

Université de Montréal

Localisation, rôle et caractérisation des Paraoxonases -1 et -2 au niveau  
hépatique, intestinal et circulant et effets du stress oxydatif sur leur activité et  
taux protéiques

par  
Karine Trudel

Département de Nutrition  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en Nutrition

Décembre, 2005

©, Karine Trudel, 2005



QV

145

058

2006

V.004

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Localisation, rôle et caractérisation des Paraoxonases -1 et -2 au niveau  
hépatique, intestinal et circulant et effets du stress oxydatif sur son activité et  
taux protéiques

présenté par :  
Karine Trudel

a été évalué par un jury composé de personnes suivantes :

Dr. Béatriz Tuchweber  
président-rapporteur

Dr. Émile Levy  
directeur de recherche

Dr. Edgard Delvin  
codirecteur

Dr. Marielle Ledoux  
membre du jury

## RÉSUMÉ

Les paraoxonases (PONs) sont des enzymes possédant un pouvoir antioxydant puissant et qui sont reconnues comme étant athéroprotectrices. La paraoxonase 1 (PON1) confère cette protection antioxydante aux lipoprotéines de haute densité (HDL) auxquelles elle est associée. Ce projet de recherche a permis de déterminer le lieu de synthèse de PON1 de même que sa localisation tissulaire et cellulaire et d'établir une comparaison au niveau de l'activité et des taux protéiques chez l'humain et le rat. La majorité de l'activité de PON1 a été décelée au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes et dans la sousfraction HDL<sub>3</sub> dans la circulation. Les taux protéiques et l'activité de PON1 se sont avérés plus importants chez le rat en comparaison à l'humain.

Malgré une importante similitude dans leur séquence, PON2 diffère de PON1 puisqu'elle n'est pas associée aux lipoprotéines et s'exprime dans de nombreux tissus. L'étude de cette protéine a permis de clarifier sa localisation cellulaire et son expression tissulaire dans plusieurs compartiments cellulaires tant au niveau intestinal qu'hépatique.

L'effet du stress oxydatif sur l'activité et les taux protéiques de PON1 et PON2 au niveau hépatique et intestinal a également pu être spécifié. Il a été trouvé

que les taux de PON1 et PON2 diminuent en présence de stress oxydatif, puisque ces protéines antioxydantes se dégradent afin de préserver l'intégrité des cellules.

#### Mots-clés

PON1; PON2; stress oxydatif; antioxydants; compartiments cellulaires; intestin; foie; réticulum endoplasmique; HDL<sub>3</sub>.

## SUMMARY

The paraoxonase gene family (PONs) includes PON1, PON2 and PON3, which are major antioxidant enzymes that are believed to be atheroprotective. The association of paraoxonase 1 (PON1) with high-density lipoproteins (HDL) is an important determinant of the antioxidant potential of this lipoprotein particle. This research project allowed us to identify the intracellular site of PON1 synthesis. A comparison between PON1 protein levels and activity in rats and humans was also established. The major bulk of activity was found in liver microsomes and in serum HDL<sub>3</sub> fraction. PON1 activity and protein levels were more elevated in rats in comparison to humans.

Even though PON1 and PON2 exhibit large sequence identity, tissue distribution and probably their antioxidant role are different: PON2 is not associated to HDL and is expressed in many tissues. The study of this protein permitted the appraisal of its localization and tissular expression. PON2 was detected in most cellular subcompartments in the intestine and in the liver.

The effect of oxidative stress on the activity and protein levels of both PON1 and PON2 was also specified. It was found that PON1 and PON2 levels are considerably decreased in the presence of oxidative stress, meaning that these proteins serve as antioxidants to preserve cell integrity.

**Key words**

PON1; PON2; oxidative stress; antioxidants; intracellular compartments; intestine; liver; endoplasmic reticulum; HDL<sub>3</sub>.



## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>III</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES SIGLES .....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>CHAPITRE 1: INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	1
1.1.1 Stress oxydatif .....	1
1.1.2 Stress oxydatif et acides gras .....	3
1.1.3 Stress oxydatif et protéines .....	4
1.1.4 Stress oxydatif et ADN .....	6
1.1.5 Stress oxydatif et athérosclérose .....	7
1.1.6 Stress oxydatif et diabète.....	9
1.1.7 Stress oxydatif et cancer.....	10
1.1.8 Stress oxydatif et fibrose kystique.....	11
1.1.9 Stress oxydatif et maladie de Crohn .....	13
1.1.10 Antioxydants .....	15

1.1.11 Antioxydants exogènes .....	15
1.1.12 Antioxydants endogènes.....	19
1.1.13 Catalase.....	19
1.1.14 Superoxyde dismutase.....	21
1.1.15 Glutathion peroxydase .....	23
1.1.16 Paraoxonases .....	24
1.1.17 PON1 .....	25
1.1.18 PON2 .....	33
1.2 HYPOTHÈSES.....	37
1.3 OBJECTIFS.....	40
<b>CHAPITRE 2: STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LE COMPLEXE PROOXYDANT FER-ASCORBATE ET SA NEUTRALISATION PAR L'ENZYME PARAOXONASE 1 AU NIVEAU DES HDLS ET DU FOIE : COMPARAISON ENTRE LE RAT ET L'HUMAIN.....</b>	<b>41</b>
2.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE .....	41
2.2 IRON-ASCORBIC ACID–INDUCED OXIDANT STRESS AND ITS QUENCHING BY PARAOXONASE 1 IN HDL AND THE LIVER: COMPARISON BETWEEN HUMANS AND RATS.....	42
2.2.1 Abstract.....	43
2.2.2 Introduction .....	44
2.2.3 Material and methods.....	46

2.2.3.1 Assay of arylesterase activity.....	47
2.2.3.2 Assay of carboxylesterase activity .....	47
2.2.3.3 Preparation of microsomes .....	47
2.2.3.4 Lipoprotein isolation .....	48
2.2.3.5 Estimation of lipid peroxidation .....	48
2.2.3.6 Statistical analysis.....	49
2.2.4 Results .....	49
2.2.5 Discussion.....	51
2.2.6 Acknowledgment.....	55
2.2.7 References.....	55
2.2.8 Figure legends .....	58
2.2.9 Figures .....	62

### **CHAPITRE 3: DISTRIBUTION ÉPITHÉLIALE ET RÉPONSE AU STRESS OXYDATIF DE L'ENZYME PARAOXONASE 2 DANS L'INTESTIN DE L'HUMAIN ET DE RAT.....68**

3.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE .....	68
3.2 EPITHELIAL DISTRIBUTION AND OXIDATIVE STRESS RESPONSE OF PARAOXONASE2 IN HUMAN AND RAT INTESTINE .....	69
3.2.1 Abstract.....	70
3.2.2 Introduction .....	71
3.2.3 Material and methods.....	74
3.2.3.1 Preparation and Specificity of PON 2 Antibody .....	75
3.2.3.2 Immunocytochemical labelling .....	75

3.2.3.3 Preparation of Microsomes and subcellular fractions .....	76
3.2.3.4 Western blots .....	76
3.2.3.5 Effect of Antioxidants .....	77
3.2.3.6 Estimation of lipid peroxidation .....	77
3.2.3.7 Statistical analysis .....	78
3.2.4 Results .....	78
3.2.5 Discussion.....	82
3.2.6 Acknowledgment.....	86
3.2.7 References.....	86
3.2.8 Figure legends .....	91
3.2.9 Figures .....	98
<b>CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>111</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>122</b>
<b>ANNEXE I : ACCORD DES COAUTEURS, PREMIER ARTICLE.....</b>	<b>139</b>
<b>ANNEXE II : ACCORD DES COAUTEURS, DEUXIÈME ARTICLE .....</b>	<b>141</b>
<b>ANNEXE III : DÉCLARATION DE L'ÉTUDIANT CONCERNANT LES ARTICLES .....</b>	<b>143</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Activité enzymatique PON1 dans le sérum de l'humain et de rat.

Figure 2.2 : Activité enzymatique PON1 dans les microsomes de foie humain et de rat.

Figure 2.3 : Analyse de Western blots de PON1, taux protéiques dans le sérum, l'homogénat et les microsomes de foie de rat et de l'humain.

Figure 2.4 : Activité enzymatique PON1 et taux protéiques dans les sousfractions de HDLs.

Figure 2.5 : Effet du complexe prooxydant fer-ascorbate sur l'activité enzymatique PON1 dans les microsomes hépatiques humains et de rat et dans la fraction HDL<sub>3</sub>.

Figure 2.6 : Effet du complexe prooxydant fer-ascorbate sur les taux protéiques de PON1 dans les microsomes hépatiques humains et de rat et dans la fraction HDL<sub>3</sub>.

Figure 3.1 : Profil de distribution de PON2 au niveau hépatique et dans les différentes sections de l'intestin humain et de rat.

Figure 3.2 : Immunomarquage de PON2 à la protéine A-or sur les tissus hépatiques de rat (A) et humain (B).

Figure 3.3 : Immunomarquage de PON2 à la protéine A-or dans l'intestin humain.

Figure 3.4 : Profil de distribution de PON2 dans les différents compartiments cellulaires de foie et d'intestin de rat et d'humain.

Figure 3.5 : Expression protéique de PON2 dans les microsomes de foie et d'intestin de rat et humain.

Figure 3.6 : Profil d'expression de PON2 au cours du développement dans le petit intestin et dans le colon.

Figure 3.7 : Profil de distribution de PON2 dans les différents compartiments cellulaires d'intestin grêle fœtal.

Figure 3.8 : Effet du complexe prooxydant fer-ascorbate sur les taux protéiques de PON2 dans les microsomes hépatiques de rat.

Figure 3.9 : Effet du complexe prooxydant fer-ascorbate sur les taux protéiques de PON2 dans les microsomes de jéjunum de rat.

Figure 3.10 : Effet du complexe prooxydant fer-ascorbate sur les taux protéiques de PON2 dans les microsomes hépatiques humains.

Figure 3.11 : Effet du complexe prooxydant fer-ascorbate sur les taux protéiques de PON2 dans les microsomes de jéjunum humain.

Figure 3.12 : Effet du complexe prooxydant fer-ascorbate sur les taux protéiques de PON2 dans les microsomes d'intestin proximal foetal.

Figure 3.13 : Effet du complexe prooxydant fer-ascorbate sur les taux protéiques de PON2 dans les microsomes et les cellules de Caco-2.

## LISTE DES SIGLES

kDa : kilo Dalton

$\alpha$ - : alpha

$\beta$ - : beta

$\gamma$ - : gamma

$\delta$ - : omega

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC : ATP-binding cassette

ADN : Acide désoxyribonucléique

Apo A-I : Apolipoprotéine A-I

Apo A-II : Apolipoprotéine A-II

Apo A-IV : Apolipoprotéine A-IV

BHT : Butylated hydroxytoluene

CETP : Cholesterol ester transfert protein

CFTR : Transmembrane conductance regulator

GSH : Glutathion réduit

HDL : Lipoprotéine de haute densité

HDL<sub>3</sub> : Lipoprotéine de haute densité, sousfraction 3

HDL<sub>2</sub> : Lipoprotéine de haute densité, sousfraction 2

LDL : Lipoprotéine de faible densité

oxLDL : Lipoprotéine de faible densité, oxydée

MAP kinase : Mitogen-activated protein kinase

MDA : Malondialdehyde

NAC : N-acetyl cystéine

PI 3-kinase : Phosphoinositide 3-kinase

PONs : Paraoxonases

PON1 : Paraoxonase 1



PON2 : Paraoxonase 2

PON3 : Paraoxonase 3

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SR-BI : Récepteur scavenger B-I

TROLOX : 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

VLDL : Lipoprotéine de très faible densité

## CHAPITRE 1: INTRODUCTION

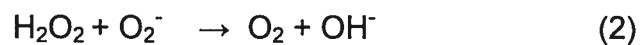
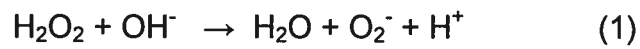
### 1.1 Revue de la littérature

#### 1.1.1 Stress oxydatif

La balance oxydo-réduction est maintenue par un équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants [McCall and Frei, 1999]. L'oxydation se traduit par une perte d'électrons du réducteur, entraînant un gain d'électrons par l'oxydant. Cet échange d'électrons laisse pourtant place à la formation d'espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non-pairés, appelés radicaux libres. Ces espèces radicalaires sont par définition très instables puisqu'elles possèdent des électrons disponibles pour réagir avec divers substrats organiques.

La production de radicaux libres est un processus naturel dans le métabolisme de l'oxygène et lors de l'inflammation [Shen et al., 1996]. Au niveau cellulaire, la production d'ATP par la mitochondrie implique l'utilisation d'oxygène et ainsi la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). De nombreux facteurs comme l'exercice physique et le tabagisme, agissant sur la combustion ou la modification de l'oxygène, entraînent également une augmentation de taux de radicaux libres [Ozguner et al., 2005; Senturk et al., 2005].

Les espèces réactives de l'oxygène les plus communes sont l'anion superoxide ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La demi-vie du radical hydroxyle est très courte, mais il s'agit du radical le plus virulent. Ce type de radical peut être formé à partir de superoxide et de peroxyde d'hydrogène via la réaction d'Harber-Weiss [Koppenol, 2001].



La réaction du cuivre ou du fer avec le peroxyde d'hydrogène permet également la formation d'un radical hydroxyle par la réaction de Fenton [Rice-Evans and Burdon, 1993].



Lorsque les niveaux d'espèces radicalaires et de pro-oxydants sont élevés, l'équilibre oxydo-réduction peut être maintenu grâce à une proportion accrue d'antioxydants [Serafini and Del Rio, 2004]. Cependant, un excès de radicaux libres, une diminution de la protection antioxydante ou une défaillance dans la capacité de réparer le dommage oxydatif, entraînent un déséquilibre d'oxydo-réduction [Halliwell, 1994]. Cette déstabilisation a des conséquences majeures puisqu'elle potentialise la réactivité de substrats organiques cruciaux à cause de leur contact avec les espèces radicalaires. En effet, le stress oxydatif

généralisé peut altérer la fonction des lipides, des protéines et même de l'ADN [Bernotti et al., 2003; Cochrane, 1991]. Ces dommages structuraux majeurs engendrent fréquemment une fonction cellulaire défectueuse, une diminution du statut antioxydant et une intensification de la détérioration initiale [Rice-Evans and Burdon, 1993].

### 1.1.2 Stress oxydatif et acides gras

La peroxydation des membranes cellulaires conduit inévitablement à une modification de l'activité et de la fonction de certaines de ses composantes. Le stress oxydatif modifie les acides gras polyinsaturés ainsi que la fluidité et la perméabilité membranaire. Il affecte également les enzymes associés à la membrane cellulaires, altère le transport ionique et induit la sortie de substrats des compartiments subcellulaires [Dinis et al., 1993; Eze, 1992]. De plus, les espèces réactives de l'oxygène peuvent initier la peroxydation des lipides au niveau des membranes intracellulaire; les lipides peroxydés ont alors des effets très néfastes sur la fonction cellulaire [Esterbauer, 1993; Terrasa et al., 2005]. L'ensemble de ces processus est initié lorsqu'une espèce réactive de l'oxygène déloge un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène d'un acide gras polyinsaturé sur une membrane. Cette altération crée un radical carbonyl sur la chaîne carbonique de l'acide gras, pouvant maintenant réagir avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxy. Cette étape donne

lieu à une réaction en chaîne puisque ce radical peut à son tour s'attaquer à un atome d'hydrogène d'un acide gras adjacent dans la membrane [Hedley and Chow, 1992]. Cette réaction est donc auto-catalytique et peut être amplifiée tant que l'oxygène est suffisant et que des acides gras non-oxydés sont disponibles [Rice-Evans and Burdon, 1993]. Lorsqu'ils sont présents, les antioxydants membranaires comme l' $\alpha$ -tocophérol peuvent interrompre la phase de propagation en neutralisant le radical [McCord, 2000].

### 1.1.3 Stress oxydatif et protéines

Les protéines sont également susceptibles d'être modifiées par les espèces radicalaires alkoxyl et peroxy, qui sont des intermédiaires de la peroxydation des lipides. Dépendamment de la nature des radicaux libres présents et de celle de la protéine, il est possible que cet assaut résulte en l'altération de l'activité enzymatique et de la fonction membranaire et cellulaire par l'agrégation ou la réticulation de récepteurs membranaires [Rice-Evans and Burdon, 1993]. La peroxydation de protéines de transport peut également entraîner un déséquilibre de l'homéostasie ionique et une accumulation de calcium. Par conséquent, les phospholipases et les protéases, dont l'activation est médiée par le calcium ou par l'accumulation de cet ion au niveau mitochondrial, peuvent causer des dommages membranaires importants, une détérioration cellulaire et l'initiation des lésions tissulaires [Dinis et al., 1993]

Les protéines constituent une cible importante pour les radicaux libres en vue de l'oxydation de leur structure principale, de l'attaque radicalaire sur un de leurs hydrogènes alpha d'un acide aminé pour former une molécule réactive. Cette réaction peut suivre le même type de chaîne autocatalytique que dans le cas de la peroxydation des lipides et ainsi déloger un autre hydrogène de cette même protéine ou d'une adjacente. Des dérivés alkoxy de protéines peuvent aussi être générés et engendrer une rupture de liens peptidiques [Stadtman, 2001]. L'oxydation de résidus d'acides aminés sur des chaînes latérales peut amener un changement de la structure tertiaire alors que l'interférence avec des groupements fonctionnels de liens peptidiques, l'interaction de radicaux avec la structure principale polypeptidique et avec les ponts hydrogène, peuvent modifier la structure secondaire [Rice-Evans and Burdon, 1993]. Le stress oxydatif peut donc mener à des changements de conformation des protéines et à leur inactivation. De plus, dépendamment de la nature de modifications apportées par l'oxydation, plusieurs protéines oxydées sont préférentiellement dégradées par certaines protéases intracellulaires alors que d'autres deviennent non seulement résistantes à la protéolyse mais inhibent également la capacité de protéases à dégrader d'autres protéines modifiées [Grune et al., 1995].

#### 1.1.4 Stress oxydatif et ADN

En plus de modifier la conformation de protéines, d'inactiver certaines enzymes et de peroxyder les membranes cellulaires, les radicaux libres peuvent également endommager l'ADN et ainsi mener à la cytotoxicité, la mutagénicité et la carcinogénicité [Kappus, 1986]. En effet, la modification irréversible du matériel génétique suite au stress oxydatif constitue une des premières étapes dans le processus carcinogène impliquant la mutagénèse et le vieillissement. Des modifications de bases, la production de sites avec des bases manquantes, des délétions, des mutations de changement de phase, la rupture de brins et les réarrangements chromosomiques sont les différentes formes d'altérations de l'ADN par les espèces réactives de l'oxygène [Prestwich et al., 2005; Valko et al., 2004]. Le radical hydroxyle est capable de réagir avec toutes les composantes de l'ADN, soit les purines, les pyrimidines et le squelette de déoxyribose [Jackson, 1994].

Des mécanismes de réparation spécifiques et non-spécifiques existent afin de remédier aux modifications des radicaux sur l'ADN. Néanmoins, ces processus peuvent aussi mener à la carcinogénèse lorsqu'une mauvaise réparation de l'ADN se produit, soit par une délétion ou un changement de base [Marnett, 2000]. Puisque le potentiel mutagène est souvent proportionnel aux lésions causées par le stress oxydatif et que les mécanismes permettant d'y remédier

décroissent dans le vieillissement, l'accumulation des lésions non-réparées sur l'ADN augmentent avec l'âge [Storz, 2005].

Les radicaux libres et le stress oxydatif causent donc des dommages importants puisqu'ils réagissent avec des macromolécules organiques comme les lipides, les protéines et l'ADN [Bernotti et al., 2003; Cochrane, 1991; Stadtman, 2001]. De toute évidence, les répercussions de ces altérations sont grandes à l'échelle tissulaire et dans l'organisme. À ce jour, il apparaît certain que le stress oxydatif joue un rôle majeur dans de nombreuses pathologies, comme les maladies cardiovasculaires, incluant l'athérosclérose [Yokoyama, 2004].

#### 1.1.5 Stress oxydatif et athérosclérose

Il est maintenant reconnu que l'athérosclérose constitue un état de stress oxydatif accru, marqué par l'oxydation de lipides et de protéines dans la paroi vasculaire. En effet, l'oxydation de lipides et la propagation sur d'autres acides gras polyinsaturés entraînent la libération de peroxydes lipidiques. Les produits de dégradation de ces lipides peuvent alors réagir sur l'apolipoprotéine B100 des lipoprotéines de faible densité (LDLs), altérant son activité physiologique. Ce processus est considéré comme athérogène puisqu'il provoque l'accumulation des LDLs qui sont normalement captées par



des récepteurs ayant un site de liaison pour l'ApoB100 [Boren et al., 2001; Ettelaie et al., 1999]. De plus, la pénétration des LDLs au niveau de l'intima et leur oxydation subséquente semble être une étape déterminante pour l'amplification du processus d'athérosclérose [Stocker and Keaney, 2004]. En effet, l'incubation de LDLs avec des cellules musculaires lisses ou des cellules endothéliales induit leur oxydation suite à la production de radicaux libres [Yokoyama, 2004]. Plusieurs évidences confirment l'hypothèse quant à l'implication du stress oxydatif dans la genèse des lésions endothéliales. En particulier, le potentiel pro-athérogène des oxLDLs a été confirmé par de nombreuses études [Fuhrman et al., 2004; Hulthe, 2004; Salonen et al., 2003; van Aalst et al., 2004]. Des LDLs petites et denses, formées par l'action de l'enzyme CETP (Cholesterol Ester Transfert Protein), sont également considérées comme étant pro-athérogènes. L'affinité de ce type de LDL pour son récepteur est beaucoup moins grande et demeure donc dans la circulation pour une plus grande période de temps. Ces lipoprotéines sont par conséquent plus susceptibles de subir des modifications oxydatives [Berneis and Rizzo, 2004; Homma, 2004].

Alors que l'oxydation des LDLs joue un rôle prépondérant dans l'initiation du processus de formation de la plaque athéromateuse par l'activation de l'adhésion des monocytes à l'endothélium et leur pénétration dans l'intima, le stress oxydatif intervient aussi à d'autres niveaux dans les maladies

cardiovasculaires [Poli et al., 2004; Stocker and Keaney, 2004; Yokoyama, 2004]. Cette implication inclut la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote par les cellules vasculaires ainsi que des modifications oxydatives contribuant à d'importantes manifestations cliniques observées dans les maladies coronariennes. Par exemple, la production non-régulée d'oxydants a pour conséquence l'élaboration et l'activation d'enzymes au niveau de la capsule fibreuse de la plaque, susceptibles de promouvoir son détachement [Stocker and Keaney, 2004]. Les espèces réactives de l'oxygène interviennent également dans la signalisation cellulaire via des molécules réactives telles que les céramides, les sphingolipides et les isoprostanes, qui modulent certaines kinases et phosphatases [Poli et al., 2004]. Le stress oxydatif est donc impliqué dans plusieurs sentiers métaboliques aboutissant au développement des maladies cardiovasculaires.

#### 1.1.6 Stress oxydatif et diabète

La principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients diabétiques sont les complications au niveau vasculaire. Le stress oxydatif semble jouer un rôle prédominant dans leur étiologie puisque plusieurs voies biochimiques, telles que la glycation et les modifications de protéines, induisent la production de radicaux libres [Scott and King, 2004]. Également, l'exposition continue des cellules endothéliales à d'importants taux de glucose résulte en

l'accroissement de la production de radical superoxide [Giugliano et al., 1996; Johansen et al., 2005]. Finalement, le stress oxydatif accélère les effets pathogènes de taux de glucose élevés sur les tissus microvasculaires [Davi et al., 2005; Scott and King, 2004].

### 1.1.7 Stress oxydatif et cancer

Alors que le stress oxydatif a également des répercussions sur le plan génétique par la modification de l'ADN, les espèces réactives de l'oxygène sont perçues comme une classe importante de carcinogènes [Valko et al., 2004]. De nombreuses études confirment que les cellules cancéreuses sont soumises à un stress oxydatif accru associé à une plus grande production de radicaux libres, des transformations oncogéniques et des altérations de l'activité métabolique, surtout au niveau mitochondrial [Behrend L, 2003; Kang and Hamasaki, 2003; Pelicano et al., 2004]. Par conséquent, des niveaux élevés de stress oxydatif dans les cellules cancéreuses ont des répercussions néfastes telles que la stimulation de la prolifération cellulaire, favorisant l'occurrence de mutations et l'instabilité génétique [Pelicano et al., 2004].

D'ailleurs, cette labilité génétique des cellules cancéreuses est potentiellement due à des mutations des différents gènes dont les produits protéiniques assurent normalement l'intégrité de l'ADN [Barnes and Lindahl, 2004]. Les

dommages de l'ADN, les mécanismes de réparation déficients, la réduction de l'apoptose et l'induction de la prolifération cellulaire sont tous associés au stress oxydatif et contribuent à l'augmentation du pool de cellules génétiquement altérées ayant un pouvoir mitogénique [Valko et al., 2004]. Les espèces réactives de l'oxygène ont aussi un rôle à jouer dans la formation de métastases. En effet, elles diminuent l'adhésion cellulaire et augmentent le potentiel migratoire et invasif des cellules cancéreuses. Ce processus permet aux cellules de la tumeur d'accéder à la vasculature et de se répandre [Storz, 2005]. En résumé, le stress oxydatif intervient non seulement dans les premières étapes qui provoquent des modifications génétiques dans le développement du cancer, mais également dans celles reliées à sa progression et sa diffusion.

#### 1.1.8 Stress oxydatif et fibrose kystique

Outre les maladies cardiovasculaires et le cancer, le stress oxydatif est reconnu pour jouer un rôle majeur dans la pathophysiologie de nombreuses maladies telle que la fibrose kystique. Un grand nombre d'études ont démontré que les niveaux de stress oxydatif sont élevés chez les patients atteints de la fibrose kystique en parallèle avec un statut antioxydant largement diminué [Benabdeslam et al., 1999; Brown et al., 1996; McGrath et al., 1999; Wood et al., 2001].

Le stress oxydatif accru observé dans la fibrose kystique s'explique par de nombreux facteurs dont l'infection pulmonaire, l'inflammation et la malnutrition. Tout d'abord, l'obstruction des bronchioles par le mucus favorise l'accumulation et la multiplication des bactéries au niveau pulmonaire. Les neutrophiles tentent donc d'éliminer les agents infectieux en libérant de considérables concentrations de radicaux libres qui malheureusement exacerbent la maladie [Wood et al., 2001]. De plus, l'augmentation du métabolisme de base chez les patients atteints de fibrose kystique, due en grande partie à une demande énergétique accrue lors de la respiration, résulte en une augmentation considérable des espèces réactives de l'oxygène [Bell et al., 1996; Wood et al., 2001].

Le déséquilibre oxydo-réduction dans la pathologie de la fibrose kystique se caractérise également par un statut antioxydant diminué. La malabsorption intestinale et la digestion anormale des aliments est à l'origine des carences en antioxydants [Back et al., 2004]. L'obstruction des conduits pancréatiques par un mucus épais résulte en l'hyposécrétion d'enzymes digestives, d'où la stéatorrhée notoire observée dès le jeune âge. La malabsorption affecte également les vitamines antioxydantes liposolubles et perturbe l'équilibre prooxydants/antioxydants [Dodge, 1985; Wood et al., 2005]. Dernièrement, il s'est avéré que la mutation du gène codant pour la protéine CFTR (Transmembrane Conductance Regulator) réduit le transport du glutathion

réduit (GSH) au détriment donc des défenses antioxydantes [Hudson, 2001; Velsor et al., 2001]. Le concept actuel veut que le stress oxydatif dans la fibrose kystique soit dû à une combinaison de plusieurs facteurs : infection, inflammation, métabolisme anormal et malabsorption.

#### 1.1.9 Stress oxydatif et maladie de Crohn

La maladie de Crohn se caractérise également par un stress oxydatif élevé et un statut antioxydant diminué suite à l'inflammation et à la malabsorption intestinale. Cette maladie est une inflammation chronique de la paroi intestinale, pouvant survenir tout le long du tractus gastro-intestinal, mais se localisant le plus souvent dans la région distale du petit intestin [Grand et al., 1995; Levy et al., 2000]. Cette maladie se distingue également par une élévation de l'activité immune liée à l'inflammation et ne se résorbant pas après la neutralisation de l'infection. La réponse inflammatoire provoque une activation des neutrophiles produisant des radicaux libres hautement réactifs qui peuvent attaquer les cellules adjacentes par la peroxydation des lipides, agrandissant ainsi l'étendue des dommages [Reimund et al., 2000]. La production de radicaux libres excessivement élevée chez les patients affecte l'épithélium intestinal, d'où la recrudescence des désordres locaux [Kruidenier et al., 2003; Tuzun et al., 2002; Wendland et al., 2001].

