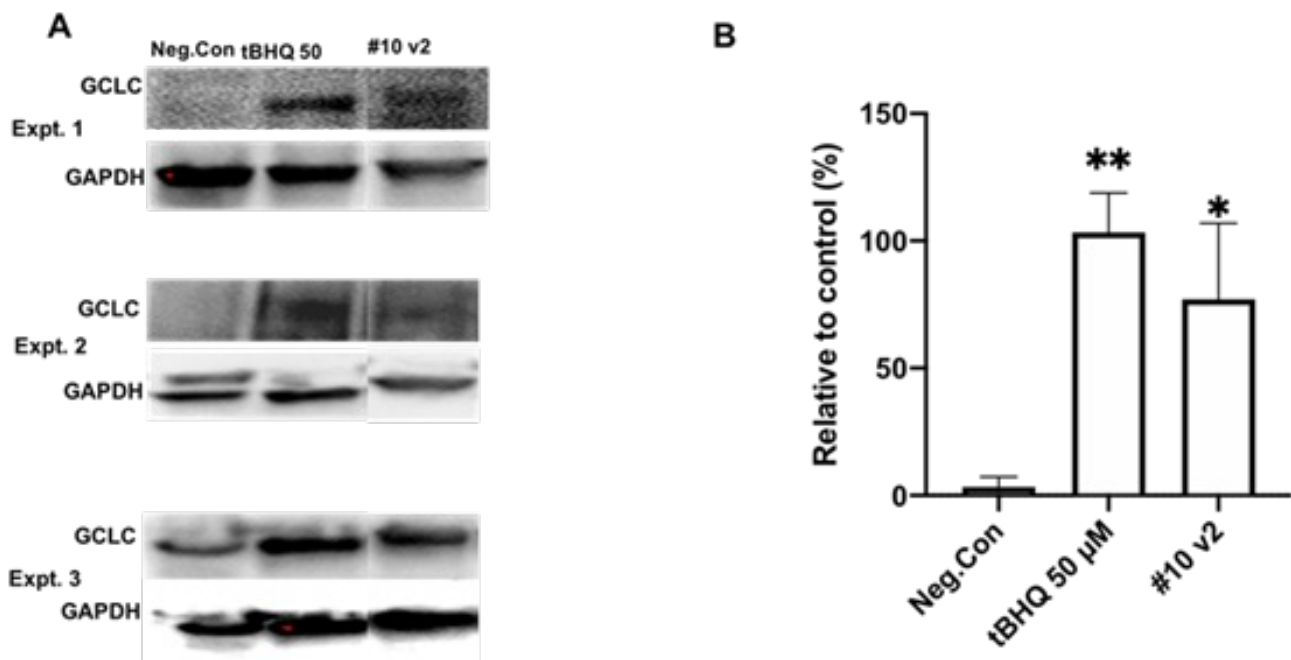


Figure 11:

Expression de la protéine GCLC par analyse Western blot. Les cellules HEGP2 ont été cultivées dans des flacons de culture de cellules T75 et ont été soumises au traitement pendant 24 heures. (A) Niveaux d'expression des protéines de GCLC avec n=3 expériences. (B) Les données ont été analysées avec ImageJ et introduites dans Graphpad Prism 9. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ par rapport au témoin négatif (cellules avec seulement du milieu de culture).

