



HAL
open science

Modifications de la protéine p53 et induction de l'apoptose par le NO et ses dérivés : mécanismes réactionnels et implication dans la cancérogenèse

Laurence Aubert

► To cite this version:

Laurence Aubert. Modifications de la protéine p53 et induction de l'apoptose par le NO et ses dérivés : mécanismes réactionnels et implication dans la cancérogenèse. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paul Verlaine - Metz, 2000. Français. NNT : 2000METZ032S . tel-01775389

HAL Id: tel-01775389

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775389>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE DE METZ-UFR Sci F.A

THESE

Présentée et soutenue publiquement en vue de l'obtention du grade de
docteur ès Sciences de l'université de Metz,
le 14 novembre 2000.

Discipline : biologie

Modifications de la protéine p53,
induction de l'apoptose par le NO et
ses dérivés : mécanismes réactionnels
et implications dans la cancérogenèse

Laurence CHAZOTTE-AUBERT

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	20000325
Cote	S/M3 00/32
Loc.	Magasin

Membres du jury :

Professeur S. CHOUAIB

Institut Gustave Roussy, Villejuif - Rapporteur.

Docteur P. HAINAUT

Centre International de Recherche sur le cancer, Lyon - Examineur.

Docteur M. LEPOIVRE

CNRS 1116, Orsay - Rapporteur.

Docteur H.OHSHIMA

Centre International de Recherche sur le Cancer, Lyon - Directeur de thèse.

Professeur P. VASSEUR

Université de Metz - Co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu le Docteur Hiroshi Ohshima, mon directeur de thèse, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition d'excellentes conditions de travail. J'ai bénéficié d'une grande autonomie dans la conception, l'organisation et la réalisation de ce travail et et je le remercie de la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie le Centre International de Recherche sur le Cancer de m'avoir attribué un financement pour le bon déroulement de cette thèse.

Je suis très reconnaissante envers le Docteur Michel Lepoivre et le Professeur Salem Chouaib d'avoir accepté de consacrer leur temps précieux à examiner ce manuscrit. Je les remercie pour leurs remarques pertinentes et les conseils qu'ils m'ont prodigués, ce qui m'a permis d'améliorer la qualité de ce document.

Je remercie vivement le Professeur Paule Vasseur d'avoir accepté d'être co-directeur de cette thèse car sans son accord ce travail n'aurait pas été possible.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Docteur Christian Malaveille d'avoir consacré beaucoup de temps à la relecture de ce manuscrit. Je remercie également le Docteur Brigitte Pignatelli pour ses conseils au sujet de ma présentation orale.

Je remercie le Docteur Pierre Hainaut de m'avoir permis d'élargir mon champ d'investigation en entretenant une collaboration au sujet de p53. Je le remercie vivement de l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Un grand merci à Olivier pour son amitié, son soutien dans les moments de doute. Je lui souhaite le plus grand succès pour sa thèse et sa future carrière dans le monde scientifique. Je remercie également Anita de m'avoir accueillie quand je n'avais plus d'appartement à Lyon.

Je remercie Isabelle avec qui nous nous sommes souvent évadées très loin du labo ainsi que Pascale et Mitsuharu pour leur gentillesse lors de la rédaction de cette thèse.

A mes parents qui ont toujours crû en moi et à mon mari, pour tout...

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Apoptosis Inducing factor
Apaf 1	Apoptosis protease-activating factor
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AS	Angeli's Salt (un donneur d'anion
nitroxyle)	
ATM	Ataxia Telangectasia Mutated
Atr	ATM-Related
CD 95	Récepteur membranaire de Fas
Cdc	Cyclin dependent of cell cycle
CDK	Cyclin Dependent Kinase
DEA-NO	Diethylenamide-NONOate (un donneur
de monoxyde d'azote)	
Chk-1	Checkpoint 1
CKII	Casein Kinase II
DNA-PK	DNA dependent Protein Kinase
DTT	Dithiotréitol
EGF	Epithelial Growth Factor
FADD	Fas Associated Death Domain
GADD45	Growth Arrest DNA Damage 45
GR	Glutathion Reductase
GSH	Glutathion réduit
GSNO	S-nitrosoglutathione
GSSG	Glutathion oxydé
Grx	Glutarédoxine
Gy	Grays
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HO·	Radical hydroxyle
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IGF	Insulin Growth Factor
IGF-BP3	IGF Binding Protein 3
JNK	Jun N-terminal Kinase
MDA	Malondialdéhyde
MDM-2	Murine Double Minute 2
MPO	Myéloperoxydase
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localisation Signal
cNOS	Constitutive Nitric Oxide Synthase
eNOS (NOS-3)	Endothélial Nitric oxide Synthase
iNOS (NOS-2)	Inducible Nitric oxide synthase
nNOS (NOS-1)	Neuronal Nitric Oxide Synthase
NO·	Monoxyde d'azote
NO ⁻	Anion nitroxyle
NO ⁺	Cation nitrosonium
NTYR	Nitrotyrosine

