



# Effet in vitro des molécules de signalisation redox sur la régulation de la voie Nrf2

Résumé des études menées par :  
Université de Bath, Royaume-Uni  
Université de Western Sydney, Australie

## Principales conclusions

Des universités de renommée internationale ont étudié l'impact des molécules de signalisation redox sur différents types de cellules.

- Les recherches menées indépendamment par les deux universités ont montré que la voie Nrf2 était fortement influencée par les molécules de signalisation redox.
- Nrf2 est une voie génétique qui joue un rôle essentiel dans la régulation des gènes qui favorisent la réponse et la résilience à toute une série de facteurs de stress. Ces facteurs de stress peuvent être la fatigue, le stress émotionnel, l'inflammation, la pollution environnementale et même des facteurs liés au mode de vie tels qu'une mauvaise alimentation ou un comportement sédentaire.
- L'une des principales conclusions de cette recherche est que la supplémentation en molécules de signalisation redox augmente l'activité de Nrf2 jusqu'à 60 %. Ce résultat est important car la voie Nrf2 renforce le système de protection antioxydant à l'intérieur des cellules de notre corps. (Voir fig. 7B.)
- Une autre découverte importante est que la supplémentation en molécules de signalisation redox a augmenté la production par les cellules de protéines protectrices comme le glutathion, qui jouent un rôle important dans la promotion de l'équilibre général. La recherche a révélé que la supplémentation en molécules de signalisation redox augmentait la production de glutathion de 40 % dans les cellules saines et qu'elle rétablissait encore davantage la production de glutathion dans les cellules fragilisées, à hauteur de 55 % (voir les figures 12A et 12B). (Voir les figures 12A et 12B.)

## Nrf2 - un facteur de transcription

Le facteur nucléaire 2 (NF-E2) spécifique de l'érythroïde a été caractérisé, décrit et cloné pour la première fois chez le murin par Andrews et al. en 1993. Ce polypeptide était un nouveau membre spécifique des cellules hématopoïétiques de la famille des facteurs de transcription de la région de base et du glisseur de leucine (b-zip).

(1). NF-E2 est l'une des protéines qui se lient à la répétition tandem AP1 (protéine activatrice 1)-NF-E2, qui représente l'enhancer central au sein de HS2 (2).

En 1994, on a découvert que le Nrf2 (ou NF-E2-related factor 2) était un membre de la famille des facteurs de transcription humains CNC-bZIP pour la stimulation transcriptionnelle des gènes de la bêta-globine. Il a été décrit pour la première fois comme un activateur transcriptionnel de type Nf-E2 (basic leucine zipper) appartenant à la famille Cap'n'Collar (CNC) (p45-NFE2, Nrf1, Nrf2 et Nrf3) et exprimé de manière ubiquitaire dans différents tissus (2,

53). Il est intéressant d'observer que, contrairement à NF-E2, l'expression de Nrf2 n'est pas limitée aux tissus hématopoïétiques. À l'époque, on ne savait pas quel rôle Nrf2 jouait 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 NFE2L2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) situé dans la bande cytogénétique 2q31.2 du chromosome 2 chez l'homme (gene ID : 4780). Le NFE2L2 est constitué de cinq exons interrompus par quatre introns donnant lieu à 8 variantes de transcription codant pour 6 isoformes de Nrf2 (3).

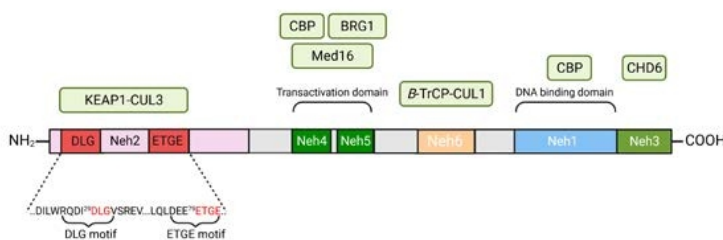
Des décennies plus tard, on en sait beaucoup plus sur cette protéine. Selon Cancer.gov/National Institute of Health, Nrf2 est une protéine qui contrôle l'expression de certains gènes. Ces gènes contribuent à protéger les cellules des dommages causés par les radicaux libres (les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote sont générées par notre organisme par divers systèmes endogènes, 4). Ces radicaux libres sont des composés importants car ils peuvent jouer un rôle important dans le développement de certaines pathologies. Ils sont également liés au processus de vieillissement (5). Les données actuelles montrent que Nrf2 se trouve au centre d'un réseau de régulation complexe et font de Nrf2 un véritable facteur de transcription pléiotropique (6).

Nrf2 est un régulateur principal de la réponse antioxydante et du métabolisme des xénobiotiques par la régulation d'un large éventail de gènes antioxydants et de gènes de détoxification de phase II. Par conséquent, Nrf2 protège les cellules de différents types de facteurs de stress, de substances endogènes, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'agressions environnementales. (7).

L'activité de Nrf2 est régulée par KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) - une sous-unité adaptatrice de l'E3 ubiquitine ligase basée sur la Culline 3.

qui agit comme un capteur de stress oxydatif et électrophile (8). KEAP1 agit comme un capteur clé du stress oxydatif et électrophile. Dans des conditions homéostatiques, KEAP1 fait partie d'une E3 ubiquitine ligase 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 de KEAP1, permet à Nrf2 d'échapper à l'ubiquitination, de s'accumuler dans la cellule et de se déplacer vers le noyau, où il peut promouvoir son programme de transcription antioxydant, en régulant l'expression des gènes cytoprotecteurs (9).

### Nrf2 domain



### KEAP1 domain

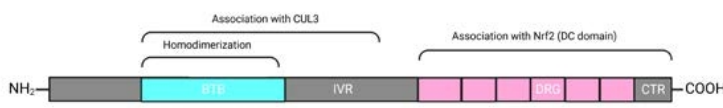


Figure 1 : Structures des domaines de Nrf2 (A) et KEAP1 (B). Les molécules interagissant avec Nrf2 sont représentées dans des boîtes vertes et placées au-dessus de leurs domaines d'interaction (adapté et modifié de la référence 10).

La conservation phylogénétique de la structure de Nrf2 entre les espèces a révélé la présence de six domaines fonctionnels : Neh1 (Nrf2-ECH homology domain-1) à Neh6. Neh1 contient les domaines CNC et bZIP qui assurent la liaison avec 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 apportent une contribution majeure à l'activation transcriptionnelle en recrutant l'histone acétyl-transférase, la protéine de liaison de l'élément sensible à l'AMPc et le complexe Mediator (9).

KEAP1 agit comme un capteur riche en cystéine thiol des agressions 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 de repos, tandis que Nrf2 est libéré de la répression médiée par KEAP1 lorsqu'il est exposé à des stress. 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 intensives sur le système KEAP1-Nrf2 ont démontré l'importance cruciale de l'activité Nrf2 et de ses mécanismes de régulation pour le maintien de notre santé. Il est important de souligner que le dérèglement de ce système est à l'origine de 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 Nrf2 en servant de composant de reconnaissance du substrat du complexe E3 ubiquitin ligase en coopération 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 E3 ubiquitine ligase du complexe KEAP1-CUL3 est perturbée par l'exposition à des électrophiles et à des ROS qui modifient les résidus cystéine de KEAP1, ce qui permet à Nrf2 nouvellement synthétisé de s'accumuler dans le noyau et d'activer la transcription. Ainsi, la possession de résidus cystéine hautement réactifs fait de KEAP1 un biocapteur efficace et sensible aux perturbations redox en activant ou désactivant l'activité ubiquitine E3 ligase du complexe KEAP1-CUL3 (10).

Lorsque les cellules sont exposées à un stress oxydatif ou à des composés chimiques préventifs, Nrf2 se déplace vers le noyau, forme un hétérodimère avec son partenaire obligatoire Maf et se lie à la séquence ARE pour activer la transcription de plusieurs types de gènes différents. La majorité des gènes en aval de Nrf2 contiennent une séquence ARE dans le promoteur (12).

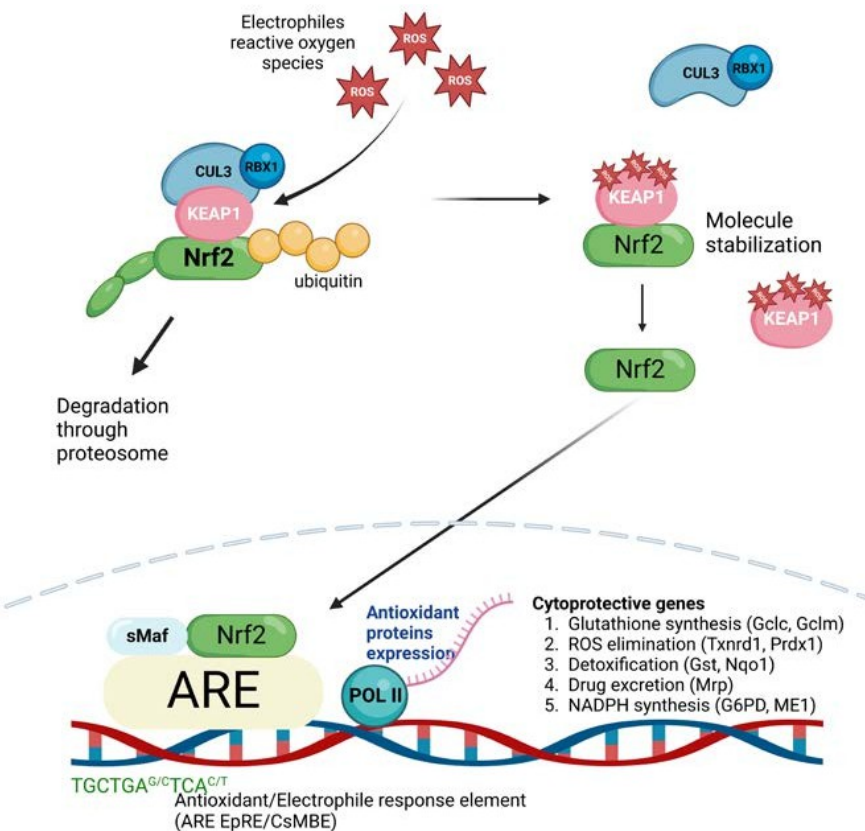


Figure 2 : KEAP1-NRF2 est un système à deux composants. Dans le cytoplasme, NRF2 est ubiquitiné par l'ubiquitine KEAP1-CUL3. E3 ligase pour le marquer en vue de sa dégradation par le protéasome. Lorsque les cellules sont exposées à des électrophiles ou à des espèces réactives de l'oxygène, KEAP1 est modifié et l'activité de l'ubiquitine E3 ligase KEAP1-CUL3 diminue, ce qui entraîne la stabilisation de NRF2. Stabilisé et accumulé NRF2 se transloque dans le noyau et active une batterie de gènes cytoprotecteurs (adapté et modifié de la référence 10).