La malnutrition et la malabsorption intestinale est à l'origine des carences en antioxydants observées chez les patients avec maladie de Crohn. Tout d'abord, l'apport alimentaire des patients est souvent inadéquat et insuffisant. L'obstruction intestinale causée par la présence de fistules s'accompagne de fortes douleurs abdominales et de nausées et provoque fréquemment une appréhension à s'alimenter. De plus, les résections, les lésions et l'inflammation dans le tractus intestinal diminuant l'aire d'absorption viable provoquent une malabsorption [Geerling et al., 1999]. L'interaction entre les médicaments administrés aux patients avec différents nutriments peut aussi entraîner une mauvaise digestion et absorption, aggravant la déficience en vitamines et en calcium [Geerling et al., 1999; Krok and Lichtenstein, 2003]. Les pertes au niveau intestinal de même qu'une augmentation de la demande énergétique sont également des facteurs importants dans le développement de la malnutrition chez les patients atteints de la maladie de Crohn [Griffiths, 1998; Kushner and Schoeller, 1991]. Les répercussions sur l'organisme d'une augmentation des radicaux libres et d'une diminution des systèmes de défense antioxydants, brisant l'équilibre normalement existant, sont donc très significatives.

### 1.1.10 Antioxydants

Un déséquilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants entre ainsi en jeu dans diverses pathophysiologies. Les antioxydants sont donc essentiels dans la lutte au stress oxydatif puisqu'ils permettent de neutraliser les radicaux libres et de rétablir l'équilibre oxydo-réduction. Deux types d'antioxydants, les antioxydants exogènes et endogènes, permettent à l'organisme de se doter d'un bon mécanisme de défense et de limiter les dommages engendrés par les radicaux libres.

### 1.1.11 Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes sont ceux que l'on retrouve dans l'alimentation, surtout dans les fruits et légumes [Blomhoff, 2005]. La vitamine E est reconnue comme un antioxydant puissant possédant un rôle protecteur contre plusieurs maladies chroniques, incluant les maladies cardiovasculaires [Singh et al., 2005]. La vitamine E comprend huit différentes formes dont  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, et  $\delta$ -tocophérols et  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, et  $\delta$ -tocotrienols; chacune des formes diffère par sa biodisponibilité, son activité biologique et sa capacité à soulager les effets d'une déficience en antioxydants [Singh et al., 2005; Traber and Arai, 1999]. De nombreuses études ont cependant démontré une plus grande efficacité de la forme  $\alpha$ -tocophérol en tant qu'antioxydant dans le plasma et au niveau des



LDL. Son caractère liposoluble et son incorporation préférentielle dans les lipoprotéines expliquent son efficacité dans la prévention de la peroxydation des composantes lipidiques des LDLs [Thomas and Stocker, 2000]. La forme  $\alpha$ -tocophérol possède également des propriétés anti-inflammatoires et inhibe certaines étapes cruciales dans l'athérogénèse [Meydani, 2004]. Malgré les effets bénéfiques de la vitamine E dans les tests in vitro et les modèles animaux, les études chez l'humain sont controversées et ne semblent pas, en général, démontrer d'effets avantageux de la supplémentation dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer [Kinlay et al., 2004; Lee et al., 2005; Lonn et al., 2005; Singh et al., 2005].

La vitamine C, ou ascorbate, est reconnue comme un excellent antioxydant hydrosoluble, en plus d'être un nutriment essentiel et un cofacteur pour de nombreux enzymes. La prise de vitamine C en quantité suffisante dans l'alimentation réduit les risques de plusieurs maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, les maladies ophtalmiques et neurodégénératives [Jacob and Sotoudeh, 2002]. Alors que la dysfonction de l'endothélium et la perte de vasodilatation observées notamment dans l'athérosclérose sont associées à une libération moindre d'oxyde nitrique, la vitamine C prévient la dégradation de ce dernier et permet de contrer ce processus. Selon des études, la vitamine C prévient la dysfonction endothéliale en inhibant l'oxydation des LDLs, en neutralisant les radicaux superoxide

intracellulaires, en permettant la réduction du nitrite et en activant la synthèse enzymatique d'oxyde nitrique [Carr et al., 2000; May, 2000]. Tout comme la vitamine E, les effets de la supplémentation de vitamine C en vue de ses propriétés antioxydantes ne sont pas clairs et les résultats sont mitigés chez l'humain [Fumeron et al., 2005; Huang et al., 2002; Kim et al., 2002; Scott et al., 2005].

Les agents polyphénoliques provenant de plantes sont une classe importante d'antioxydants, abondants dans l'alimentation [Scalbert et al., 2005]. Leur consommation suggère des effets positifs dans la prévention des maladies cardiovasculaires mais non du cancer [Arts and Hollman, 2005]. Parmi cette grande classe de composés, les flavonoïdes permettent la neutralisation des radicaux libres et la vasodilatation [Woodman and Chan, 2004]. Les polyphénols comprennent de nombreuses molécules qui se combinent dans l'organisme et dont les métabolites subséquents sont parfois plus actifs, ce qui rend la recherche sur leurs implications difficile [Scalbert et al., 2005]. De plus en plus d'études leur confèrent des propriétés qui vont au-delà de leur capacité antioxydante, comme le rôle modulateur dans différentes voies de signalisation telles que le sentier des MAP kinases et PI 3-kinase [Stoclet et al., 2004; Williams et al., 2004].

Les caroténoïdes, des pigments organiques, se retrouvent dans les plantes et possèdent des propriétés antioxydantes. Ces composants sont très efficaces pour neutraliser l'oxygène singulet et autres espèces réactives de l'oxygène [Truscott et al., 1995]. Ils permettent également un renforcement du système immunitaire et exhibent des propriétés anti-inflammatoires [Chew and Park, 2004]. Certaines molécules de la famille des caroténoïdes, comme la  $\beta$ -carotène et le lycopène, ont des propriétés anticarcinogènes et sont utiles dans la prévention du cancer [Nishino et al., 2002]. Cependant, des évidences montrent que les caroténoïdes pourraient dans certaines conditions se comporter comme des prooxydants [Lowe et al., 2003]. Dans cette optique, l'augmentation des doses de caroténoïdes pourrait ne pas se traduire en des bénéfices concrets [Lowe et al., 1999].

Alors que les caroténoïdes en sont les précurseurs, le rétinol ou vitamine A sont également considérés comme des antioxydants. Tout comme la vitamine E, le rétinol se retrouve notamment dans les LDL, leur conférant une protection additionnelle contre l'oxydation [Duvall, 2005]. La vitamine A semble donc réduire les risques de maladies cardiovasculaires mais peut aussi diminuer ceux du cancer. La supplémentation de très fortes doses peut induire une toxicité étant donné la régulation minutieuse du rétinol plasmatique et son stockage au niveau du foie [Dawson, 2000].

### 1.1.12 Antioxydants endogènes

Malgré les études *in vitro* montrant clairement les effets protecteurs des antioxydants exogènes contre le stress oxydatif dans des pathologies comme l'athérosclérose et le cancer, les études de supplémentation d'un ou plusieurs de ces antioxydants ont démontré des résultats mitigés et même décevants [Clarke and Armitage, 2002; Williams and Fisher, 2005]. Il apparaît maintenant évident que le mécanisme d'action des antioxydants est complexe et que leur action est synergique [Liu, 2004]. L'apport en antioxydants exogènes est plus complet lorsqu'il provient de l'alimentation; les fruits et légumes en renferment une grande diversité dont les suppléments synthétiques ne peuvent imiter les bénéfices [Blomhoff, 2005; Devasagayam et al., 2004]. De plus, l'échec de la supplémentation d'antioxydants exogènes a mis en évidence l'importance de pousser la recherche sur les systèmes de défenses antioxydantes endogènes [Devasagayam et al., 2004].

### 1.1.13 Catalase

Les antioxydants endogènes sont des enzymes permettant de transformer des espèces réactives de l'oxygène en une molécule moins réactive pour ensuite les neutraliser. Par exemple, la catalase est une enzyme hématique et tétramérique constituée de quatre sous-unités de 60 kDa identiques capable

de réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former de l'eau et de l'oxygène [Mates et al., 1999]. La catalase se retrouve chez un grand nombre d'organismes, comme dans l'ensemble des eucaryotes aérobies, et se localise plus précisément dans le peroxysome [Maritim et al., 2003]. La catalase est une enzyme des plus efficaces pour la protection des différents constituents cellulaires comme les lipides et les protéines et elle est cruciale au maintien d'un fonctionnement cellulaire adéquat. Cette enzyme n'atteint jamais un niveau de saturation, même en présence de très fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène [Lledias et al., 1998]. Elle joue également un rôle dans l'adaptation de la cellule face au stress oxydatif, augmentant ainsi sa survie [Mates and Sanchez-Jimenez, 1999; Shim et al., 2005]. L'addition de peroxyde d'hydrogène produit une augmentation des taux d'ARNm de catalase à la fois dans des cellules fibroblastiques en prolifération et en pleine confluence [Mates et al., 1999]. Certaines conditions pathologiques entraînent, cependant, une diminution ou une augmentation des taux de catalase, dépendamment des organes et du désordre. Par exemple, le diabète semble augmenter les taux de catalase au niveau du cœur et de l'aorte, alors que les tumeurs diminuent sa synthèse [Goth et al., 2004; Maritim et al., 2003]. Des mutations de la catalase ont également été détectées dans certaines pathologies comme le diabète, l'hypertension et le vitiligo [Goth et al., 2004]. Les espèces réactives de l'oxygène peuvent oxyder la catalase sans toutefois affecter son activité [Lledias et al., 1998]. La catalase est donc une enzyme antioxydante

importante qui agit en présence de stress oxydatif sévère [Mates and Sanchez-Jimenez, 1999].

#### 1.1.14 Superoxide dismutase

La superoxide dismutase est également une enzyme antioxydante importante puisqu'elle permet la transmutation du superoxide en peroxyde d'hydrogène, une espèce moins réactive qui est par la suite traitée par la catalase. Il existe trois types de superoxide dismutase chez l'humain, soit la SOD-Cu/Zn cytosolique, la SOD-Mn mitochondriale et la SOD extracellulaire [Mates et al., 1999]. Le mécanisme par lequel la superoxide dismutase neutralise le radical superoxide est constitué d'une série de réactions d'oxydation et de réduction successives du métal de transition, avec une vitesse de réaction extrêmement rapide [Meier et al., 1998]. L'enzyme cytosolique est composée de deux sous-unités identiques de 32 kDa, chacune contenant un site actif composé d'un atome de cuivre et un autre de zinc, reliés par un groupement histidine [Banci et al., 1998]. Cette enzyme est exprimée dans plusieurs tissus normaux alors que son expression est significativement moindre dans les tumeurs [Mates and Sanchez-Jimenez, 1999]. Quant à la superoxide dismutase mitochondriale, elle est formée d'un homotétramère de 96 kDa avec un atome de manganèse pour chaque sous-unité. Puisque la respiration cellulaire dans la mitochondrie utilise l'oxygène et que ce processus génère nécessairement des radicaux libres, la

SOD-Mn joue un rôle crucial dans les situations d'aérobie et dans le développement de la résistance cellulaire à la toxicité engendrée par les espèces radicalaires [Mates et al., 1999]. La SOD mitochondriale n'est pas exprimée dans la majorité des tissus. Elle est retrouvée dans les tumeurs, les cellules vasculaires et musculaires lisses, les macrophages pulmonaires et certaines classes de fibroblastes [Zelko et al., 2002]. Les cytokines peuvent induire ou réprimer l'expression de la SOD mitochondriale alors que les oxydants ne l'influencent que très modérément [Stralin and Marklund, 1994; Zelko et al., 2002]. La dernière superoxide dismutase est extracellulaire et est formée d'un tétramère d'environ 135 kDa contenant un atome de cuivre et un atome de zinc. Elle possède une homologie au niveau de la séquence centrale avec la SOD cytosolique et contient tous les ligands essentiels pour la coordination du site actif où se positionnent les métaux. Ce type de SOD est une glycoprotéine ayant la capacité de se lier à de nombreux éléments de la matrice extracellulaire comme le collagène, ce qui facilite une grande distribution de l'enzyme [Petersen and Enghild, 2005]. Sa régulation est contrôlée davantage par des cytokines que par différents oxydants [Mates et al., 1999]. Les trois types de superoxide dismutase sont donc essentiels au maintien de l'équilibre oxydo-réduction en vue de la transformation des radicaux superoxide en une espèce moins réactive, limitant par conséquent les dommages causés aux tissus.

### 1.1.15 Glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase est une autre enzyme antioxydante importante dans le maintien d'un statut antioxydant adéquat. Cette enzyme est une peroxydase de 80 kDa comprenant quatre sous-unités ayant chacune une molécule de sélénocystéine. La glutathion peroxydase permet donc la réduction de plusieurs hydroperoxydes et du peroxyde d'hydrogène en utilisant la forme réduite du glutathion [Ding et al., 1998]. Même si la glutathion peroxydase s'attaque au peroxyde d'hydrogène comme substrat tout comme la catalase, il peut également se mesurer aux lipides et autres hydroperoxydes organiques, ce qui ne laisse pas de place pour la compétition. Il est à préciser que la glutathion peroxydase agit sur des taux de stress oxydatif plus faible que la catalase [Mates and Sanchez-Jimenez, 1999].

L'ensemble des antioxydants endogènes et exogènes font partie du statut antioxydant permettant de maintenir l'équilibre oxydo-réduction et de lutter contre le stress oxydatif. Dans certaines pathologies, cet équilibre est rompu soit par un statut antioxydant diminué ou par un excès de radicaux libres, ce qui contribue à l'étendue des lésions et des dommages. Le rétablissement de cet équilibre passe par une augmentation de la défense antioxydante pour neutraliser un maximum de radicaux libres et ainsi diminuer les taux d'espèces réactives de l'oxygène. La première approche proposée a donc été la



supplémentation d'antioxydants exogènes à la fois pour prévenir les risques de pathologies associées au stress oxydatif mais également pour limiter les dommages en période active de la maladie. Tel que mentionné précédemment, la prise d'antioxydants tel que la vitamine E a eu peu d'impact sur l'état pathophysiologique incluant le stress oxydatif. Cet échec a eu comme répercussion une intensification des recherches concernant les antioxydants endogènes décrits précédemment comme la catalase, la superoxyde dismutase et le glutathion peroxidase, en plus de permettre la découverte de nouvelles enzymes antioxydantes comme les paraoxonases (PONs).

#### 1.1.16 Paraonoxases

La famille des gènes des paraonoxases comprend PON1, PON2 et PON3, localisés sur le chromosome 7q21.3-22.1 et leur séquence possède environ 65% d'homologie au niveau des acides aminés [Li et al., 2003; Primo-Parmo et al., 1996]. Leur rôle physiologique exact ainsi que leurs substrats naturels demeurent incertains, bien que de nombreuses études aient démontré la capacité des PONs à hydrolyser de nombreux substrats comme des organophosphates, des esters aromatiques et des acides carboxyliques [Draganov et al., 2005]. Alors que certaines spéculations sur l'origine des PONs laissaient croire que ces enzymes provenaient de serine estérases et carboxylases, il est maintenant clair que l'homologie structurale n'est pas en

lien avec une estérase ancestrale commune malgré quelques substrats identiques [La Du et al., 1999].

Une duplication du gène au cours de l'évolution serait à l'origine de cette redondance des PONs, ce qui laisse croire que ces enzymes possèdent une fonction physiologique importante et toute particulière. En plus de détoxifier un important nombre de substrats, les PONs sont également protectrices contre le stress oxydatif, inhibent l'oxydation des LDLs et contrent les effets des bactéries endotoxines [La Du et al., 1999]. Ces propriétés ont tout d'abord été attribuées à PON1, l'enzyme la plus étudiée de cette famille et possiblement la plus récente dans l'évolution.

#### 1.1.17 PON1

PON1 a d'abord été décrite par Mazur en 1946 durant des études d'hydrolyse enzymatique d'organophosphates, puis par Aldridge qui a étudié l'hydrolyse du paraoxon dans le sérum humain. C'est seulement en 1996 que PON1 a été décrite comme faisant partie d'une famille de plusieurs gènes [Primo-Parmo et al., 1996]. PON1 possède des caractéristiques qui lui sont propres, comme l'activité arylesterase et paraoxonase, qui sont quasi-inexistantes chez PON2 et PON3 [Draganov and La Du, 2004]. Son activité arylesterase lui permet de convertir l'acétate de phényle en phénol, alors que son activité paraoxonase

détoxifie le paraoxon en p-nitrophénol. PON1 possède en plus une activité lactonase et est capable d'hydrolyser des agents neurotoxiques comme le sarin et le soman [Bargota et al., 2003].

PON1 est une protéine de 43 kDa et son activité nécessite la présence de calcium. En effet, son site actif contient deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  se liant avec des constantes de dissociation de 0.36 et 6.6  $\mu\text{M}^{-1}$  [Draganov and La Du, 2004]. Le site de liaison ayant la plus grande affinité permet le maintien de la conformation du site actif et de sa stabilité. Le second site de liaison est spécifique au calcium et permet la sortie du phosphate diéthylique du site actif par une polarisation du double lien P-O du paraoxon, permettant l'attaque d'un nucléophile sur le phosphore [Mackness et al., 1998]. Une dyade de deux histidines au site actif permettrait cependant la première étape par la déprotonation d'une molécule d'eau pour former un anion hydroxyde qui attaque l'ester carbonyle [Harel et al., 2004].

Les polymorphismes de PON1 modulent à la fois son activité et son expression. Les deux polymorphismes majeurs sont représentés par la substitution d'un acide aminé en position 55 (leucine vs méthionine) et en position 192 (glutamine vs arginine) [Aviram et al., 2000]. Les taux de PON1 dans le sérum sont très variables dans une population, en relation aux polymorphismes. L'activité enzymatique d'hydrolyse du paraoxon est la plus

élevée chez les individus PON1 55 LL et 192 RR et la plus faible chez les individus PON1 55 MM et 192 QQ [Mackness et al., 2002b]. Les hétérozygotes ont donc une activité enzymatique intermédiaire. Il semble aussi que les polymorphismes reliés à la protection contre l'oxydation des LDLs soient le contraire de ceux pour l'activité hydrolytique du paraoxon [Li et al., 2003].

Trois autres polymorphismes se retrouvent également sur le promoteur du gène (-909G > C, -162A > G, -108C > T) [Chen et al., 2005; Leviev et al., 2001]. Le polymorphisme -108 a pour effet d'augmenter l'activité de PON1, contrairement à -162 qui causerait une activité inférieure [Brophy et al., 2001]. Les polymorphismes -108T et -909G ont été corrélés avec des concentrations de PON1 les plus élevées, le premier de ses sites ayant un effet dominant sur l'expression [Leviev et al., 2001]. Les polymorphismes du promoteur du gène de PON1 ont donc un impact majeur sur son expression et sur les taux plasmatiques de l'enzyme. Par contre, des facteurs environnementaux expliquent aussi l'énorme variabilité interindividuelle des taux d'activité de PON1, comme l'usage de la cigarette, l'âge, l'alimentation, la prise de médicaments, l'exposition à des composés chimiques et certaines conditions pathophysiologiques [Costa et al., 2005].

PON1 n'est pas libre dans la circulation car elle est liée aux lipoprotéines de haute densité (HDLs), une association essentielle au maintien d'une activité enzymatique normale dans le sérum. Cette lipoprotéine offre un environnement amphiphile pour dissimuler et ancrer la région hydrophobe N-terminale de PON1, fournissant du même coup un milieu favorable à l'interaction avec ses substrats [James and Deakin, 2004]. Puisque les HDLs sont reconnues comme étant athéroprotecteurs, il est clair que PON1 y joue un rôle important par ses propriétés antioxydantes et que cette localisation est idéale afin de réaliser sa pleine fonction. En effet, les lipides des lipoprotéines reviennent de façon cyclique aux HDLs par les boucles du métabolisme comme le transport inverse du cholestérol et la lipolyse de lipoprotéines riches en triglycérides [Tall, 1990]. Ce processus a pour effet l'incorporation de lipides provenant de l'alimentation dans les HDLs, dont plusieurs sont oxydés. Ce transporteur est aussi idéal par sa capacité de circuler dans le sang et de parvenir à proximité de certains tissus et membranes cellulaires, donnant une plus grande étendue à son rôle antioxydant [James and Deakin, 2004].

La présence des HDLs est cruciale à la libération de PON1 du foie où elle est synthétisée. L'apoA-I, l'apoA-II, les phospholipides ou les lipoprotéines de faible densité ne peuvent se substituer efficacement aux HDLs comme accepteur physiologiques de PON1, mais sont nécessaires pour promouvoir la libération et la stabilité du complexe [James and Deakin, 2004]. De faibles

concentrations de PON1 ont également été détectées dans les VLDLs qui en seraient un vecteur de sécrétion, mais moins stable que les HDLs. Cette association est bénéfique car elle confère à ces VLDLs des propriétés antioxydantes [Deakin et al., 2005]. Avant sa libération, PON1 s'accumule dans la membrane externe cellulaire à laquelle le HDL se connecte provisoirement pour permettre la désorption de PON1 avec une grande affinité [Deakin et al., 2002]. En circulation, la fraction HDL<sub>3</sub> semble posséder la plus grande activité enzymatique PON1 [Bergmeier et al., 2004].

Les taux de HDL-cholestérol sont inversement corrélés avec les risques de maladies cardiovasculaires. Lors du processus athérogénique, une captation trop élevée en LDLs modifiées et en lipoprotéines résiduelles par les macrophages de la paroi vasculaire mènent à la formation de cellules spumeuses regorgeant de gouttelettes de cholestérol estérifié [Libby, 2001]. Dans ce processus, l'efflux de cholestérol par les HDLs est crucial et permet soit de prévenir, soit de renverser l'athérosclérose. Les transporteurs ATP-binding cassette (ABC) facilitent cette sortie du cholestérol des macrophages [Linsel-Nitschke and Tall, 2005]. Le récepteur éboueur SR-BI peut également prévenir l'accumulation de cholestérol dans les macrophages en facilitant l'efflux de cholestérol et en permettant le transfert des lipides des HDLs vers le foie [von Eckardstein et al., 2005]. Ces processus d'efflux sont donc potentiellement anti-athérogènes et les HDLs en sont le pivot central. De plus,

les HDLs permettent d'inhiber l'oxydation des LDLs et les effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène par différents mécanismes, particulièrement le PON1.

PON1 est une enzyme antioxydante puissante qui confère cette propriété aux HDLs. Alors que les HDLs sont protecteurs contre l'athérogénèse par l'inhibition de l'oxydation des LDLs, plusieurs études confirment que PON1 en est en grande partie responsable [Navab et al., 1996]. Tout d'abord, on remarque une réduction de la formation de lipoperoxydes et de substances réactives avec l'acide thiobarbiturique lors de l'ajout de HDLs ou de PON1 purifiée à un mélange de LDLs et de cuivre. Cette inhibition de la peroxydation des LDLs met en lumière l'importance de PON1 dans le pouvoir antioxydant des HDLs [Mackness et al., 1991]. De même, la diminution de lipides peroxydés dans les LDLs en présence de HDL ou de paraoxonase est dépendante de la concentration de ces dernières. D'une part, l'activité paraoxonase corrèle bien avec le degré de protection offert par les HDLs contre l'oxydation [Mackness et al., 1993]; d'autre part, l'incubation de LDL minimalement oxydées avec l'enzyme PON1 purifiée résulte en une réduction considérable de leur habileté à induire des interactions entre les monocytes et la paroi endothéliale. On comprend donc que l'inactivation de PON1 au cours de ce processus réduit la capacité des HDLs à inhiber les modifications générées par les LDLs [Watson et al., 1995].

PON1 constitue par le fait même une enzyme antioxydante prépondérante permettant de contrer la peroxydation des lipides et son association aux HDLs lui donne une grande importance dans la lutte au stress oxydatif dans de nombreuses pathologies, dont l'athérosclérose. L'hydrolyse de lipides peroxydés par PON1 au niveau des lésions athérosclérotiques chez l'humain constitue un mécanisme antiathérogène [Aviram et al., 2000]. De plus, un modèle de souris avec une suppression moléculaire de PON1 a clairement démontré les effets athéroprotecteurs de cette enzyme. Les HDLs isolées de ces souris sont incapables de prévenir et d'inhiber l'oxydation des LDLs dans une co-culture modélisant la paroi vasculaire. De plus, les HDLs et les LDLs sont plus susceptibles d'être oxydées dans cette co-culture que les lipoprotéines isolées à partir du type sauvage. Finalement, lorsqu'elles sont soumises à une diète riche en gras et en cholestérol, les souris knockout sont plus à risque de développer l'athérosclérose en comparaison au type sauvage [Shih et al., 1998].

L'implication de PON1 dans la prévention de l'athérosclérose a été le sujet de nombreuses investigations surtout à cause des polymorphismes qui modulent son activité. Certaines études ont mis en évidence une association significative entre le polymorphisme 192R et la présence de maladies cardiovasculaires [Ito et al., 2002; Oliveira et al., 2004; Osei-Hyiaman et al., 2001; Voetsch et al., 2002]. L'allozyme R de PON1 est moins efficace pour différer l'oxydation des



LDLs en comparaison à l'allozyme Q et ceci est dû à une plus faible hydrolyse des lipides peroxydés [Mackness et al., 1997]. Par contre, d'autres études épidémiologiques n'ont trouvé aucun lien entre les polymorphismes de PON1 et ces pathologies [Arca et al., 2002; Malin et al., 2001; Ombres et al., 1998; Yamada et al., 2002]. Une méta analyse récente n'a également décelé aucun lien significatif entre les polymorphismes -55 et -192 et les maladies cardiovasculaires [Wheeler et al., 2004]. Le lien entre les polymorphismes de PON1 et les risques de maladies cardiovasculaire demeure donc nébuleux.

D'autres pathologies ont également des corrélations avec des taux faibles d'activité et de protéine PON1. Tel est le cas du syndrome métabolique dans lequel les LDLs sont plus athérogènes en étant petites et denses, mais les taux de PON1 sont plus faibles [Garin et al., 2005]. Chez le rat, avec l'induction d'une cirrhose hépatique, une diminution de l'activité de PON1 dans les microsomes explique la peroxydation des lipides et les dommages causés au foie avant l'occurrence de la cirrhose [Ferre et al., 2001]. Chez les patients avec diabète de type 2 également atteints de maladies macrovasculaires, les taux de LDLs oxydées sont plus élevés simultanément aux niveaux abaissés de PON1 [Tsuzura et al., 2004]. De plus, l'usage de la cigarette chez les patients avec diabète de type 2 diminue les taux et l'activité de PON1 [Boemi et al., 2004]. L'activité de PON1 est également réduite dans les cas de diabète de type 1, limitant la capacité d'inhiber l'oxydation des LDLs, malgré des taux

de HDLs acceptables lors d'un bon contrôle de la glycémie [Mackness et al., 2002a]. D'autres pathologies ont également été reliées à des taux inférieurs de PON1 tels que la colite ulcéreuse et la démence, incluant l'Alzheimer et la démence vasculaire [Baskol et al., 2005; Dantoine et al., 2002; Helbecque et al., 2004]. La diminution de PON1 dans ces désordres signifie que l'enzyme se "sacrifie" pour lutter contre le stress oxydatif abondant afin de protéger d'autres protéines et lipides dont la fonction est essentielle. De plus, les polymorphismes de PON1 ont aussi été corrélés avec l'incidence de Parkinson et de certains cancers, comme ceux du pancréas, de l'estomac et de la prostate [Akçay et al., 2003a; Akçay et al., 2003b; Antognelli et al., 2005; Zintzaras and Hadjigeorgiou, 2004]. En somme, l'implication de PON1 dans ces pathologies montre bien la place importante de cette enzyme antioxydante dans la lutte contre le stress oxydatif et sa nécessité dans le maintien de l'équilibre oxydo-réduction.