8-oxo-dG
O₂⁻
ONOOH/ONOO⁻
Pb
P/CAF
PCNA
PIG
PI(3) Kinase
Ref-1
RPA
SOD
TAF
TBP
TFIID
TR
Trx
VEGF
TNF α

8-oxo-2'-deoxyguanosine
Anion superoxyde
Peroxynitrite
Paire de base
p300/CBP Associated Factor
Proliferation Cell Nuclear Antigen
p53-induced gene
Phosphatidyl Inositol Kinase
Redox Factor-1
Replication-Associated Protein A
Superoxyde dismutase
TBP Associated Factor
TATA box Binding Protein
Transcription Factor IID
Thioredoxine
Thioredoxine Reductase
Vascular Endothelial Growth Factor
Tumor Necrosis Factor

TABLE DES MATIERES

PROLOGUE	15
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1 REACTIVITE DU NO ET DE SES DERIVES	23
1.1 Production des dérivés oxygénés et azotés	23
<u>1.1.1 Enzymes impliqués dans la production des dérivés oxygénés</u>	24
1.1.1.1 NOS et production de NO	24
1.1.1.2 Myéloperoxydase et production de HOCl	26
1.1.1.3 NADPH oxydase/xanthine oxydase et production de O ₂ ^{•-}	26
<u>1.1.2 Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote</u>	27
1.1.2.1 Formes redox du NO	27
• NO ⁺	27
• NO ⁻	27
1.1.2.2 Formation d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	31
• ONOO ⁻	31
• NO _x	35
• NO ₂ Cl	35
• H ₂ O ₂	35
• HO [•]	35
<u>1.1.3 Systèmes de détoxification et de contrôle intracellulaire des espèces oxygénées</u>	36
1.1.3.1 Détoxification enzymatique de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène	36
• Les SOD	36
• La catalase	37
• La glutathion peroxydase	37
1.1.3.2 Systèmes impliquant l'oxydo-réduction de groupements thiols	37
• Le système GSH/GST/GSH reductase	37
• La glutarédoxine	39
• Le système thioredoxine/ thioredoxine reductase	39
• Ref1	40
1.1.3.3 Systèmes piègeurs de radicaux libres	41
• Le α tocopherol	41

• <i>Le β carotène</i>	41
• <i>L'acide ascorbique</i>	42
1.2 Réactivité du NO et de ses dérivés avec les constituants cellulaires	42
<u>1.2.1 Acides gras insaturés</u>	42
<u>1.2.2 Acides nucléiques</u>	43
1.2.2.1 Nitration	43
1.2.2.2 Oxydation	44
1.2.2.3 Alkylation	44
1.2.2.4 Déamination	45
1.2.2.5 Cassures de l'ADN	46
<u>1.2.3 Protéines</u>	49
1.2.3.1 Formation des nitrosothiols	49
• <i>Le cas du GSNO</i>	51
1.2.3.2 Oxydation des protéines	52
1.2.3.3 Réaction avec les métalloprotéines	52
• <i>Réaction avec le Fer</i>	52
• <i>Réaction avec les clusters Zinc-Soufre</i>	54
• <i>Réactions avec le Cuivre</i>	54
1.2.3.4 Formation de groupements nitrotyrosine	55
• <i>Réaction de nitration</i>	55
• <i>Analyse des résidus nitrotyrosine</i>	61
• <i>Existence des résidus nitrotyrosine in vivo</i>	62
• <i>Conséquences de la nitration des protéines sur leur fonctionnalité</i>	63
1.3 Le NO dans la cancérogenèse	66
<u>1.3.1 Rôle pro-cancérogène</u>	69
1.3.1.1 Rôle génotoxique	69
1.3.1.2 Rôle dans la progression et l'invasion tumorale	70
1.3.1.3 Effet immunosuppresseur	71
<u>1.3.2 Effet tumoricide</u>	72