is n'ont pas été évaluées par la Food and Drug Administration. Ce s destiné à diagnostiquer, traiter, guérir ou prévenir une adie.

L'une des caractéristiques les plus importantes de la transcription médiée par Nrf2 est son inductibilité en réponse aux stress xénobiotiques et oxydatifs. Dans des conditions normales, l'activité de la transcription médiée par Nrf2 est faible, car la majeure partie de la protéine Nrf2 est dégradée dans le protéasome (Itoh et al., 2003). Lorsque les cellules sont exposées à des électrophiles ou à des ROS, Nrf2 est stabilisé et s'accumule dans le noyau, ce qui entraîne une forte activation des gènes cibles de Nrf2. Ainsi, le mécanisme qui sous-tend la dégradation de Nrf2 dans des conditions normales et la stabilisation de Nrf2 à la suite d'une exposition à un stress sont des indices cruciaux pour la révélation de la base moléculaire de notre système de défense (13).

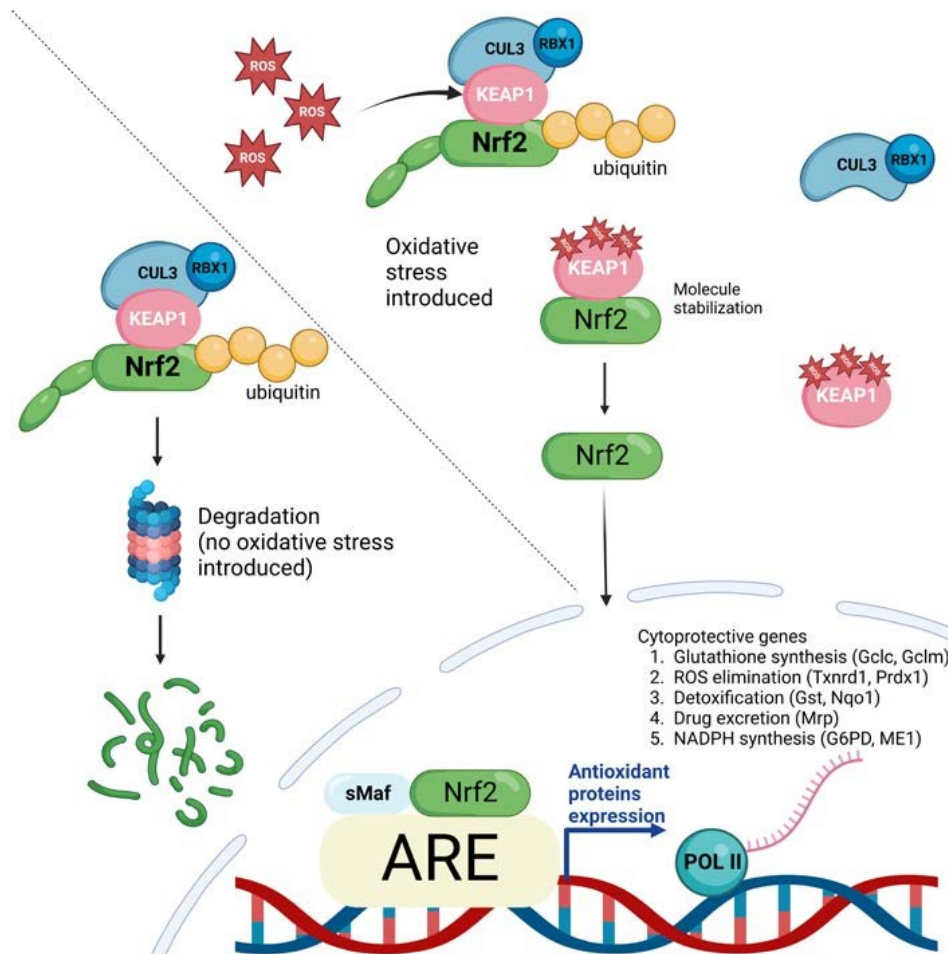


Figure 3 : Le système KEAP1-NRF2. Dans des conditions normales, Nrf2 est constamment ubiquitiné par KEAP1 et dégradé dans le protéasome. Après exposition à des électrophiles ou un stress oxydatif, KEAP1 est inactivé. Le Nrf2 stabilisé s'accumule dans le noyau et active de nombreux gènes cytoprotecteurs (adapté et modifié d'après la référence 13).

En fin de compte, le système KEAP1-Nrf2 est un appareil efficace pour maintenir l'homéostasie redox. Il s'agit d'une combinaison parfaite où KEAP1 agit comme un capteur d'insultes redox et Nrf2 comme un facteur de transcription qui transduit de manière robuste les signaux chimiques pour réguler une batterie de gènes cytoprotecteurs. La relation entre les deux reprend de telle manière que KEAP1 réprime l'activité de Nrf2 dans des conditions de repos, tandis que Nrf2 est libéré de la répression médiée par KEAP1 lors de l'exposition à des stress (10).

## Voie Nrf2-KEAP1 et régulation

La voie Nrf2-KEAP1 est fondamentale pour détecter et répondre au stress oxydatif et électrophile. Dans la voie de signalisation classique Nrf2-KEAP1, KEAP1 est un répresseur clé de Nrf2 et joue un rôle essentiel dans la régulation de la voie de signalisation Nrf2. KEAP1 sert de pont entre Nrf2 et la ligase d'ubiquitination Cullin-3. Les facteurs 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 pour les inducteurs chimiques (14).



Nrf2 est un facteur de transcription qui affecte l'expression de nombreux gènes différents impliqués dans le stress oxydant et le métabolisme des médicaments. La régulation de l'expression du Nrf2 est donc une cible importante pour le traitement ou la prévention des maladies et il a été rapporté que cette régulation était influencée par l'épigénétique (15).

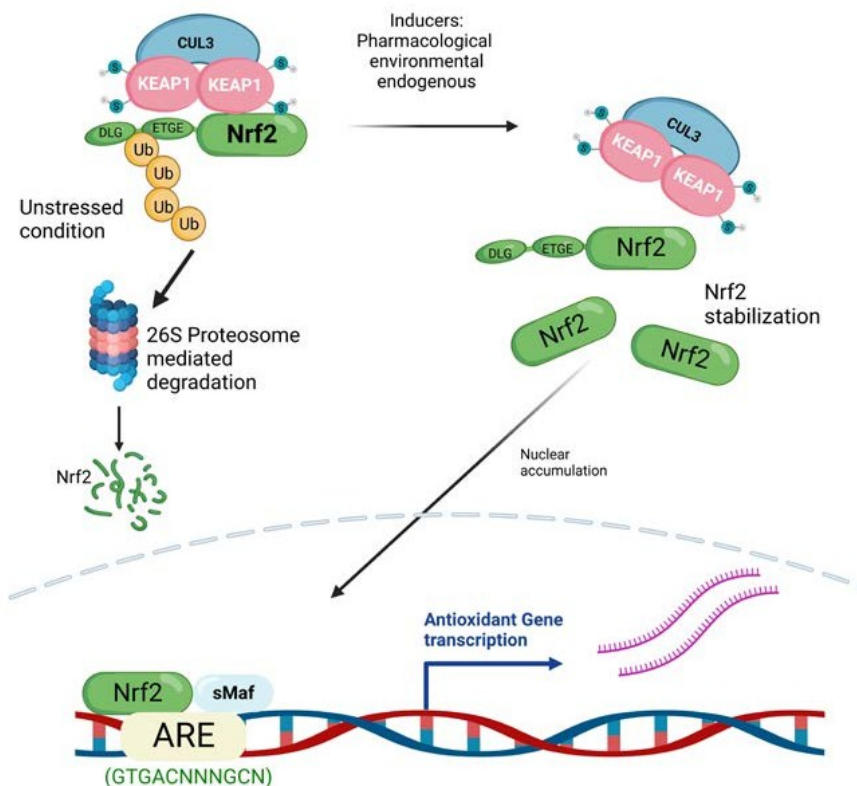


Figure 4 : Schéma de la voie de signalisation Nrf2 (adapté et modifié à partir de la référence 16).