#### 1.1.18 PON2

Alors que PON1 est davantage protecteur au niveau circulatoire, PON2 inhibe également les effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène au niveau cellulaire [Aviram, 2004]. En effet, PON2 n'est pas associée aux HDLs et ne se retrouve pas dans la circulation mais est plutôt exprimée dans de nombreux tissus comme le cœur, le placenta, les testicules, les poumons et le foie [Li et

al., 2003; Ng et al., 2001]. Cette protéine de 40 kDa ne présente pas les activités enzymatiques paraoxonase et arylesterase qui caractérisent PON1 et ne détoxifie donc pas contre les organophosphates. Cependant, PON2 est un antioxydant endogène puissant capable de réduire le stress oxydatif intracellulaire et de prévenir l'oxydation des LDLs initiée au niveau cellulaire [Li et al., 2003]. La surexpression de PON2 dans les cellules HeLa amène une diminution significative du stress oxydatif cellulaire après un traitement au peroxyde d'hydrogène ou aux phospholipides oxydés. De plus, ces cellules ont une capacité réduite à oxyder et à modifier les LDLs, pouvant même renverser les effets des LDLs minimalement oxydées [Ng et al., 2001]. PON2 est aussi exprimée au niveau des macrophages où elle exerce son rôle antioxydant. Contrairement à PON3, l'expression de PON2 augmente significativement dans les macrophages en présence de stress oxydatif, ce qui constitue un mécanisme de réponse cellulaire sélectif et compensatoire [Rosenblat et al., 2003]. Cette augmentation de l'expression de PON2 dans les monocytes se différenciant en macrophages est de l'ordre de cinq à huit fois et résulte de l'activation du NADPH oxydase, régulée notamment par le facteur de transcription AP-1 [Shiner et al., 2004]. Ce processus, en plus de la diminution de stress oxydatif intracellulaire et de l'inhibition de l'oxydation des LDLs, font de PON2 une protéine athéroprotectrice permettant d'atténuer la formation de cellules spumeuses [Aviram and Rosenblat, 2004]. De plus, il est important de

souligner que l'expression de PON2 dans un grand nombre de tissus suggère que cette protéine peut jouer un rôle protecteur.

Tout comme PON1, PON2 possède des polymorphismes donnant lieu à des substitutions d'acides aminés. Ceux-ci se retrouvent en position 148 (glycine ou alanine) et en position 311 (cystéine ou serine) [Li et al., 2003]. Il y a un déséquilibre de liaison évident entre ces deux sites polymorphiques dans différentes populations, suggérant que le génotype d'une position peut être employé comme déterminant de l'autre. Plus précisément, les polymorphismes A148 et S311 forment un haplotype allélique des plus communs et G148 et C311 le second le plus fréquent dans les populations caucasiennes, de l'Asie du sud et de l'Afrique [Hegele, 1999].

Tout comme dans le cas de PON1, des études épidémiologiques ont associé les polymorphismes de PON2 à certains facteurs de risque de certaines pathologies. En premier lieu, une relation entre les polymorphismes de PON2 et les taux de lipoprotéines plasmatiques a été rapportée. Le polymorphisme G148 a d'ailleurs été associé à des taux plasmatiques de cholestérol et d'apo-AI plus élevés alors que le polymorphisme A148 entraîne des effets opposés [Boright et al., 1998]. Deux autres études ont montré que les sujets homozygotes pour les allèles A148 et S311 de PON2 ont des taux

plasmatiques de cholestérol total, de LDL cholestérol et d'Apo-B plus élevés par rapport aux autres génotypes [Hegele, 1999; Leus et al., 2001].

Le cholestérol plasmatique total et les LDLs sont considérés comme des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires. Les taux de LDLs sont plus élevés chez les sujets souffrant d'hypercholestérolémie familiale homozygotes pour l'allèle de PON2 codé S311, indiquant que ce polymorphisme accroît les risques de maladie cardiovasculaire [Leus et al., 2001], qui a également été relié avec un plus grand nombre de vaisseaux sanguins affectés chez des patientes souffrant d'ischémie [Chen et al., 2003]. Le polymorphisme de PON1 R192 en combinaison avec le S311 de PON2 agissent de façon synergique dans l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires [Sanghera et al., 1998].

Des débalancements de la glycémie sont reconnus pour influencer le développement d'autres désordres tels qu'une augmentation des triglycérides, une diminution des HDLs, de la haute pression artérielle et un abaissement de la taille des LDLs [Li et al., 2003]. Dans cette perspective, des études épidémiologiques ont également trouvé une association entre les taux de glucose sanguins et les polymorphismes de PON2. L'association est claire entre la glycémie à jeun et le polymorphisme du codon 148 chez les sujets atteints de diabète de type 1 et 2, mais pas chez les témoins [Hegele, 1999].

En résumé, les études suggèrent que le polymorphisme de PON2 G148 détériore davantage la glycémie chez les sujets atteints de diabète, indiquant que des facteurs génétiques sont susceptibles de modifier la sévérité du phénotype.

## 1.2 Hypothèses

Il apparaît donc certain que les paraoxonases (PONs) sont des antioxydants puissants et que leur implication dans plusieurs pathologies est majeure. Même si de nombreuses études épidémiologiques portant sur PON1 et PON2 ont été réalisées au cours des dernières années, la physiologie humaine et animale ainsi que le rôle de ces enzymes demeurent mal éclairés. Pourtant, certains organes comme le foie et l'intestin ont un besoin accru d'antioxydants tels que PON1 et PON2. Tout d'abord, le foie constitue un carrefour régulateur pour les lipoprotéines et un lieu de synthèse protéique, d'où la nécessité de préserver non seulement l'intégrité cellulaire et ses composantes protéiques nouvellement synthétisées au niveau microsomial mais aussi d'autres constituants. Étant aussi un organe détoxifiant, le foie est constamment soumis à un stress oxydatif considérable. Il est donc incontestable que le foie ait besoin de grandes quantités d'antioxydants puissants tels que PON1 et PON2 pour neutraliser les radicaux libres.

L'intestin est également un organe nécessitant la présence marquée d'antioxydants pour lutter contre le stress oxydatif prédominant auquel il est soumis. La paroi intestinale constitue la barrière physiologique entre le milieu externe et notre organisme et est constamment confrontée à des aliments oxydés, aux toxines renfermées par les aliments ou sécrétées par la flore intestinale, et aux produits des cellules desquammées. L'intestin doit par conséquent détenir des mécanismes de défense puissants afin de préserver son intégrité et son fonctionnement. Certaines pathologies affectant le système gastro-intestinal comme la maladie de Crohn se caractérisent par un statut antioxydant diminué en lien avec un stress oxydatif élevé et une malabsorption intestinale considérable. Dans ce contexte, les enzymes PON1 et PON2 sont des candidats idéaux pour la protection antioxydante de l'intestin.

Les HDLs étant sécrétés à la fois par l'intestin et le foie, il est probable que PON1 soit également synthétisée par ces deux organes puisqu'elle est associée à cette lipoprotéine dans la circulation. La libération de PON1 dans la circulation implique également l'association aux HDLs. L'objectif majeur de ce mémoire est de déterminer l'expression tissulaire, la localisation intracellulaire et les affinités de PON1 pour les sousfractions de HDLs.

L'information concernant la localisation et l'expression de PON2 est très limitée. Cette enzyme n'a jamais été détectée dans l'intestin mais devrait pourtant s'y retrouver afin de préserver la fonctionnalité de cet organe exposé à de grandes concentrations d'espèces réactives de l'oxygène. La localisation intracellulaire au niveau hépatique nécessite également des clarifications.

Les enzymes antioxydantes ont pour rôle la protection contre les radicaux libres et les pro-oxydants. Par contre, l'effet du stress oxydatif sur PON1 et PON2 n'a pas été élucidé et cette information est pourtant cruciale à une meilleure compréhension de leur rôle et fonctionnement. Hypothétiquement, PON1 et PON2 devraient être diminués en présence de stress oxydatif puisqu'elles devraient se "sacrifier" afin de protéger la cellule et ses constituants. Il est évident que la validation de cette hypothèse au niveau du foie et de l'intestin est essentielle.



### 1.3 Objectifs

Le présent programme de recherche comprend plusieurs objectifs portant sur les antioxydants endogènes PON1 et PON2 :

- 1) Clarifier le rôle, l'expression tissulaire et la localisation cellulaire de PON1 et PON2, plus spécifiquement au niveau hépatique et intestinal.
- 2) Établir une comparaison entre les taux protéiques de PON1 et PON2 chez le rat et l'humain, au niveau hépatique et intestinal.
- 3) Déterminer l'activité et l'affinité de PON1 dans les différentes sousfractions de HDLs.
- 4) Examiner la réaction de PON1 et PON2 au stress oxydatif dans le foie et l'intestin.

## **CHAPITRE 2: STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LE COMPLEXE PROOXYDANT FER-ASCORBATE ET SA NEUTRALISATION PAR L'ENZYME PARAOXONASE 1 AU NIVEAU DES HDLS ET DU FOIE : COMPARAISON ENTRE LE RAT ET L'HUMAIN**

### **2.1 Présentation de l'article**

La paraoxonase 1 (PON1) est une enzyme étroitement associée aux lipoprotéines de haute densité (HDL) et serait protectrice contre l'athérocclérose par sa capacité d'hydrolyse de lipides peroxydés et de plusieurs organophosphates. L'objectif principal du travail présenté dans cet article était de vérifier l'hypothèse que la peroxydation des lipides modifie l'activité et les taux protéiques de PON1. Les résultats obtenus ont révélé que la majorité de l'activité enzymatique PON1, mesurée par l'hydrolyse du paraoxon et de l'acétate de phényle, se retrouve dans le foie au niveau du réticulum endoplasmique et dans la sousfraction HDL<sub>3</sub> dans le sérum. La technique de Western blot a permis de confirmer ces résultats. Il est important de souligner que les taux protéiques et l'activité de PON1 sont significativement plus faibles chez l'humain en comparaison au rat. Simultanément à l'induction d'une peroxydation lipidique à l'aide du complexe prooxydant fer-ascorbate, une diminution des taux protéiques et de l'activité de PON1 dans les microsomes hépatiques et les HDL<sub>3</sub> a pu être observée. Par contre, l'ajout de l'antioxydant

BHT a permis d'atténuer cette diminution. Ces données indiquent que la localisation de PON1 dans les microsomes et les HDL<sub>3</sub> pourrait représenter une réponse sélective de ces organites et lipoprotéines face au stress oxydatif. Il est également proposé dans cet article que les taux plus élevés de PON1 chez le rat soient reliés à leur grande résistance à développer l'athérosclérose.

2.2 Iron-ascorbic acid–induced oxidant stress and its quenching by paraoxonase 1 in HDL and the liver: comparison between humans and rats.

Trudel K<sup>1</sup>, Sinnett D<sup>2</sup>, James RW<sup>3</sup>, Delvin E<sup>4</sup>, Amre D<sup>2</sup>, Seidman E<sup>2</sup>, Levy E<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Nutrition, <sup>2</sup>Pediatrics and <sup>4</sup>Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, and <sup>3</sup>Lipid Laboratory of Clinical Diabetes Unit, University of Geneva, Geneva, Switzerland

Key Words: PON1; oxidative stress; liver microsomes; HDL<sub>3</sub>.

Short Title: PON1 in Human Serum, Circulating HDL<sub>3</sub>, Liver Microsomes.

Number of Figures: 6

Address for correspondence: Dr. Emile Levy  
GI-Nutrition Unit  
CHU-Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5  
Tel.: (514) 345-4626  
Fax: (514) 345-4999

### 2.2.1 Abstract

Paraoxonase 1 (PON1) is a serum enzyme closely associated with high density lipoprotein (HDL), which may protect against atherosclerosis by hydrolyzing lipid peroxides and several organophosphorus compounds. The purpose of the present work was to test the hypothesis that lipid peroxidation modifies the activity and protein mass of PON1 in humans and rats. Our findings revealed that the bulk of the activity monitored by the hydrolysis of paraoxon and phenyl acetate was confined to liver intracellular endoplasmic reticulum-derived microsomes and was mostly recovered in circulating HDL<sub>3</sub>. Confirmation was obtained by the determination of PON1 expression by Western blot. It is noteworthy that PON1 levels were consistently decreased in human sera, HDL and liver microsomes compared with rat counterparts. Concomitant with iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation, there was a decline in PON1 activity and protein in both HDL<sub>3</sub> and microsomes, which was attenuated by butylated hydroxytoluene antioxidant treatment. The current data indicate that PON1

localization in microsomes and HDL<sub>3</sub> could represent a selective cellular and lipoprotein response to oxidative stress. This was tested by the iron-ascorbate oxygen-radical generating system. It is also proposed that the increased PON1 level may have a function related to the well-known atherosclerosis resistance of rats.

### 2.2.2 Introduction

Numerous studies emphasize the implication of oxidative stress in atherosclerosis and its resultant cardiovascular events (Stocker *et al.*, 2004). Oxidative stress usually takes place when the production of harmful free radicals and additional oxidative molecules exceeds the capacity of antioxidant defenses. The effect of oxidative stress is removed by the antioxidant action of alimentary antioxidants as well as endogenous antioxidant enzymes (Djordjevic, 2004). Exogenous antioxidants involve vitamin C, vitamin E, carotenoids, selenium and others, whereas endogenous antioxidant defense mechanisms include enzymes such as catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase. Since observations emerging from several clinical studies stresses the failure of antioxidant therapy in preventing cardiovascular morbidity and mortality (Blomhoff, 2005), the optimal approach at this time is to enhance endogenous antioxidants and reduce sources of oxidative stress.

Growing evidence indicates the critical role of high-density lipoprotein (HDL) in protection against atherosclerosis and in the progression of coronary atherosclerotic disease (Hovingh *et al.*, 2005). If reverse cholesterol transport is believed to represent the crucial function of HDL, more and more studies underscore additional mechanisms through which HDL exerts its remarkable protective effect. This lipoprotein particle displays anti-inflammatory action on the vasculature, inhibits thrombogenesis and reduces the oxidative modification of low-density lipoproteins (Navab *et al.*, 2001; Rohrer *et al.*, 2004). The antioxidative activity of HDL is intimately and primarily linked to its component paraoxonase 1 (PON1).

PON1 is a calcium-dependent enzyme with a molecular mass of 43 Kda and its highest activity occurs in the liver and blood (Chemnitz *et al.*, 1983). It catalyzes the hydrolysis of organophosphates, aromatic carboxylic acid esters and carbamates (La Du, 1992). The precise process responsible for the cardioprotective action of PON is not clear, although it is likely to be related to its antioxidant strength. In fact, extensive *in vitro* data have demonstrated lower concentrations of lipid peroxides associated with LDL (Mackness *et al.*, 1991) and HDL (Aviram *et al.*, 1998), as well as a reduced pathobiologic influence of LDL (Watson *et al.*, 1995) as a function of PON1 activity. More convincingly, animal models have revealed a greater degree of lipoprotein oxidation and more extensive atheroma formation in mice lacking PON1 activity (Shih *et al.*,

1998), whereas overexpressing PON1 has a protective influence (Tward *et al.*, 2002). Only a few studies have analyzed the potential effect of lipid peroxidation on HDL-associated PON1. Similarly, little is known about the impact of lipid peroxidation on PON1 in the liver, the major source of enzyme synthesis. Furthermore, these investigations are limited to the analysis of activity measurements. Finally, the status of PON1 in the human liver and its response to oxidative stress have not received much attention. The purpose of the present work was to test the hypothesis that lipid peroxidation modifies the activity and protein mass of PON1 in HDL and hepatic microsomes that derive from humans and rats. To this end, HDL particles and microsomal fractions were isolated and incubated with iron/ascorbate, a widely used oxygen-radical generating system.

### 2.2.3 Material and methods

Studies were carried out on human livers found invalid for transplantation and on animal livers obtained from Sprague-Dawley rats. The study protocol was approved by the ethics committees of Sainte-Justine Hospital and all experimental animal procedures were authorized by the Institutional Animal Care Committee.

### 2.2.3.1 Assay of arylesterase activity

Typically, 5  $\mu$ l of serum were added to a total volume of 1 ml containing 10 mM phenyl acetate in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . In the case of ultracentrifugal fractions, the enzyme was assayed before dialysis using a 10–20  $\mu$ l sample. An aliquot of each fraction was assayed (25–200  $\mu$ l depending on the PON-1 activity). The increase in OD at 270 nm was monitored every 3 sec for 30 sec using a spectrophotometer. Activities are reported as units per liter, where 1 U is defined as 1  $\mu$ mol of phenyl acetate hydrolyzed per minute.

### 2.2.3.2 Assay of carboxylesterase activity

Sera were diluted 160 times with 0.15 M NaCl, pH 7.4. A 20  $\mu$ l aliquot was added to 200  $\mu$ l of 0.48 mM *p*-nitrophenyl valerate in 50 mM HEPES, pH 7.0. The increase in OD at 405 nm was followed between 5 and 20 min. Activities are reported as units per milliliter, where 1 U is defined as 1  $\mu$ mol of *p*-nitrophenyl valerate hydrolyzed per minute.

### 2.2.3.3 Preparation of microsomes

Liver specimens were rinsed, homogenized and centrifuged for 15 min at  $12,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  in order to prepare microsome fractions, a technique described earlier (Brunet *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 2000). The supernatant fraction was then centrifuged for 60 min at  $100,000 \times g$ . The pellet was



centrifuged for 60 min at 4°C. The washed microsomal pellets were quick frozen and stored at -80°C for later use.

#### 2.2.3.4 Lipoprotein isolation

Lipoprotein fractions were isolated by discontinuous density gradient ultracentrifugation in an L5-65 preparative ultracentrifuge (Beckman, Montreal) with a Ti-50 rotor as reported previously (Levy *et al.*, 1990; Levy *et al.*, 1988). HDL subpopulations were separated by centrifugation at 100000 x g for 48 h at 4°C at the following densities: 1125 g/L for HDL<sub>2</sub> and 1210 g/L for HDL<sub>3</sub>. The lipoprotein fractions were dialyzed intensively against 0.15 mol NaCl/L and 0.001 mol EDTA/L at pH 7.0.

#### 2.2.3.5 Estimation of lipid peroxidation

The amount of free malondialdehyde (MDA) formed during the reaction was determined by HPLC, as we previously described (Bernotti *et al.*, 2003). Proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate (Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>) solution (Aldrich, Milwaukee, WI). The protein-free supernatants were then reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/vol) thiobarbituric acid solution (TBA; Sigma, St. Louis, MO) at 90°C for 60 min. After cooling to room temperature, the pink chromogene [(TBA) 2-MDA] was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then

resuspended in a KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/methanol mobile phase (70:30, pH 7.0) before MDA detection by HPLC.

#### 2.2.3.6 Statistical analysis

All values were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The data were evaluated by ANOVA, where appropriate, and the differences between the means were assessed using the Student's two-tailed *t*-test.

#### 2.2.4 Results

Basal and salt-stimulated PON were measured in rats and humans (Figure 2.1). We consistently observed that serum basal PON activity in rats is higher than in humans. Stimulation with calcium salt remained without effect on rat serum PON, while it doubled the basal human activity. The measurement of arylesterase also showed a superior activity level in rat sera.

A second series of experiments was undertaken to examine PON and arylesterase profiles in microsomal fractions (Figure 2.2). Again, the enzymatic activities appeared significantly higher in rat microsomes than in human microsomes. The addition of calcium salt to the reaction mixture did not enhance PON magnitude in human and rat biological specimens.

Subsequent analyses were carried out to determine the PON1 protein concentrations. Specimens of sera, liver homogenates and hepatic microsomes were electrophoresed on an SDS-polyacrylamide gel. An immunoblot of these samples showed immunoreactive bands corresponding to PON1 (Figure 2.3). Densitometric estimation of the PON1 visualized on the immunoblot revealed that rat sera, homogenates and microsomes contained more PON1 protein levels than human counterparts. In fact, the Western blot results confirmed the enzymatic findings.

Since PON1 is located specifically on HDL particles in the circulation, we isolated HDL<sub>2</sub> (1125 g/ml) and HDL<sub>3</sub> (1.210 g/ml) by ultracentrifugation and determined PON1 activity and protein mass. Both were associated with the denser subfraction of HDL in humans and rats, but far less in the former (Figure 2.4).

It has been postulated that PON within HDL has a role in protecting LDL against oxidative modification. In the present study, we hypothesized that PON1 could guard blood intracellular organelles and HDL particles by scavenging peroxides caused by oxidative stress, which might affect its own concentration. In order to test this hypothesis, we exposed microsomes and HDL<sub>3</sub> to iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation. Incubation with iron-ascorbate at different concentrations (50  $\mu$ M-150  $\mu$ M) resulted in a significant

increase in malondialdehyde levels (results not shown) and inhibition of PON1 enzyme activities tested with paraxon and phenyl acetate (Figure 2.5). PON1 downregulation was iron-ascorbate dose dependent. Although pre-incubation with butylated hydroxytoluene (BHT), a strong antioxidant, led to a protection against oxidative stress in humans and rats, it was unable to fully restore PON1 activity. The effects of iron-ascorbate treatment on PON1 protein expression were also examined in microsomes and HDL. The results shown in Figure 2.6 documented a decrease in PON1 expression response to oxidative stress-inducing agents. BHT normalized at least in part PON1 deterioration observed with iron-ascorbate treatment.

#### 2.2.5 Discussion

The liver is a key organ in lipid and lipoprotein metabolism. It is closely involved in the regulation of HDL synthesis and degradation. Recent reports have indicated that the enzyme PON1 is secreted in association with HDL and it represents a primary determinant of the antioxidant potential of this lipoprotein particle. In this study, we assessed the location of PON1 in the intracellular compartments of the hepatocyte, its distribution in HDL subpopulations and its response to oxidative stress. In particular, we focused on the human liver in comparison with the rat liver. Our findings showed that the bulk of the activity monitored by the hydrolysis of paraxon and phenyl acetate was recovered in

circulating HDL<sub>3</sub> and confined to intracellular endoplasmic reticulum (ER)-derived microsomes. Confirmation was obtained by the determination of PON1 expression by Western blot. Our data also provided evidence that PON1 levels were consistently higher in rats than in humans. Finally, concomitant with iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation, there was a decline in PON1 activity in HDL<sub>3</sub> and microsomes, which was partially corrected by BHT treatment.

According to our observations, PON1 is predominant in the microsomal fraction and HDL particles. Only negligible amounts were detected in other cellular compartments and lipoprotein classes such as LDL. It is, therefore, reasonable to assume that during HDL assembly in the ER compartment, there is a mechanism that regulates the addition of PON1 to the HDL particles. These data strengthen the suggestion that PON1 is mostly expressed in the liver and is carried in plasma bound to HDL (Reddy *et al.*, 2001). In this context, PON has been isolated from human plasma in association with apolipoprotein (apo) A-I and apo J (Blatter *et al.*, 1993; Kelso *et al.*, 1994). Additional studies are necessary to delineate the mechanistic events involved in PON1 synthesis and incorporation in HDL.

Circulating HDL particles are heterogeneous in their physicochemical properties and anti-atherogenic activities (Barter *et al.*, 2003). Indeed, small dense HDLs inhibit the expression of adhesion proteins by endothelial cells

(Ashby *et al.*, 1998) and potentially protect atherogenic LDLs against oxidative stress (Kontush *et al.*, 2003). Consistent with our findings, the abundance of PON1 in HDL<sub>3</sub> may enhance its capacity to protect LDL from oxidation and preserve its important function. By exerting PON and arylesterase activities, PON1 tightly bound with HDL<sub>3</sub> can efficiently hydrolyze not only organophosphate compounds such as paraoxon and aromatic carboxylic acid esters, but also harmful peroxides.

The liver's unique metabolism has to tackle toxicity induced by drugs and xenobiotics (Gunawan *et al.*, 2004). In order to avoid an overwhelming lethal insult, the detoxification system, made up of a large group of enzymes, converts xenobiotics into metabolites and free radicals and participates in the excretion process. In coordination with detoxifying enzymes, antioxidants are involved in scavenging reactive species, thereby reducing cytotoxicity (Varga, 1992; Kehrer *et al.*, 1994). The presence of PON1 activity in liver microsomes may help hydrolyze a number of exogenous and endogenous chemicals and inactivate oxidative stress by-products.

Recently, we showed that iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation altered the composition and properties of the bilayer lipid environment, affected the functions of sterol regulatory enzymes and integral membrane proteins of the ER and disturbed cholesterol homeostasis (Brunet *et al.*, 2000; Brunet *et*

*al.*1999). Several laboratories have shown iron's ability to initiate strong lipid peroxidation, whereas ascorbic acid can amplify iron's oxidative potential by promoting metal ion-induced lipid peroxidation (Bachowski *et al.*, 1988; Brasitus *et al.*, 1985; Jourd'Heuil *et al.*, 1993). The data presented here clearly indicate that the iron-ascorbate system functioned not only as a producer of lipid peroxidation but, at the same time, diminished the activity and protein expression of PON1 in microsomes and HDL<sub>3</sub>. The deterioration in PON1 resulting from the exposure of microsomes and HDL<sub>3</sub> to iron-ascorbate is probably attributable to oxidative stress, because the addition of the BHT antioxidant simultaneously prevented the occurrence of lipid peroxidation and improved the level of PON1. Iron-catalyzed lipid peroxidation may directly modulate enzyme activity by attacking polyunsaturated fatty acids, resulting in changes in the physical properties of the fluidity of the membrane in which PON1 is embedded (Poet *et al.*, 2003). Furthermore, iron-catalyzed lipid peroxidation may affect PON1 protein by disturbing its folding and accelerating its degradation.

In summary, our results show the profiles of PON1 in sera, HDL<sub>3</sub> and liver microsomes in humans and rats. A different behavior was noted between the two species as to PON1 levels, salt-stimulated serum PON1 activities and the inhibitory effect of lipid peroxidation. Not only did our data stress the localization of PON1 particularly in human HDL<sub>3</sub> and liver endoplasmic

reticulum, but they also emphasize that PON1 enzyme plays a significant role within the antioxidant systems in these specific sites.

### 2.2.6 Acknowledgment

This work was supported by research grants from the Crohn and Colitis Foundation of Canada (CCFC) as well as the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The authors thank Ms. Schohraya Spahis for her expert assistance.

### 2.2.7 References

Stocker,R, Keaney,JF, Jr. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 84:1381-1478.

Djordjevic,VB. 2004. Free radicals in cell biology. *Int.Rev.Cytol.* 237:57-89.

Blomhoff,R. 2005. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Curr.Opin.Lipidol.* 16:47-54.

Hovingh,GK, de Groot,E, van der,SW, Boekholdt,SM, Hutten,BA, Kuivenhoven,JA, Kastelein,JJ. 2005. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 16:139-145.

Navab,M, Berliner,JA, Subbanagounder,G, Hama,S, Lusis,AJ, Castellani,LW, Reddy,S, Shih,D, Shi,W, Watson,AD, Van Lenten,BJ, Vora,D, Fogelman,AM. 2001. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:481-488.



Rohrer,L, Hersberger,M, von Eckardstein,A. 2004. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr.Opin.Lipidol.* 15:269-278.

Chemnitiu,JM, Losch,H, Losch,K, Zech,R. 1983. Organophosphate detoxicating hydrolases in different vertebrate species. *Comp Biochem.Physiol C.* 76:85-93.

La Du,BN. 1992. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow,W, editor: *Pharmacogenetics of Drug Metabolism.* New-york: p 51-91.

Mackness,MI, Arrol,S, Durrington,PN. 1991. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286:152-154.

Aviram,M, Rosenblat,M, Bisgaier,CL, Newton,RS, Primo-Parmo,SL, La Du,BN. 1998. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101:1581-1590.

Watson,AD, Berliner,JA, Hama,SY, La Du,BN, Faull,KF, Fogelman,AM, Navab,M. 1995. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 96:2882-2891.

Shih,DM, Gu,L, Xia,YR, Navab,M, Li,WF, Hama,S, Castellani,LW, Furlong,CE, Costa,LG, Fogelman,AM, Lusis,AJ. 1998. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394:284-287.

Tward,A, Xia,YR, Wang,XP, Shi,YS, Park,C, Castellani,LW, Lusis,AJ, Shih,DM. 2002. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 106:484-490.

Brunet,S, Thibault,L, Delvin,E, Yotov,W, Bendayan,M, Levy,E. 1999. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 29:1809-1817.

Brunet,S, Thibault,L, Lepage,G, Seidman,EG, Dube,N, Levy,E. 2000. Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Radic.Biol.Med.* 28:46-54.

Levy,E, Thibault,L, Garofalo,C, Messier,M, Lepage,G, Ronco,N, Roy,CC. 1990. Combined (n-3 and n-6) essential fatty deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes. *J Lipid Res.* 31:2009-2017.

Levy,E, Thibault,LA, Roy,CC, Bendayan,M, Lepage,G, Letarte,J. 1988. Circulating lipids and lipoproteins in glycogen storage disease type I with nocturnal intragastric feeding. *J Lipid Res.* 29:215-226.

Bernotti,S, Seidman,E, Sinnett,D, Brunet,S, Dionne,S, Delvin,E, Levy,E. 2003. Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 285:G898-G906.

Reddy,ST, Wadleigh,DJ, Grijalva,V, Ng,C, Hama,S, Gangopadhyay,A, Shih,DM, Lusic,AJ, Navab,M, Fogelman,AM. 2001. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:542-547.

Blatter,MC, James,RW, Messmer,S, Barja,F, Pometta,D. 1993. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur.J Biochem.* 211:871-879.

Kelso,GJ, Stuart,WD, Richter,RJ, Furlong,CE, Jordan-Starck,TC, Harmony,JA. 1994. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 33:832-839.