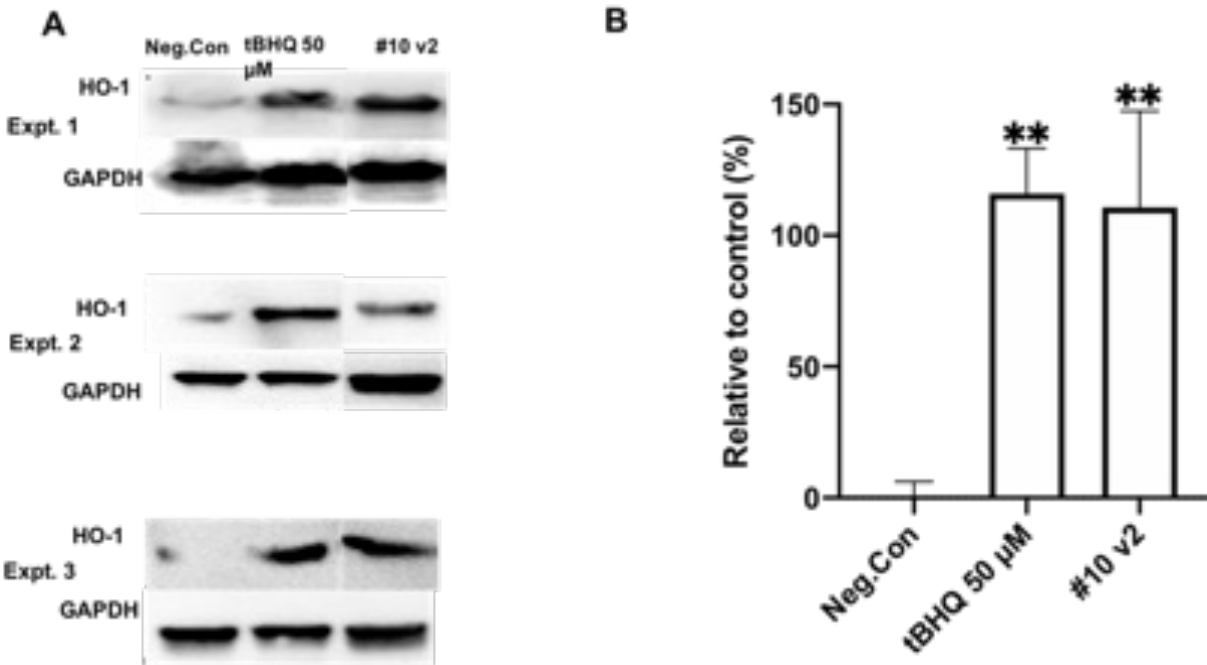


Figure 12:

Expression de la protéine HO-1 par analyse Western blot. Les cellules HEGP2 ont été cultivées dans des flacons de culture de cellules T75 et ont été soumises au traitement pendant 24 heures. (A) Niveaux d'expression des protéines de HO-1 avec n=3 expériences. (B) Les données ont été analysées avec ImageJ et introduites dans Graphpad Prism 9. *p<0.05, ** p<0.01 par rapport au témoin négatif (cellules avec seulement du milieu de culture).

En résumé, les cellules exposées à ARS ont montré une surexpression de GCLC et de HO-1 par rapport au témoin, ce qui signifie qu'elles augmentent la vitesse à laquelle ces protéines sont produites. L'augmentation de l'expression de GCLC fait partie de la réponse adaptative de la cellule pour contrer le stress oxydatif et maintenir l'équilibre redox. GCLC catalyse la formation d'un dipeptide, la gamma-glutamylcystéine, qui est un précurseur de la synthèse ultérieure de GSH. Comme le GSH joue un rôle vital dans la neutralisation des ROS, la détoxification des substances nocives et la protection des cellules

contre les dommages causés par le stress oxydatif, la surexpression de GCLC pourrait servir de mécanisme protecteur pour renforcer la capacité antioxydante cellulaire et promouvoir la survie cellulaire dans des conditions de stress oxydatif accru.

La surexpression de HO-1 peut être considérée comme une réponse protectrice et adaptative à divers stress cellulaires, notamment le stress oxydatif, et fait partie des mécanismes de défense cellulaires contre le stress qui peuvent contribuer à maintenir l'homéostasie cellulaire et à favoriser la survie cellulaire dans des conditions difficiles.

Fonction des molécules de signalisation redox dans les cellules FEK4

(fibroblastes primaires de prépuce humain)

1- Methode

Culture cellulaire et test MTT

Les cellules FEK4 ont été cultivées pendant 48 heures dans un milieu à 15 % de sérum pendant la nuit. Elles ont été lavées avec du PBS, fixées avec du paraformaldéhyde à 4 % pendant 10 minutes, perméabilisées avec du triton à 0,1 % pendant 15 minutes, bloquées avec de l'albumine sérique bovine (BSA) à 2 % pendant 45 minutes, puis cultivées avec un anticorps polyclonal Nrf2 (1:100) dans du BSA à 0,1 % à 4 °C pendant la nuit. Ensuite, les cellules ont été colorées avec Alexa Fluor Plus 488 (1:2000) dans du BSA à 0,1 % pendant 45 minutes et une goutte de DAPI avant l'imagerie.