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 se renouvelle rapidement grâce au système de protéasome ubiquitine. La stabilité de Nrf2 est contrôlée par KEAP-1, connu comme un 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 soi-disant activateurs de Nrf2 devraient être appelés 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 E3-ubiquitine ligase basé sur Cul3/Rbx1 avec Nrf2, ce qui conduit à l'ubiquitination continue de Nrf2 et à sa dégradation protéasomale ultérieure. Cela maintiendrait de faibles niveaux basaux d'antioxydants régulés par Nrf2. En cas de stress cellulaire ou d'exposition à un stress oxydatif léger, Nrf2 se dissocie de KEAP1, se stabilise, se déplace dans les noyaux où il interagit avec d'autres facteurs protéiques et se lie à ARE, ce qui entraîne une augmentation de la transcription des gènes antioxydants (10). Chez les mammifères, y compris chez l'homme, l'axe KEAP1-Cul3-Rbx1 est connu comme étant le mécanisme de régulation le plus critique de l'activité de Nrf2 (19).

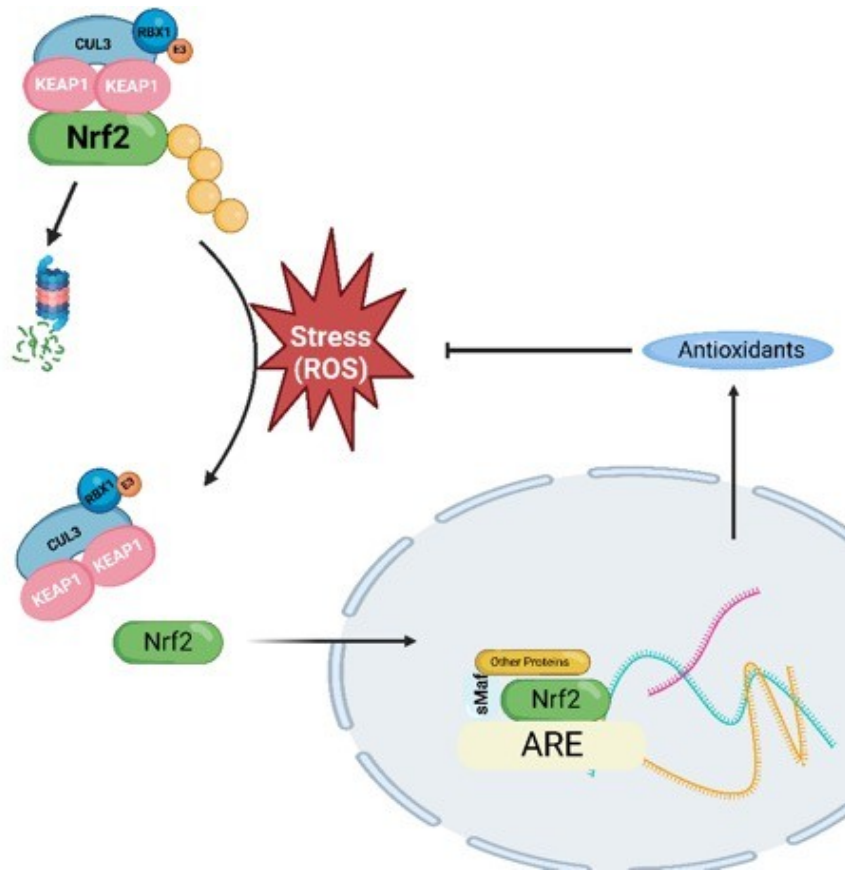


Figure 5 : KEAP1 en tant que principal régulateur de l'activation de Nrf2 et de l'expression des gènes antioxydants induite par ARE (adapté et modifié d'après la référence [19](#)).

Les mécanismes prédominants par lesquels les conditions de stress (par exemple, le stress oxydatif et électrophile) et les inducteurs chimiques provoquent la dissociation de Nrf2 de KEAP1 sont l'oxydation des résidus de cystéine de KEAP1. Les groupes sulfhydryles de la cystéine peuvent être oxydés pour former un pont disulfure, un acide sulfénique ou un acide sulfonique. Ces modifications redox entraînent la séparation de KEAP1 et de Nrf2, ce qui conduit à la stabilisation et à la translocation nucléaire de Nrf2 ([19](#)).

La dérégulation de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 a été décrite dans la pathogenèse de nombreuses maladies, et l'axe Nrf2/ KEAP1 est apparu comme un modulateur crucial de l'homéostasie cellulaire. Alors que l'importance de Nrf2 dans la modulation de ces processus biologiques a été bien établie et largement discutée en détail, l'attention portée à KEAP1 va rarement au-delà de la régulation de l'activité de Nrf2 et de la détection de l'oxydoréduction ([20](#)).

Il est important de considérer que l'alimentation humaine fournit un grand nombre de composés actifs qui peuvent affecter et activer la voie de signalisation Nrf2 ([52](#)). Parmi eux, certains sont même considérés comme de puissants activateurs de Nrf2. Ces composés naturels peuvent stimuler diverses kinases en amont, interférer avec l'interaction KEAP1-Nrf2 et/ou perturber l'équilibre redox cellulaire, ce qui entraîne l'activation de la voie Nrf2 ([14](#)).

Des composés comme la curcumine, présente dans le curcuma, et le sulforaphane, présent dans les légumes crucifères comme le brocoli, activent directement la voie Nrf2-KEAP1 ([22](#)).

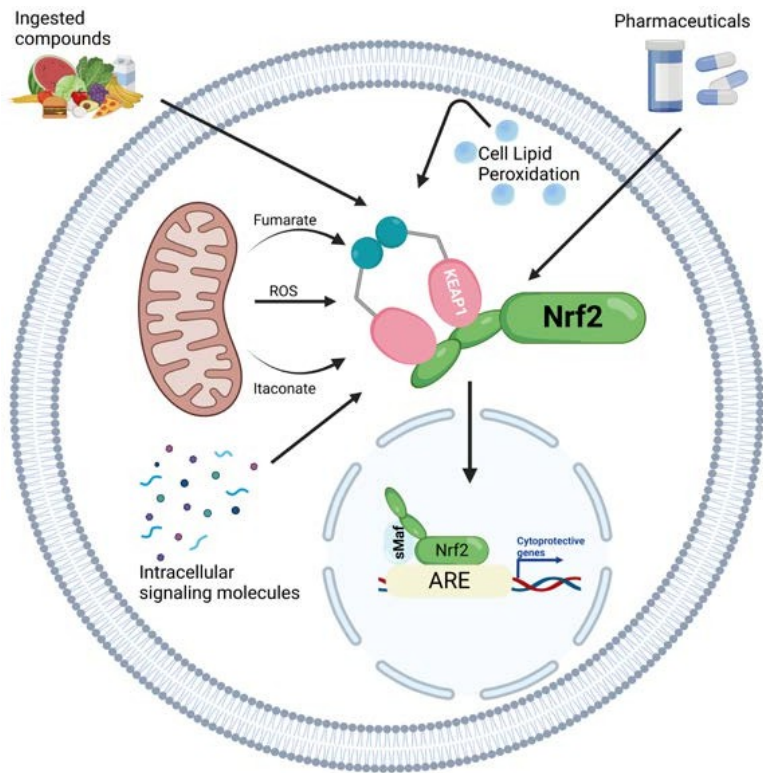


Figure 6 : La voie KEAP1-NRF2 intègre la détection d'un large éventail de stress cellulaires à la régulation de l'expression des gènes cytoprotecteurs. Les molécules de stress endogènes et exogènes sont capables de se lier directement aux résidus de cystéine réactifs de KEAP1, ce qui entraîne la stabilisation de NRF2 et l'augmentation de l'expression des gènes cytoprotecteurs. son programme de transcription cytoprotecteur (adapté et modifié à partir de la référence [21](#)).

## Nrf2 et protéines de détoxication

### 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 du blanc d'œuf frais. de Rey-Paihade a nommé cette substance philothion, qui signifie 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 sur l'azote aminé 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 du glutathion contribue à la détoxication en liant les électrophiles qui pourraient autrement se lier aux protéines ou aux acides nucléiques, entraînant des dommages cellulaires et des mutations génétiques ([24](#)). Le glutathion est présent dans de nombreux tissus à des concentrations relativement élevées, à savoir 1 à 10 mM dans les cellules, tout comme le glucose, le potassium et le cholestérol, et joue un rôle essentiel dans plusieurs processus physiologiques, tels que la préservation de l'équilibre redox, la réduction du stress oxydatif par la détoxication des composés xénobiotiques et endogènes, et la modulation du système immunitaire. L'action du glutathion sur le stress oxydatif a conduit à des spéculations sur le rôle thérapeutique possible de cette molécule pour plusieurs maladies chroniques dont l'équilibre redox est 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 détoxication métabolique des xénobiotiques et des composés exogènes, la régulation du cycle cellulaire et la modulation du système immunitaire, ainsi que la fibrogenèse ([26](#)). Son rôle principal est de protéger les macromolécules cellulaires des espèces réactives de l'oxygène (ROS) endogènes et exogènes et des espèces azotées. En particulier, le GSH détoxifie par catalyse les hydroperoxydes, les peroxydites et les peroxydes lipidiques et élimine directement diverses molécules oxydantes, telles que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, l'oxyde nitrique et les radicaux de carbone ([26](#) ; [27](#)). Fondamentalement, le GSH neutralise les ROS en donnant du H<sup>+</sup> et maintient la cystéine des protéines sous une forme réduite active en offrant de l'e<sup>-</sup>. La capacité du GSH

en tant qu'agent réducteur dépend du rapport GSH/GSSG et de la concentration totale de glutathion, qui sont affectés par les conditions de stress (28). Le GSH maintient l'état redox cellulaire et affecte la signalisation redox, la prolifération cellulaire, la mort et l'homéostasie du GSH est régulée par la synthèse de novo ainsi que par l'état redox du GSH. Ainsi, Nrf2 est essentiel au maintien de l'état redox du GSH via la régulation transcriptionnelle du GSR et à la protection des cellules contre le stress oxydatif (29).