Barter,P, Kastelein,J, Nunn,A, Hobbs,R. 2003. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis* 168:195-211.

Ashby,DT, Rye,KA, Clay,MA, Vadas,MA, Gamble,JR, Barter,PJ. 1998. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 18:1450-1455.

Kontush,A, Chantepie,S, Chapman,MJ. 2003. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23:1881-1888.

Gunawan,B, Kaplowitz,N. 2004. Clinical perspectives on xenobiotic-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Rev.* 36:301-312.

Varga,M. 1992. Understanding the role of oxyradicals in general and in toxic hepatic damage can help safer drug design. *Med.Hypotheses* 39:133-136.

Kehrer,JP, Lund,LG. 1994. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* 17:65-75.

Bachowski,GJ, Thomas,JP, Girotti,AW. 1988. Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photooxidized cell membranes: cholesterol product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids* 23:580-586.

Brasitus,TA, Davidson,NO, Schachter,D. 1985. Variations in dietary triacylglycerol saturation alter the lipid composition and fluidity of rat intestinal plasma membranes. *Biochim.Biophys.Acta* 812:460-472.

Jourd'Heuil,D, Vaananen,P, Meddings,JB. 1993. Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. *Am.J Physiol* 264:G1009-G1015.

Poet,TS, Wu,H, Kousba,AA, Timchalk,C. 2003. In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon. *Toxicol.Sci.* 72:193-200.

#### 2.2.8 Figure legends

Figure 2.1 Serum PON1 activity in humans and rats. The enzyme activity toward paraxon (A) and arylesterase (B) was determined by measuring the hydrolysis of diethyl-p-nitrophenyl phosphate and phenyl acetate, respectively. The activity toward paraxon was assessed in the presence (S) and absence (NS) of calcium salt. Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=7 in humans and n=4 for rats.

\*p < 0.05 vs. NS in humans; \*\*p < 0.01 vs. NS in rats.

Figure 2.2 Liver microsomal PON1 activity in humans and rats. Microsomes were prepared from liver homogenates and PON1 activity toward paraxon (A) and acylesterase (B) was determined by measuring the hydrolysis of diethyl-p-nitrophenyl and phenyl acetate, respectively. The activity toward paraxon was assessed in the presence (S) and absence (NS) of calcium salt.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 in humans and n=4 for rats.

\*p < 0.05 vs. NS in rats; \*\*p < 0.01 vs. S in rats; \*\*\*p < 0.05 vs. NS in humans.

Figure 2.3 Western blot analysis of human and rat PON1. To determine PON1 protein status, samples from sera (A), liver homogenates (B) and microsomes (C) were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting and then probed with antibodies. Immunoreactive proteins were made visible with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies and enhanced chemiluminescence. PON1 mass was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 in humans and n=4 for rats.

\*\*p < 0.01 vs. rats.

Figure 2.4 PON1 activity and mass in HDL fractions. The enzyme activity toward paraxon (A) and arylesterase (B) was determined by measuring the hydrolysis of diethyl-p-nitrophenyl phosphate and phenyl acetate, respectively, in HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub>. The activity toward paraxon was assessed in the presence (S) and absence (NS) of calcium salt. PON1 mass (C) was quantitated following immunoblotting and scanning.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=7 in humans and n=4 for rats.

\*\*p < 0.01 vs rat HDL<sub>3</sub>; \*\*\*p < 0.05 vs. (S) in rat.

Figure 2.5 Effect of iron-ascorbate on PON1 activity in liver microsomes and HDL<sub>3</sub> fractions. Microsomes (isolated from liver homogenates) and HDL<sub>3</sub> fractions (separated by ultracentrifugation) were challenged with various concentrations of iron-ascorbate. Then, the enzyme activity toward paraxon (PON) and arylesterase.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4-7 in humans and n=4 for rats

\*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 when compared to controls.

Figure 2.6 Effect of iron-ascorbate on PON1 mass protein in human and rat liver microsomes and HDL<sub>3</sub> fractions. Microsomes and HDL<sub>3</sub> fractions were challenged with various concentrations of iron-

ascorbate. Then, PON1 mass was quantitated following immunoblotting and scanning.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 in humans and n=4 for rats.

\*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 when compared to controls.

## 2.2.9 Figures

Figure 2.1

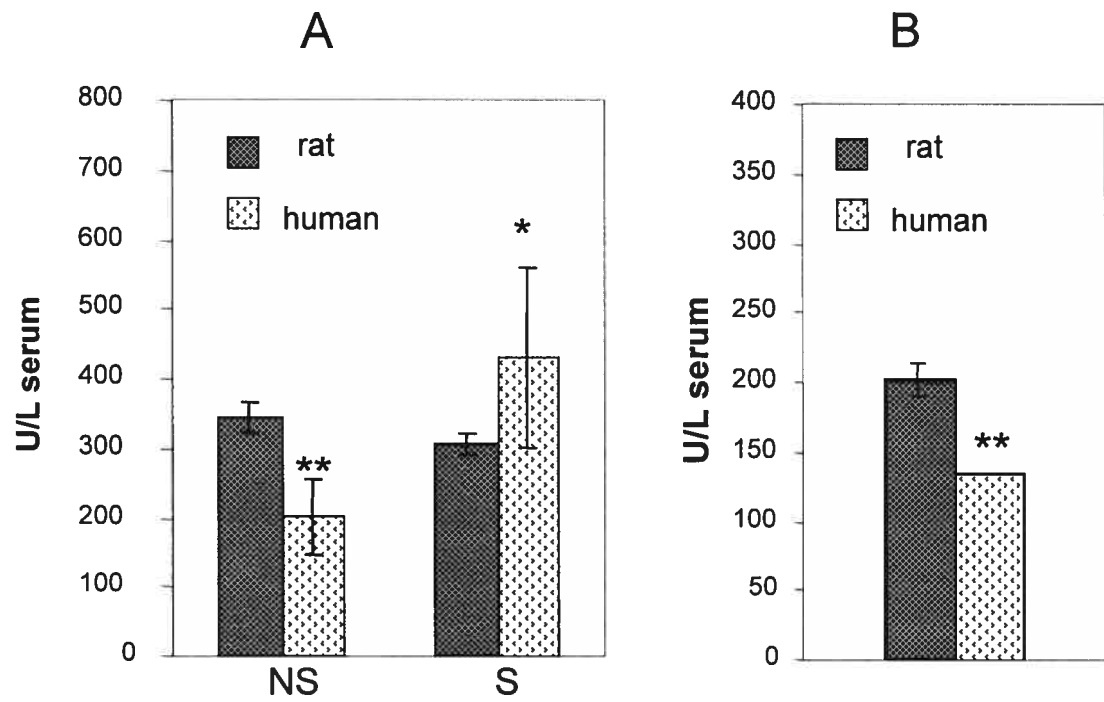


Figure 2.2

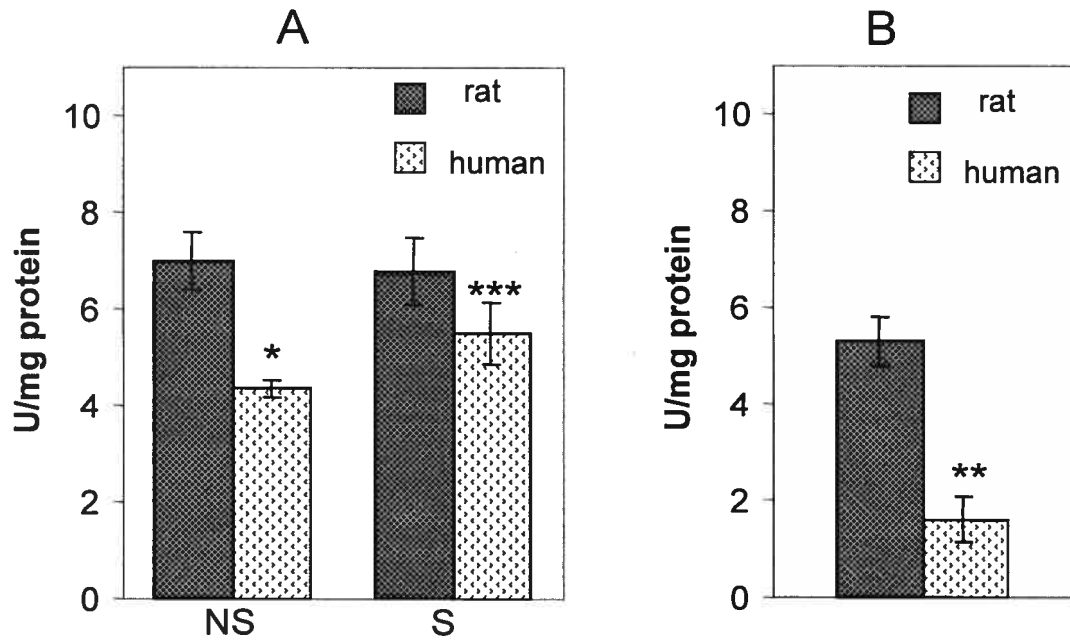




Figure 2.3

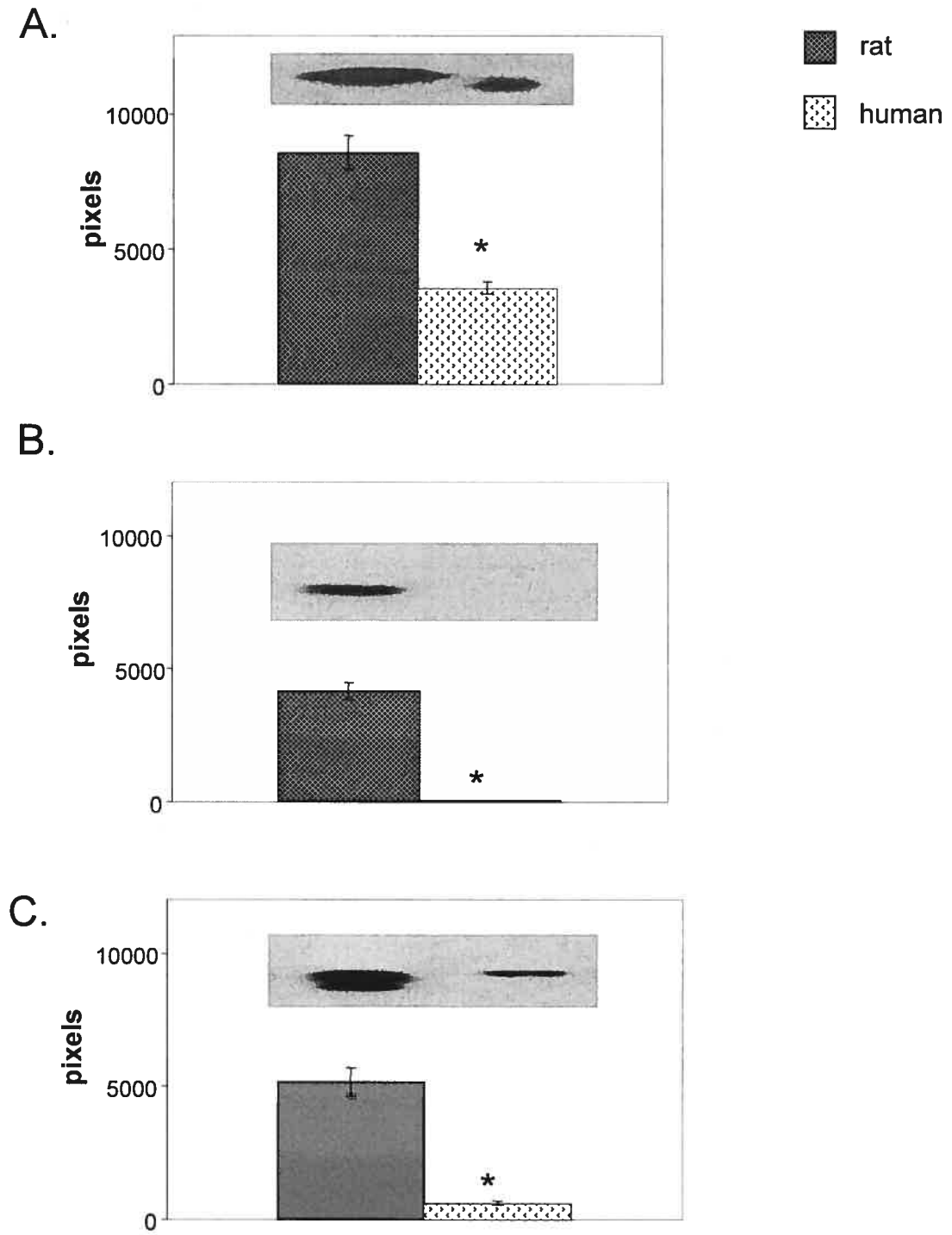


Figure 2.4

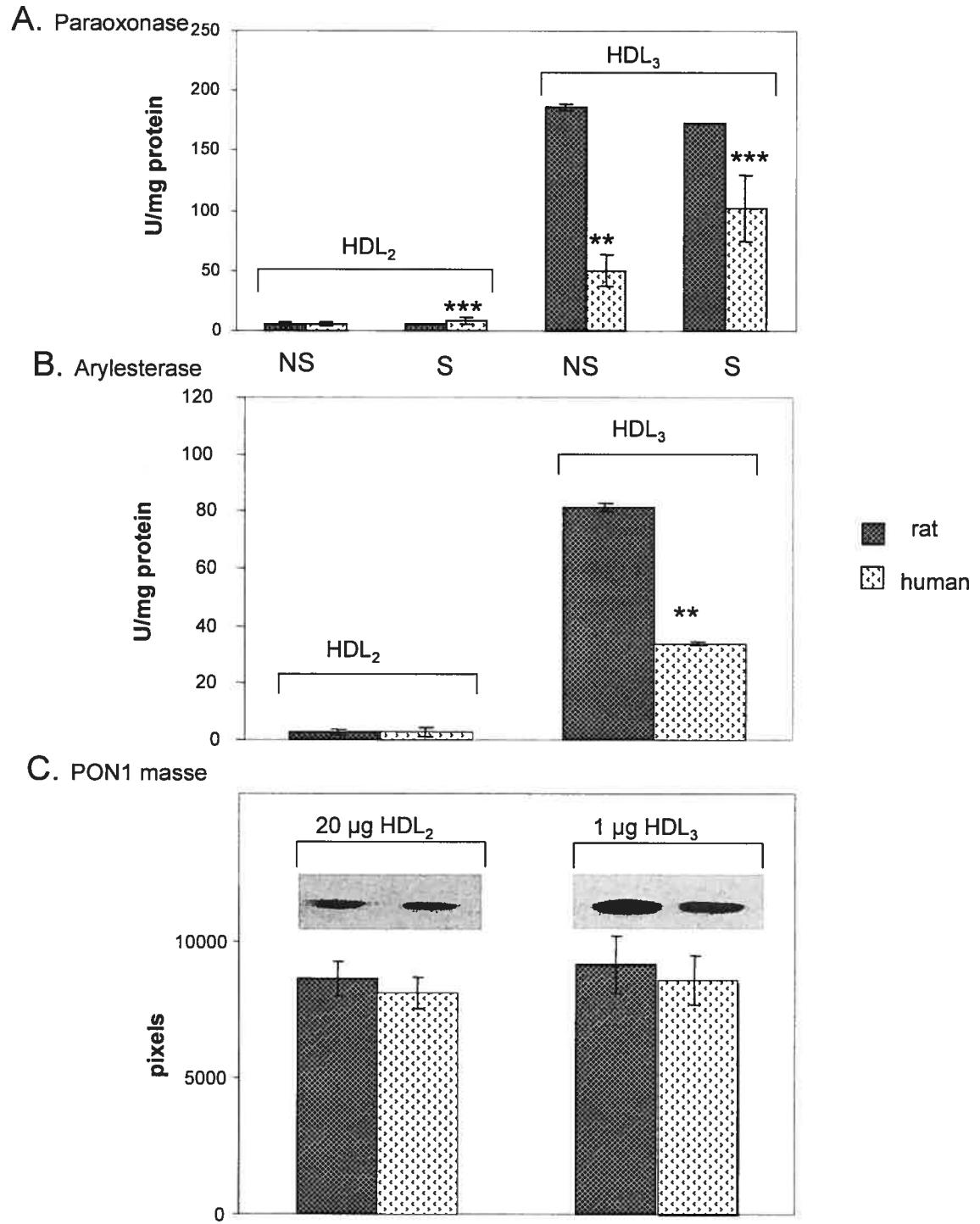


Figure 2.5

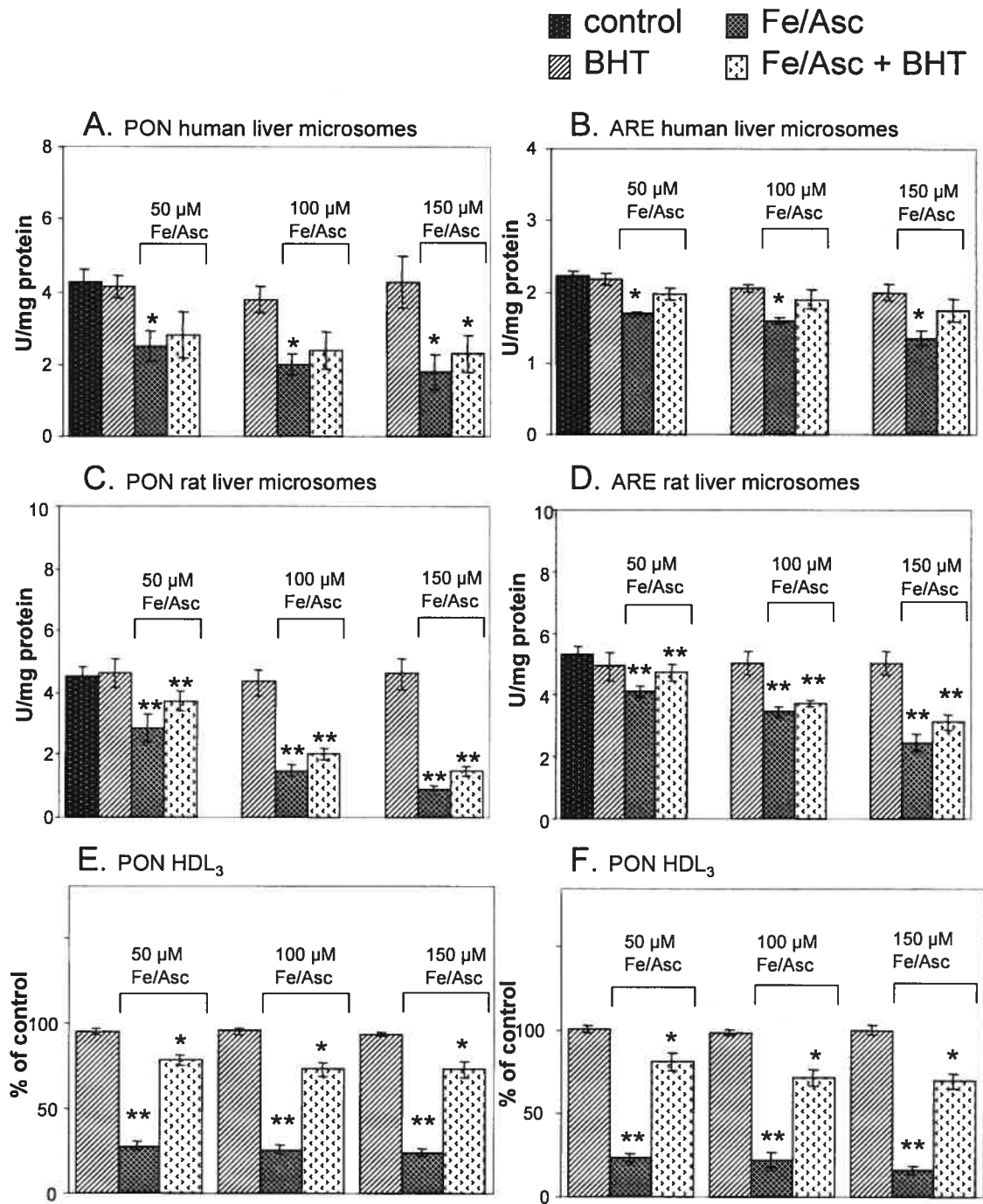
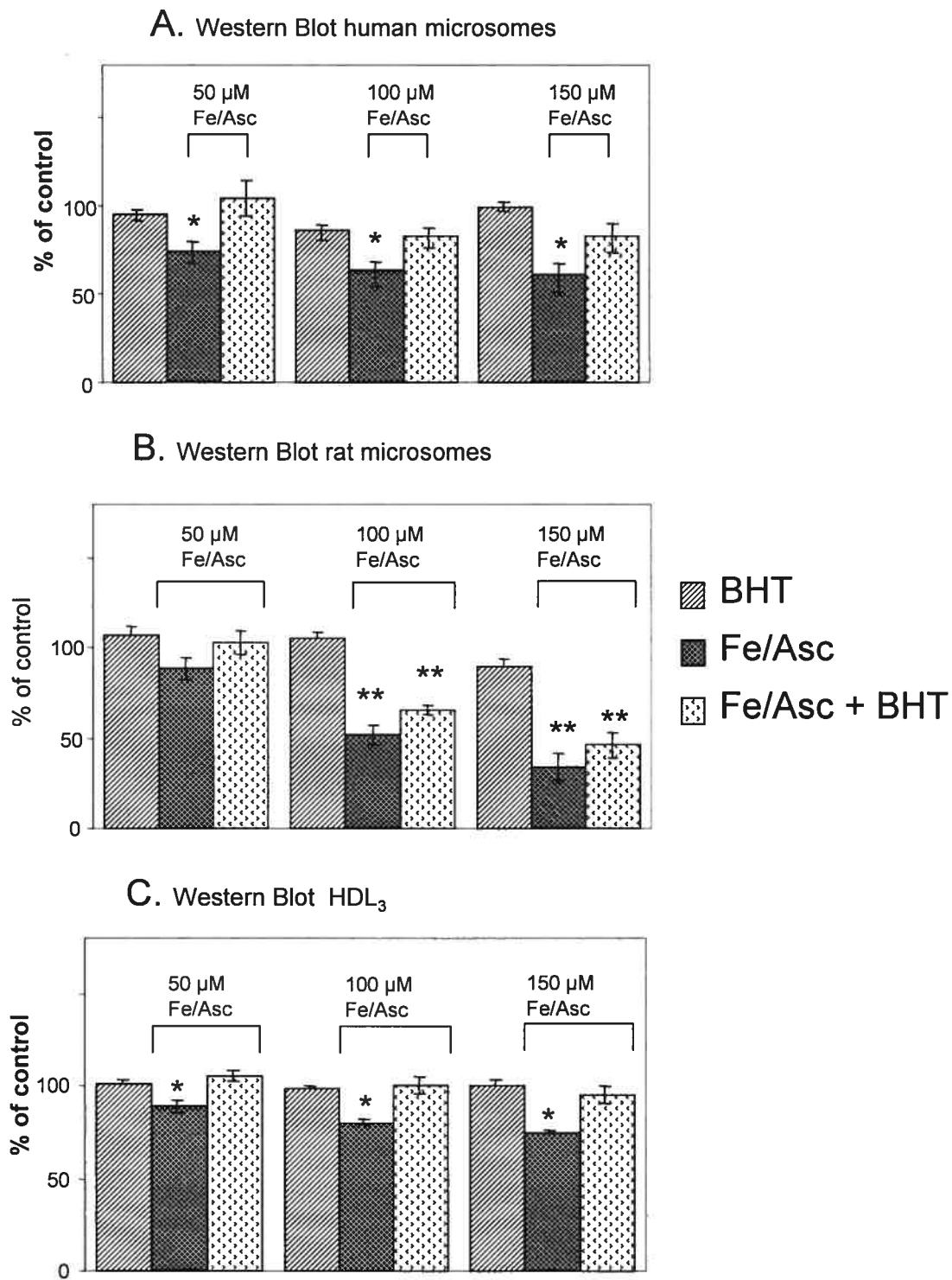


Figure 2.6



## **CHAPITRE 3: DISTRIBUTION ÉPITHÉLIALE ET RÉPONSE AU STRESS OXYDATIF DE L'ENZYME PARAOXONASE 2 DANS L'INTESTIN DE L'HUMAIN ET DE RAT**

### **3.1 Présentation de l'article**

Le stress oxydatif est une condition observée dans différents désordres intestinaux, incluant les maladies inflammatoires de l'intestin. Cependant, très peu de données concernant les mécanismes de défense de l'intestin face aux radicaux libres sont disponibles. La présente étude avait donc pour but de déterminer la localisation, l'ontogénie et l'effet du stress oxydatif sur la paraoxonase 2 (PON2) dans l'intestin et le foie humain et de rat, puisque cette protéine fait partie d'une famille d'antioxydants endogènes puissants. Les expériences réalisées ont démontré une forte expression de PON2 au niveau hépatique et intestinal, mais ces niveaux sont beaucoup plus élevés chez l'humain. L'analyse de Western blot a permis de détecter des taux de PON2 supérieurs dans le jéjunum en comparaison au duodénum, à l'iléon et au colon. L'isolation des différents compartiments cellulaires a mis en évidence une association prédominante de PON2 dans les microsomes et les lysosomes au niveau du foie et de l'intestin humain, résultats qui différaient chez le rat. En ce qui trait au développement foetal, PON2 a pu être détectée aussitôt qu'à la 15<sup>e</sup> semaine de gestation et ces taux protéiques se sont avérés plus grands à la

20<sup>e</sup> semaine. L'induction d'une peroxydation lipidique à l'aide du complexe prooxydant fer-ascorbate a provoqué une diminution des taux de PON2 au niveau intestinal et hépatique, parallèlement à une hausse des concentrations de malondialdéhyde (MDA). La pré-incubation avec divers antioxydants tels que le BHT, le NAC et le TROLOX a permis d'atténuer la diminution des taux de PON2 et de réduire la concentration de MDA. Ces observations démontrent que l'intestin humain est préférentiellement muni d'une expression marquée de PON2 comparativement au rat et que celle-ci se distingue par un profil de distribution intracellulaire et développemental spécifique. De plus, cette étude indique clairement que PON2 est affectée par le stress oxydatif, ce qui suggère que cette protéine joue un rôle protecteur contre les prooxydants dans l'intestin grêle et le foie.

### 3.2 Epithelial distribution and oxidative stress response of paraoxonase2 in human and rat intestine

Karine Trudel,<sup>1</sup> Daniel Sinnett,<sup>2</sup> Moïse Bendayan,<sup>3</sup> Ernest Seidman,<sup>2</sup> Edgard Delvin,<sup>4</sup> Jean-Claude Lavoie,<sup>2</sup> Daniel Ménard,<sup>5</sup> Devendra Amre,<sup>2</sup> and Emile Levy<sup>1\*</sup>

Departments of <sup>1</sup>Nutrition, <sup>2</sup>Pediatrics, <sup>3</sup>Pathology and cellular biology and <sup>4</sup>Biochemistry, Université de Montréal, Research Center, CHU Sainte Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5. <sup>5</sup>Group of the

Functional Development and Physiopathology of the Digestive Tract, Canadian Institute of Health Research and Department of Cellular Biology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

Running Head: A Comparison of PON2 Expression in Humans and Rats

Address for correspondence: \* Dr. Emile Levy  
GI-Nutrition Unit  
CHU Sainte-Justine  
3175 Côte Ste-Catherine  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5  
Tel.: (514) 345-4626  
Fax: (514) 345-4999

### 3.2.1 Abstract

Oxidative stress is a cardinal manifestation of various intestinal disorders, including inflammatory bowel diseases. However, very little knowledge is available on the intestine's inherent defense mechanisms against free radicals. This study was designed to determine the protein expression, subcellular localization and oxidative stress response of paraoxonase2 (PON2), a member of a powerful antioxidant family, in human and rat intestine and liver. Biochemical and ultrastructural experiments all showed a substantial expression of PON2 in human and rat intestine and liver. Western blot analysis disclosed higher levels of PON2 in the jejunum than in the duodenum, ileum and colon. Cell fractionation revealed a predominant PON2 association with

microsomes and lysosomes in the human jejunum and liver, which differed from that in rats. PON2 was detected in the intestine as early as week 15 of gestation, which significantly increased by week 20. Iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation induced a marked decrease in PON2 expression in intestinal and hepatic specimens coincidental to an abundant rise in malondialdehyde (MDA). On the other hand, pre-incubation with potent antioxidants, such as butylated hydroxytoluene, trolox and N-acetylcystein, prevented iron/ascorbate-generating PON2 reduction in parallel with MDA suppression. These observations demonstrate that the human intestine is preferentially endowed with a marked PON2 expression compared with the rat intestine and this expression shows a developmental and intracellular pattern of distribution. Furthermore, our observations indicate that PON2 is highly sensitive to oxidative stress, suggesting protective effects against pro-oxidant stimuli in the small intestine and liver.