Les cellules de fibroblastes primaires de la peau humaine FEK4 ont étéensemencées le jour 0. Après 48 heures de culture, le milieu a été changé et les molécules de signalisation redox ont été ajoutées à la culture avec un rapport de dilution de 1:1 dans le milieu. Après 24 heures de culture en présence de RSM, les cellules ont été fixées et soumises à une immunocytochimie avec un anticorps Nrf2 et le marqueur nucléaire DAPI.

Viabilité cellulaire

Le test au bromure de tétrazolium (MTT) est une méthode couramment utilisée pour évaluer la viabilité et la prolifération cellulaires in vitro. En bref, les cellules sont cultivées dans un milieu (en présence ou non de RSM) dans des conditions standard (37°C, 5 % CO₂) jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence désirée. Le milieu de culture est retiré, les cellules sont lavées avec du PBS. La solution de MTT est ajoutée à chaque puits et incubée pendant 2-4 heures à 37 °C. Le MTT est réduit pour former du formazan par les cellules métaboliquement actives. Le MTT est soigneusement aspiré, remplacé par du DMSO pour dissoudre les cristaux de formazan, et pipeté de haut en bas pour mélanger. Après le mélange, l'absorbance de chaque puits est mesurée à une longueur d'onde d'environ 570 nm avec un lecteur de microplaques. L'absorbance est corrélée au nombre de cellules viables. Les données collectées ont été analysées pour déterminer et calculer les pourcentages de viabilité.

Dosage du glutathion

Les cellules sont cultivées dans un milieu normal jusqu'à ce que la confluence soit atteinte. Le milieu est retiré et remplacé par un nouveau milieu contenant RSM dans un rapport de 1:1 contenant 50 µM de sulfoxyde de buthionine (BSO). Les témoins sont cultivés sans BSO, qui est un inhibiteur bien connu de la gamma-glutamylcystéine synthase, qui est la première étape de la synthèse du GSH. Après 24 heures de culture, le dosage du glutathion est effectué à l'aide de Bio-Rad (dosage de Bradford). Le dosage des protéines de Bradford est une procédure colorimétrique simple et précise pour déterminer la concentration de protéines (glutathion dans ce cas) en solution. Lorsque le colorant se lie à la protéine, il est converti en une forme bleue non protonée stable (A_{max} = 595 nm). C'est cette forme bleue protéine-colorant qui est détectée à 595 nm dans le dosage à l'aide d'un spectrophotomètre ou d'un lecteur de microplaques.

Activation de Nrf2 / Translocation nucléaire

Les cellules de fibroblastes primaires de la peau humaine FEK4 sontensemencées et cultivées dans un milieu dans des conditions standard (37°C, 5 % CO₂). Une fois que les cellules ont atteint la confluence désirée, RSM est ajouté à la culture à un taux de dilution de 1:1 dans le milieu. Les cellules sont cultivées en présence de RSM pendant 24 heures. Après cette période, le milieu est retiré, les cellules sont lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et fixées au formol. Les cellules fixées sont perméabilisées avec du Triton X-100 et les sites de liaison non spécifiques sont bloqués par la BSA. Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire (anti-Nrf2), puis lavées avec du PBS, et incubées à nouveau avec l'anticorps secondaire. Les cellules sont également colorées au DAPI, pour la localisation nucléaire. Les cellules cultivées sont montées sur des lames de microscope à l'aide d'un milieu de montage et les cellules colorées sont visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence.

2- Résultats et conclusions

Viabilité cellulaire

Les données obtenues avec les essais MTT ont montré que les traitements nocturnes des cellules avec des molécules de signalisation redox au rapport de dilution utilisé n'ont pas diminué la viabilité cellulaire des cellules traitées, par rapport au témoin non traité (Figure 13).