La glutamate cystéine ligase (GCL) est une enzyme qui joue un rôle essentiel 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 des sous-unités catalytique (GCLC) et modificatrice (GCLM) (30). Ainsi, la glutamate-cystéine ligase, également connue sous le nom de gamma-glutamylcystine synthétase, est la première enzyme limitant la vitesse de synthèse du glutathion (31).

## Hème oxygénase 1

L'hème oxygénase-1 (HO-1) est une enzyme cytoprotectrice qui répond aux stimuli oxydatifs et/ou inflammatoires et qui a la capacité de réduire le stress oxydatif. L'une des principales fonctions de l'HO-1 est de métaboliser l'hème qui s'accumule dans les tissus à la suite du renouvellement des globules rouges (32). HO-1 est un gène régulé par Nrf2, car il fait partie des gènes cibles de Nrf2 qui sont exprimés de manière significative dans différents types de cellules

(33). Dans des conditions homéostatiques, l'expression de HO-1 est faible ou absente dans la plupart des cellules et des tissus.

Cependant, HO-1 est fortement régulée par la plupart des cellules en réponse à un grand nombre de stimuli pro-oxydants et fournit une protection contre les dommages oxydatifs.

L'expression de l'HO-1 est largement sous le contrôle du Nrf2, sensible à l'oxydoréduction, qui se lie à l'élément de réponse antioxydant (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 signalisation redox, nécessite une réaction entre un électrophile (une molécule qui attire les électrons) et un nucléophile (une molécule qui cède des électrons). La signalisation redox implique des réactions dans lesquelles un électrophile enlève des électrons, laissant le nucléophile dans un état plus oxydé (réaction d'oxydation). Dans cette situation, l'électrophile est appelé oxydant.

(35). D'autre part, le stress réducteur se caractérise par un excès de donneurs d'électrons cellulaires. Lorsque les conditions aboutissent à des ratios où les antioxydants dépassent les pro-oxydants, un stress réducteur se produit avec une accumulation excessive consécutive d'équivalents réducteurs comme le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) réduit, par exemple, dépassant les activités compensatoires des oxydoréductases régulatrices (54). 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 des cellules endothéliales stimulée par le flux, et joue également un rôle important dans les réponses physiopathologiques telles que celles qui se produisent dans les lésions d'ischémie/reperfusion. Contrairement à la signalisation par des seconds messagers comme l'AMPC, la signalisation par des espèces réactives implique une modification chimique d'un résidu cystéine de la protéine de signalisation cible plutôt qu'une liaison non covalente à une protéine (35). Les événements liés à la signalisation redox sont déclenchés à des niveaux physiologiques de stress oxydatif et nitrosatif, et les flux temporels dans l'homéostasie sont rétablis par le biais de déglutathionylation des capteurs d'oxydoréduction et 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 les NADPH oxydases induites par la signalisation cellulaire dans le cytosol (38). Ils comprennent des molécules telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles, qui ont tous des propriétés chimiques inhérentes qui leur confèrent une réactivité vis-à-vis de différentes cibles biologiques. Les ROS sont souvent associés au stress oxydatif, ce qui suggère qu'ils provoquent des dommages dans les lipides, les protéines et l'ADN. Toutefois, au cours des deux dernières décennies, il est devenu évident que les ROS servent également de molécules de signalisation pour réguler les processus biologiques et physiologiques. Il semble qu'au début de l'évolution, la nature ait sélectionné les ROS comme mécanisme de transduction des signaux pour permettre l'adaptation aux changements de nutriments environnementaux et à l'environnement oxydatif. En effet, chez les procaryotes, il existe des

mécanismes bien décrits par lesquels les ROS activent directement les facteurs de transcription pour l'adaptation au stress (39).

## Études sur les molécules de signalisation redox

Un essai humain de 8 semaines, en double aveugle et contrôlé par placebo, a démontré que la consommation de molécules de signalisation redox (RSM) jouait un rôle dans la modulation de l'expression des gènes en la liant à des fonctions clés et à des voies importantes dans les cellules. Certains de ces gènes se sont révélés être régulés à la hausse et liés à la transcription de gènes cruciaux. Après une analyse du profil transcriptionnel, il a été observé que cinq gènes présentaient un changement de pli significatif dans leur expression, par rapport aux sujets n'ayant pas reçu de RSM : KCTD12, EGR1, PYROXD1, IRAK3 et CCR10.

Il est intéressant de noter que l'expression de ces gènes est revenue au niveau de base lorsque la consommation de RSM a été arrêtée, ce qui suggère que l'utilisation continue de ces molécules est nécessaire pour maintenir la modulation 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 afin d'identifier leur relation avec différentes voies. Certaines de ces voies sont la voie de signalisation du facteur neurotrophique dérivé du cerveau, la voie de signalisation de l'hormone stimulant la thyroïde humaine, la voie Nrf2, la voie de signalisation VEGFA-VEGFR2, et d'autres encore. Ces voies et les autres voies liées à ces gènes sont cruciales pour la santé et la fonction cellulaires.

On a découvert que la voie Nrf2 est responsable de l'activation et de la désactivation de gènes essentiels à la production de protéines protectrices, comme le glutathion, qui combattent les composés nocifs présents dans l'organisme. Cette voie est capable d'activer et de désactiver l'expression des gènes (40 ; 41 ; 42).

On sait également que Nrf2 est un régulateur crucial de la réponse antioxydante (43 ; 42), qui favorise la résilience cellulaire au stress (44 ; 45). Lorsque cette voie est activée, les cellules sont capables de faire face aux agressions, d'y répondre et de 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 la voie Nrf2 est activée, davantage de protéines antioxydantes sont produites dans l'organisme pour lutter contre le stress oxydatif (51).

# Fonction des molécules de signalisation redox dans l'AREC32

(lignée cellulaire mammaire humaine MCF7) ET CELLULES HEPG2 (lignée cellulaire non tumorigène d'hépatome humain)

## 1- Méthode

### Culture cellulaire sur cellules AREc32 et HepG2

La lignée cellulaire AREc32 est une lignée cellulaire MCF7 transfectée de façon stable qui contient une construction de gène luciférase sous le contrôle de huit copies de l'ARE Gsta2 de rat. Les cellules HepG2 du foie humain possèdent de nombreuses fonctions spécialisées qui caractérisent les hépatocytes humains normaux. Les deux cellules ont été maintenues dans un milieu d'aigle modifié de Dulbecco (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Australie) complété par 10 % de sérum bovin fœtal (FBS, Sigma-Aldrich, Australie), 1 % de pénicilline (Sigma-Aldrich, Australie) dans un environnement de culture tissulaire humidifié à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules cultivées à plus de 90 % de confluence ont été digérées avec de la trypsine à 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, Australie) pour les essais biologiques suivants.

### Préparation de la solution d'eau électrolysée

Les SMR ont été générés et stabilisés selon un procédé électrochimique breveté. La présence de RSM a été vérifiée à l'aide de méthodes analytiques appropriées. Différents échantillons de MRS ont été préparés et testés pour l'activité Nrf2 (tableau 1).

Tableau 1. Échantillons de MSR fournis

Étiquette	Information
Contrôle négatif	0,27% NaCl
RSMR	Molécules de signalisation d'oxydation

## Essai de la luciférase Nrf2 sur les cellules AREc32

Les échantillons de RSM ont été soumis à un test de luciférase Nrf2 en utilisant des cellules AREc32 pour l'examen de l'activité Nrf2, où l'expression de la luciférase est induite par une construction de gène rapporteur Nrf2 transfectée de manière stable. La tert-butylhydroquinone (tBHQ), un additif alimentaire synthétique qui active puissamment Nrf2, a été utilisée comme contrôle positif. Le contrôle utilisé consistait en un mélange de NaCl à 0,27%, collecté avant l'électrolyse.

Les cellules AREc32 ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules/puits et ont été traitées avec des échantillons de RSM lorsqu'elles ont atteint 90 % de confluence. Après 24 heures, tous les surnageants ont été prélevés dans de nouvelles plaques à 96 puits pour le dosage du glutathion. Les cellules des plaques d'origine ont été mélangées avec du tampon de lyse triton (20  $\mu$ L). Les lysats cellulaires ont été obtenus en agitant la plaque pendant 10 minutes à température ambiante et congelés pendant 20 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Enfin, les lysats cellulaires ont été collectés (15  $\mu$ L) et transférés dans une plaque blanche microtitre 96 puits.

Un tampon de luciférine (100  $\mu$ L) a été ajouté au 96-WP et la bioluminescence a été enregistrée dans les 5 minutes [19]. L'activation de Nrf2 a été calculée par le changement de pli par rapport au contrôle négatif (cellules avec milieu uniquement).

## Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire des cellules AREc32 après le traitement des échantillons de RSM pendant 24 heures a été contrôlée par l'essai au bleu d'Alamar, largement utilisé pour les tests de viabilité cellulaire. Après élimination des surnageants, les cellules AREc32 ont été exposées à 100  $\mu$ L de solution de colorant bleu Alamar. La plaque a ensuite été incubée pendant 2 heures supplémentaires dans un incubateur humidifié à  $37^{\circ}\text{C}$ . 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 milieu uniquement) a été considérée comme une viabilité cellulaire de 100 %, et la viabilité cellulaire après traitement a été calculée en normalisant l'absorbance par rapport au témoin pour déterminer le pourcentage.