Keywords: PON2, intestine, liver, oxidative stress, subcellular organelles

### 3.2.2 Introduction

Redox balance, usually observed in healthy subjects, is maintained by an equilibrium between prooxidants and antioxidants (17, 30). A decrease in antioxidant protection, an excess of reactive oxygen species, as well as a



failure to repair oxidative damage leads to redox imbalance (17). The resulting accumulation of free radicals can have deleterious effects by reacting and oxidizing key organic substrates, such as polyunsaturated fatty acids, proteins and DNA (5, 11, 42). This process, called oxidative stress, disturbs normal functioning and is involved in a wide spectrum of pathologies: cancer, atherosclerosis, cystic fibrosis, Alzheimer and Parkinson's (10, 20, 23, 31, 44, 45). Importantly, a variety of gastrointestinal diseases are also associated with reactive oxygen species and oxidative stress (15, 33, 34). In fact, the gastrointestinal mucosa is repetitively exposed to luminal oxidants from ingested foods (12, 16, 33) and, despite the antioxidant properties of its mucus lining, there is a continuous generation of oxidative stress (16). Clearly, the ingestion and/or occurrence of peroxides may have implications for human health, particularly in the long term.

Antioxidants play a crucial role in preventing damage induced by oxidative stress through the neutralization of free radicals. Alimentary non-enzymatic oxidants, such as  $\alpha$ -tocopherol, vitamin C and retinoids, possess a chemical structure that allows the quenching of singlet oxygen and peroxides (19). In addition, our organism is endowed with endogenous enzymatic antioxidants that include: superoxide dismutase, which catalyzes the conversion of superoxides into oxygen and hydrogen peroxide and is less reactive towards organic molecules (28); catalase, a heme-containing enzyme, which allows the

dismutation of hydrogen peroxide into water and oxygen (29); and glutathione peroxidase, which detoxifies activated oxygen through the catalysis of hydrogen peroxide reduction (1, 29). Recently, the focus has been on the paraoxonase (PON) protein family. Its distinct members (PON1, PON2, and PON3) are believed to be powerful attenuators of oxidative damage and highly atheroprotective (14, 25, 32). PON1 and PON3 circulate attached to high-density lipoprotein particles (13). They inhibit atherogenesis by hydrolyzing lipid hydroperoxides and by preventing low-density lipoprotein oxidative modification (13). Although the function of PON2 is presently unknown, its distribution in a variety of tissues suggests a significant role (35). PON2 is increased in cells harvested from 4-month-old apolipoprotein (apo) E<sup>-/-</sup> animals exhibiting signs of oxidative stress (39). Additionally, the administration of PON2 to macrophages from apo E<sup>-/-</sup> mice reduced lipid peroxide content (39). Similarly, overexpression of PON2 in Hela cells prevents the formation of oxidized low-density lipoproteins (32, 38). Overall, these observations are indicative of the anti-oxidant properties of PON 2.

Although a number of studies demonstrated the protective properties of PON2, there has been little insight into its role in animal and human physiology. In particular, limited data are available on the intestine, even though this organ is exposed on a daily basis to high levels of oxidative stress and requires strong antioxidants, which may preserve important endocrine, metabolic, immunologic and absorptive functions. The major aims of the present investigation were to

examine the protein expression, subcellular localization, ontogeny and response to oxidative stress of PON 2 in the human intestine. Experiments were also carried out to explore whether powerful antioxidants may prevent the manifestation of oxidative stress and the depletion of PON 2 following the exposure of microsomal fractions to iron-ascorbate. Comparisons between the intestine and liver were achieved in both humans and rats.

### 3.2.3 Material and methods

Small intestine and large bowel tissues were obtained from fetuses ranging from 15 to 20 weeks following legal or therapeutic abortion with informed patient consent. No tissues were collected from cases associated with known fetal abnormalities or fetal death. Intestinal samples were also obtained from patients who had undergone surgical resection of different areas of the digestive tract. Normal tissue found adjacent to the resected pathological tissues was used in all cases, as ascertained by routine hematoxylin/eosin staining. Studies were also carried out on human liver found invalid for transplantation and on animal liver obtained from Sprague-Dawley rats. The human study protocol was approved by the Ethics committee of Sainte-Justine Hospital and the Institutional Review Committee for the use of human material from the "Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke/Faculté de Médecine".

All experimental animal procedures were authorized by the Institutional Animal Care Committee.

#### 3.2.3.1 Preparation and Specificity of PON 2 Antibody

The PON 2 polyclonal antibody (Ab) was prepared by Invitrogen (Carlsbad, California). It was generated against the PON 2 region spanning amino acids 94-112. The specificity of the antibody was evaluated by various methods, including ELISA that recognized only PON 2 among various proteins, Western blotting following the incubation of the Ab in the presence or absence of the 19-amino acid antigen, the omission of the primary PON 2 Ab in Western blot and the identification of the PON 2 sequences following immunoprecipitation and SDS-PAGE. Noteworthy is the KEEKPRARELRISRGFDL epitope that allows cross-reaction between humans and rats.

#### 3.2.3.2 Immunocytochemical labelling

Rat and human liver and intestinal tissues were sampled and fixed by immersion in 0.1 mmol/L phosphate buffered 1% glutaraldehyde for 2 h. Tissues were then processed for embedding in Lowicryl at -30 °C (3, 24). Tissue thin sections were cut, mounted on Parlodion-carbon coated grids and processed for the protein A-gold immunolabelling according to previously described methods (3, 24). The anti-PON2 antibody was used at 1/10 dilution in combination with the 10 nm protein A-gold complex. Control of specificity was

carried out by omitting the primary antibody step or by replacing the PON 2 antibody with albumin.

#### 3.2.3.3 Preparation of Microsomes and subcellular fractions

Liver and intestine specimens were rinsed, homogenized and centrifuged for 15 min at  $12,000 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  in order to prepare microsome fractions, a technique described earlier (6, 7). The supernatant fraction was then centrifuged for 60 min at  $100,000 \times g$ . The pellet was centrifuged for 60 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The washed microsomal pellets were quick frozen and stored at  $80^{\circ}\text{C}$  for later use. To isolate subcellular fractions, tissue homogenate was subjected to differential and discontinuous sucrose density gradient centrifugation.

#### 3.2.3.4 Western blots

To assess the presence of PON2 and evaluate its mass, liver and intestinal tissues were homogenized and adequately prepared for Western blotting as described previously (22). Proteins were assessed by Bradford protein assay (BioRad), denatured in sample buffer containing SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol, separated on a 4-20% gradient SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites of the membranes were blocked using defatted milk proteins followed by the addition of primary antibodies directed against PON2. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary

antibody. Even if identical protein amounts of tissue homogenates were applied, the protein  $\beta$ -actin was used to confirm equal loading on SDS-PAGE (results not shown). Blots were developed and the mass of PON2 was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software.

#### 3.2.3.5 Effect of Antioxidants

To determine whether lipid peroxidation was responsible for alterations in PON2 protein expression, the antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) (0.5 mM), N-acetylcystein (NAC) (5 mM) and Trolox (0.5 mM) were added to microsomes or to the apical compartment of Caco-2 cells for 1 h before incubation with iron-ascorbate.

#### 3.2.3.6 Estimation of lipid peroxidation

The amount of free malondialdehyde (MDA) formed during the reaction was determined by HPLC, as we previously described (4). Proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) solution (Aldrich, Milwaukee, WI). The protein-free supernatants were then reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/vol) thiobarbituric acid solution (TBA; Sigma, St. Louis, MO) at 90°C for 60 min. After cooling to room temperature, the pink chromogene [(TBA) 2-MDA] was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/methanol mobile phase (70:30, pH 7.0) before MDA detection by HPLC.

#### 3.2.3.7 Statistical analysis

All values were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The data were evaluated by ANOVA, where appropriate, and the differences between the means were assessed using the Student's two-tailed t-test.

#### 3.2.4 Results

First we evaluated PON2 protein mass in liver and intestine homogenates. As illustrated by the profiles reported in Figure 1. PON2 expression was strongest in the liver with varying degrees in the different regions of the small intestine. In the gastrointestinal tract, PON2 levels predominated in the jejunum. Additionally, its protein mass was higher in humans than in rats for the same quantities of homogenate proteins loaded on SDS-PAGE. In fact, the protein expression of PON2 in the human liver and the different regions of the intestine (duodenum, jejunum, ileum) was found to be 6.8-, 2.7-, 3.1- and 2.7-fold greater than corresponding rat tissue (Fig. 1A). We have also assessed PON2 gene expression in human tissues in order to determine whether it parallels PON2 protein distribution. PCR evaluation showed that the profile of PON 2

mRNA transcripts corroborated the pattern of the PON 2 protein expression in the liver and intestinal regions (Fig. 1B).

Subsequently, immunolabelling for PON2 was carried out on rat and human liver and intestine tissues using specific anti-PON2 antibody in combination with the protein A-gold complex. Labelling by gold particles was obtained over cellular membranes as well as intracellular compartments. In liver tissue (Figure 2), the labelling was mainly present over the rough endoplasmic reticulum (RER) and mitochondria (M). Nuclei (N) also display some labelling, whereas lipid droplets (L) were totally devoid of gold particles (results not shown). In human intestinal tissues (Figure 3), the labelling was associated with microvilli as well as along the basolateral membrane (blm). Apical membrane-derived endosomal vesicles (end) also displayed gold particles. Additionally, the RER-Golgi (G) complex secretory pathway as well as lysosomes (Lys), mitochondria (M) and nuclei (N) were labelled. Once again, lipid droplets (L) were devoid of gold particles. Under the control condition in which the primary antibody was omitted, the labelling was totally abolished (results not shown). Overall, these observations provided support for the presence of PON2 protein in the liver and the intestine. Moreover, the high resolution immunogold approach disclosed the intracellular distribution of PON2 in the hepatocyte and enterocyte.



We then examined the cellular localization of PON2 in the adult liver and jejunum by conventional fractionation. As shown in Figure 4, the pattern of PON2 distribution was different in rats and humans. In rats, PON2 was mostly associated with nuclei, mitochondria, lysosomes and microsomes, whereas its expression in humans was predominant in lysosomes and microsomes. The question arose as to whether microsomal PON2 expression pattern paralleled the homogenate profile displayed in Figure 1. Western blotting of microsomes exhibited similar PON2 observations (Figure 5), convincingly, indicating significant liver enrichment in relation to intestinal segments, particularly preeminent in humans compared with rats and higher jejunum in comparison with respect to the duodenum and ileum.

We also explored the maturation aspect of PON2 in the human small and large intestine using equal protein amounts of tissue homogenates. An increase in PON2 was noted only in the proximal regions of the small intestine and colonic tissue as a function of foetal age (Figure 6). The proximal small intestine and colon exhibited a significant progressive rise in PON2 protein content: 145% and 123%, respectively, at the end of week 20 compared with the value (100%) noted at the end of week 15. No marked ontogenic differences in PON2 protein expression were recorded in the other intestinal segments, except for the ileum where a decline was apparent at the end of week 20.

Interestingly, subcellular fractionation experiments conducted in human foetal jejunum revealed a PON2 distribution similar to that in rats with evidently less enrichment in lysosomes (Figure 7).

Given the growing importance of PON as a cardiovascular disease risk factor and its potential involvement in protection against free radicals, we expected the status of PON2 to be significantly decreased by oxidative stress. In order to test this hypothesis, we exposed liver microsomes to iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation. Incubation with iron-ascorbate at the concentration of 100  $\mu$ M resulted in a significant increase in malondialdehyde (MDA) levels in rat (Figure 8A) and human liver (Figure 9A) microsomes. Pre-incubation with strong antioxidants, such as BHT, NAC and trolox, markedly suppressed the production of MDA, providing direct evidence for the ability of the iron/ascorbate system to provoke profound lipid peroxidation. Subsequently iron-ascorbate was added to liver microsomes and PON2 expression was analyzed by Western blot. Microsomes treated with iron/ascorbate exhibited decreased quantities of PON2 and the presence of antioxidants was capable of eliminating the iron-ascorbate-mediated PON2 decline in rat (Figure 8B) and human liver (Figure 9B) microsomes. Noteworthy was the superior effectiveness of trolox to protect PON2, especially in human liver microsomes. Similar findings were noted in rat (Figure 10), human (Figure 11) and foetal intestine microsomes (Figure 12), apart from the remarkable ability of BHT

(compared with the other antioxidants) to restore PON2 expression. It is important to note that the addition of iron-ascorbate to microsomes never decreased the protein expression of protein disulfide isomerase (results not shown), a microsomal marker, which suggests a selective response of PON 2 to oxidative stress.

Similar studies were repeated with intestinal microsomes (Figure 13A) and integral Caco-2 cells (Figure 13B), and corroborated the capability of iron-ascorbate to reduce PON2 protein expression (Fig.13). Preincubation with BHT at a concentration of 0.5 mM prevented the PON 2 protein decline observed with iron/ascorbate, which suggests the direct involvement of oxidative stress.

### 3.2.5 Discussion

The PON family consists of the three PON1, PON2 and PON3 members that share structural properties. Most of the information available on the PON family function derives from studies of PON1. We therefore initiated a comparative investigation of rats and humans with special respect to subcellular localization and ontogeny as well as the status of PON2 in response to oxidative stress. Our data clearly established that PON2: 1) is localized in the liver and different regions of the intestine, including the duodenum, jejunum, ileum, proximal colon and distal colon; 2) is present at higher concentrations in the human

intestine and liver than rat counterparts; 3) distributes in various cellular organelles, such as nuclei, mitochondria, lysosomes and microsomes; 4) is more associated with mitochondria and lysosomes in rat liver and jejunum, and with lysosomes and microsomes in human liver and jejunum; and 5) is decreased in the presence of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation and is restored with antioxidants.

Of considerable interest is the detection of PON2 in a number of intracellular compartments. Subcellular fractionation analyses revealed the distribution of PON2 in nuclei, mitochondria, lysosomes and microsomes. If the role of PON2 truly lies in counteracting oxidative stress, its subcellular localization may suggest its active participation in the protection of organelle integrity and function during lipid peroxidation. Ng et al. have hypothesized that PON2 is a cellular antioxidant, expressed in a variety of cell types, which is capable of retarding the oxidation of modified LDL (32). Additional studies are needed to clarify the functionality of PON2 in distinct cellular sites, which may help understand the differences in distribution in rats and humans.

Reactive oxygen species (ROS) are abundantly released by activated neutrophils that infiltrate the intestinal wall during the cascade of immunological events that produce intestinal inflammation. Moreover, their luminal concentrations can dramatically increase due to environmental factors, such as

dietary oxidant ingestion, intraluminal catalase-negative bacteria and desquamated cell oxidases. Therefore, important cellular detoxification systems may adequately control the amplified generation of ROS, terminate radical injury and repair damaged cellular elements. As documented in the present study, PON2 is abundantly expressed along the intestine. PON2 may be a potentially important antioxidant that could prevent impairment or breakdown of membrane integrity, ensuring the maintenance of cellular homeostasis and functions. In line with this assumption, several workers have suggested that PON2 may possess a biochemical function similar to that of PON1 and PON3, given its genetic association with pathophysiological conditions, including variations in plasma lipoproteins (6, 18), glucose levels in fasting type 2 diabetics (27), neonatal birth weight (9), the risk of coronary heart disease (40) and decreased oxidative state in human endothelial cells (32).

Rats have largely been used to exploit their physiological uniqueness in addressing biomedical and nutritional research issues. Very often, findings in lipid metabolism and lipid peroxidation in rats are inadequately extrapolated to humans. Since many aspects relative to these fields in rats are not identical to humans (4), we have addressed the pattern of distribution in the liver and intestine, the intracellular localization and the response to oxidative stress of PON 2 in rats and humans. Our findings could document various quantitative and qualitative changes in the two species.

This work provides evidence that PON2 expression is higher in the jejunum than in the duodenum and ileum in adult humans and rats. Previous studies emphasized that the jejunum is the preferential site of fatty acid uptake, lipid resynthesis and chylomicron assembly (21). Since the jejunal wall is continuously exposed to prooxidants present in the diet (12, 16, 33), PON2 likely plays a significant role in neutralizing the effects of prooxidant excess that trigger dramatic changes in intestinal epithelial cells, including the collapse of the cytoskeleton, disruption of tight junctions and loss of mucosal barrier integrity (2, 26, 37). Very little information is available concerning the antioxidant status of the enterocyte following peroxidative attack directed toward the brush-border membrane. Using iron/ascorbate oxygen radical-generating system, we showed that oxidative stress did not induce changes in the Caco-2 cells antioxidant enzyme activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione transferase (5). In the present investigation, iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation induced a diminished level of PON2 expression, pointing out the direct implication of this protein in scavenging lipid peroxidation. Other proteins may counteract oxidative stress capable of provoking the loss of enterocyte function. Tso's team has evidenced the powerful antioxidant capacity of apo A-IV, a protein produced by the small intestine (36, 43). Shamir et al (41) have shown that the gut could be the site of synthesis of PON family members. Collectively, all these antioxidant proteins may protect against oxidative stress that arises from dietary oxidized lipids,

circulatory oxidized lipoproteins, luminal flora or inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and ulcerative colitis.

In conclusion, our data demonstrated the presence of PON 2 in all the regions of the intestine and in different subcellular compartments. Microsomal PON 2 protein expression was reduced by iron-ascorbate-induced lipid peroxidation whereas pre-treatment with powerful antioxidants abolished PON 2 decline. Although our studies suggest a potential role of PON 2 in oxidative stress, additional work is needed to provide ultimate proof.

### 3.2.6 Acknowledgment

The authors are grateful to Schohraya Spahis for her excellent technical assistance. This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (CCFC).

### 3.2.7 References

1. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 57: 1825-1835, 2000.
2. Banan A, Fields JZ, Zhang Y and Keshavarzian A. iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal

- monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1234-G1246, 2001.
3. Bendayan M. Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 29: 1-159, 1995.
  4. Bergen WG and Mersmann HJ. Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *J Nutr* 135: 2499-2502, 2005.
  5. Bernotti S, Seidman E, Sinnott D, Brunet S, Dionne S, Delvin E and Levy E. Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G898-G906, 2003.
  6. Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui LC and Hegele RA. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis* 139: 131-136, 1998.
  7. Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M and Levy E. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 29: 1809-1817, 1999.
  8. Brunet S, Thibault L, Lepage G, Seidman EG, Dube N and Levy E. Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 28: 46-54, 2000.
  9. Busch CP, Ramdath DD, Ramsewak S and Hegele RA. Association of PON2 variation with birth weight in Trinidadian neonates of South Asian ancestry. *Pharmacogenetics* 9: 351-356, 1999.
  10. Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS and Li L. Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem* 280: 11648-11655, 2005.
  11. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 91: 23S-30S, 1991.
  12. Cross CE, Halliwell B and Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1: 1328-1330, 1984.



13. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS and La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 275: 33435-33442, 2000.
14. Getz GS and Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol* 15: 261-267, 2004.
15. Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 344: 859-861, 1994.
16. Grisham MB, Von Ritter C, Smith BF, Lamont JT and Granger DN. Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. *Am J Physiol* 253: G93-G96, 1987.
17. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52: 253-265, 1994.
18. Hegele RA, Harris SB, Connelly PW, Hanley AJ, Tsui LC, Zinman B and Scherer SW. Genetic variation in paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Canadian Oji-Cree. *Clin Genet* 54: 394-399, 1998.
19. Hosaka S, Obuki M, Nakajima J and Suzuki M. Comparative study of antioxidants as quenchers or scavengers of reactive oxygen species based on quenching of MCLA-dependent chemiluminescence. *Luminescence* 2005.
20. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23: 21-48, 1993.
21. Levy E. The 1991 Borden Award Lecture. Selected aspects of intraluminal and intracellular phases of intestinal fat absorption. *Can J Physiol Pharmacol* 70: 413-419, 1992.
22. Levy E, Menard D, Suc I, Delvin E, Marcil V, Brissette L, Thibault L and Bendayan M. Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci* 117: 327-337, 2004.
23. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L and Seidman E. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 71: 807-815, 2000.

24. Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G and Bendayan M. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 277: 16470-16477, 2002.
25. Li HL, Liu DP and Liang CC. Paraonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med* 81: 766-779, 2003.
26. Lum H and Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C719-C741, 2001.
27. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJ and Mackness MI. Low paraonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy1. *Clin Sci (Lond)* 98: 355-363, 2000.
28. Maier CM and Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8: 323-334, 2002.
29. Mates JM, Perez-Gomez C and Nunez dC, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32: 595-603, 1999.
30. McCall MR and Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?. *Free Radic Biol Med* 26: 1034-1053, 1999.
31. Moreira PI, Smith MA, Zhu X, Honda K, Lee HG, Aliev G and Perry G. Oxidative damage and Alzheimer's disease: are antioxidant therapies useful?. *Drug News Perspect* 18: 13-19, 2005.
32. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM and Reddy ST. Paraonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 276: 44444-44449, 2001.
33. Parks DA. Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 30: 293-298, 1989.
34. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J and Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 33: 311-322, 2002.

35. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J and La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33: 498-507, 1996.
36. Qin X, Swertfeger DK, Zheng S, Hui DY and Tso P. Apolipoprotein AIV: a potent endogenous inhibitor of lipid oxidation. *Am J Physiol* 274: H1836-H1840, 1998.
37. Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A and Holycross M. Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 273: G812-G823, 1997.
38. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusic AJ, Navab M and Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 542-547, 2001.
39. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN and Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 468-474, 2003.
40. Sanghera DK, Aston CE, Saha N and Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 62: 36-44, 1998.
41. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A and Aviram M. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med* 39: 336-344, 2005.
42. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928: 22-38, 2001.
43. Tso P and Liu M. Apolipoprotein A-IV, food intake, and obesity. *Physiol Behav* 83: 631-643, 2004.
44. Valko M, Morris H and Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12: 1161-1208, 2005.

45. Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Collins CE and Garg ML. Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors. *J Am Coll Nutr* 20: 157-165, 2001.

### 3.2.8 Figure legends

Figure 3.1 Pattern of PON2 distribution in the liver and in different regions of human and rat intestine. The proteins of tissue homogenates (A) were fractionated by SDS-PAGE and electrotransferred onto nitro-cellulose membranes. The blots were then incubated with the polyclonal antibody overnight at 4 °C. Immunocomplexes were revealed by means horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin and an enhanced chemiluminescence's kit. PON2 mass was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software. The mRNA levels of human tissues (B) were also assessed to corroborate the PON2 protein mass findings. A representative PCR gel illustrates the PON2 tissue distribution. Values are expressed as means  $\pm$  SE for n=4 in each group of experiments.

\*p < 0.02 vs humans; \*\*p < 0.05 vs duodenum and ileum.

Figure 3.2 Immunogold labelling of PON2 on rat (A) and human (B) liver tissues. The gold particles revealing PON2 antigenic sites are

present over the rough endoplasmic reticulum (RER) and the mitochondria (M). Lipid droplets (L) are free of any labelling.

Figure 3.3 Immunogold labelling of PON2 on human intestinal tissue. The labelling by gold particles is present over the microvilli (mv) and is particularly associated with their limiting membrane and the endosomal vesicles (end) (Panel A). Intracellularly, the labelling is present over the rough endoplasmic reticulum (RER), the Golgi apparatus (G) and the lysosomes (Lys), as well as in mitochondria (M) and nuclei (N) (Panels B, C and D) lipid droplets (L) however, are devoid of any labelling (Panel D). Protein A-golds are also noted on the basolateral membrane (blm) (Panel D).

Figure 3.4 Subcellular localization of PON2 in liver and jejunum from humans and rats. Subcellular fractions were prepared from homogenates using sucrose density gradient centrifugation. Samples of each fraction were subjected to SDS-PAGE and Western blotting.

Values represent the mean  $\pm$  SE for 4 separate experiments.

\*p < 0.05 vs homogenates; \*\*p < 0.005 vs homogenates.

Figure 3.5 Protein expression of PON2 in hepatic and intestinal microsomes.

Microsomes were obtained by subcellular fractionation and PON2 profile was examined by SDS-PAGE and Western blotting.

Values represent the mean  $\pm$  SE for n=4 in each group of experiments.

\*p < 0.05 vs humans; \*\*p < 0.005 vs humans; \*\*\*p < 0.05 vs duodenum and ileum.

Figure 3.6 Developmental pattern of PON2 expression in the human intestine.

Proximal and distal small intestine (A) and colon (B) were analyzed with similar protein amounts at the various periods of gestation. PON2 profile was examined by SDS-PAGE and Western blotting.

Values represent the mean  $\pm$  SE for n=4 in each group of experiments.

\*p < 0.05 vs proximal segment; \*\*p < 0.005 vs proximal region; \*\*\*p < 0.01 vs 20 weeks of gestation.

Figure 3.7 Analyses of the cellular fractions in their PON2 content.

PON2 expression in cellular fractions obtained from fetal small intestine. The organelles were isolated from the proximal intestine (17 weeks of gestation) using sucrose density gradient centrifugation. They were resolved by SDS-PAGE, electroblotted

onto nitrocellulose membranes and incubated with primary and secondary antibodies.

Values represent the mean  $\pm$  SE for n=4 in each experimental group.

\*p < 0.05 vs homogenates; \*\*p < 0.005 vs homogenates.

**Figure 3.8** Effect of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation on PON2 status in rat liver.

Microsomal fractions were incubated in the presence or absence of Fe<sup>2+</sup>-ascorbate. Oxidative stress was assessed by measuring MDA as an index of lipid peroxidation. In order to determine whether lipid peroxidation was largely responsible for PON2 changes, various antioxidants (BHT, N-acetylcystein and Trolox) were added separately to the reaction mixture before incubation with Fe<sup>2+</sup>-ascorbate. Then PON2 mass was quantitated by SDS-PAGE and Western blotting.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 for each experimental group.

\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.005 vs control.

**Figure 3.9** Effect of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation on PON2 protein expression in rat jejunum microsomes.

Microsomal fractions were incubated in the presence or absence of Fe<sup>2+</sup>-ascorbate. Oxidative stress was assessed by measuring

MDA as an index of lipid peroxidation. In order to determine whether lipid peroxidation was largely responsible for PON2 changes, various antioxidants (BHT, N-acetylcystein and Trolox) were added separately to the reaction mixture before incubation with  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate. Then PON2 mass was quantitated by SDS-PAGE and Western blotting.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 for each experimental group.

\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.005 vs control.

Figure 3.10 Effect of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation on PON2 protein expression in human liver microsomes.

Microsomal fractions were incubated in the presence or absence of  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate. Oxidative stress was assessed by measuring MDA as an index of lipid peroxidation. In order to determine whether lipid peroxidation was largely responsible for PON2 changes, various antioxidants (BHT, N-acetylcystein and Trolox) were added separately to the reaction mixture before incubation with  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate. Then PON2 mass was quantitated by SDS-PAGE and Western blotting.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 for each experimental group.

\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.005 vs control.



Figure 3.11 Effect of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation on PON2 expression in human jejunum microsomes.

Microsomal fractions were incubated in the presence or absence of Fe<sup>2+</sup>-ascorbate. Oxidative stress was assessed by measuring MDA as an index of lipid peroxidation. In order to determine whether lipid peroxidation was largely responsible for PON2 changes, various antioxidants (BHT, N-acetylcystein and Trolox) were added separately to the reaction mixture before incubation with Fe<sup>2+</sup>-ascorbate. Then PON2 mass was quantitated by SDS-PAGE and Western blotting.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 for each experimental group.

\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.005 vs control.

Figure 3.12 Effect of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation on PON2 status in fetal proximal intestinal microsomes.

Microsomal fractions were incubated in the presence or absence of Fe<sup>2+</sup>-ascorbate. Oxidative stress was assessed by measuring MDA as an index of lipid peroxidation. In order to determine whether lipid peroxidation was largely responsible for PON2 changes, various antioxidants (BHT, N-acetylcystein and Trolox) were added separately to the reaction mixture before incubation

with  $\text{Fe}^{2+}$ -ascorbate. Then PON2 mass was quantitated by SDS-PAGE and Western blotting.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 for each experimental group.

\*p < 0.05 vs control; \*\*p < 0.005 vs control.

Figure 3.13 Effect of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation on PON2 status in microsomes and Caco-2 cells. Iron –ascorbate (100  $\mu\text{M}$ ) was administered to Caco-2 cell microsomes (A) as well as to differentiated Caco-2 cells (B) for 30 min at 37°C. BHT was added in some experiments at the concentration of 0.5 mM to neutralize the oxidative stress. Cells were then harvested, washed, homogenized and tested for PON2 mass by SDS-PAGE and Western blotting.

Values are expressed as mean  $\pm$  SE for n=4 for each experimental group.