2. LA PROTEINE ONCO-SUPPRESSIVE P53	75
2.1 Présentation générale de p53	75
<u>2.1.1 P53 et cancérogenèse</u>	75
<u>2.1.2 Le gène TP 53, membre d'une famille multigénique</u>	77
2.2 Structure et organisation fonctionnelle de p53	78
<u>2.2.1 La région N-terminale (résidus 1-102)</u>	78
2.2.1.1 Structure	78
2.2.1.2 Modifications post-traductionnelles	82
<u>2.2.2 La région centrale (résidus 102-293)</u>	83
<u>2.2.3 Domaine C-terminal (résidus 293-393)</u>	86
2.2.3.1 Structure	86
2.2.3.2 Modifications post-traductionnelles	89
• <i>Phosphorylations et déphosphorylations</i>	89
• <i>Acétylations</i>	90
• <i>O-glycolysation</i>	91
• <i>Ubiquitination</i>	91
2.3 Régulation de p53	92
<u>2.3.1 Son activation</u>	92
2.3.1.1 La forme latente	92
2.3.1.2 Signalisation en amont de son activation	93
2.3.1.3 Mécanismes conduisant à son activation	96
<u>2.3.2 Sa dégradation</u>	98
<u>2.3.3 Régulation redox</u>	101
2.4 Fonctions biochimiques et leurs conséquences biologiques	103
<u>2.4.1 Activité transactivatrice</u>	103
2.4.1.1 Généralités sur les cibles transcriptionnelles de p53	103

2.4.1.2	Gènes codant pour des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire	105
	• P21 ^{Waf-1}	105
	• 14-3-3 σ	108
	• Gadd45	108
	• BTG2	108
2.4.1.3	Gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN	109
	• p53R2	109
	• PCNA	109
2.1.1.4	Gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques	109
	• Bax	109
	• Fas/APO-1/CD95	112
	• Killer/DR5	112
	• PIG-3	112
	• IGF-BP3	114
2.4.1.5	Gènes codant pour une protéine possédant une autre fonction	114
	<u>2.4.2 Activité de répression</u>	114
	<u>2.4.3 Liaison avec des protéines hétérologues</u>	116
2.4.3.1	Implication dans la régulation de p53	116
2.4.3.2	Implication pour les effets biologiques de p53	117
	2.5 NO et p53	118
2.5.1	<u>Induction de mutations sur p53 par le NO et ses dérivés</u>	118
2.5.2	<u>Accumulation de p53 dans le noyau de cellules exposées à du NO</u>	118
	RESULTATS	123
	1 PREMIERE PARTIE	125
1.1	Le monoxyde d'azote nitrate des résidus tyrosine de la protéine onco-suppressive p53 chez des cellules MCF-7	127
	Résultats : article 1, BBRC.	
1.2	Le NO inhibe la réponse de p53 face à l'irradiation γ et induit l'apoptose chez des cellules MCF-7	129
	Résultats : article 2, à soumettre	
	2 DEUXIEME PARTIE	153

2.1	Mise au point d'une méthode d'analyse de la 3-nitrotyrosine par HPLC et son utilisation pour comparer l'efficacité de nitration de différents agents nitrants.	155
	Résultats : article 3, Nitric Oxide Biol Chem	
3	TROISIEME PARTIE	159
3.1	Cytotoxicité et lésions de l'ADN sur des sites spécifiques par l'anion nitroxyde en présence de peroxyde d'hydrogène, implications dans diverses conditions pathophysiologiques.	161
	Résultats : article 4, J.Biol Chem.	
3.2	Effets synergiques de l'anion nitroxyde et du peroxyde d'hydrogène pour induire l'apoptose et former de la 8-oxo-dG chez des cellules MCF-7.	167
	Résultats : article 5, Nitric oxide, à soumettre.	
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	191
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	209
	ANNEXES	247

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Réactivité du monoxyde d'azote et de ses dérivés.	29
Figure 2 : Réactivité et métabolisme des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.	33
Figure 3 : Modifications des bases de l'ADN.	48
Figure 4 : Compétition entre la formation de NTYR et de diTYR.	59
Figure 5 : Modèle de progression tumorale du cancer colorectal proposé par Kinzler et Vogelstein.	68
Figure 6 : Le NO : une substance cancérogène et anti-tumorale.	74
Figure 7 : Structure de la p53 humaine.	79
Figure 8 : Structure détaillée de la partie N terminale de p53.	80
Figure 9 : Structure en 3 dimensions de p53.	85
Figure 10 : Structure détaillée de la partie C terminale de p53.	87
Figure 11 : Modèles d'activation en trois étapes de p53 par des signaux de stress.	97
Figure 12 : Dégradation de p53 par Mdm-2.	99
Figure 13 : Fonctions biochimiques et biologiques de p53.	104
Figure 14 : Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire.	107
Figure 15 : Apoptose par voie mitochondriale.	111
Figure 16 : Apoptose induite via les récepteurs de TRAILS	113

PROLOGUE

Le cancer est, après les accidents cardiovasculaires, la deuxième cause de mortalité dans les pays industrialisés. L'apparition d'un cancer est liée à une accumulation d'altérations sur des gènes dont les produits sont impliqués dans le maintien de l'intégrité génétique, le contrôle de la prolifération cellulaire et des relations intercellulaires.