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

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

Une solution standard composée de 800 mM de cystéine et de 50 mM de cystéine-glycine, d'homocystéine et de glutathion (GSH) a été préparée puis séquentiellement diluée 2 fois six fois dans de l'eau ou du DMEM. Chaque solution a été mélangée à un volume égal de 1 % de

5- L'acide sulfosalicylique contenant 1 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), avant centrifugation à 14 000 g pendant 10 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant a ensuite été transféré dans des tubes neufs et stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ , avant d'être utilisé dans les réactions de dérivation ABD-F. Le surnageant a ensuite été transféré dans des tubes neufs et stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ , avant d'être utilisé dans les réactions de dérivation ABD-F.

Les surnageants prélevés sur les cellules AREc32 après différents traitements ont été retirés du congélateur et laissés à température ambiante. Les flacons ont été placés dans un bloc chauffant réglé à  $35^{\circ}\text{C}$ , et 50  $\mu$ L du surnageant ont été ajoutés. La réduction des liaisons sulfure a été réalisée par l'ajout de 30  $\mu$ L de chlorhydrate de tris (2-carboxyéthyl) phosphine 1 mM et de 30  $\mu$ L de 50 mM

De la N-acétyl cystéine a ensuite été ajoutée pour servir d'étalon interne. Cette opération a été suivie d'une incubation à  $35^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes. 100  $\mu$ L de tampon borate suivis de 30  $\mu$ L d'ABD-F ont été ajoutés à l'échantillon. L'échantillon a ensuite été incubé à  $35^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes supplémentaires, avant que la réaction de dérivation ne soit interrompue par l'ajout de 50  $\mu$ L d'acide chlorhydrique 2 M. Pour éliminer toute matière particulaire, les flacons de microcentrifugation ont été centrifugés à 14 000 g pendant 5 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Les solutions mélangées ont ensuite été placées dans des flacons de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et chargées dans l'échantillonneur automatique d'un système CLHP Dionex composé d'un injecteur d'échantillons automatisé WPS-3000, d'une pompe ultime 3000, d'un échantillonneur automatique ACC-3000, d'un compartiment de colonne et d'un détecteur de fluorescence FLD-3100. Le système était équipé d'un Luna RP-18 end-capped protégé par une cartouche SecurityGuard C18 dans un porte-cartouche SecurityGuard fourni par Phenomenex. Le système de données

chromatographiques Chromeleon 7.0 de Dionex a été utilisé pour contrôler les instruments, acquérir les données et quantifier les surfaces des pics.

#### Analyse par Western blot

Les cellules HepG2 ont été cultivées dans des flacons T75 jusqu'à confluence. Les cellules ont ensuite été traitées avec du milieu, 50  $\mu$ M de tBHQ, V10 v1, V10 v2 à la 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'essai de radio-immunoprécipitation contenant 1% d'inhibiteurs de protéinase, et leurs concentrations ont été déterminées à l'aide du Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Les protéines totales de chaque échantillon à 10 mg/mL ont été



Les protéines ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE, puis transférées sur la membrane PVDF à l'aide de l'appareil de transfert de gel iBlot 2. Les membranes ont été incubées avec 3 % d'albumine sérique bovine (BSA) dissoute dans du PBST [tampon PBS plus 1 % de tween 20] pendant 1 heure à température ambiante. Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires contre GCLC, HO-1 pendant une nuit à 4°C. La glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisée comme témoin de charge. Les anticorps primaires ont été sondés avec des anticorps anti-  
Les anticorps secondaires conjugués à la HRP de lapin ont été incubés à température ambiante pendant 2 h. Tous ces anticorps ont été achetés auprès de Cell Signaling Technology. Les bandes d'immunoréactivité sur les membranes ont été incubées par le kit SuperSignal West Pico Plus ECL et visualisées par l'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., USA). Les données ont été présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM) à partir d'au moins trois expériences individuelles. La comparaison statistique entre les groupes a été effectuée par ANOVA à sens unique avec le test de Tukey, et  $p < 0,05$  a été considéré comme statistiquement significatif.

## 2- Résultats et conclusions

### Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a d'abord été évaluée en fonction de la dose 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 le RSM pourrait être toxique pour les cellules et d'identifier les tests de dosage optimal.

Ce test évalue la capacité des cellules à survivre et à fonctionner lorsqu'elles sont exposées au SMR. Les résultats ont montré que les cellules étaient vivantes et capables de maintenir leur intégrité structurelle et fonctionnelle tout au long de l'expérience (figure 7).

### Activation de Nrf2

La plupart des échantillons ont montré une légère activation de Nrf2 par rapport aux cellules inactivées. Une activation perceptible de la voie Nrf2 a été observée dans les cellules traitées avec le RSM. Les cellules exposées au RSM ont montré une augmentation de l'activation de Nrf2 (Figure 7), ce qui suggère que le supplément présente un potentiel d'induction d'une réponse antioxydante cellulaire par la voie Nrf2, contribuant à la défense cellulaire contre le stress oxydatif et à la promotion de la santé cellulaire globale.

Les tests concernant la viabilité cellulaire et l'activation de Nrf2 résultant du traitement au RSM ont été réalisés en trois exemplaires par deux laboratoires de recherche différents (tableau 2).

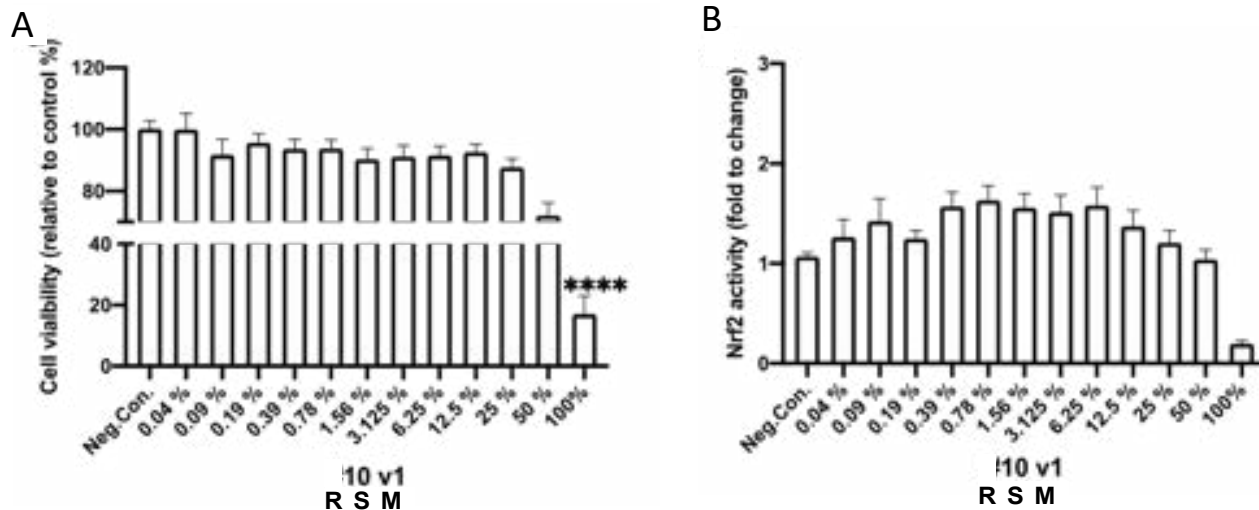


Figure 7 : Viabilité cellulaire lorsque le RSM est ajouté au milieu de culture à différentes concentrations (A). Activation de Nrf2 par le RSM (B).

\*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Neg. Con. Contrôle négatif où les cellules n'ont pas reçu de RSM. Les statistiques ont été réalisées à l'aide d'une analyse ANOVA à sens unique dans GraphPad Prism 9.

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

Tableau 2. RSM des effets Nrf2 maximaux au National Institute of Complementary Medicine (NICM) et à la School of Medicine (SOM).

Étiquette	Résultats du NICM concernant le Nrf2	Les résultats de SOM sur le Nrf2
Contrôle négatif	1	1
RSM	1.63±0.52	2.25±0.19
Contrôle positif	12.43 ± 2.93	16.89 ± 3.62

Les résultats obtenus représentent le changement de pli dans l'activation de Nrf2 par rapport au contrôle négatif où aucun traitement n'a été ajouté à la culture. Il est démontré une activation discernable de la voie Nrf2 dans les cellules traitées avec le RSM.

Dans le tableau 2, deux laboratoires distincts ont, indépendamment, obtenu des résultats comparables lors de l'analyse de l'activité Nrf2. Ces résultats cohérents ont conduit à la sélection de l'échantillon pour d'autres expériences mécanistiques visant à étudier le potentiel antioxydant régulé par Nrf2.

#### Augmentation de l'expression du GSH régulé par Nrf2

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 par le RSM a entraîné une augmentation de 1,52 fois. Nous avons également remarqué une diminution significative des productions de cystéine et de CysGly par RSM. Ces résultats suggèrent que le RSM induit le métabolisme pour augmenter l'expression du GSH.