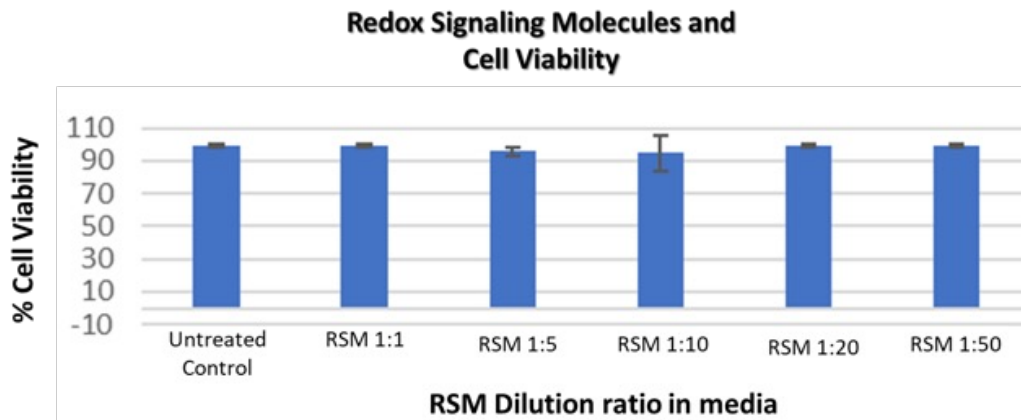


Figure 13: Données exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire des cellules traitées avec différentes concentrations de molécules de signalisation redox par rapport au témoin non traité (Ctrl) fixé à 100%. Les données sont présentées en moyenne sur au moins 3 expériences indépendantes (n=3) +/- écart-type, représenté par des barres d'erreur.

Dosage du glutathion

Les cellules exposées aux molécules de signalisation redox pendant la nuit ont montré une augmentation de 40 % du niveau intracellulaire de GSH (augmentation de 2,3 fois par rapport au témoin non traité) par rapport au témoin.

Traitement des cellules avec le BSO seul a réduit le niveau intracellulaire de GSH à 0,5 fois celui des fibroblastes témoins non traités. Cependant, dans les cellules traitées au BSO,

les molécules de signalisation redox ont montré la capacité de restaurer le niveau intracellulaire de GSH jusqu'à 0,8 fois celui des fibroblastes témoins non traités. Le BSO est un inhibiteur connu de la gamma-glutamylcystéine synthase, qui est la première étape de la synthèse du GSH. L'ajout de molécules de signalisation redox a montré qu'il restaurait la production de GSH dans les cellules cultivées (Figure 14).