Des études épidémiologiques ont montré qu'infections et inflammations chroniques sont associées à la survenue d'un cancer. C'est le cas notamment de l'infection par *Helicobacter Pylori* et le cancer de l'estomac, le virus de l'hépatite B et le cancer du foie, l'inflammation du côlon et le cancer du côlon etc... Lors de l'inflammation, de fortes quantités de monoxyde d'azote (NO[•]) sont produites par la monoxyde d'azote synthase inductible (inducible Nitric Oxyde Synthase : iNOS) exprimée par différents types cellulaires (macrophages, monocytes et neutrophiles). En outre, les macrophages produisent, indirectement, du peroxyde d'hydrogène. La présence simultanée de ces deux espèces réactives potentialise leurs effets cytotoxiques. Le NO[•] peut également être présent sous forme d'anion nitroxyle (forme réduite) dans des conditions physiologiques. Le rôle du NO et de ses dérivés dans la cancérogenèse est complexe et il s'avère que le NO est un composé à facettes multiples qui peut exercer des effets pro et anti-cancérigènes qui dépendent du stade tumoral. Il semble acquis que le NO exerce des effets qui favorisent l'apparition et le développement d'un cancer alors qu'il exercerait un effet tumoricide lorsque les tumeurs sont déjà installées. Le NO[•] est, de part sa nature radicalaire, un produit très réactif vis à vis des protéines et il peut exercer des effets cytotoxiques. De plus, le NO et ses dérivés induisent différents types de lésions sur l'ADN.

Une des protéines clés impliquée dans la détection de multiple formes de stress, dont les altérations génétiques, est la protéine onco-suppressive p53. Le fait que le gène TP53 soit muté dans 50% des cas de tumeurs montre son rôle dans le maintien de l'intégrité génomique. Depuis plus de 20 ans, cette protéine onco-suppressive a fait l'objet de très nombreuses études et au fur et

à mesure des progrès de la science, il est apparu qu'elle possède des propriétés multiples qui lui ont valu l'appellation de "gardienne du génome" ou encore d'"ange gardien". Le gène TP53 est parmi les gènes les plus étudiés et le plus en vogue ces dernières années pour la lutte contre le cancer.

Alors que la majorité des études portent sur l'inactivation de p53 par mutations, nous avons fait l'hypothèse originale que cette protéine clé pour le maintien de l'intégrité génétique pouvait être altérée par des modifications post traductionnelles. Ceci pourrait expliquer pourquoi certains tissus ne possèdent pas de mutations sur TP53 alors qu'ils sont le siège d'un développement tumoral. Le NO, produit en forte quantité lors de l'inflammation, pourrait réagir avec la protéine p53 et altérer ainsi sa fonction de suppresseur de tumeur. Nous proposons une approche différente pour l'étude des cas de cancer liés à une inflammation chronique où la protéine pourrait être altérée sans que le gène ne soit muté.

Dans la première partie de l'analyse bibliographique, je présenterai le NO: sa production, sa réactivité avec d'autres espèces chimiques et avec les composants cellulaires. Je présenterai ensuite la protéine p53: sa structure, les modifications post traductionnelles auxquelles elle est sujette et son mode de régulation. Ses fonctions biochimiques et biologiques seront ensuite présentées.

La première publication a montré la formation de résidus nitrotyrosine sur p53 dans des cellules exposées à un donneur de NO. La deuxième porte sur l'effet du NO sur la p53 et sur la cellule en général.

La troisième publication présentée a un caractère plus chimique et propose une nouvelle technique d'analyse des résidus nitrotyrosine par HPLC, plus sensible que les précédentes. Cette technique a permis de comparer la capacité de nitration des protéines, *in vitro*, par différents composés. Afin de mieux comprendre la réactivité du NO, nous avons été amené à décortiquer le mécanisme d'action du NO et de ses dérivés. Ainsi, nous avons montré, dans une autre publication, la formation de radical hydroxyle, très toxique, par réaction entre le NO ou le NO⁻ et le peroxyde

d'hydrogène. La formation de ce radical conduit à l'apparition de mutations séquence-spécifiques sur p53, à la formation de bases oxydées et à une forte cytotoxicité.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1^{ère} PARTIE :