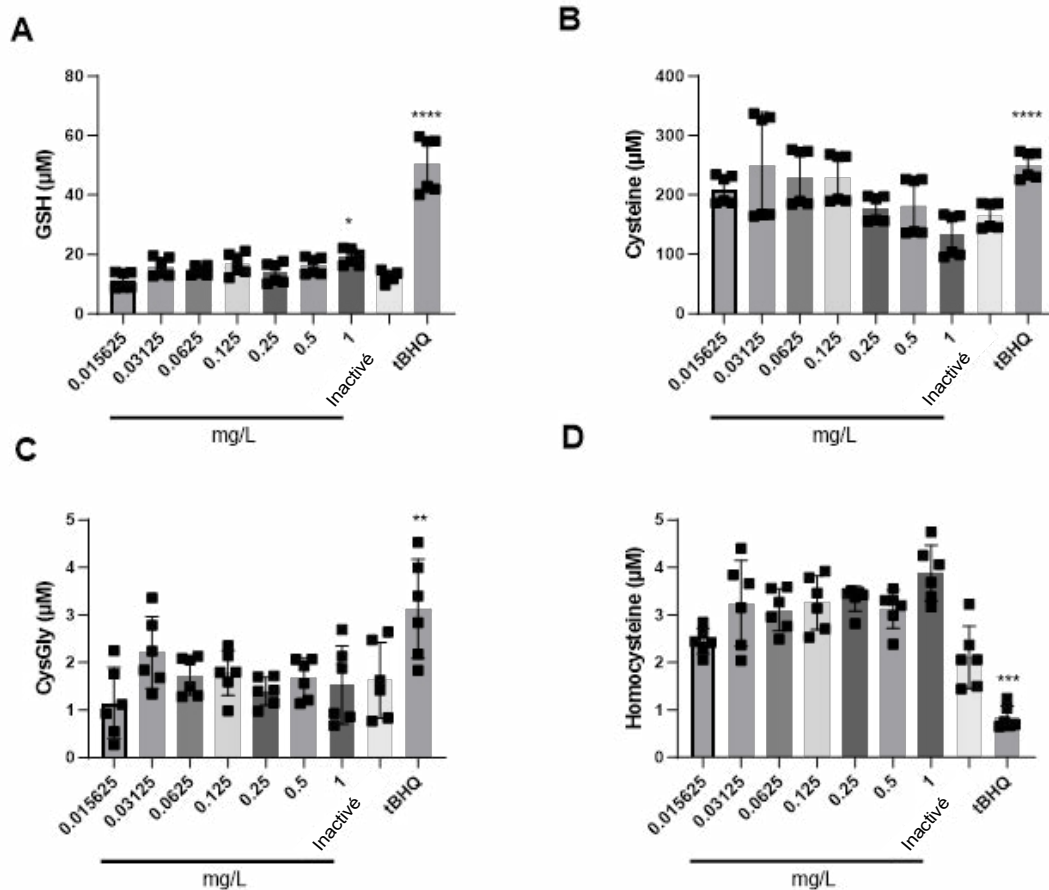


Figure 8 : Expressions de (A) GSH, (B) Cystéine, (C) CysGly et (D) Homocystéine induites par RSM sur les cellules AREc32. Inactivé représente les cellules sans traitement RSM. tBHQ (tert-butylhydroquinone) : contrôle positif. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  par rapport aux cellules inactivées par ANOVA à sens unique.

#### Augmentation des expressions GCLC et HO-1 régulées par Nrf2

Pour compléter la mesure de l'activité luciférase du Nrf2, l'effet du RSM sur l'expression des protéines cibles régulées par le Nrf2, GCLC et HO-1, a été étudié par Western blot. Les cellules HepG2, une lignée cellulaire d'hépatome humain couramment utilisée dans les études sur le métabolisme des médicaments et l'hépatotoxicité, ont été utilisées pour ces expériences. Le contrôle positif tBHQ (50  $\mu\text{M}$ ) a augmenté de manière significative l'expression de GCLC et HO-1 (Figure 8). L'analyse par Western blot de l'expression des protéines antioxydantes GCLC a montré que le RSM présentait des expressions plus élevées de cette protéine par rapport au contrôle négatif ( $p < 0,01$ ). En outre, le RSM à la concentration de 0,25 mg/L a induit une expression significativement plus élevée de HO-1, ce qui suggère des activités antioxydantes importantes.

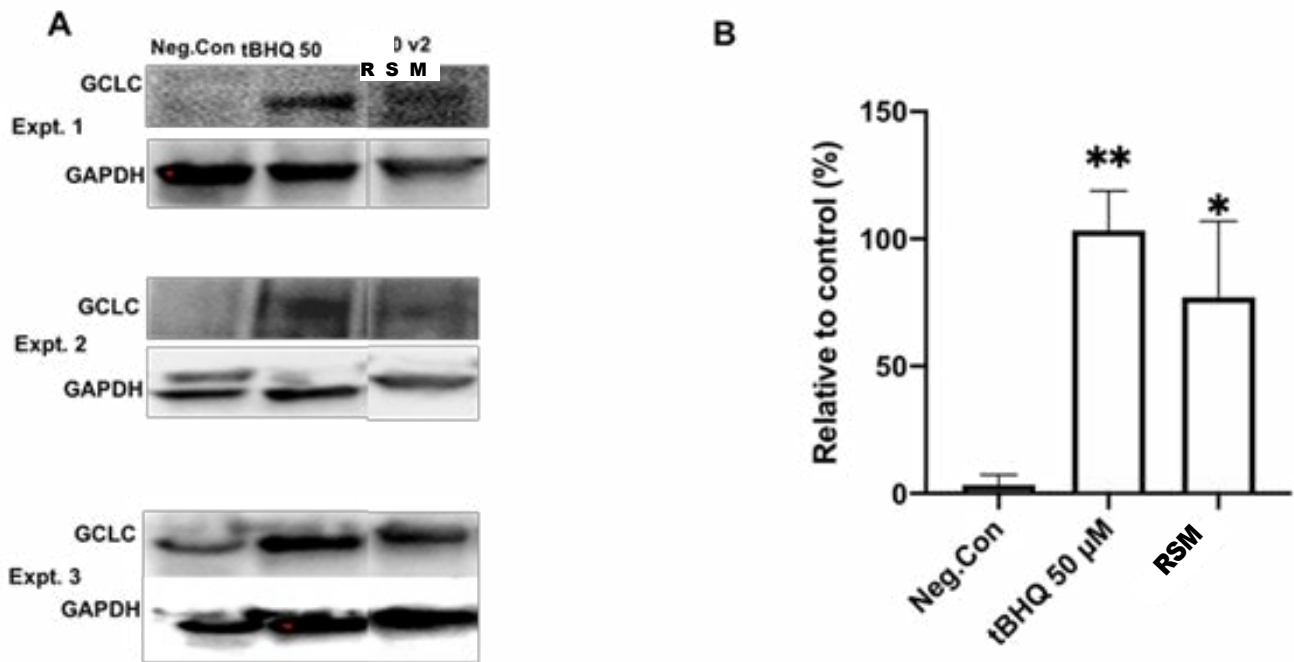


Figure 9 : Expression de la protéine GCLC par analyse Western blot. Les cellules HEGP2 ont été cultivées dans des flacons T75 et ont été traitées avec le RSM pendant 24 heures. (A) Niveaux d'expression de la protéine GCLC avec n=3 expériences. (B) Les données ont été analysées par ImageJ et introduites dans Graphpad Prism 9. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  par rapport au contrôle négatif (Neg. Con ; cellules cultivées uniquement avec du milieu).

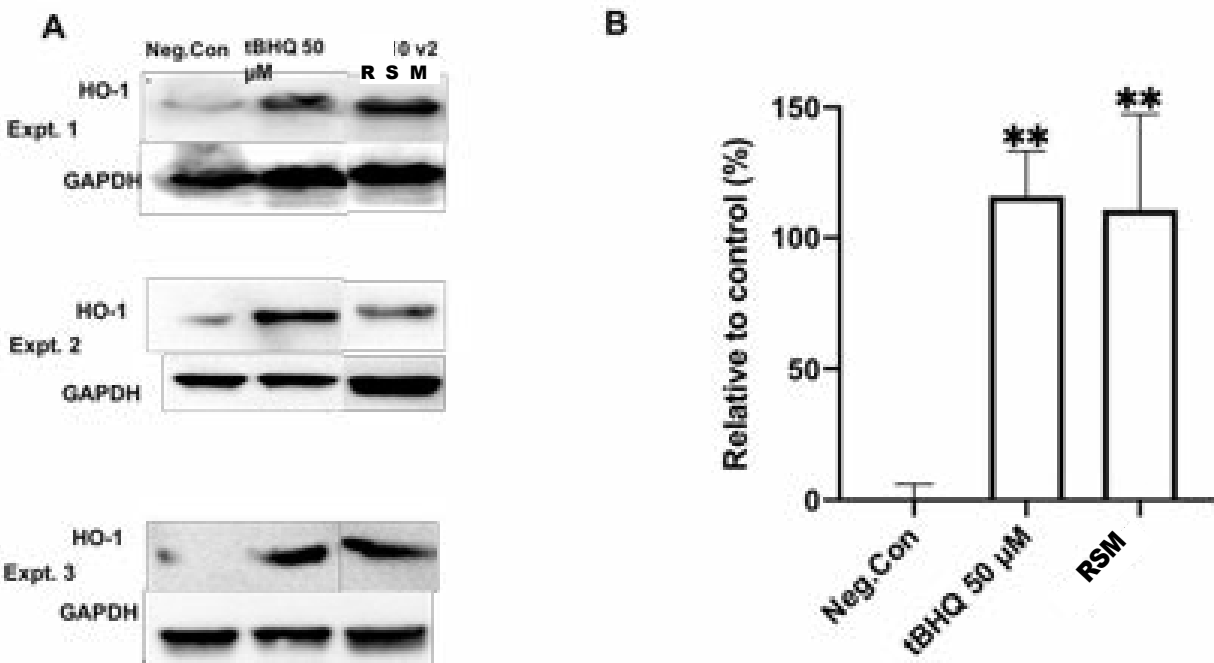


Figure 10 : Expression de la protéine HO-1 par analyse Western blot. Les cellules HEGP2 ont été cultivées dans des flacons T75 et ont été traitées avec le RSM pendant 24 heures. (A) Niveaux d'expression protéique de HO-1 avec n=3 expérience. (B) Les données ont été analysées par ImageJ et introduites dans Graphpad Prism 9. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  par rapport au contrôle négatif (Neg. Con ; cellules cultivées uniquement avec du milieu).