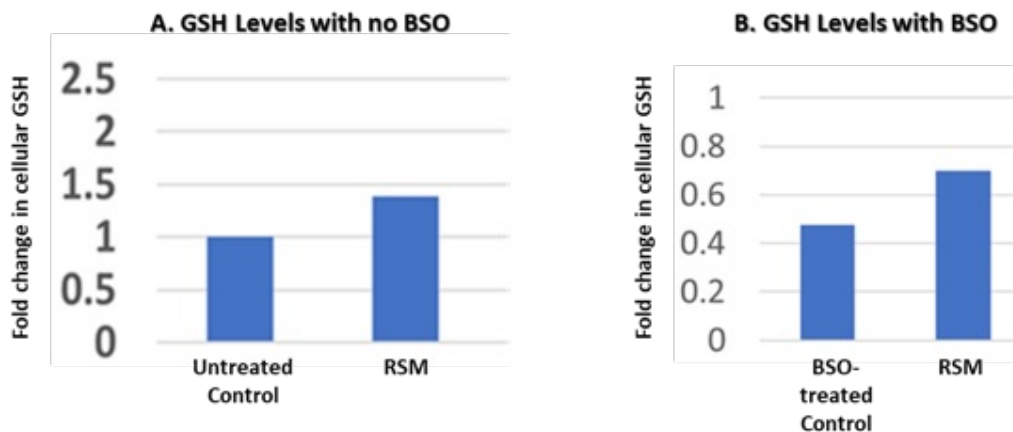


Figure 14: A. Niveaux de glutathion (GSH) sur des cellules exposées à des molécules de signalisation redox (Formulation 1) par rapport à des cellules non traitées (témoin). B. Les cellules traitées avec la buthionine sulfoximine (BSO) et les molécules de signalisation redox ont montré une expression accrue de GSH par rapport aux cellules traitées avec la BSO seule. Les données ont été calibrées en nanomoles de GSH par mg de protéine, puis représentées comme un changement relatif de GSH par rapport au témoin non traité (Ctrl), qui a été arbitrairement défini comme 1. Les données sont présentées comme une moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes (n=3) +/- les écarts-types indiqués par les barres d'erreur.

Translocation de Nrf2 vers le noyau

La Figure 15 montre que les molécules de signalisation redox ont été capables de favoriser la translocation de Nrf2 vers le noyau (colonne 3, coloration aqua du noyau)

lorsque les cellules ont été exposées au traitement pendant la nuit. Ces résultats sont cohérents avec les capacités supérieures des molécules de signalisation redox à augmenter les niveaux intracellulaires de GSH..

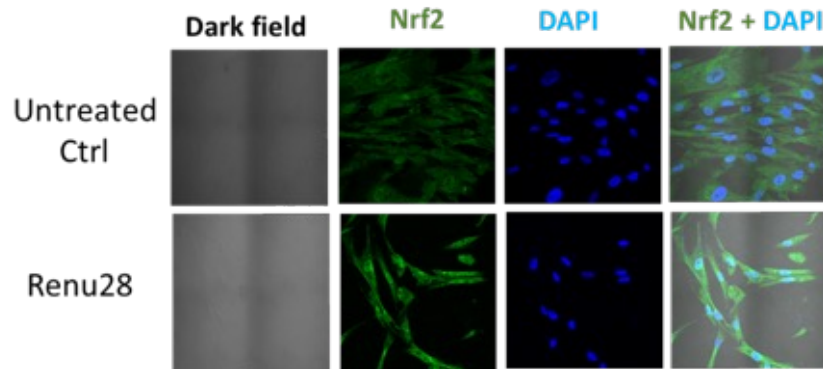


Figure 15: Analyse d'immunofluorescence des cellules fibroblastiques primaires humaines de la peau FEK4 traitées par des molécules de signalisation redox (RSM) ou non traitées (témoin, Ctrl). Translocation de Nrf2 vers le noyau. Colonne 1, immunocytochimie pour localiser les protéines NRF2. Colonne 2, coloration nucléaire avec le DAPI. Colonne 3, image fusionnée des protéines NRF2 et du DAPI. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Intensité moyenne de fluorescence (MFI). Quantification de la translocation de Nrf2 vers le noyau avec le logiciel Image J.

RSM et Nrf2 - remarques finales

L'enquête sur le rôle des molécules de signalisation redox (RSM) dans les cellules AREc32 et HepG2, ainsi que dans les cellules FEK4, a fourni des résultats éclairants sur leur impact sur les voies de protection des cellules contre le stress oxydatif. Les expériences ont permis de comprendre les réponses cellulaires de Nrf2 aux RSM et ont également démontré la capacité des RSM à réguler la production de glutathion dans les cellules.

Les résultats ont indiqué que les RSM contenus dans V10 induisent une activation légère mais perceptible de la voie de Nrf2 dans les cellules AREc32 et HepG2, contribuant à la défense cellulaire contre le stress oxydatif. L'activation cohérente de Nrf2 sur différents lots d'échantillons, vérifiée par des laboratoires indépendants, renforce la fiabilité de nos résultats. De plus, l'étude du potentiel antioxydant régulé par Nrf2 a révélé une augmentation des expressions de GCLC et de HO-1, suggérant une réponse adaptative cellulaire pour renforcer la capacité antioxydante (43).

De plus, nos explorations se sont étendues aux cellules FEK4, où les molécules de signalisation redox n'ont montré aucune toxicité cellulaire ni altération de la viabilité cellulaire.