REACTIVITE DU NO ET DE SES DERIVES

Le NO[•] est produit, lors de la réaction inflammatoire, pour défendre l'hôte des organismes pathogènes qui l'ont envahi. Cependant, le NO[•] est un médiateur non spécifique de l'immunité et lorsqu'il touche des cellules saines, ses effets peuvent s'exercer au détriment de l'organisme. De part sa nature radicalaire, il réagit très facilement avec d'autres espèces oxygénées et azotées pour former des dérivés plus toxiques; ce point sera développé dans le premier chapitre. Nous présenterons ensuite la réactivité du NO[•] et de ses dérivés avec les constituants cellulaires (lipides, ADN et protéines). Le rôle complexe du NO[•] dans la cancérogenèse sera abordé dans un troisième chapitre.

Dans la suite de ce document, lorsqu'il ne s'agit pas de réaction chimique, le terme NO peut être mentionné ce qui signifie précisément NO[•].

1.1 Production des dérivés oxygénés et azotés

La production de dérivés oxygénés est inhérente à notre métabolisme aérobie. Ceux-ci sont, en grande partie, produits de façon enzymatique, mais également parfois de façon accidentelle comme, par exemple, dans le cas de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) qui est produit très facilement dans le corps humain. On estime, en effet, que 1 à 3% de l'O₂ inhalé se transforme en O₂^{•-}. Plusieurs composés de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale réagissent avec l'O₂ pour produire accidentellement du O₂^{•-}. Après la formation d'anion superoxyde, la production la plus massive est celle du monoxyde d'azote (NO[•]) lors de l'inflammation. Divers composés réactifs peuvent réagir entre eux, selon des réactions chimiques complexes, pour former d'autres dérivés oxygénés et azotés, souvent plus toxiques que les espèces d'origine. L'organisme possède des défenses anti-oxydantes qui permettent la détoxification cellulaire ainsi que des molécules qui permettent de maintenir certaines protéines clés dans leur état réduit. Malgré ces protections, lors d'une production massive de NO[•] durant l'inflammation, ces systèmes sont saturés; on parle alors de stress oxydant.

Dans une première partie, je décrirai la production enzymatique des dérivés oxygénés, en insistant tout particulièrement sur le NO[•]. Je présenterai ensuite les différentes voies menant à la production des divers intermédiaires réactifs, oxygénés et azotés. Dans un troisième temps, je décrirai brièvement les systèmes de défense que l'organisme possède pour faire face au stress oxydatif.

1.1.1 Enzymes impliqués dans la production des dérivés oxygénés

1.1.1.1 NOS et production de NO

Le prix Nobel 1998 a été décerné à trois chercheurs, R. Furchgott, L.J. Ignarro et F. Murad, pour l'ensemble de leurs travaux pionniers portant sur le NO[•] dans le système cardiovasculaire. Cette distinction a permis de donner toutes ses lettres de noblesse au NO, la plus simple des molécules bioactives avec l'O₂.

L'existence de trois NO synthases, exprimées dans divers tissus et fonctionnant différemment, confère au NO son don d'ubiquité et un rôle ambivalent.

- *Les isoformes des NOS*

Parmi les 3 isoformes de NOS on distingue deux classes de NOS : les NOS constitutives (cNOS) qui sont Ca²⁺ dépendantes et les NOS inductibles (iNOS ou NOS-2), Ca²⁺ indépendantes. La classe des NOS constitutives comprend la NOS endothéliale (eNOS ou NOS-3) et la NOS neuronale (nNOS ou NOS-1). Ces deux classes ne sont pas exprimées dans les mêmes tissus et ne produisent pas les mêmes quantités de NO, ce qui détermine les différents effets physiologiques du NO.

Les NOS constitutives produisent de faibles quantités de NO[•] pendant un court laps de temps lorsque la concentration en Ca²⁺ s'élève. Dans ce cas, le NO[•] joue le rôle de messenger intracellulaire : c'est un neurotransmetteur dans le cas de la NOS neuronale ou un vasodilatateur (EDRF : Endothelial Derived Relaxing Factor) dans le cas de la NOS endothéliale. Dans les vaisseaux, le

NO[•], via la production de GMP cyclique, provoque la relaxation des cellules musculaires lisses, inhibe l'agrégation plaquettaire et inhibe l'adhésion et l'activation leucocytaire. Dans ce cas, le NO[•] est le relais physiologique entre une élévation de calcium et l'activation de la guanylate cyclase qui produit du GMP cyclique.