En résumé, les cellules exposées au RSM ont montré une augmentation de la GCLC et de l'HO-1 par rapport aux contrôles où aucun RSM n'a été ajouté, ce qui signifie que le RSM augmente le taux de production de ces protéines.

L'augmentation de l'expression de la GCLC fait partie de la réponse adaptative de la cellule pour contrer le stress oxydatif et maintenir l'équilibre redox. La GCLC catalyse la formation d'un dipeptide, la gamma-glutamylcystéine, qui est un précurseur de la synthèse ultérieure du GSH. Comme le GSH joue un rôle essentiel dans la neutralisation des ROS, la détoxification des substances nocives et la protection des cellules contre les dommages induits par le stress oxydatif, la régulation à la hausse de la GCLC pourrait servir de mécanisme de protection pour renforcer la capacité antioxydante cellulaire et promouvoir la survie des cellules dans des conditions de stress oxydatif accru.

La régulation à la hausse de HO-1 peut être considérée comme une réponse protectrice et adaptative à divers facteurs de stress cellulaire, y compris le stress oxydatif, et comme un élément des mécanismes de défense cellulaire contre le stress qui peut contribuer à maintenir l'homéostasie cellulaire et à promouvoir la survie des cellules dans des conditions difficiles.

# Fonction des molécules de signalisation redox dans les cellules FEK4

(fibroblastes primaires de prépuce humain)

## 1- Méthode

### Culture cellulaire et test MTT

Les cellules FEK4 ont été cultivées pendant 48 heures et ont reçu un milieu à 15% de sérum pendant la nuit. Lavées avec du PBS, fixées avec 4% de paraformaldéhyde pendant 10 minutes, perméabilisées avec 0,1% de triton pendant 15 minutes, bloquées avec 2% de BSA pendant 45 minutes et cultivées avec l'anticorps polyclonal Nrf2 (1:100) dans 0,1% de BSA à 4 °C pendant la nuit, puis colorées avec Alexa fluor plus 488 (1:2000) dans 0,1% de BSA pendant 45 minutes et une goutte de DAPI avant la formation de l'image.

Les fibroblastes primaires de la peau humaine FEK4 ont étéensemencés au jour 0. Après 48 heures de culture, le milieu a été changé et le RSM a été ajouté à la culture à un taux de dilution de 1:1 dans le milieu. Après 24 heures de culture en présence de RSM, les cellules ont été fixées et ont fait l'objet d'une immunocytochimie avec l'anticorps Nrf2 et le marqueur nucléaire DAPI.

### Viabilité cellulaire

Le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) est une méthode couramment utilisée pour évaluer la viabilité et la prolifération des cellules in vitro. En bref, les cellules ont été cultivées dans un milieu (en présence ou non de RSM) dans des conditions standard (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence souhaitée. Le milieu de culture a été retiré, les cellules ont été lavées avec du PBS et une solution de MTT a été ajoutée à chaque culture. Le MTT est réduit en formazan par les cellules métaboliquement actives. Le MTT a été soigneusement aspiré, remplacé par du DMSO pour dissoudre les cristaux de formazan et mélangé à l'aide d'une pipette de haut en bas. Après le mélange, l'absorbance de chaque puits a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques. L'absorbance est en corrélation avec le nombre de cellules viables. Les données recueillies ont été analysées pour déterminer et calculer les pourcentages de viabilité.

### Dosage du glutathion

Les cellules ont été cultivées dans un milieu normal jusqu'à confluence. Le milieu a été retiré et remplacé par un milieu frais contenant du RSM dans un rapport 1:1 avec 50 µM de buthionine sulfoxyde (BSO). Les témoins ont été cultivés sans BSO, 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 a été effectué par Bio-Rad (dosage Bradford). Le test protéique de Bradford est une procédure colorimétrique



simple et précise permettant de déterminer la concentration de protéines (le glutathion dans ce cas) en solution. Lorsque le colorant se lie à la protéine, il est converti en une forme bleue stable non protonée ( $A_{max} = 595 \text{ nm}$ ). C'est la forme bleue du colorant protéique 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 fibroblastes primaires de la peau humaine FEK4 ont étéensemencés et cultivés dans un milieu dans des conditions standard (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Une fois que les cellules ont atteint la confluence souhaitée, le RSM a été ajouté à la culture à un taux de dilution de 1:1 dans le milieu. Les cellules ont été cultivées en présence de RSM pendant 24 heures. Après cette période, le milieu a été retiré, les cellules ont été lavées avec du tampon phosphate salin (PBS) et fixées dans du formaldéhyde. Les cellules fixées ont été perméabilisées avec du Triton X-100 et les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués avec de la BSA. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire (anti-Nrf2), puis lavées avec du PBS et incubées à nouveau avec l'anticorps secondaire. Les cellules ont également été colorées avec du DAPI, pour la localisation nucléaire. Les cellules cultivées ont été montées sur des lames de microscope à l'aide d'un milieu de montage et les cellules colorées ont été visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence.

## 2- Résultats et conclusions

### Viabilité cellulaire

Les données obtenues avec les tests MTT ont montré que les traitements d'une nuit des cellules avec le RSM aux différents taux de dilution utilisés n'ont pas diminué la viabilité cellulaire des cellules traitées, par rapport au contrôle non traité (Figure 11).

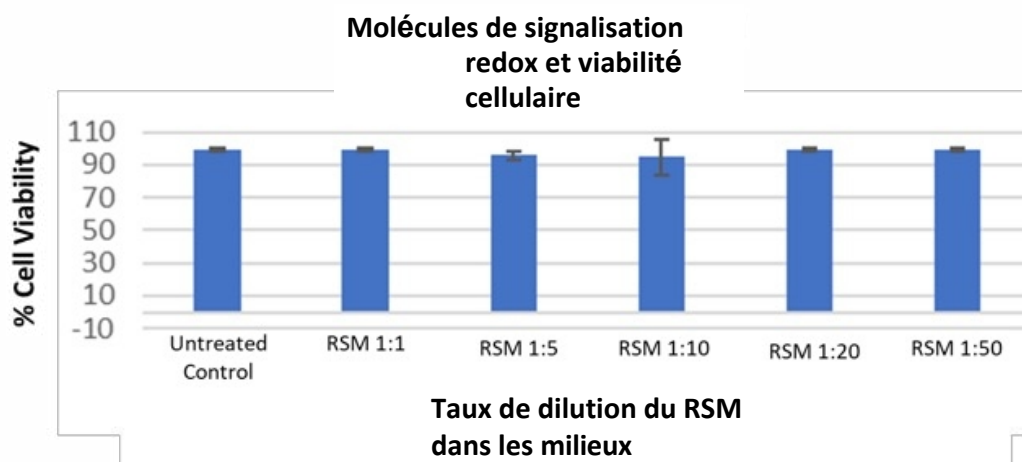


Figure 11 : Données exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire des cellules traitées avec différentes concentrations de RSM par rapport au contrôle non traité fixé à 100 %. Les données sont présentées comme une moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes (n=3) +/- les déviations standard indiquées comme barres d'erreur.

### Dosage du glutathion

Les cellules qui ont été exposées au RSM pendant une nuit ont montré une augmentation des niveaux intracellulaires de GSH de 40 % (augmentation de 0,4 fois) par rapport au contrôle non traité (figure 12A).

La buthionine sulfoximine (BSO) est un inhibiteur connu de la gamma-glutamylcystéine synthase, qui est la première étape de la synthèse du GSH. Le traitement des cellules par la BSO seule a réduit le niveau de GSH intracellulaire à 0,5 fois celui des fibroblastes témoins non traités. Cependant, dans les cellules traitées au BSO, l'ajout de RSM a montré une capacité à restaurer le niveau de GSH intracellulaire jusqu'à 0,55 fois (55%). Ainsi, l'ajout de molécules de signalisation a permis de restaurer la production de GSH dans les cellules cultivées (Figure 12B).

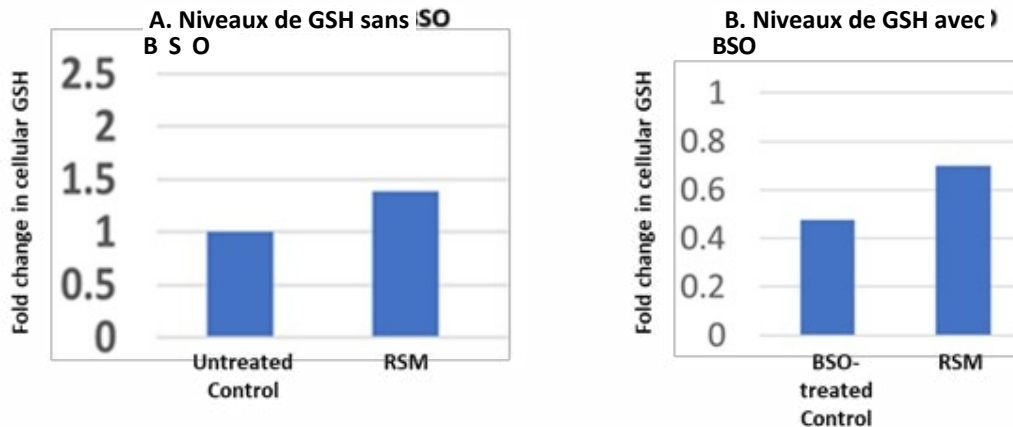


Figure 12 : A. Niveaux de glutathion (GSH) sur les cellules exposées aux molécules de signalisation redox (RSM) par rapport aux cellules non traitées (contrôle non traité). B. Les cellules traitées avec de la buthionine sulfoximine (contrôle traité au BSO) et des RSM ont montré une augmentation des niveaux de glutathion (GSH) par rapport aux cellules non traitées (contrôle non traité).

de GSH par rapport aux cellules traitées au BSO. Les données ont été calibrées en nanomoles de GSH par mg de protéine, puis représentées sous forme de variation de GSH par rapport au contrôle non traité, qui a été arbitrairement fixé à 1. Les données sont présentées comme la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes (n=3).