\*p < 0.05 vs control

## 3.2.9 Figures

Figure 3.1

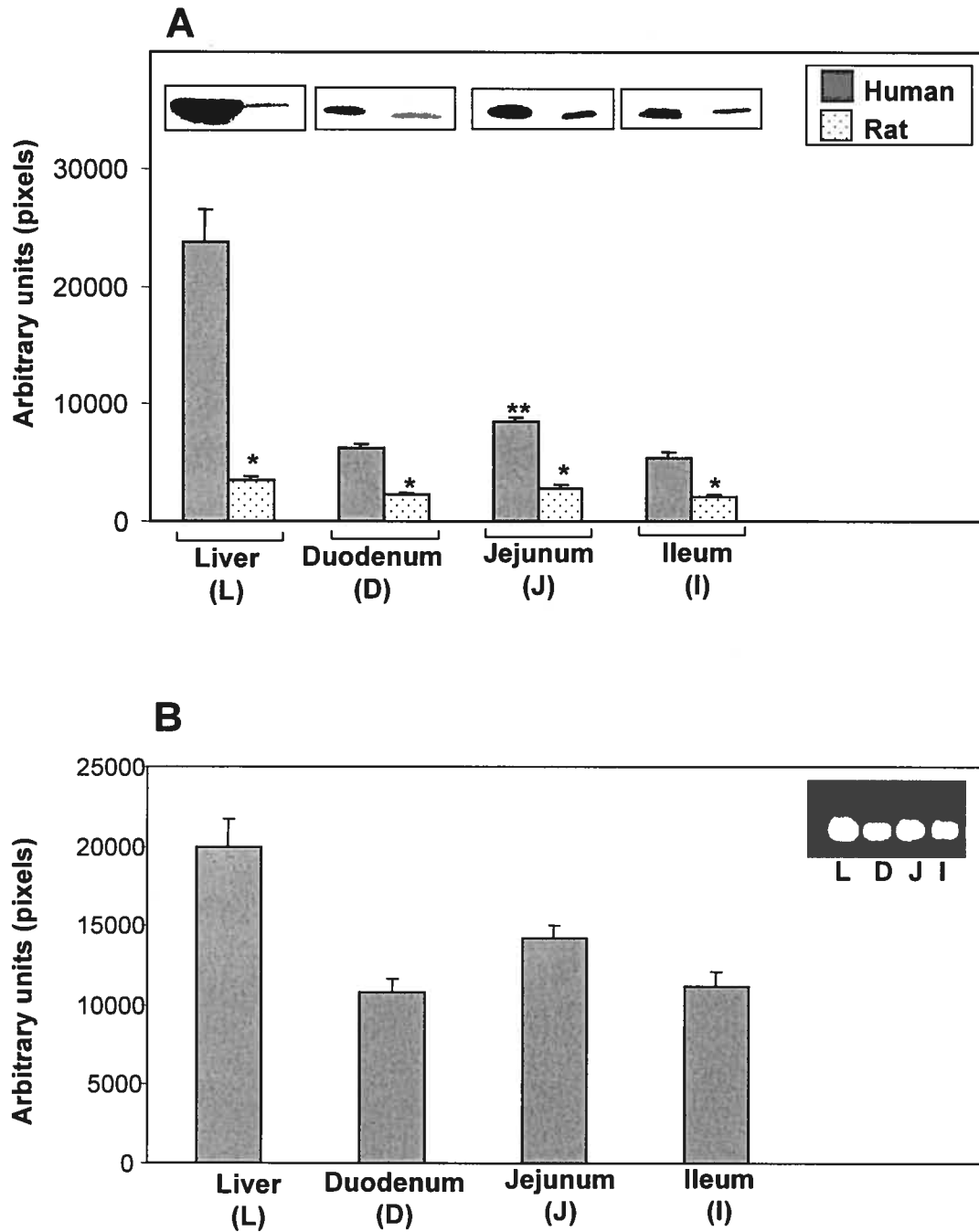


Figure 3.2

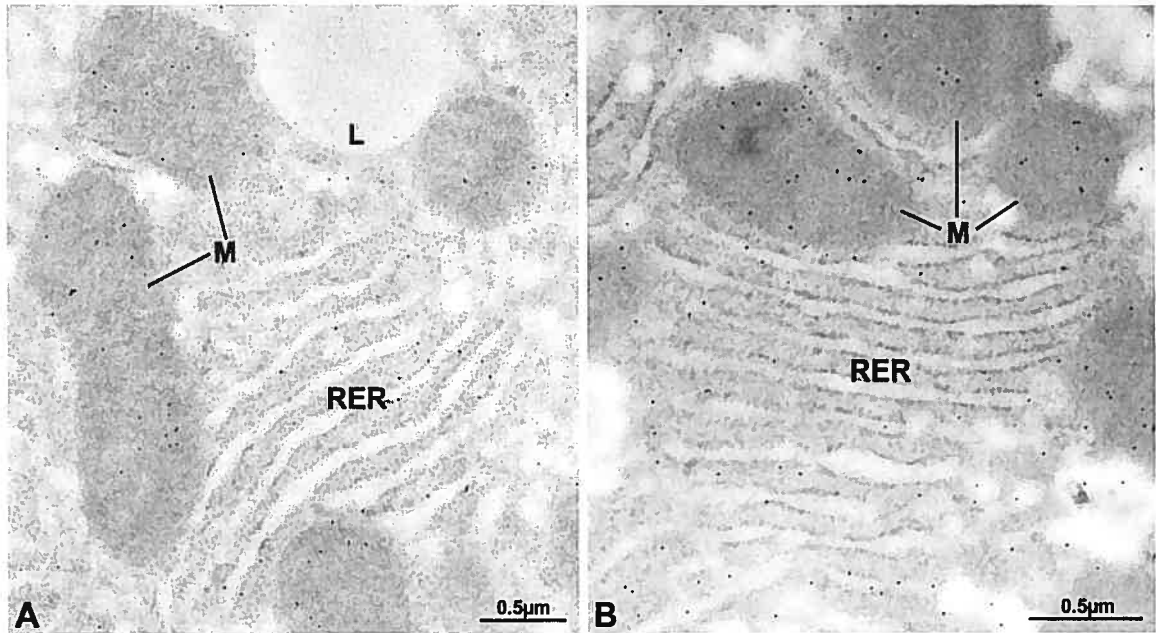


Figure 3.3

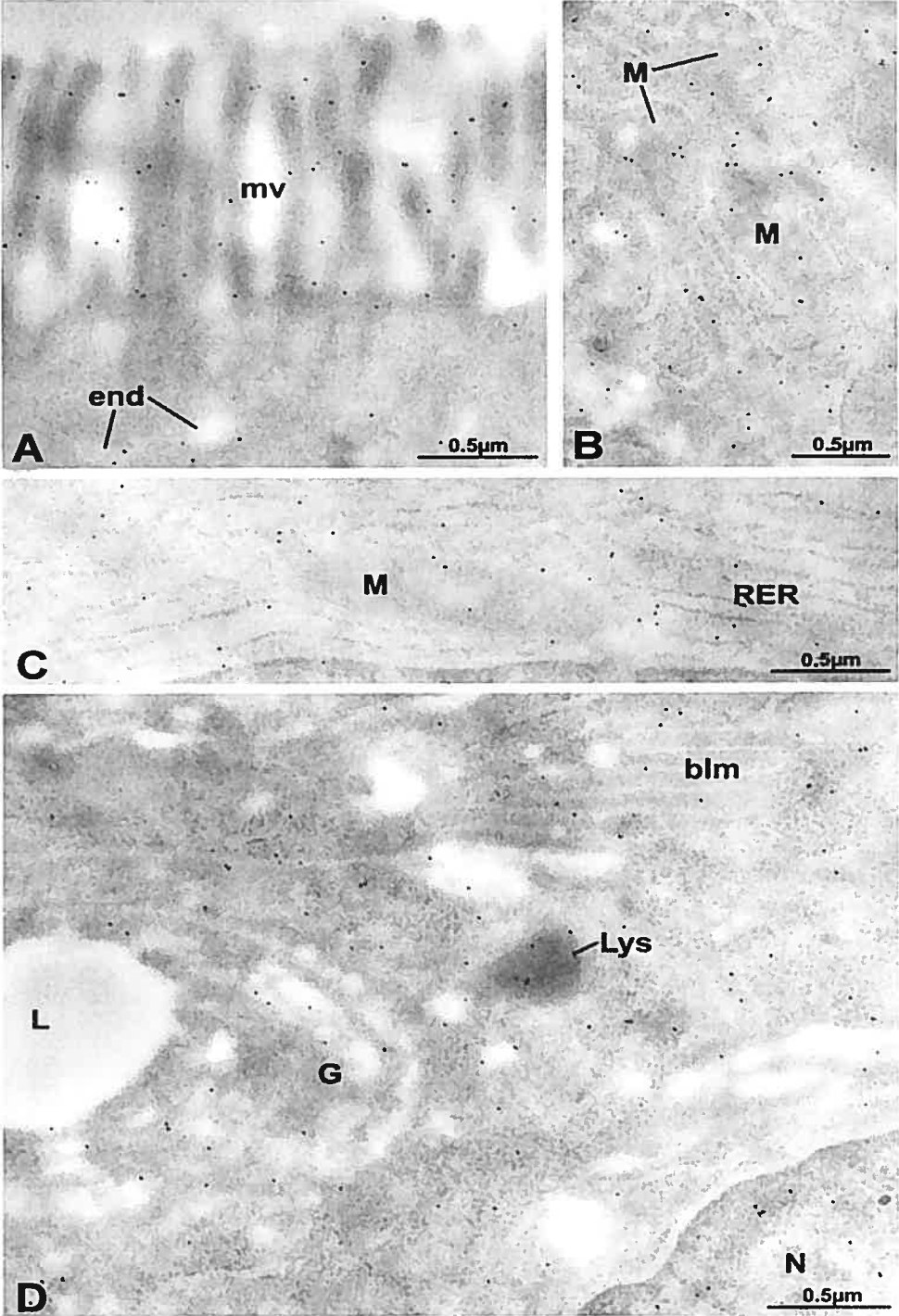


Figure 3.4

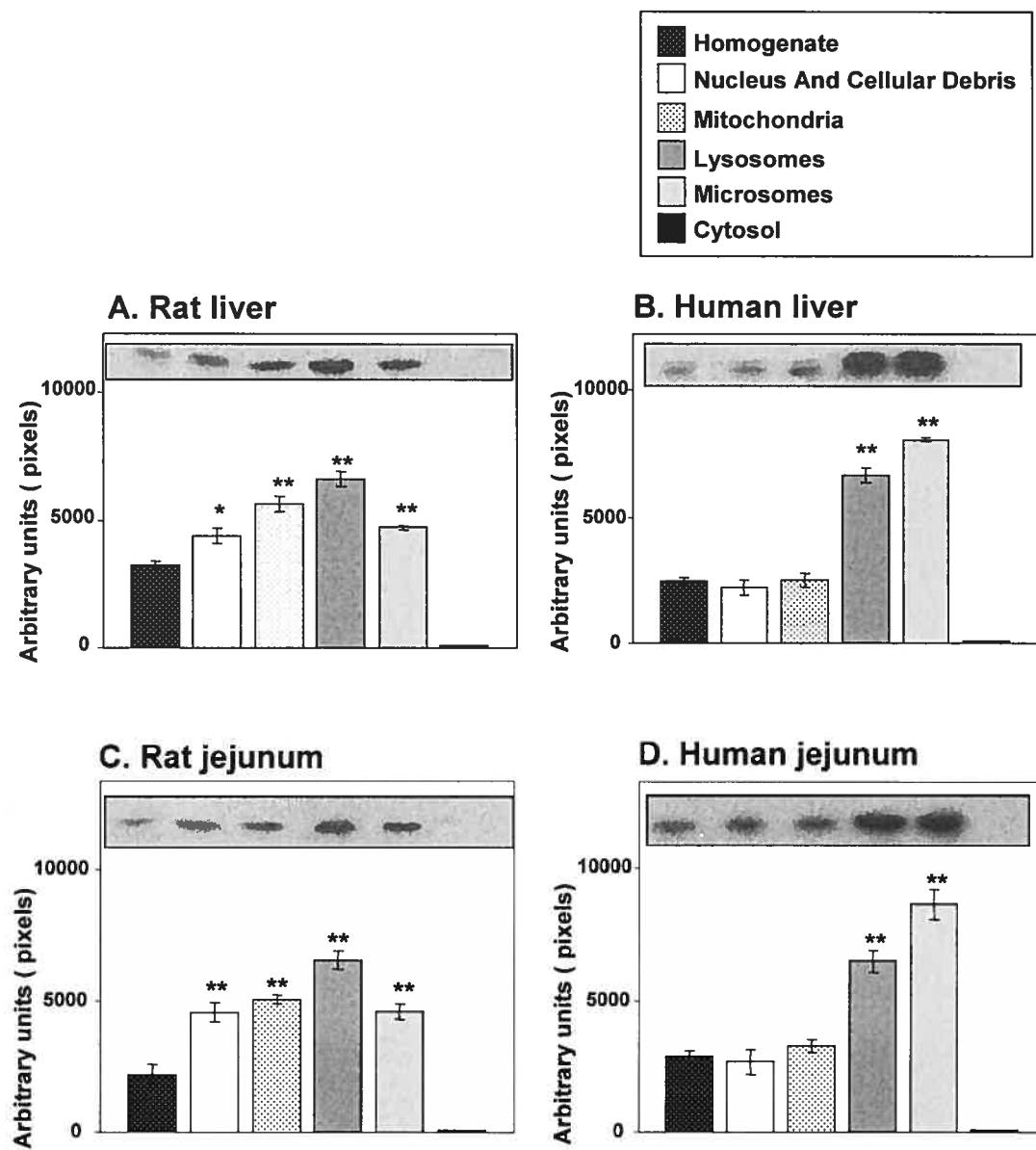


Figure 3.5

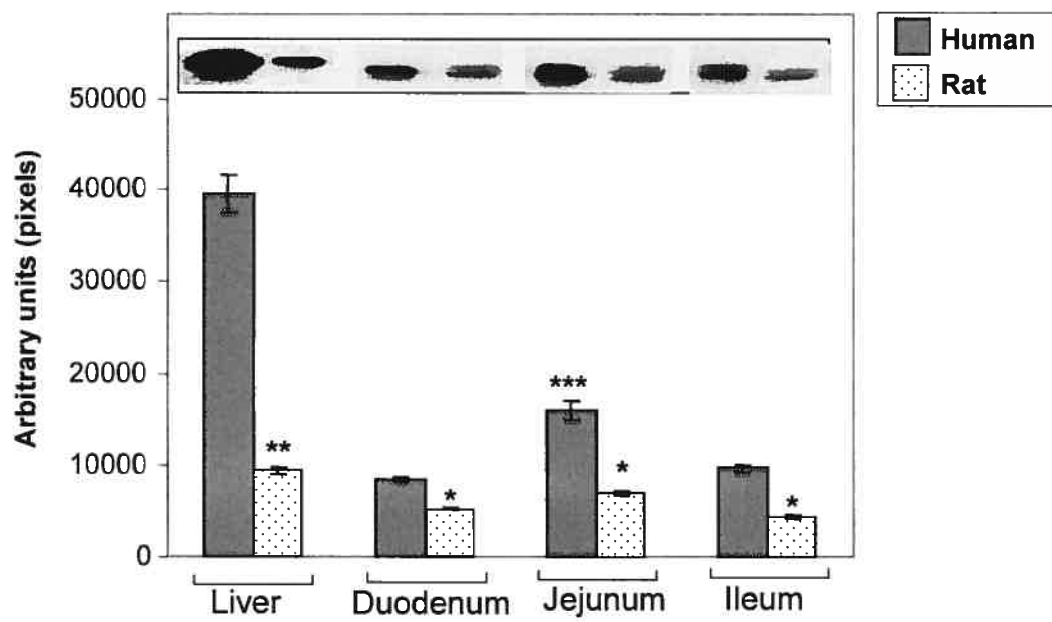


Figure 3.6

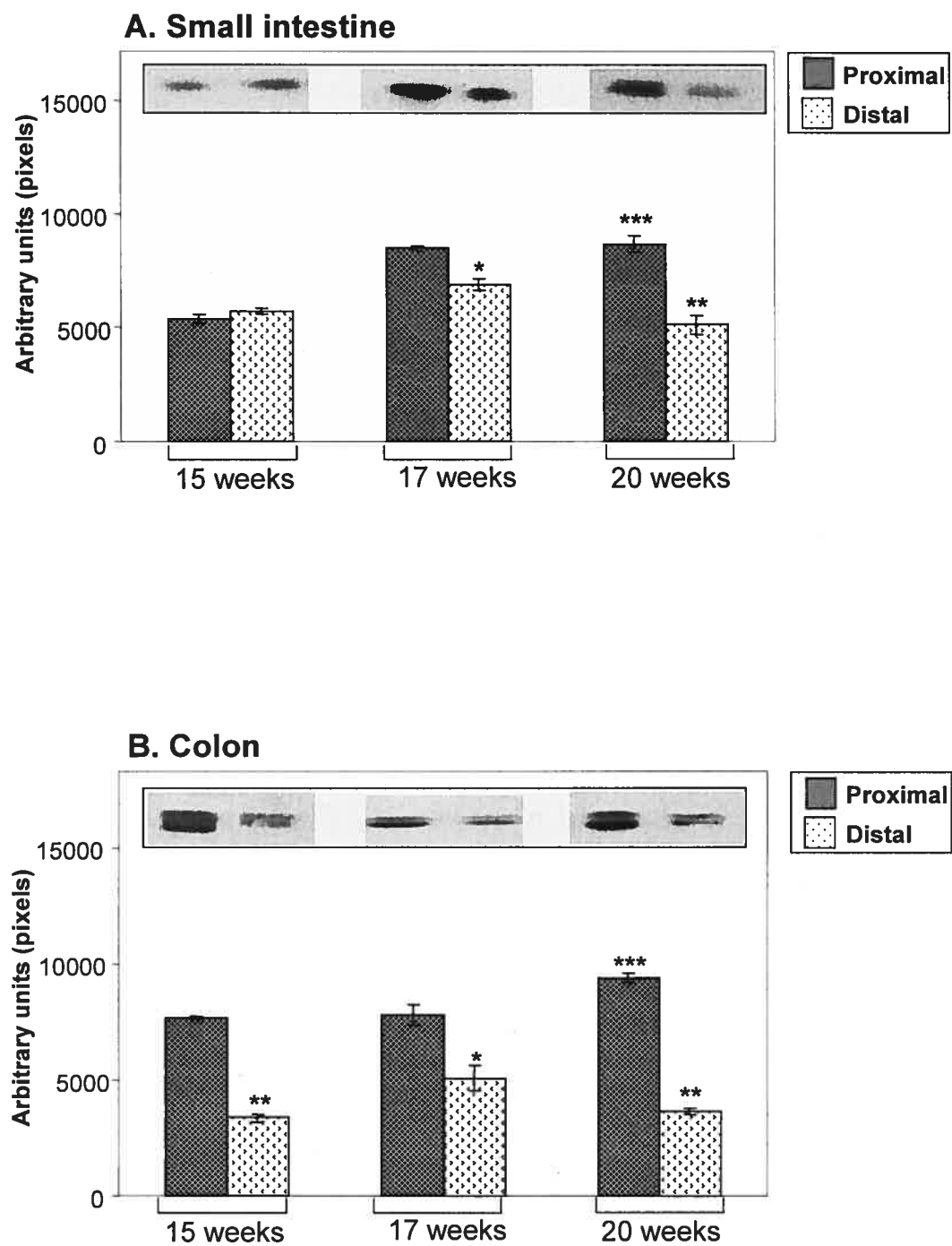




Figure 3.7

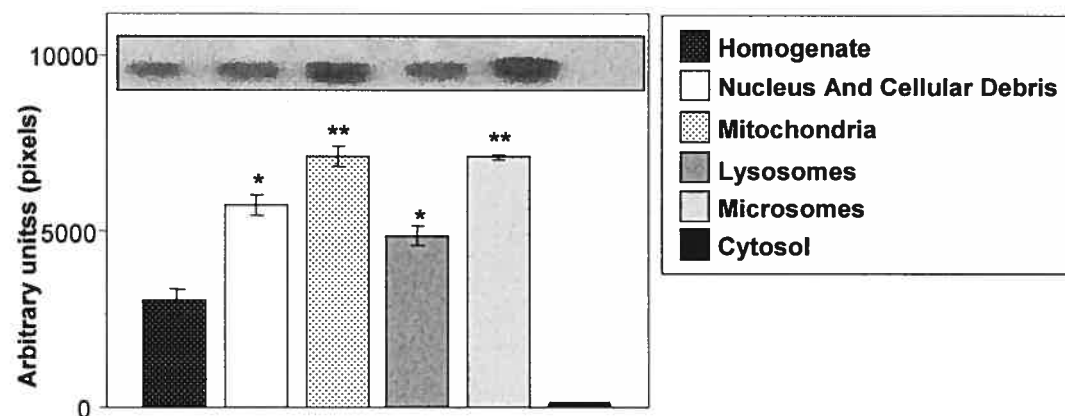


Figure 3.8

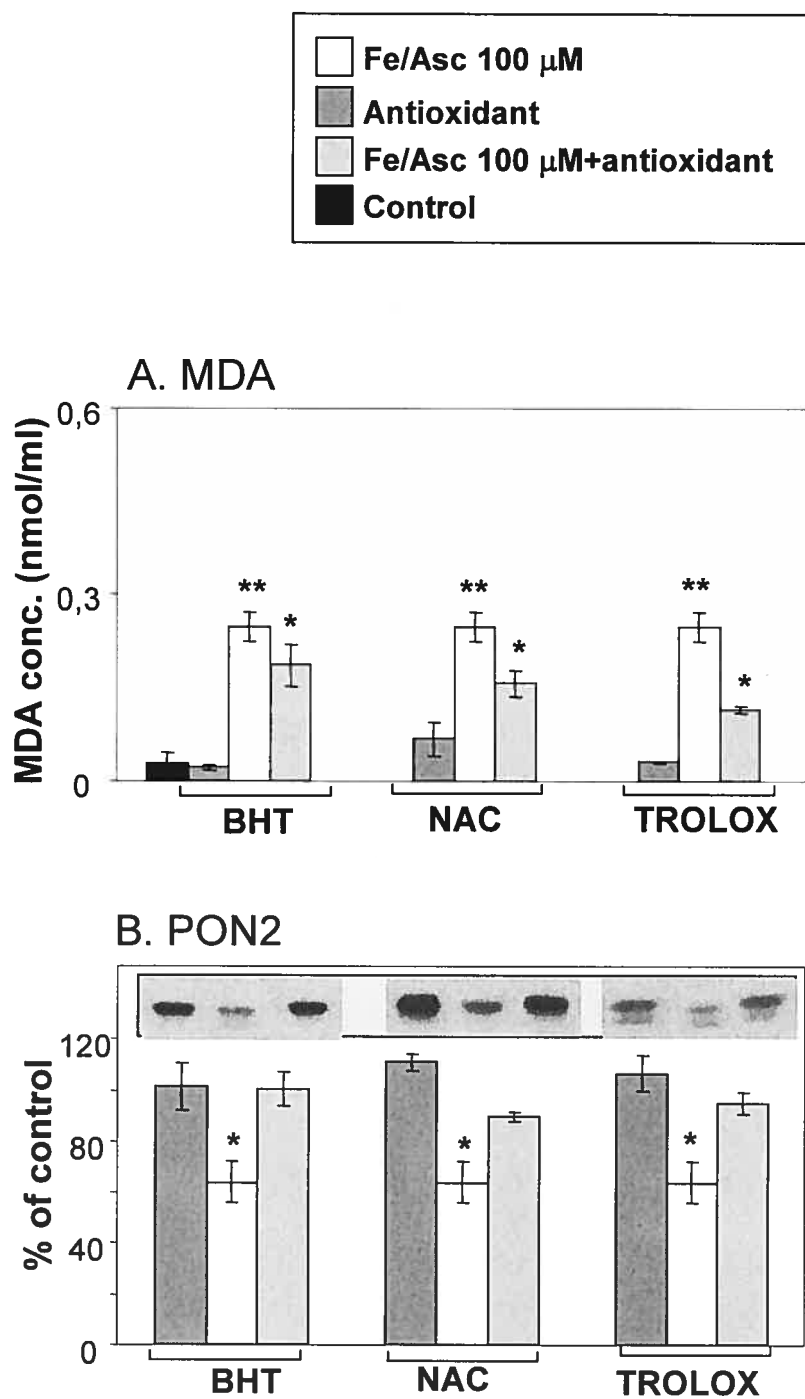


Figure 3.9

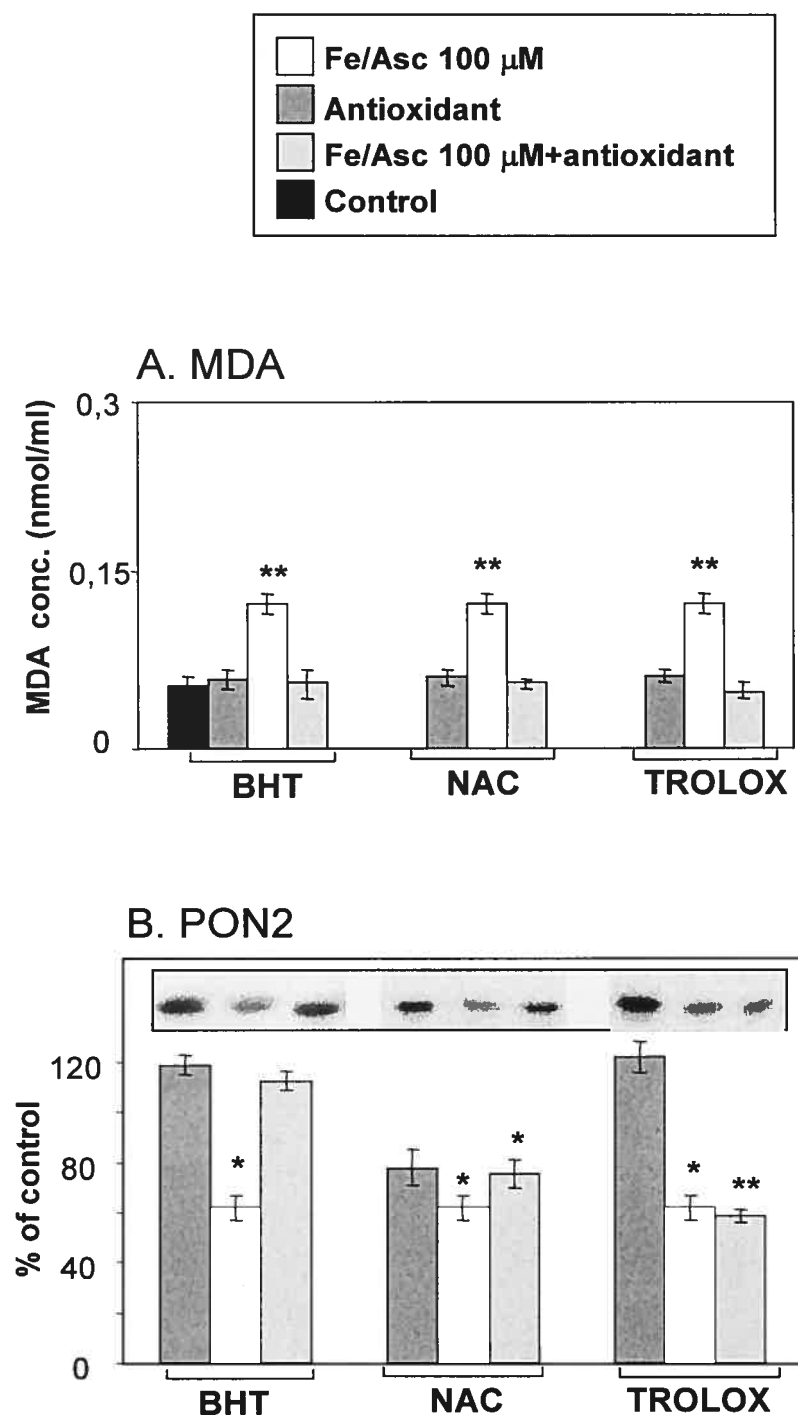


Figure 3.10

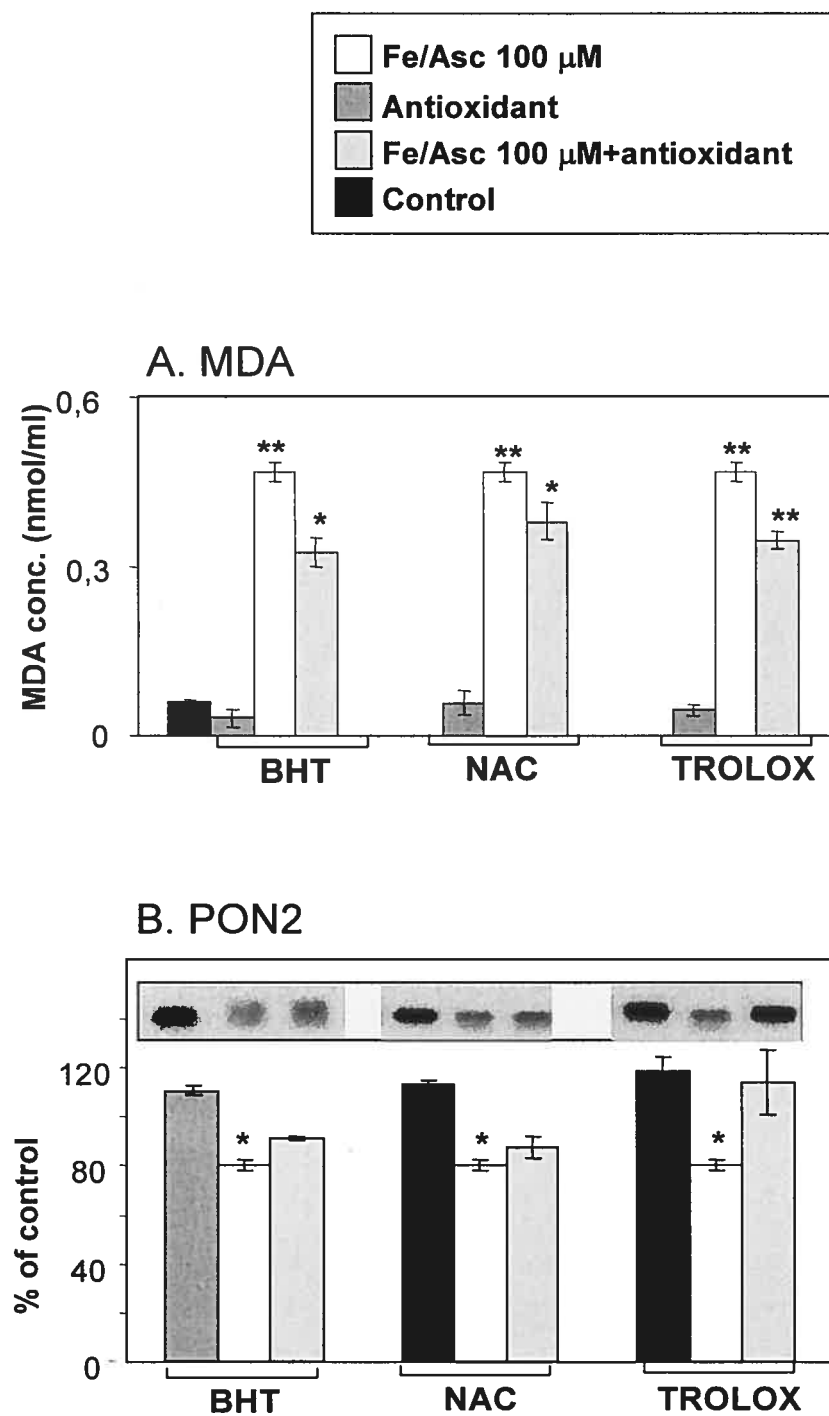


Figure 3.11

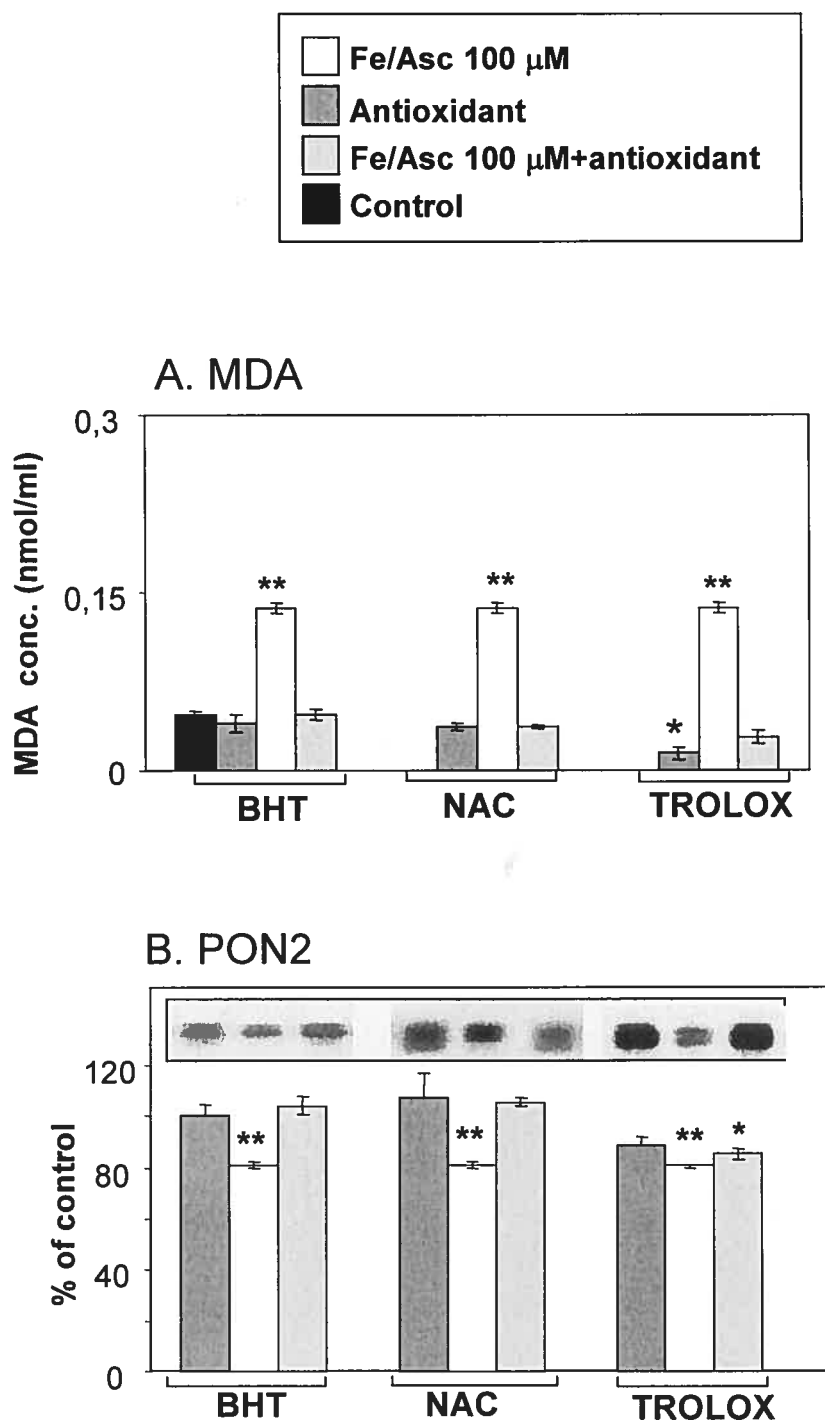


Figure 3.12

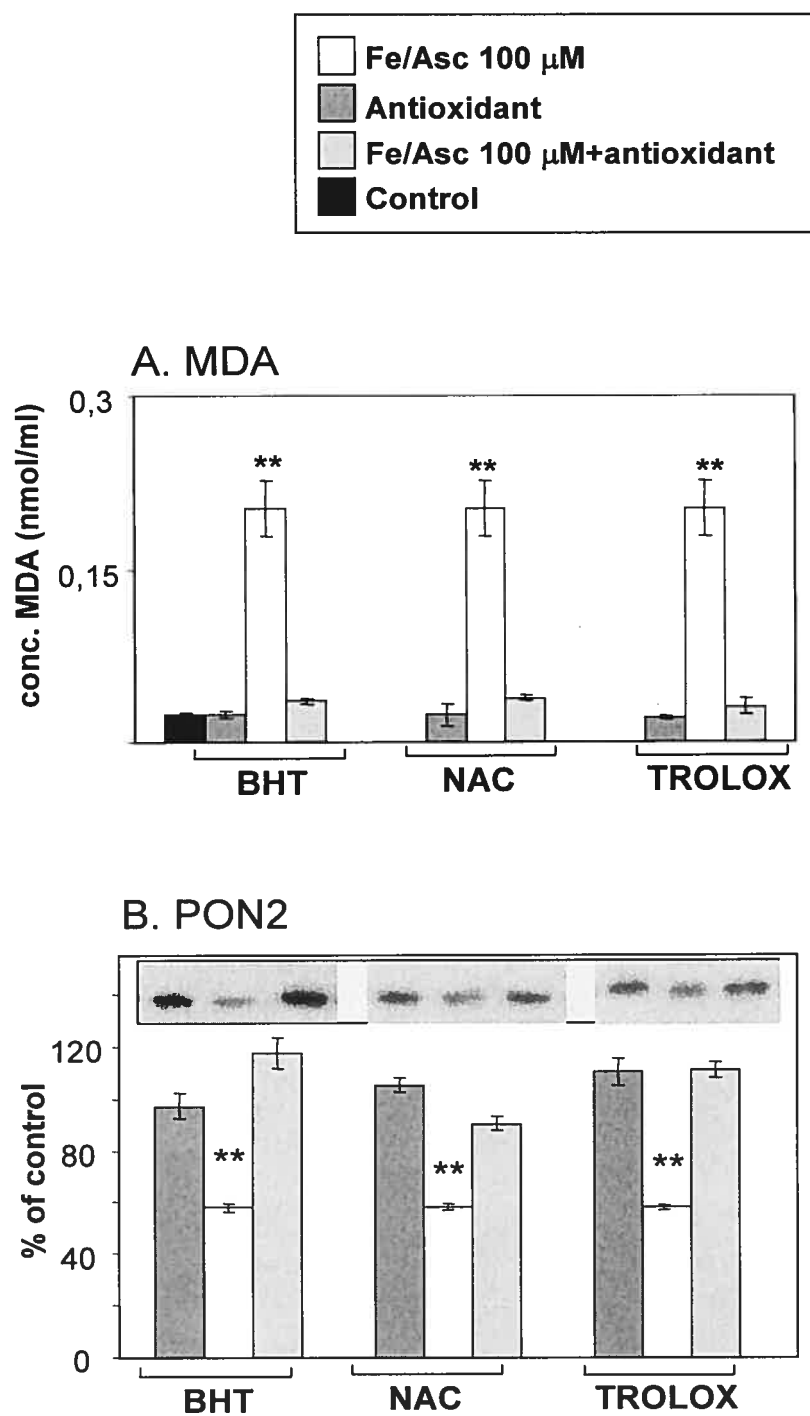
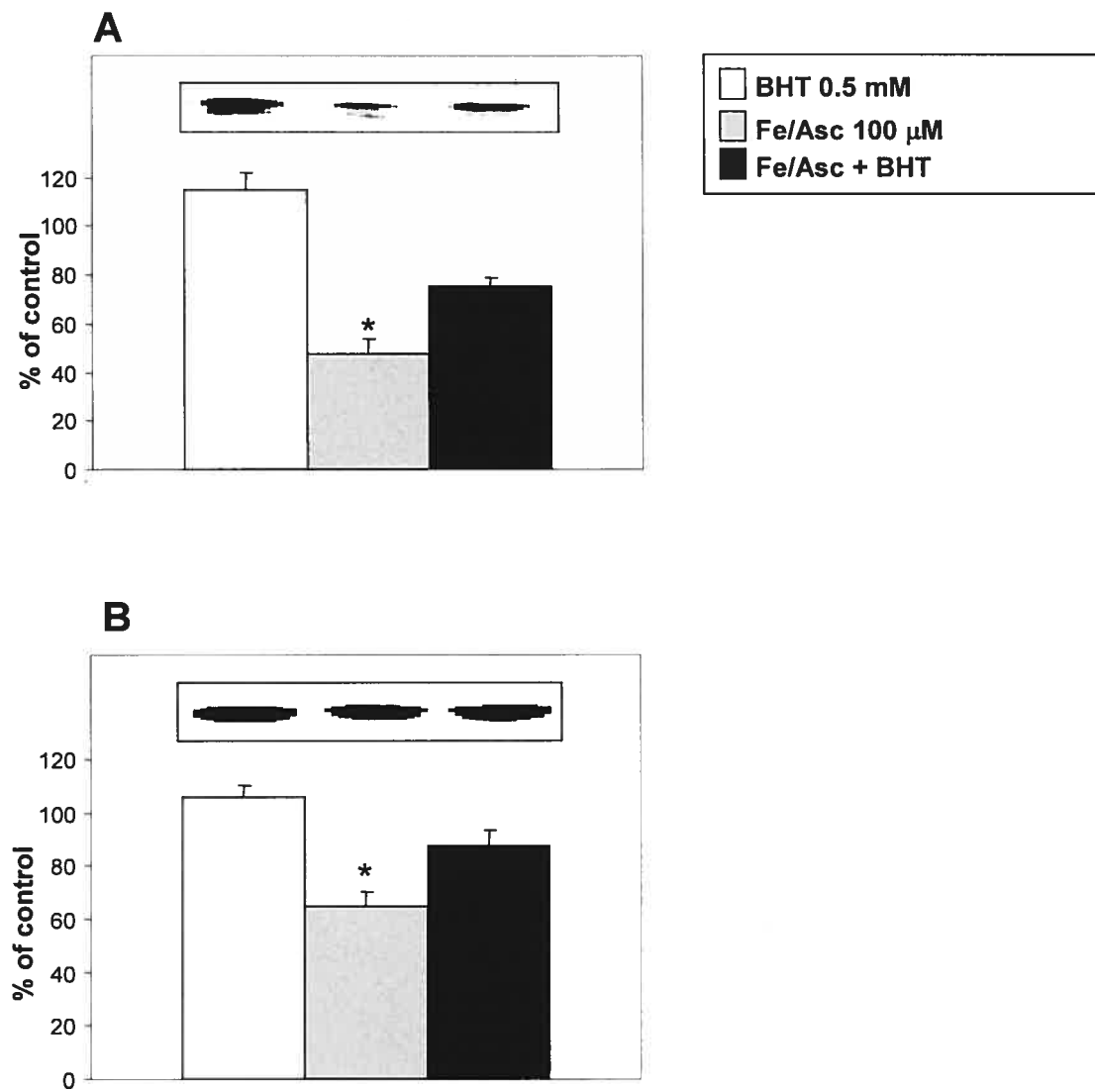


Figure 3.13



## CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE

Le foie est un organe essentiel au métabolisme des lipides et des lipoprotéines, telles que les HDLs. En effet, le foie module la sécrétion et la dégradation des HDLs en plus de synthétiser la partie protéique de cette lipoprotéine, incluant l'apo A-I. De plus en plus d'études confèrent aux HDLs un rôle protecteur essentiel contre l'athérosclérose ainsi qu'au cours de la progression des maladies coronariennes [Hovingh et al., 2005]. Le transport inverse du cholestérol par les HDLs est un processus antiathérogène permettant l'efflux du cholestérol des macrophages, empêchant ainsi son accumulation et la formation subséquente de cellules spumeuses [Libby, 2001]. En plus d'exercer leur rôle athéroprotecteur en permettant l'exocytose du cholestérol, les HDLs possèdent également des propriétés anti-inflammatoires et inhibent l'oxydation des LDLs [Navab et al., 2001; Watson et al., 1995]. Cette propriété antioxydante des HDLs est intimement liée à son association à l'enzyme paraoxonase (PON1). Alors que les HDLs sont protecteurs dans les étapes initiales de l'athérogénèse par l'inhibition de l'oxydation des LDLs, de nombreuses observations suggèrent que PON1 en est en majeure partie responsable [Mackness et al., 1993; Navab et al., 1996].

Au cours de ce projet de recherche, il a donc été possible de clarifier la localisation cellulaire de PON1 au niveau du réticulum endoplasmique des



hépatocytes, de déterminer sa distribution dans les sousfractions de HDLs, d'établir une comparaison entre son activité et ses taux protéiques chez l'humain et le rat et de spécifier l'effet du stress oxydatif sur cette enzyme. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que la majorité de l'activité PON1, mesurée par l'hydrolyse du paraoxon et d'acétate de phényle, se concentre dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. En plus d'une activité enzymatique élevée dans la fraction microsomiale, l'utilisation de la technique d'immunobuvardage de type Western a mis en évidence les taux supérieurs de PON1 dans cet organite. Dans la circulation, la fraction HDL<sub>3</sub> a présenté des taux protéiques et d'activité de PON1 prédominants en comparaison aux HDL<sub>2</sub>. Les résultats obtenus ont également révélé que le rat possède une activité et des taux de PON1 beaucoup plus élevés que l'humain. Finalement, une diminution de l'activité de PON1 dans les microsomes hépatiques et dans les HDL<sub>3</sub> a été observée simultanément avec la peroxydation des lipides induite par l'ajout du complexe pro-oxydant Fer/Ascorbate. Cette réduction a toutefois pu être partiellement enrayée par un traitement avec l'antioxydant BHT.

Les données obtenues dans cette étude démontrent tout d'abord que PON1 se localise dans la fraction microsomiale du foie et dans les HDLs dans la circulation. Les autres organelles des hépatocytes et les autres lipoprotéines plasmatiques ne renfermaient que des quantités négligeable de l'enzyme. Il va sans dire que les données obtenues concernant la localisation tissulaire et

circulante de PON1 appuient les hypothèses stipulant la synthèse hépatique de PON1 et son association aux HDLs dans le sérum [James and Deakin, 2004]. Dans cette perspective, il est possible de spéculer que l'association de PON1 avec les HDLs s'accomplit lors de leur formation et que l'assemblage prend place au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes. Il doit donc exister un mécanisme régulant la synthèse et l'addition de PON1 à son transporteur, en fonction de la formation et de la sécrétion de celui-ci. D'autres études ont cependant émis l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de PON1 au niveau de la membrane externe cellulaire permettrait au HDL de s'y lier temporairement pour enclencher un processus de désorption [Deakin et al., 2002]. Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de clarifier étapes de synthèse de PON1 et de son incorporation dans les HDLs.

Les HDLs présents dans le plasma humain sont très hétérogènes en terme de forme, taille, densité, composition et charge de surface [Barter et al., 2003]. Alors que l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire est une des étapes initiales dans l'athérogénèse, la fraction HDL<sub>3</sub> a pour effet d'inhiber l'expression de protéines d'adhésion par les cellules endothéliales [Ashby et al., 1998]. Il a également été montré que la sousfraction de HDL avec la plus grande densité, soit les HDL<sub>3</sub>, est celle qui possède la plus grande capacité antioxydante et la meilleure protection contre l'oxydation des LDLs [Kontush et al., 2003]. Ces données corrént bien avec la présence plus marquée de

PON1 dans la fraction HDL<sub>3</sub> puisque cette enzyme antioxydante permet d'accroître la protection contre le stress oxydatif, de prévenir l'oxydation des LDLs et de préserver l'importante fonction métabolique de cette lipoprotéine à laquelle elle est associée. Par son activité enzymatique, PON1 liée au HDL<sub>3</sub> permet non seulement d'hydrolyser et de détoxifier les organophosphates, comme le paraoxon, mais aussi de neutraliser des peroxydes extrêmement nuisibles.

Les deux fonctions principales du foie résident dans la synthèse d'une vaste gamme de protéines et dans la détoxification de toxines ingérées quotidiennement par l'organisme en plus des multiples sous-produits toxiques et endogènes générés par le métabolisme [Pineiro-Carrero and Pineiro, 2004]. De nombreuses enzymes composent le système de détoxification hépatique qui transforme les xénobiotiques en divers métabolites et radicaux libres [Gunawan and Kaplowitz, 2004]. De pair avec les enzymes détoxifiantes, les enzymes antioxydantes permettent de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène, afin de réduire globalement la cytotoxicité. La détection de PON1 au niveau des microsomes hépatiques indique que cette enzyme joue possiblement un rôle dans l'hydrolyse de plusieurs composés endogènes et exogènes, en plus de neutraliser le stress oxydatif généré par les différents processus prenant place dans le foie.

De nombreux mécanismes dans l'organisme sont à l'origine de la production de radicaux libres, dont l'activité mitochondriale. In vitro, il est possible d'induire un stress oxydatif avec le complexe hautement prooxydant fer-ascorbate. Il a été démontré que la forte nature prooxydante de ce complexe provoque une peroxydation lipidique, un mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras membranaires conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables qui entraînent une diminution de la fluidité membranaire. De plus, la peroxydation induite par ce complexe altère la fonction des enzymes régulatrices des stérols et des protéines membranaires. L'homéostasie du cholestérol est également perturbée par la peroxydation lipidique induite avec le fer-ascorbate [Brunet et al., 2000]. Il est reconnu que plusieurs métaux, incluant le fer, entraînent la formation de radicaux libres pouvant réagir avec d'importants substrats organiques comme l'ADN et augmentent la peroxydation lipidique [Valko et al., 2005]. Le fer induit la peroxydation des lipides via le cycle de Fenton et plusieurs études ont noté un stress oxydatif accru lors de l'ajout de ce métal [Fukuzawa et al., 2005; Lim and Vaziri, 2004]. L'addition d'acide ascorbique peut amplifier le potentiel oxydatif du fer par la mobilisation du métal se liant normalement à diverses protéines, lui permettant une plus grande capacité catalytique de peroxydation lipidique [Kapsokefalou and Miller, 2001].

Les données présentées dans ce projet démontrent bien que le complexe prooxydant fer-ascorbate a non seulement induit une peroxydation des lipides