La iNOS est exprimée par les cellules inflammatoires (monocytes, macrophages et neutrophiles), mais également par d'autres cellules telles que les hépatocytes, les chondrocytes, les cellules tumorales etc, lorsqu'elles sont stimulées par des endotoxines (lipopolysaccharide) et des cytokines (interleukines, interféron γ et le facteur de nécrose tumoral. La cascade d'activation de la iNOS semble impliquer la voie des tyrosines kinases et NF κ B.

L'expression de la iNOS a été observée récemment dans les neurones à la suite d'une ischémie cérébrale et cette production de NO[•] jouerait un rôle neurotoxique (Grandati et al., 1997; Iadecola, 1997). Dans le cas de la iNOS, le NO[•] est un médiateur non spécifique de l'immunité et exerce une fonction cytotoxique en réagissant avec d'autres espèces oxygénées. Une fois exprimée, la iNOS produit de fortes quantités de NO[•] (de l'ordre du pmol/min/mg de protéine, soit une concentration de l'ordre du μ M/min) pendant un temps relativement long (de quelques heures à quelques jours). Dans mon travail de thèse, je m'intéresserai au cas de la production massive de NO[•] qui correspond, *in vivo*, aux conditions inflammatoires.

- *Réaction enzymatique*

Les NOS utilisent la L-Arginine pour produire du NO[•] et de la L-citrulline (Nathan and Xie, 1994). Les différentes formes de NOS réalisent l'oxydation de la L-arginine en 2 étapes. La première étape consomme un atome d'O₂ et un équivalent NADPH pour former un composé intermédiaire, la N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA). La deuxième mono-oxygénation consomme un demi-équivalent NADPH et conduit à la formation de L-citrulline et de NO[•].

Les NOS sont des hémoprotéines, de structure homodimérique, pour revue, voir (Knowles and Moncada, 1994; Mayer and Hemmens, 1997). Chaque

monomère est composé d'un domaine réductasique, situé dans sa partie N terminale, et d'un domaine oxygénasique, dans la partie C terminale.

Le domaine réductasique possède des sites de fixation pour les co-facteurs NADPH, FAD et FMN. Le domaine oxygénasique lie l'hème, le substrat et la tétrahydrobioptérine (BH4). La BH4 est un cofacteur crucial pour la stabilisation du dimère et le contrôle de l'affinité du substrat (Ghosh et al., 1999; Knowles and Moncada, 1994; Mayer and Hemmens, 1997).

L'activité des NOS est strictement dépendante de la calmoduline car c'est elle qui permet le transfert d'électron dans la partie réductasique. Alors que chez les NOS constitutives la liaison de la calmoduline dépend d'une augmentation du niveau de Ca^{2+} intracellulaire, la iNOS est déjà liée à la calmoduline pour des concentrations de Ca^{2+} correspondant au niveau normal de la cellule.

Récemment, des études cristallographiques ont montré l'existence d'un atome de Zinc, sous forme de ZnS_4 , entre les deux monomères, conservé entre les différents types de NOS humaines (Fischmann et al., 1999; Li et al., 1999; Raman et al., 1998). Le Zn jouerait un rôle crucial dans la stabilisation du dimère et dans le maintien de l'intégrité de la BH4. En effet, le Zn est coordonné avec quatre cystéines, deux par monomère.

Une étude cristallographique a révélé de grandes homologues entre la eNOS et la iNOS en ce qui concerne leur interaction avec le substrat et le co-facteur (Fischmann et al., 1999; Li et al., 1999).

1.1.1.2 Myéloperoxidase (MPO) et production de HOCl

La myéloperoxidase (MPO), exprimée par les neutrophiles et les monocytes, produit de l'acide hypochloreux (HOCl) à partir du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de l'anion chlorure.



La MPO est une peroxydase non spécifique qui est capable d'oxyder d'autres substrats comme par exemple le nitrite (NO_2^-).

1.1.1.3 NADPH oxydase/xanthine oxydase et production de $O_2^{\cdot-}$

La NADPH oxydase et la xanthine oxydase produisent de l'anion superoxyde. La NADPH oxydase est exprimée par les cellules phagocytaires (monocytes, macrophages et polynucléaires). La xanthine oxydase se trouve

dans les mitochondries. La production d'anion superoxyde peut également résulter de l'auto-oxydation de certains composés tissulaires (catécholamines, acide ascorbique, flavines, quinones) ou de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons.

1.1.2 Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les effets cellulaires variés du NO résultent de sa concentration, des différentes formes qu'il peut prendre suivant son environnement radicalaire et des enzymes et composés de détoxification (voir la figure 2)

1.1.2.1 Formes redox du NO

Le NO[•] est un radical libre; de fait, il possède un électron non apparié sur son orbitale externe et il est très réactif. Le NO[•] peut être soit oxydé en cation nitrosonium (NO⁺) soit être réduit en anion nitroxyle (NO⁻) (Wink, 1996) (figure 1).