Les résultats ont montré que les RSM étaient capables d'augmenter et/ou de restaurer les niveaux intracellulaires de glutathion, après un traitement au BSO, tout en favorisant la translocation de Nrf2 vers le noyau. Ces observations suggèrent le potentiel des RSM pour soutenir la santé cellulaire et les mécanismes de défense antioxydante.

Les résultats positifs obtenus à partir de différentes lignées cellulaires et de différents essais ont offert une perspective globale sur l'impact multifacette des molécules de signalisation redox sur les fonctions cellulaires. Ces découvertes contribuent à l'essor des connaissances dans le domaine de la signalisation redox et pourraient ouvrir la voie à d'autres études visant à dévoiler les voies sous-jacentes impliquées dans la réponse des RSM au stress cellulaire.

Ces études ont démontré des résultats cohérents et prometteurs liant le rôle des RSM à la résilience cellulaire et à la défense antioxydante. En fait, cette recherche pourrait ouvrir la voie à des investigations futures, potentiellement conduisant au développement d'approches innovantes pour l'amélioration de la santé cellulaire et la gestion du stress oxydatif.

Bibliography

- Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature*. 1993 Apr 22;362(6422):722-8. Doi: 10.1038/362722a0. PMID: 8469283.
- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 11;91(21):9926-30. doi: 10.1073/pnas.91.21.9926. PMID: 7937919; PMCID: PMC44930.
- Zgorzynska E, Dziedzic B, Walczewska A. An Overview of the Nrf2/ARE Pathway and Its Role in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 4;22(17):9592. doi: 10.3390/ijms22179592. PMID: 34502501; PMCID: PMC8431732.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010 Jul;4(8):118-26. doi: 10.4103/0973-7847.70902. PMID: 22228951; PMCID: PMC3249911.
- <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/nrf2>
- He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 6;21(13):4777. doi: 10.3390/ijms21134777. PMID: 32640524; PMCID: PMC7369905.
- Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN. The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem*. 2015 Dec;26(12):1401-13. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.001. Epub 2015 Aug 8. PMID: 26419687; PMCID: PMC4785809.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9817#:~:text=Keap1>
- Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol*. 2020 Jun 15;40(13):e00099-20. doi: 10.1128/MCB.00099-20. PMID: 32284348; PMCID: PMC7296212.
- Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1169-1203. doi: 10.1152/physrev.00023.2017. PMID: 29717933; PMCID: PMC9762786.
- Matsumaru D, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 System in Healthy Aging and Longevity. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Nov 30;10(12):1929. doi: 10.3390/antiox10121929. PMID: 34943032; PMCID: PMC8750203.
- Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res*. 2008 Nov-Dec;58(5-6):262-70. doi: 10.1016/j.phrs.2008.09.003. Epub 2008 Sep 13. PMID: 18838122; PMCID: PMC2652397.
- Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol*. 2012 Dec 26;2:200. doi: 10.3389/fonc.2012.00200. PMID: 23272301; PMCID: PMC3530133.
- Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN. The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem*. 2015 Dec;26(12):1401-13. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.001. Epub 2015 Aug 8. PMID: 26419687; PMCID: PMC4785809.
- Cheng D, Wu R, Guo Y, Kong AN. Regulation of Keap1-Nrf2 signaling: The role of epigenetics. *Curr Opin Toxicol*. 2016 Dec;1:134-138. doi: 10.1016/j.cotox.2016.10.008. Epub 2016 Nov 5. PMID: 29057383; PMCID: PMC5645054.
- Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2018 Dec 10;29(17):1727-1745. doi: 10.1089/ars.2017.7342. Epub 2017 Oct 20. PMID: 28899199; PMCID: PMC6208165.
- Sihvola V, Levonen AL. Keap1 as the redox sensor of the antioxidant response. *Arch Biochem Biophys*. 2017 Mar 1;617:94-100. doi: 10.1016/j.abb.2016.10.010. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27769838.
- Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Jul 14;2019:9372182. doi: 10.1155/2019/9372182. PMID: 31396308; PMCID: PMC6664516.
- Li R, Jia Z, Zhu H. Regulation of Nrf2 Signaling. *React Oxy Species (Apex)*. 2019 Nov;8(24):312-322. PMID: 31692987; PMCID: PMC6830569.
- Kopacz A, Kloska D, Forman HJ, Jozkowicz A, Grochot-Przeczek A. Beyond repression of Nrf2: An update on Keap1. *Free Radic Biol Med*. 2020 Sep;157:63-74. doi: 10.1016/j.