mais a également diminué l'activité et les taux protéiques de PON1 dans les microsomes hépatiques et les HDL<sub>3</sub>. La dégradation de PON1 suite à l'exposition des microsomes et des HDL<sub>3</sub> au fer-ascorbate peut s'expliquer par la génération de radicaux libres et de stress oxydatif par le complexe pro-oxydant, puisque l'ajout de l'antioxydant BHT a simultanément permis de prévenir la peroxydation lipidique et d'améliorer les taux de l'enzyme. Il est possible que la peroxydation lipidique catalysée par le fer module l'activité enzymatique par l'attaque d'acides gras polyinsaturés, provoquant un changement de la fluidité membranaire dans laquelle se localise PON1. En outre, il est probable que la peroxydation induite par le fer-ascorbate affecte la structure secondaire et tertiaire de PON1 et que de tels changements conformationnels modifient son site actif et accélèrent sa dégradation.

En somme, les résultats de cette étude sur PON1 démontrent la localisation de PON1 dans les microsomes hépatiques, dans le sérum et plus particulièrement dans la fraction HDL<sub>3</sub>, à la fois chez l'humain et le rat. Il a été noté que le rat possède des plus hauts taux de PON1 et d'activité paraoxonase basale et arylesterase en comparaison à l'humain. Cependant, seulement l'activité PON1 chez l'humain a pu être stimulée par l'addition de sel dans le réactif. Les résultats montrent également des différences dans la protection de PON1 contre le stress oxydatif chez l'humain et le rat. Non seulement les données ont démontré la localisation de PON1 au niveau du réticulum endoplasmique au

niveau hépatique et dans la fraction HDL<sub>3</sub> dans la circulation, mais elles mettent aussi en évidence le rôle majeur de cette enzyme dans les systèmes de défense antioxydante de ces sites.

La paraoxonase 2 (PON2) est beaucoup moins bien caractérisée que PON1 et l'information disponible sur la physiologie de cette protéine est très limitée. Dans cette perspective, le projet de recherche a été orienté vers une comparaison entre le rat et l'humain pour la localisation tissulaire et cellulaire, l'ontogénie et l'effet du stress oxydatif sur PON2. Tout d'abord, les résultats obtenus montrent clairement la localisation de PON2 au niveau hépatique et tout le long de l'intestin, soit dans le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le colon proximal et le colon distal. Il a également été noté que la concentration de PON2 dans le foie et l'intestin est significativement plus élevée chez l'humain en comparaison avec le rat. Dans ces deux organes, PON2 a été détectée dans différents compartiments cellulaires tels que le noyau, la mitochondrie, les lysosomes et les microsomes. Alors que les mitochondries et les lysosomes renferment la majorité de PON2 chez le rat, les lysosomes et les microsomes sont les organites chez l'humain avec les plus hauts taux de cette protéine. Finalement, la peroxydation lipidique induite par le fer-ascorbate a eu pour effet de diminuer les taux protéiques de PON2, mais ces effets ont pu être contrés par l'ajout d'antioxydants comme le BHT, le NAC et le TROLOX.

Alors que PON1 se retrouve principalement dans la fraction microsomiale, PON2 a été détectée dans plusieurs organelles cellulaires. Le fractionnement au niveau du foie et de l'intestin a révélé la présence de PON2 non seulement dans les microsomes, mais également dans le noyau, la mitochondrie et le lysosome. En supposant que PON2 a comme rôle principal de contrer le stress oxydatif, sa localisation intracellulaire laisse suggérer son implication dans la protection antioxydante des divers organites. Puisque PON2 est exprimée dans plusieurs tissus, retarde l'oxydation des LDLs et ne se retrouve pas dans la circulation, elle est perçue comme davantage protectrice au niveau cellulaire [Ng et al., 2001]. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'élucider le rôle de PON2 dans chacun des différents compartiments cellulaires où elle a pu être détectée, ce qui permettra de mieux comprendre les différences observées dans la distribution chez le rat et l'humain.

La cascade d'évènements immunologiques provoquant l'inflammation de l'intestin est marquée par une production accrue de radicaux libres par les neutrophiles activés qui s'infiltrent dans la paroi intestinale. Les radicaux libres produits sont hautement réactifs et peuvent causer des dommages aux cellules adjacentes par la peroxydation des lipides. De plus, certains facteurs environnementaux contribuent à amplifier la génération d'espèces réactives de l'oxygène. L'ingestion alimentaire d'oxydants est largement impliquée dans ce processus, alors que les aliments contenant du cholestérol contiennent

souvent des oxydes du cholestérol. Les oxydases provenant de cellules détachées, comme la xanthine oxydase, et les bactéries déficientes en catalase intracavitaire produisent d'importantes quantités de peroxyde d'hydrogène et représentent des sources de radicaux libres non négligeables au niveau intestinal. De toute évidence, la présence de ces peroxydes et autres espèces réactives de l'oxygène peuvent être très néfastes pour l'organisme puisque les dommages tissulaires peuvent avoir des répercussions sur l'absorption intestinale. Dans ce contexte, des systèmes de détoxification peuvent contrôler et minimiser la production aggravée d'espèces réactives, neutraliser les radicaux et ainsi limiter l'étendue des dommages et réparer les tissus endommagés. Tel que décrit au cours de la présente étude, PON2 se retrouve tout le long de l'intestin et y est abondamment exprimée. Il est donc possible que PON2 soit un antioxydant essentiel dans l'intestin, prévenant la détérioration de l'intégrité membranaire, assurant le maintien de l'homéostasie cellulaire et permettant la conservation de ses fonctions endocrine, métabolique, immunologique et absorptive. Cette hypothèse est renforcée par des liens de plus en plus évidents entre la fonction biochimique de PON2 et celle de PON1 et PON3. Par ailleurs, des études montrent des associations génétiques avec certains facteurs de risque et pathologies comme les taux de lipoprotéines plasmatiques [Boright et al., 1998; Hegele, 1999; Leus et al., 2001], la glycémie dans le diabète de type 1 et 2 [Hegele, 1999; Hegele et al.,



1997], le stress oxydatif cellulaire [Ng et al., 2001] et les maladies cardiovasculaires [Chen et al., 2003; Leus et al., 2001; Sanghera et al., 1998].

Les résultats obtenus démontrent clairement que l'expression de PON2 est significativement plus grande dans le jéjunum en comparaison aux autres portions de l'intestin grêle, soit le duodénum et l'iléon. Parallèlement, des études antérieures ont montré que le jéjunum constitue le site le plus important dans l'absorption des acides gras, la synthèse des lipides et l'assemblage des chylomicrons [Levy, 1992]. Alors que le jéjunum assume l'ensemble de ces fonctions et qu'il est constamment exposé à des prooxydants provenant de l'alimentation, PON2 permet sans doute de neutraliser l'excès de radicaux susceptibles d'altérer la fonction des cellules épithéliales intestinales. En effet, PON2 en tant qu'antioxydant pourrait ainsi prévenir d'importants dommages comme la rupture du cytosquelette, la désintégration des jonctions serrées et la perte de l'intégrité de la muqueuse intestinale [Rao et al., 1997].

Il existe très peu d'informations sur le statut antioxydant de l'entérocyte suite à une attaque peroxydative dirigée vers la bordure en brosse. Cependant, une étude antérieure a démontré que le stress oxydatif avait augmenté les taux de malondialdéhyde, change le ratio des acides gras polyinsaturés en fonction des saturés et altère la fluidité et perméabilité membranaire dans les cellules Caco-2. Les antioxydants endogènes tels que la superoxyde dismutase, la

catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion transférase sont demeurés inchangés [Bernotti et al., 2003]. Dans la présente étude, la peroxydation lipidique induite par le complexe prooxydant fer-ascorbate a diminué les taux protéiques de PON2 au niveau intestinal, démontrant l'implication directe de cette protéine dans la neutralisation des radicaux libres. D'autres protéines sont néanmoins capables de limiter et même d'éviter les dommages causés par le stress oxydatif sur l'entérocyte. L'apo A-IV, produite par le petit intestin, aurait également de puissantes propriétés antioxydantes [Qin et al., 1998]. Par ailleurs, les autres membres de la famille de PONs semblent aussi être synthétisés dans l'intestin et pourraient y jouer un rôle antioxydant similaire [Shamir et al., 2005]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les fonctions spécifiques ou complémentaires des différentes protéines de la famille des PONs dans l'intestin et le foie.