• NO⁺

Une oxydation directe du NO[•] en NO⁺ semble peu probable dans des conditions physiologiques de part son fort potentiel d'oxydation ($E^{\circ}_{NO^{\bullet}/NO^+} = +1.2 \text{ V}$) (Wink, 1996). Néanmoins, certains dérivés nitrés peuvent servir de donneurs de NO⁺ dans des conditions physiologiques (Stamler et al., 1992). C'est le cas notamment des complexes métaux-nitrosyle, des nitrosamines, et des tri et tétra-oxydes (N₂O₃, N₂O₄) (Stamler et al., 1992).

• NO⁻

Le NO⁻ est formé *in vivo* dans des conditions physiologiques car la réduction du NO[•] en NO⁻ est thermodynamiquement tout à fait possible ($E^{\circ}_{NO^{\bullet}/NO^-} = -0.33 \text{ V}$) (Wink, 1996).

Le pKa de HNO/NO⁻ est de 4.7, ce qui signifie que dans des conditions physiologiques le produit de réduction du NO[•] est sous forme d'anion. Celui-ci est relativement peu stable dans des conditions physiologiques.

Production enzymatique

Il a été proposé que le NO⁻ pouvait être produit de façon enzymatique, mais ce point reste discuté. Deux équipes indépendantes ont proposé que la iNOS et la nNOS pourraient produire de l'anion nitroxyle et que celui-ci serait

ensuite converti en NO^\cdot par la superoxyde oxyde dismutase (SOD) ou d'autres accepteurs d'électrons (Hobbs et al., 1994; Schmidt et al., 1996). Il a été observé, en effet, que la présence de SOD catalysait la formation de NO^\cdot .

La formation de NO^\cdot par la NOS a cependant été remise en question par l'équipe de B. Mayer (Riethmuller et al., 1999). Ces derniers ont prouvé que la nNOS produisait du NO^\cdot , en absence d'accepteur d'électrons, lorsque l'enzyme est incubé en présence la 5-méthyl tétrahydrobioptérine au lieu du co-facteur naturel. Il apparaîtrait que l'on ne détecte pas de NO^\cdot quand la nNOS purifiée est incubée en présence de tétrahydrobioptérine car son auto-oxydation produit de $\text{O}_2^{\cdot-}$ qui réagit avec le NO^\cdot .

La publication la plus récente sur ce sujet a montré que la nNOS, en absence de tétrahydrobioptérine, produit du NO^\cdot (Adak et al, 2000). Il découle de cette étude que ce co-facteur ne soit pas nécessaire pour l'hydroxylation de l'arginine et que sa fonction soit de permettre la formation de NO^\cdot au lieu de NO^\cdot . La proportion de NOS qui pourrait fonctionner sans tétrahydrobioptérine *in vivo*, n'est pas connue pour l'instant. Cependant, étant donné que ce co-facteur est un agent réducteur, nous pouvons supposer qu'il peut être oxydé dans des conditions de stress oxydant et à ce moment là, la NOS produirait du NO^\cdot . Cependant, l'étude enzymatique de la NOS est pratiquée *in vitro* en présence de fortes quantités des divers co-facteurs et que cela ne retraduit pas forcément toutes les conditions physiologiques.

Formation par réduction du NO^\cdot

Bien que la formation enzymatique de NO^\cdot soit encore sujet de controverses, la production de cet ion par réduction est, quant à elle, bien documentée dans la littérature.

Sharpe et coll ont montré que le ferrocyclochrome c peut réagir avec du NO^\cdot pour former du ferricytochrome c et du NO^\cdot (Sharpe and Cooper, 1998). Cette formation, *in vivo*, du NO^\cdot est favorisée lorsque les concentrations en NO^\cdot sont fortes et que le pool de cytochrome c est réduit, comme c'est le cas lors d'une ischémie (où la cytochrome c oxydase ne peut plus oxyder son substrat, par manque d'oxygène).