- freeradbiomed.2020.03.023. Epub 2020 Mar 28. PMID: 32234331; PMCID: PMC7732858.
21. Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol.* 2020 Jun 15;40(13):e00099-20. doi: 10.1128/MCB.00099-20. PMID: 32284348; PMCID: PMC7296212.
 22. Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7857186. doi: 10.1155/2016/7857186. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26881038; PMCID: PMC4736808.
 23. Alanazi AM, Mostafa GA, Al-Badr AA. Glutathione. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2015;40:43-158. doi: 10.1016/bs.podrm.2015.02.001. Epub 2015 Mar 31. PMID: 26051685.
 24. Shayne C. Gad. Glutathione. Editor(s): Philip Wexler. *Encyclopedia of Toxicology (Fourth Edition).* Academic Press. 2024. Pages 1001-1002. ISBN 9780323854344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00478-4>.
 25. Santacroce G, Gentile A, Soriano S, Novelli A, Lenti MV, Di Sabatino A. Glutathione: Pharmacological aspects and implications for clinical use in non-alcoholic fatty liver disease. *Front Med (Lausanne).* 2023 Mar 22;10:1124275. doi: 10.3389/fmed.2023.1124275. PMID: 37035339; PMCID: PMC10075255.
 26. Pizzorno J. Glutathione! *Integr Med (Encinitas).* 2014 Feb;13(1):8-12. PMID: 26770075; PMCID: PMC4684116.
 27. Lee DH, Jacobs DR Jr. Hormesis and public health: can glutathione depletion and mitochondrial dysfunction due to very low-dose chronic exposure to persistent organic pollutants be mitigated? *J Epidemiol Community Health.* 2015 Mar;69(3):294-300. doi: 10.1136/jech-2014-203861. Epub 2014 Sep 30. PMID: 25271248.
 28. Khan M, Samrana S, Zhang Y, Malik Z, Khan MD, Zhu S. Reduced Glutathione Protects Subcellular Compartments From Pb-Induced ROS Injury in Leaves and Roots of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Front Plant Sci.* 2020 Apr 15;11:412. doi: 10.3389/fpls.2020.00412. PMID: 32351527; PMCID: PMC7176022.
 29. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009 Feb 15;46(4):443-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040. Epub 2008 Nov 5. PMID: 19028565; PMCID: PMC2634824.
 30. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med.* 2009 Feb-Apr;30(1-2):86-98. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.009. Epub 2008 Sep 6. PMID: 18812186; PMCID: PMC2714364.
 31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2729>
 32. A.G. Osman, A.G. Chittiboyina, I.A. Khan. Chapter Three - Cytoprotective Role of Dietary Phytochemicals Against Cancer Development via Induction of Phase II and Antioxidant Enzymes. Editor(s): J.C. Fishbein, J.M. Heilman. *Advances in Molecular Toxicology.* Elsevier. Volume 10. 2016. Pages 99-137. ISSN 1872-0854. ISBN 9780128047002. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804700-2.00003-9>.
 33. Araujo JA, Zhang M, Yin F. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. *Front Pharmacol.* 2012 Jul 19;3:119. doi: 10.3389/fphar.2012.00119. PMID: 22833723; PMCID: PMC3400084.
 34. Campbell NK, Fitzgerald HK, Dunne A. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1. *Nat Rev Immunol.* 2021 Jul;21(7):411-425. doi: 10.1038/s41577-020-00491-x. Epub 2021 Jan 29. PMID: 33514947.
 35. Forman HJ, Ursini F, Maiorino M. An overview of mechanisms of redox signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Aug;73:2-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.018. Epub 2014 Feb 8. PMID: 24512843; PMCID: PMC4048798.
 36. Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Jun;10(6):1045-59. doi: 10.1089/ars.2007.1986. PMID: 18321201; PMCID: PMC2828811.
 37. Zhang J, Grek C, Ye ZW, Manevich Y, Tew KD, Townsend DM. Pleiotropic functions of glutathione S-transferase P. *Adv Cancer Res.* 2014;122:143-75. doi: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00004-9. PMID: 24974181; PMCID: PMC5079281.
 38. Sinenko SA, Starkova TY, Kuzmin AA, Tomilin AN. Physiological Signaling Functions of Reactive Oxygen Species in Stem Cells: From Flies to Man. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Aug 6;9:714370. doi: 10.3389/fcell.2021.714370. PMID: 34422833; PMCID: PMC8377544.

39. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014 May 19;24(10):R453-62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034. PMID: 24845678; PMCID: PMC4055301.
40. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 6;21(13):4777. doi: 10.3390/ijms21134777. PMID: 32640524; PMCID: PMC7369905.
41. K.M. Kim, S.H. Ki. Chapter 28 - Nrf2: A Key Regulator of Redox Signaling in Liver Diseases. Editor(s): Pablo Muriel. *Liver Pathophysiology*. Academic Press. 2017. Pages 355-374. ISBN 9780128042748. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00028-X>.
42. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:401-26. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320. PMID: 23294312; PMCID: PMC4680839.
43. Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, von Knethen A. Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 20;18(12):2772. doi: 10.3390/ijms18122772. PMID: 29261130; PMCID: PMC5751370.
44. Kreß JKC, Jessen C, Hufnagel A, Schmitz W, Xavier da Silva TN, Ferreira Dos Santos A, Mosteo L, Goding CR, Friedmann Angeli JP, Meierjohann S. The integrated stress response effector ATF4 is an obligatory metabolic activator of NRF2. *Cell Rep*. 2023 Jul 25;42(7):112724. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112724. Epub 2023 Jul 4. PMID: 37410595.
45. Zhang JC, Yao W, Dong C, Han M, Shirayama Y, Hashimoto K. Keap1-Nrf2 signaling pathway confers resilience versus susceptibility to inescapable electric stress. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2018 Dec;268(8):865-870. doi: 10.1007/s00406-017-0848-0. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29119264.
46. Kerins MJ, Ooi A. The Roles of NRF2 in Modulating Cellular Iron Homeostasis. *Antioxid Redox Signal*. 2018 Dec 10;29(17):1756-1773. doi: 10.1089/ars.2017.7176. Epub 2017 Sep 21. PMID: 28793787; PMCID: PMC6208163.
47. Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol*. 2013 Mar 15;85(6):705-17. doi: 10.1016/j.bcp.2012.11.016. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23219527.
48. Petsouki E, Cabrera SNS, Heiss EH. AMPK and NRF2: Interactive players in the same team for cellular homeostasis? *Free Radic Biol Med*. 2022 Sep;190:75-93. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.07.014. Epub 2022 Jul 31. PMID: 35918013.
49. Calabrese EJ, Kozumbo WJ. The hormetic dose-response mechanism: Nrf2 activation. *Pharmacol Res*. 2021 May;167:105526. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105526. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33667690.
50. Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C, Traverso N. Hormesis and Oxidative Distress: Pathophysiology of Reactive Oxygen Species and the Open Question of Antioxidant Modulation and Supplementation. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Aug 19;11(8):1613. doi: 10.3390/antiox11081613. PMID: 36009331; PMCID: PMC9405171.
51. Ngo V, Duennwald ML. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Nov 27;11(12):2345. doi: 10.3390/antiox11122345. PMID: 36552553; PMCID: PMC9774434.
52. Zhao F, Ci X, Man X, Li J, Wei Z, Zhang S. Food-Derived Pharmacological Modulators of the Nrf2/ARE Pathway: Their Role in the Treatment of Diseases. *Molecules*. 2021 Feb 15;26(4):1016. doi: 10.3390/molecules26041016. PMID: 33671866; PMCID: PMC7918973.