## RÉFÉRENCES

Akcay M, Polat M, Yilmaz I, Akcay G (2003a): Serum paraoxonase levels in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 50:ccxxv-ccxxvii.

Akcay M, Yilmaz I, Polat M, Akcay G (2003b): Serum paraoxonase levels in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 50:ccxxv-ccxxvii.

Antognelli C, Mearini L, Talesa V, Giannantoni A, Mearini E (2005): Association of CYP17, GSTP1, and PON1 polymorphisms with the risk of prostate cancer. *Prostate* 63:240-51.

Arca M, Ombres D, Montali A, Campagna F, Mangieri E, Tanzilli G, Campa P, Ricci G, Verna R, Pannitteri G (2002): PON1 L55M polymorphism is not a predictor of coronary atherosclerosis either alone or in combination with Q192R polymorphism in an Italian population. *European Journal of Clinical Investigations* 32:9-15.

Arts I, Hollman P (2005): Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81:317S-325S.

Ashby D, Rye K, Clay M, Vadas M, Gamble J, Barter P (1998): Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 18:1450-5.

Aviram M (2004): Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine* 37:1301-1303.

Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M (2000): Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 101:2510-2517.

Aviram M, Rosenblat M (2004): Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology and Medicine* 37:1304-1316.

Back E, Frindt C, Nohr D, Frank J, Ziebach R, Stern M, Ranke M, Biesalski H (2004): Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? *American Journal of Clinical Nutrition* 80:374-84.

Banci L, Benedetto M, Bertini I, Del Conte R, Piccioli M, Viezzoli M (1998): Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme?. *Biochemistry* 37:11780-91.

Bargota R, Akhtar M, Biggadike K, Gani D, Allemann R (2003): Structure-activity relationship on human serum paraoxonase (PON1) using substrate analogues and inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 13:1623-1626.

Barnes D, Lindahl T (2004): Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annual Reviews of Genetics* 38:445-476.

Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R (2003): High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis* 168:195-211.

Baskol G, Baskol M, Yurci A, Ozbakir O, Yucesoy M (2005): Serum paraoxonase 1 activity and malondialdehyde levels in patients with ulcerative colitis. *Cell Biochemistry and Function* In Press.

Behrend L HG, Zwacka RM. (2003): Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions* 31:1441-4.

Bell S, Saunders M, Elborn J, Shale D (1996): Resting energy expenditure and oxygen cost of breathing in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 51:126-31.

Benabdeslam H, Abidi H, Garcia I, Bellon G, Gilly R, Revol A (1999): Lipid peroxidation and antioxidant defenses in cystic fibrosis patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 37:511-516.

Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W (2004): Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clinical Chemistry* 50:2309-2315.

Berneis K, Rizzo M (2004): LDL size: does it matter? *Swiss Medical Weekly* 134:720-4.

Bernotti S, Seidman E, Sinnott D, Brunet S, Dionne S, Delvin E, Levy E (2003): Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 285:G898-906.

Blomhoff R (2005): Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Current opinion in lipidology* 16:47-54.

Boemi M, Sirolla C, Testa R, Cenerelli S, Fumelli P, James R (2004): Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in Type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicine* 21:423-7.

Boren J, Ekstrom U, Agren B, Nilsson-Ehle P, Innerarity T (2001): The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *Journal of Biological Chemistry* 276:9214-8.

Boright A, Connelly P, Brunt J, Scherer S, Tsui L, Hegele R (1998): Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis* 139:131-6.

Brophy V, Jampsa R, Clendenning J, McKinstry L, Jarvik G, Furlong C (2001): Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *American Journal of Human Genetics* 68:1428-36.

Brown R, Wyatt H, Price J, Kelly F (1996): Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *European Respiratory Journal* 9:334-9.

Brunet S, Thibault L, Lepage G, Seidman E, Dube N, Levy E (2000): Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 28:46-54.

Carr A, Zhu B, Frei B (2000): Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circulation Research* 87:349-54.

Chen J, Chan W, Wallenstein S, Berkowitz G, Wetmur J (2005): Haplotype-phenotype relationships of paraoxonase-1. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 14:731-4.

Chen Q, Reis S, Kammerer C, McNamara D, Holubkov R, Sharaf B, Sopko G, Pauly D, Merz C, Kamboh M, Group. WS (2003): Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *American Journal of Human Genetics* 72:13-22.

Chew B, Park J (2004): Carotenoid action on the immune response. *Journal of Nutrition* 134:257S-261S.

Clarke R, Armitage J (2002): Antioxidant vitamins and risk of cardiovascular disease. Review of large-scale randomised trials. *Cardiovascular Drug and Therapy* 16:411-5.

Cochrane C (1991): Cellular injury by oxidants. *American Journal of Medicine* 91:23S-30S.

Costa L, Vitalone A, Cole T, Furlong C (2005): Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 69:514-550.

Dantoine T, Debord J, Merle L, Lacroix-Ramiandrisoa H, Bourzeix L, Charmes J (2002): Paraoxonase 1 activity: a new vascular marker of dementia? *Annals of the New York Academy of Science* 977:96-101.

Davi G, Falco A, Patrono C (2005): Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxidants & Redox Signalling* 7:256-68.

Dawson M (2000): The importance of vitamin A in nutrition. *Current Pharmaceutical Design* 6:311-25.

Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James R (2002): Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 277:4301-4308.

Deakin S, Moren X, James R (2005): Very low density lipoproteins provide a vector for secretion of paraoxonase-1 from cells. *Atherosclerosis* 179:17-25.

Devasagayam T, Tilak J, Bloor K, Sane K, Ghaskadbi S, Lele R (2004): Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India* 52:794-804.

Ding L, Liu Z, Zhu Z, Luo G, Zhao D, Ni J (1998): Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochemical Journal* 332:251-5.

Dinis T, Almeida L, Madeira V (1993): Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membranes: effect on functional and biophysical properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 301:256-64.

Dodge J (1985): The nutritional state and nutrition. *Acta Paediatrica Scandinavica* 317:31-7.

Draganov D, La Du B (2004): Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 369:78-88.

Draganov D, Teiber J, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du B (2005): Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal Lipid Research* 46:1239-47.

Duvall W (2005): Endothelial dysfunction and antioxidants. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 72:71-80.

Esterbauer H (1993): Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *American Journal of Clinical Nutrition* 57:779S-785S.

Ettelaie C, Wilbourn B, Adam J, James N, Bruckdorfer K (1999): Comparison of the inhibitory effects of ApoB100 and tissue factor pathway inhibitor on tissue factor and the influence of lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 19:1784-90.

Eze M (1992): Membrane fluidity, reactive oxygen species, and cell-mediated immunity: implications in nutrition and disease. *Medical Hypothesis* 37:220-4.

Ferre N, Camps J, Cabre M, Paul A, Joven J (2001): Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism* 50:997-1000.

Fuhrman B, Partoush A, Aviram M (2004): Acetylcholine esterase protects LDL against oxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 322:974-8.

Fukuzawa K, Saitoh Y, Akai K, Kogure K, Ueno S, Tokumura A, Otagiri M, Shibata A (2005): Antioxidant effect of bovine serum albumin on membrane lipid peroxidation induced by iron chelate and superoxide. *Biochimica and Biophysica Acta* 1668:145-55.

Fumeron C, Nguyen-Khoa T, Saltiel C, M. K, Buisson C, Druke T, Lacour B, Massy Z (2005): Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative stress and inflammation status in haemodialysis patients. *Nephrology, Dialysis and Transplant* In Press.

Garin M, Kalix B, Morabia A, James R (2005): Small, dense lipoprotein particles and reduced paraoxonase-1 in patients with the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90:2264-9.

- Geerling B, Stockbrugger R, Brummer R (1999): Nutrition and inflammatory bowel disease: an update. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 230:95-105.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G (1996): Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-67.
- Goth L, Rass P, Pay A (2004): Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis* 8:141-9.
- Grand R, Ramakrishna J, Calenda K (1995): Inflammatory bowel disease in the pediatric patient. *Gastroenterology Clinics of North America* 24:613-32.
- Griffiths A (1998): Inflammatory bowel disease. *Nutrition* 14:788-91.
- Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies K (1995): Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 270:2344-51.
- Gunawan B, Kaplowitz N (2004): Clinical perspectives on xenobiotic-induced hepatotoxicity. *Drug Metabolism reviews* 36:301-12.
- Halliwell B (1994): Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews* 52:253-265.
- Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli R, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman J, Tawfik D (2004): Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology* 11:412-9.
- Hedley D, Chow S (1992): Flow cytometric measurement of lipid peroxidation in vital cells using parinaric acid. *Cytometry* 13:686-92.
- Hegele R (1999): Paraoxonase genes and disease. *Annals of Medicine* 31:217-24.
- Hegele R, Connelly P, Scherer S, Hanley A, Harris S, Tsui L, Zinman B (1997): Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82:3373-7.
- Helbecque N, Cottel D, Codron V, Berr C, Amouyel P (2004): Paraoxonase 1 gene polymorphisms and dementia in humans. *Neuroscience Letters* 358:41-4.



Homma Y (2004): Predictors of atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 11:265-70.

Hovingh G, de Groot E, van der Steeg W, Boekholdt S, Hutten B, Kuivenhoven J, Kastelein J (2005): Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 16:139-45.

Huang H, Appel L, Croft K, Miller E, Mori T, Puddey I (2002): Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition* 76:549-55.

Hudson V (2001): Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free Radical Biology and Medicine* 30:1140-61.

Hulthe J (2004): Antibodies to oxidized LDL in atherosclerosis development—clinical and animal studies. *Clinica Chimica Acta* 348:1-8.

Ito T, Yasue H, Yoshimura M, Nakamura S, Nakayama M, Shimasaki Y, Harada E, Mizuno Y, Kawano H, Ogawa H (2002): Paraoxonase gene Gln192Arg (Q192R) polymorphism is associated with coronary artery spasm. *Human Genetics* 110:89-94.

Jackson J (1994): Potential molecular mechanisms of oxidant-induced carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 102:155-7.

Jacob R, Sotoudeh G (2002): Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutrition in Clinical Care* 5:66-74.

James R, Deakin S (2004): The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radical Biology and Medicine* 37:1986-1994.

Johansen J, Harris A, Rychly D, Ergul A (2005): Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology* 4:5.

Kang D, Hamasaki N (2003): Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41:1281-8.

Kappus H (1986): Overview of enzyme systems involved in bio-reduction of drugs and in redox cycling. *Biochemical Pharmacology* 35:1-6.

Kapsokefalou M, Miller D (2001): Iron loading and large doses of intravenous ascorbic acid promote lipid peroxidation in whole serum in guinea pigs. *The British Journal of Nutrition* 85:681-7.

Kim M, Sasaki S, Sasazuki S, Okubo S, Hayashi M, Tsugane S (2002): Lack of long-term effect of vitamin C supplementation on blood pressure. *Hypertension* 40:797-803.

Kinlay S, Behrendt D, Fang J, Delagrangé D, Morrow J, Witztum J, Rifai N, Selwyn A, Creager M, Ganz P (2004): Long-term effect of combined vitamins E and C on coronary and peripheral endothelial function. *Journal of American College of Cardiology* 43:629-34.

Kontush A, Chantepie S, Chapman M (2003): Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 23:1881-8.

Koppenol W (2001): The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox report: communications in free radical research* 6:229-34.

Krok K, Lichtenstein G (2003): Nutrition in Crohn disease. *Current opinion in gastroenterology* 19:148-53.

Kruidenier L, Kuiper I, Lamers C, Verspaget H (2003): Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *Journal of Pathology* 201:28-36.

Kushner R, Schoeller D (1991): Resting and total energy expenditure in patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 53:161-165.

La Du B, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Paromo S, Sorenson R, Standiford T (1999): On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chemico-Biological Interactions* 119-120:379-88.

Lee I, Cook N, Gaziano J, Gordon D, Ridker P, Manson J, Hennekens C, Buring J (2005): Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 294:56-65.

Leus F, Zwart M, Kastelein J, Voorbij H (2001): PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis* 154:641-9.

Leviev I, Righetti A, James R (2001): Paraoxonase promoter polymorphism T(-107)C and relative paraoxonase deficiency as determinants of risk of coronary artery disease. *Journal of molecular medicine* 79:457-63.

Levy E (1992): The 1991 Borden Award Lecture. Selected aspects of intraluminal and intracellular phases of intestinal fat absorption. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 70:413-9.

Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, Seidman E (2000): Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 71:807-815.

Li H, Liu D, Liang C (2003): Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *Journal of molecular medicine* 81:766-79.

Libby P (2001): Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. *American Journal of Cardiology* 88:3N-8N.

Lim C, Vaziri N (2004): Iron and oxidative stress in renal insufficiency. *American Journal of Nephrology* 24:569-75.

Linsel-Nitschke P, Tall A (2005): HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 4:193-205.

Liu R (2004): Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* 134:3479S-3485S.

Lledias F, Rangel P, Hansberg W (1998): Oxidation of catalase by singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry* 273:10630-7.

Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold J, Ross C, Arnold A, Sleight P, Probstfield J, Dagenais G (2005): Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 293:1338-47.

Lowe G, Booth L, Young A, Bilton R (1999): Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radical Biology and Medicine* 30:141-51.

Lowe G, Vlismas K, Young A (2003): Carotenoids as prooxidants? *Molecular aspects of Medicine* 24:363-9.

Mackness B, Durrington P, Boulton A, Hine D, Mackness M (2002a): Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *European Journal of Clinical Investigations* 32:259-64.

Mackness B, Durrington P, Mackness M (1998): Human serum paraoxonase. *General Pharmacology* 31:329-36.

Mackness B, Durrington P, Povey A, Thomson S, Dippnall M, Mackness M, Smith T, Cherry N (2002b): Paraoxonase and susceptibility to organophosphorus poisoning in farmers dipping sheep. *Pharmacogenetics* 13:81-88.

Mackness M, Arrol S, Abbott C, Durrington P (1993): Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104:129-35.

Mackness M, Arrol S, Durrington P (1991): Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Letters* 286:152-4.

Mackness M, Arrol S, Mackness B, Durrington P (1997): Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet* 349:851-2.

Malin R, Knuuti J, Janatuinen T, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Jokela H, Laakso J, Jaakkola O, Solakivi T, Lehtimäki T (2001): Paraoxonase gene polymorphisms and coronary reactivity in young healthy men. *Journal of molecular medicine* 79:449-58.

Maritim A, Sanders R, Watkins J (2003): Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17:24-38.

Marnett L (2000): Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361-70.

Mates J, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32:595-603.

Mates J, Sanchez-Jimenez F (1999): Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Biosciences* 4:D339-345.

May J (2000): How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radical Biology and Medicine* 28:1421-9.

McCall M, Frei B (1999): Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology and Medicine* 26:1034-1053.

McCord J (2000): The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine* 108:652-9.

McGrath L, Mallon P, Dowey L, Silke B, McClean E, McDonnell M, Devine A, Copeland S, Elborn S (1999): Oxidative stress during acute respiratory exacerbations in cystic fibrosis. *Thorax* 54:518-23.

Meier B, Scherk C, Schmidt M, Parak F (1998): pH-dependent inhibition by azide and fluoride of the iron superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*. *Biochemical Journal* 331:403-7.

Meydani M (2004): Vitamin E modulation of cardiovascular disease. *Annals of the New York Academy of Science* 1031:271-9.

Navab M, Berliner J, Subbanagounder G, Hama S, Lusis A, Castellani L, Reddy S, Shih D, Shi W, Watson A, Van Lenten B, Vora D, Fogelman A (2001): HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 21:481-8.

Navab M, Berliner J, Watson A, Hama S, Territo M, Lusis A, Shih D, Van Lenten B, Frank J, Demer L, Edwards P, Fogelman A (1996): The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 16:831-42.

Ng C, Wadleigh D, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva V, Navab M, Fogelman A, Reddy S (2001): Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 276:44444-44449.

Nishino H, Murakoshi M, Ii T, Takemura M, Kuchide M, Kanazawa M, Mou X, Wada S, Masuda M, Ohsaka Y, Yogosawa S, Satomi Y, Jinno K (2002): Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Review* 21:257-64.

Oliveira S, Mansur A, Ribeiro C, Ramires J, Annichino-Bizzacchi J (2004): PON1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease. *International Journal Cardiology* 94:73-77.

Ombres D, Pannitteri G, Montali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F, Cantini R, Campa P, Ricci G, Arca M (1998): The Gln-Arg192 polymorphism of

human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 18:1611-6.

Osei-Hyiaman D, Hou L, Mengbai F, Zhiyin R, Zhiming Z, Kano K (2001): Coronary artery disease risk in Chinese type 2 diabetics: is there a role for paraoxonase 1 gene. (Q192R) polymorphism? *European Journal of Endocrinology* 144:639-44.

Ozguner F, Koyu A, Cesur G (2005): Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels. *Toxicology and Industrial Health* 21:21-6.

Pelicano H, Carney D, Huang P (2004): ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates* 7:97-110.

Petersen S, Enghild J (2005): Extracellular superoxide dismutase: structural and functional considerations of a protein shaped by two different disulfide bridge patterns. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59:175-182.

Pineiro-Carrero V, Pineiro E (2004): Liver. *Pediatrics* 113:1097-106.

Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E (2004): Oxidative stress and cell signalling. *Current medicinal chemistry* 11:1163-82.

Prestwich E, Roy M, Rego J, Kelley S (2005): Oxidative DNA strand scission induced by peptides. *Chemistry and Biology* 12:695-701.

Primo-Parmo S, Sorenson R, Teiber J, La Du B (1996): The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33:498-507.

Qin X, Swertfeger D, Zheng S, Hui D, Tso P (1998): Apolipoprotein AIV: a potent endogenous inhibitor of lipid oxidation. *American Journal of Physiology*. 274:H1836-40.

Rao R, Baker R, Baker S, Gupta A, Holycross M (1997): Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 273:G812-23.

Reimund J, Hirth C, Koehl C, Baumann R, Duclos B (2000): Antioxidant and immune status in active Crohn's disease. A possible relationship. *Clinical Nutrition* 19:43-8.

Rice-Evans C, Burdon R (1993): Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Research* 32:71-110.

Rosenblat M, Draganov D, Watson C, Bisgaier C, La Du B, Aviram M (2003): Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 23:468-474.

Salonen R, Nyyssonen K, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Rissanen T, Tuomainen T, Valkonen V, Ristonmaa U, Lakka H, Vanharanta M, Salonen J, Poulsen H (2003): Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. *Circulation* 107:947-53.

Sanghera D, Aston C, Saha N, Kamboh M (1998): DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *American Journal of Human Genetics* 62:36-44.

Scalbert A, Johnson I, Saltmarsh M (2005): Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition* 81:215S-217S.

Scott D, Poston R, Wilson R, Coward P, Palmer R (2005): The influence of vitamin C on systemic markers of endothelial and inflammatory cell activation in smokers and non-smokers. *Inflammation Research* 54:138-44.

Scott J, King G (2004): Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Annals of the New York Academy of Science* 1031:204-13.

Senturk U, Gunduz F, Kuru O, Kocer G, Ozkaya Y, Yesilkaya A, Bor-Kucukatay M, Uyklu M, Yalcin O, Baskurt O (2005): Exercise - Induced Oxidative Stress Leads Hemolysis in Sedentary but not Trained Human. *Journal of Applied Physiology* In Press.

Serafini M, Del Rio D (2004): Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? *Redox report: communications in free radical research* 9:145-152.

Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M (2005): Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radical Biology and Medicine* 39:336-44.

Shen H, Shi C, Shen Y, Ong C (1996): Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radical Biology and Medicine* 21:139-46.

Shih D, Gu L, Xia Y, Navab M, Li W, Hama S, Castellani L, Furlong C, Costa L, Fogelman A, Lusis A (1998): Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394:284-7.

Shim J, Cho K, Lee K, Kim S, Myung P, Choe Y, Yoon D (2005): E7-expressing HaCaT keratinocyte cells are resistant to oxidative stress-induced cell death via the induction of catalase. *Proteomics* 5:2112-22.

Shiner M, Fuhrman B, Aviram M (2004): Paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated via a reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH)-oxidase-dependent mechanism during monocyte differentiation into macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* 37:2052-2063.

Singh U, Devaraj S, Jialal I (2005): Vitamin e, oxidative stress, and inflammation. *Annual Reviews of Nutrition* 25:151-174.

Stadtman E (2001): Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Science* 928:22-38.

Stocker R, Keaney JJ (2004): Role of oxidative modifications in atherosclerosis. 84 4.

Stoclet J, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak M, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth V (2004): Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology* 500:299-313.

Storz P (2005): Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Biosciences* 10:1881-96.

Stralin P, Marklund S (1994): Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochemical Journal* 298:347-52.

Tall A (1990): Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 86:379-84.

Terrasa A, Guajardo M, de Armas Sanabria E, Catala A (2005): Pulmonary surfactant protein A inhibits the lipid peroxidation stimulated by linoleic acid hydroperoxide of rat lung mitochondria and microsomes. *Biochimica and Biophysica Acta* In Press.



Thomas S, Stocker R (2000): Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: implications for atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine* 28:1795-805.

Traber M, Arai H (1999): Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Annual Reviews of Nutrition* 19:343-55.

Truscott T, McGarvey D, Lambert C, Hill T, Tinkler J, Conn P, Bohm F, Land E, Schalch W (1995): The interaction of carotenoids with reactive oxy-species. *Biochemical Society Transactions* 23:252S.

Tsuzura S, Ikeda Y, Suehiro T, Ota K, Osaki F, Arai K, Kumon Y, Hashimoto K (2004): Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 53:297-302.

Tuzun A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bagci S, Yesilova Z, Sayal A, Karaeren N, Dagalp K (2002): Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Biochemistry* 35:569-72.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C, Telser J (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266:37-56.

Valko M, Morris H, Cronin M (2005): Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry* 12:1161-208.

van Aalst J, Burmeister W, Fox P, Graham L (2004): Alpha-tocopherol preserves endothelial cell migration in the presence of cell-oxidized low-density lipoprotein by inhibiting changes in cell membrane fluidity. *Journal of Vascular Surgery* 39:229-37.

Velsor L, van Heeckeren A, Day B (2001): Antioxidant imbalance in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L31-8.

Voetsch B, Benke K, Damasceno B, Siqueira L, Loscalzo J (2002): Paraoxonase 192 Gln-->Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. *Stroke* 33:1459-64.

von Eckardstein A, Hersberger M, Rohrer L (2005): Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 8:147-52.

Watson A, Berliner J, Hama S, La Du B, Faull K, Fogelman A, Navab M (1995): Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation* 96:2882-91.

Wendland B, Aghdassi E, Tam C, Carrier J, Steinhart A, Wolman S, Baron D, Allard J (2001): Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 74:259-64.

Wheeler J, Keavney B, Watkins H, Collins R, Danesh J (2004): Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 463:689-95.

Williams K, Fisher E (2005): Oxidation, lipoproteins, and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 8:139-46.

Williams R, Spencer J, Rice-Evans C (2004): Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine* 36:838-49.

Wood L, Fitzgerald D, Gibson P, Cooper D, Collins C, Garg M (2001): Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors. *Journal of the American College of Nutrition* 20:157-165.

Wood L, Gibson P, Garg M (2005): Circulating markers to assess nutritional therapy in cystic fibrosis. *Clinica Chimica Acta* 353:13-29.

Woodman O, Chan E (2004): Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 31:786-790.

Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H (2002): No association of paraoxonase genotype or atherosclerosis with cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 33:896-900.

Yokoyama M (2004): Oxidant stress and atherosclerosis. *Current opinion in pharmacology* 4:110-5.

Zelko I, Mariani T, Folz R (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* 33:337-49.

Zintzaras E, Hadjigeorgiou G (2004): Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Human Genetics* 49:474-81.

ANNEXE I  
Accord des coauteurs  
Premier article

**A) Déclaration des coauteurs d'un article**

**1. Identification de l'étudiant et du programme**

Karine Trudel  
M.Sc. en Nutrition

**2. Description de l'article :**

Auteurs : Trudel Karine, Sinnett Daniel, James Richard, Delvin Edgard, Amre Devendra, Seidman Ernest, Levy Emile

Titre : Iron-ascorbic acid-induced oxidant stress and its quenching by paraoxonase 1 in HDL and the liver: Comparison between humans and rats.

Revue : Journal of Cellular Biochemistry

Date de publication : publié en ligne le 28 juillet 2005

**3. Déclaration de tous les coauteurs et permission de l'éditeur :**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Karine Trudel inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre 'Localisation, rôle et caractérisation des paraoxonases-1 et -2 au niveau hépatique, intestinal et circulant et effet du stress oxydatif sur leur activité et taux protéiques'.

Daniel Sinnett

coauteur

22/09/2005  
date

Richard W. James

coauteur

25/09/2005  
date

Edgard Delvin

coauteur

23/09/2005  
date

Devendra Amre

coauteur

06/10/2005  
date

Ernest Seidman

coauteur

date

Émile Levy

coauteur

28/9/2005  
date



ANNEXE II  
Accord des coauteurs  
Deuxième article

**A) Déclaration des coauteurs d'un article**

**1. Identification de l'étudiant et du programme**

Karine Trudel  
M.Sc. en Nutrition

**2. Description de l'article :**

Auteurs : Trudel Karine, Bendayan Moïse, Sinnett Daniel, Seidman Ernest, Delvin Edgard, Lavoie Jean-Claude, Ménard Daniel, Amre Devendra, Levy Emile

Titre : Epithelial Distribution and Oxidative Stress Response of Paraoxonase2 in Human and Rat Intestine.

Revue : American Journal of Physiology

Date de publication : soumis le 23 septembre 2005

**3. Déclaration de tous les coauteurs et permission de l'éditeur :**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Karine Trudel inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre 'Localisation, rôle et caractérisation des paraoxonases-1 et -2 au niveau hépatique, intestinal et circulant et effet du stress oxydatif sur leur activité et taux protéiques'.

Moïse Bendayan  
coauteur

26/9/2005  
date

Daniel Sinnett  
coauteur

22/09/2005  
date

Ernest Seidman  
coauteur

date

Edgard Delvin  
coauteur

23/09/2005  
date

Jean-Claude Lavoie  
coauteur

54 octobre 2005  
date

Daniel Ménard  
coauteur

26/9/2005  
date

Devendra Amre  
coauteur

06/10/2005  
date

Émile Levy  
coauteur

23/9/2005  
date

## **ANNEXE III : DÉCLARATION DE L'ÉTUDIANT CONCERNANT LES ARTICLES**

### **1. Identification de l'étudiant**

Karine Trudel  
[REDACTED]

### **2. Nom de l'unité académique**

Département de Nutrition, Faculté de Médecine

### **3. Nom du programme**

M.Sc. Nutrition

### **4. Liste des articles proposés**

Premier article : accepté.

Trudel K, Sinnett D, James RW, Delvin E, Amre D, Seidman E, Levy E. (2005) Iron-ascorbic acid-induced oxidant stress and its quenching by paraoxonase 1 in HDL and the liver: Comparison between humans and rats. *Journal of Cellular Biochemistry* 96(2) :404-11.

Deuxième article : soumis.

Trudel K, Bendayan M, Sinnett D, Seidman E, Delvin E, Lavoie JC, Ménard D, Amre D, Levy E. (2005) Epithelial Distribution and Oxidative Stress Response of Paraoxonase2 in Human and Rat Intestine. *American Journal of Physiology*.



## 5. Signature et déclaration de l'étudiant concernant les articles

Premier article :

Nature de la participation et importance de la contribution :

J'ai effectué l'ensemble des expérimentations en laboratoire, incluant le développement des méthodes de dosage et toutes autres procédures expérimentales. L'anticorps de PON1 utilisé dans la technique de Western Blot a été fourni par Dr. Richard W. James. J'ai également effectué l'analyse et l'interprétation des résultats présentés. Finalement, j'ai écrit l'article en étroite collaboration avec Dr. Levy.

Karine Trudel  
étudiant

12-déc-2005  
date

Deuxième article :

Nature de la participation et importance de la contribution :

J'ai effectué l'ensemble des expérimentations en laboratoire, incluant le développement des méthodes de dosage et toutes autres procédures expérimentales. L'immunohistochimie a été effectuée par le Dr. Moïse Bendayan. Les colons fœtaux ont été fournis par Dr. Daniel Ménard. J'ai également effectué l'analyse et l'interprétation des résultats présentés. Finalement, j'ai écrit l'article en étroite collaboration avec Dr. Levy.

Karine Trudel  
étudiant

12-déc-05  
date