### Translocation de Nrf2 vers le noyau

La figure 15 montre que les molécules de signalisation redox sont capables de promouvoir la translocation de Nrf2 vers le noyau (colonne 3, coloration aqua du noyau) lorsque les cellules sont 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.

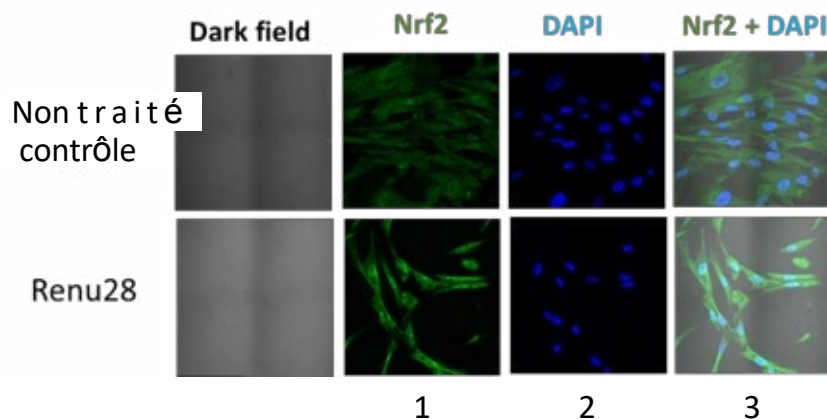


Figure 13 : Analyse par immunofluorescence des cellules FEK4 de fibroblastes cutanés primaires humains traités avec des molécules de signalisation redox (RSM) ou en comparaison avec des cellules non traitées (contrôle non traité). Colonnes 1, immunocytochimie pour localiser les protéines NRF2 et la translocation de Nrf2 dans le noyau. Colonnes 2, coloration du noyau avec du DAPI. Colonnes 3, image fusionnée de la localisation de la protéine NRF2 et de la coloration nucléaire. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Intensité moyenne de fluorescence (MFI). La quantification de la translocation de Nrf2 vers le noyau a été réalisée à l'aide du logiciel image J.

# RSM et Nrf2 - remarques finales

L'étude du rôle des molécules de signalisation redox (RSM) dans les cellules AREc32 et HepG2, ainsi que dans les cellules FEK4, a permis de faire des découvertes intéressantes concernant leur impact sur les voies qui protègent les cellules du stress oxydatif. Les expériences ont permis de comprendre les réponses cellulaires de Nrf2 au RSM et ont également démontré la capacité du RSM à augmenter la production de glutathion dans les cellules.

Les résultats indiquent que le RSM induit une activation perceptible de la voie Nrf2 dans les cellules AREc32 et HepG2, contribuant à la défense cellulaire contre le stress oxydatif. L'activation cohérente de Nrf2, vérifiée par des laboratoires indépendants, renforce la fiabilité de nos résultats. En outre, l'étude du potentiel antioxydant régulé par Nrf2 a révélé une augmentation des expressions de GCLC et de HO-1, ce qui suggère une réponse adaptative cellulaire visant à renforcer la capacité antioxydante (43).

En outre, l'exploration du rôle du RSM s'est étendue aux cellules FEK4 où les molécules de signalisation redox n'ont pas démontré de toxicité cellulaire ou d'altération de la viabilité cellulaire. Les résultats ont montré que le RSM était capable d'augmenter et/ou de restaurer les niveaux de glutathion intracellulaire, après un traitement au BSO, et de promouvoir la translocation de Nrf2 vers le noyau. Ces observations suggèrent le potentiel du RSM pour soutenir la santé cellulaire et les mécanismes de défense antioxydants.

Les résultats positifs obtenus à partir de différentes lignées cellulaires et d'essais ont fourni une perspective complète sur l'impact multiforme des molécules de signalisation redox sur les fonctions cellulaires. Ces résultats contribuent au corpus croissant de connaissances dans le domaine de la signalisation redox et peuvent ouvrir la voie à d'autres études visant à dévoiler les voies sous-jacentes impliquées dans la réponse de la SMR au stress cellulaire.

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

## Bibliographie

1. Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH. Le facteur de transcription érythroïde NF-E2 est un protéine de fermeture à glissière à base de leucine spécifique à l'hématopoïèse. *Nature*. 1993 Apr 22;362(6422):722-8. Doi : 10.1038/362722a0. PMID : 8469283.
2. 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.
3. Zgorzynska E, Dziedzic B, Walczewska A. Aperçu de la voie Nrf2/ARE et de son rôle dans les maladies neurodégénératives. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 4;22(17):9592. doi : 10.3390/ijms22179592. PMID : 34502501 ; PMCID : PMC8431732.
4. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Radicaux libres, antioxydants et aliments fonctionnels : Impact sur la santé humaine. *Pharmacogn Rev*. 2010 Jul;4(8):118-26. doi : 10.4103/0973-7847.70902. PMID : 22228951 ; PMCID : PMC3249911.
5. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/nrf2>
6. 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.
7. Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN. La complexité de la voie Nrf2 : au-delà de la réponse antioxydante. *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.
8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9817#:~:text=KEAP1>
9. 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.
10. Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. Le système KEAP1-NRF2 : un appareil capteur-émetteur basé sur le thiol pour le maintien de l'homéostasie redox. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1169-1203. doi : 10.1152/physrev.00023.2017. PMID : 29717933 ; PMCID : PMC9762786.



11. Matsumaru D, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 System in Healthy Aging and Longevity (Le système KEAP1-NRF2 dans le vieillissement sain et la longévité). *Antioxidants* (Basel). 2021 Nov 30;10(12):1929. doi : 10.3390/antiox10121929. PMID : 34943032 ; PMCID : PMC8750203.
12. 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.
13. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The KEAP1- Le système Nrf2 dans les cancers : réponse au stress et métabolisme anabolique. *Front Oncol.* 2012 Dec 26;2:200. doi : 10.3389/ fonc.2012.00200. PMID : 23272301 ; PMCID : PMC3530133.
14. Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN. La complexité de la voie Nrf2 : au-delà de la réponse antioxydante. *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.
15. 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.
16. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Régulation transcriptionnelle par 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.
17. Sihvola V, Levonen AL. KEAP1 en tant que capteur redox de la réponse antioxydante. *Arch Biochem Biophys.* 2017 Mar 1;617:94-100. doi : 10.1016/j.abb.2016.10.010. Epub 2016 Oct 18. PMID : 27769838.
18. Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Activateurs et inhibiteurs de NRF2 : une revue de leur potentiel pour le développement clinique. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Jul 14;2019:9372182. doi : 10.1155/2019/9372182. PMID : 31396308 ; PMCID : PMC6664516.
19. Li R, Jia Z, Zhu H. Régulation de la signalisation Nrf2. *React Oxyg Species (Apex).* 2019 Nov;8(24):312-322. PMID : 31692987 ; PMCID : PMC6830569.
20. 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 :

freeradbiomed.2020.03.023. Epub 2020 Mar 28. PMID : 32234331 ; PMCID : PMC7732858.

regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. Libre

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 et autres activateurs Nrf2 nutriginomiques : Les attentes du clinicien peuvent-elles correspondre à la réalité ? *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. *Glutathion.* Editeur(s) : Philip Wexler. Encyclopédie de toxicologie (quatrième édition). 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-

- 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, fonction et régulation post-traductionnelle des sous-unités catalytiques et modificatrices de la glutamate cystéine 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. Chapitre trois - Rôle cytoprotecteur des composés phytochimiques alimentaires contre le développement du cancer via l'induction de la phase II et des enzymes antioxydantes. Rédacteur(s) en chef : J.C. Fishbein, J.M. Heilman. Advances in Molecular Toxicology ( Avancées en toxicologie moléculaire). 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. Hème oxygénase-1, oxydation, inflammation et athérosclérose. 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. Aperçu des mécanismes de signalisation redox. 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. Signalisation redox, fonction vasculaire et 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. Fonctions de signalisation physiologique des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules souches : 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. Chapitre 28 - Nrf2 : un régulateur clé de la signalisation redox dans les maladies du foie. Editeur(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. La voie de défense cellulaire Nrf2 : 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 et NRF2 : des acteurs interactifs dans la même équipe pour l'homéostasie cellulaire ? *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. Le mécanisme de la dose-réponse hormétique : 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 et le stress oxydatif : A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants (Bâle)*. 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 : Leur rôle dans le traitement des maladies. *Molécules*. 2021 Feb 15;26(4):1016. doi : 10.3390/molecules26041016. PMID : 33671866 ; PMCID : PMC7918973.
53. 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.
54. Zhang L, Zhang J, Ye ZW, Muhammad A, Li L, Culpepper JW, Townsend DM, Tew KD. Changements adaptatifs dans les cellules tumorales en réponse au stress réducteur. *Biochem Pharmacol*. 2024 Jan;219:115929. doi : 10.1016/j.bcp.2023.115929. Epub 2023 Nov 22. PMID : 38000559.