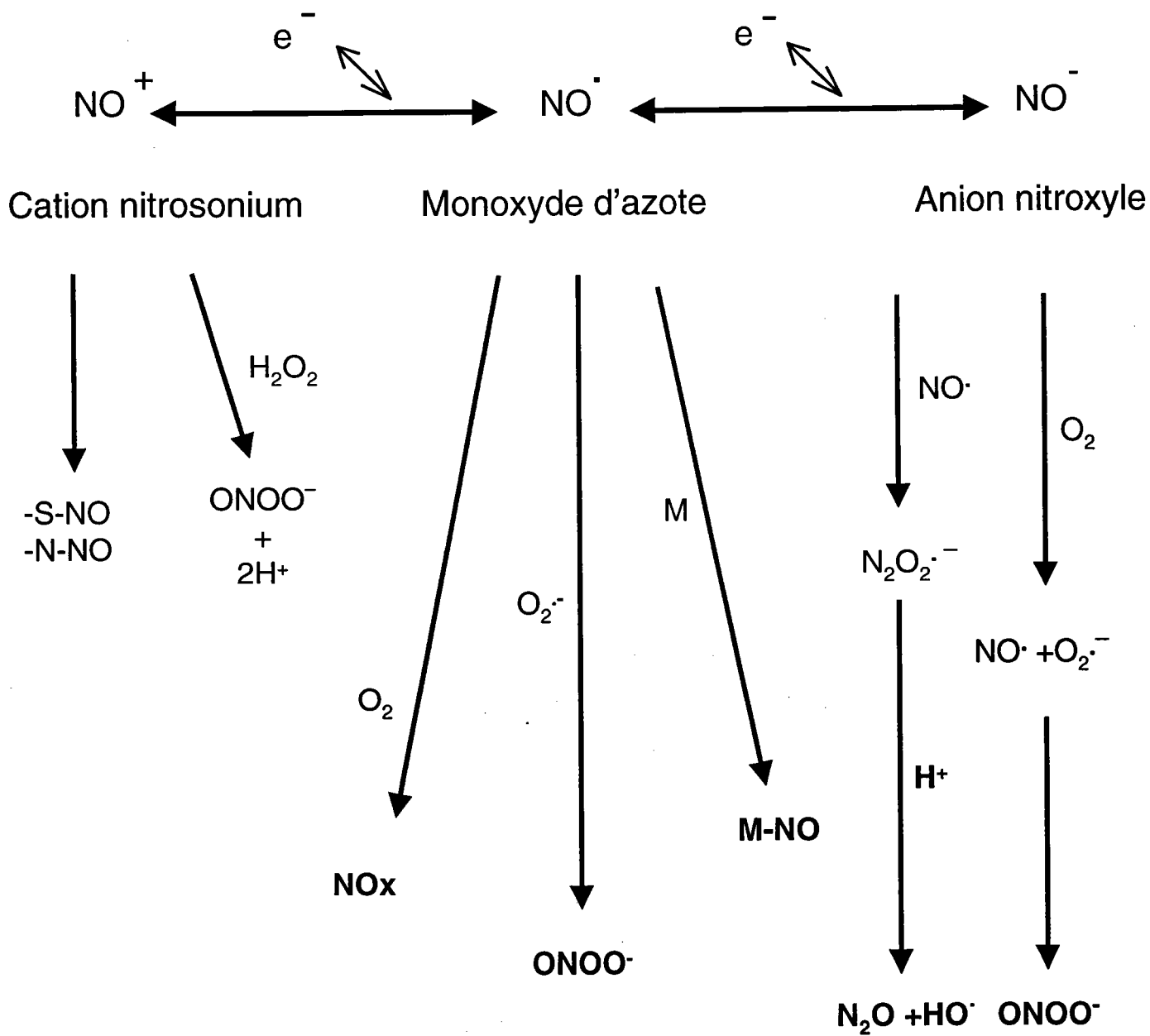


Figure 1: Réactivité du monoxyde d'azote et de ses dérivés.

De même, en absence d'oxygène, la nitrosylhémoglobine libérerait du NO⁻ en produisant de la méthémoglobine (Gow and Stamler, 1998). L'exemple de l'hémoglobine sera développé plus loin.

Le NO⁻ pourrait également être formé à partir du NO[•] par le système redox quinone/hydroquinone de la même manière qu'est produit le O₂⁻ à partir de l'O₂ (Ohshima et al., 1998a). Le NO⁻ pourrait également être formé à partir de S-nitrosothiols en présence de thiols (Arnelle and Stamler, 1995; Hogg et al., 1996; Wong et al., 1998).

Stabilité et réactivité

La stabilité et la réactivité du NO⁻ n'ont pas encore été très étudiées.

Le produit final de NO⁻/HNO est le N₂O selon les équations 2 ou 3 et 4.



Miranda et coll ont montré que le NO⁻ exerçait des propriétés chimiques différentes de celles du peroxy-nitrite, suggérant que cet agent ne soit un produit réactionnel du NO[•] (Miranda et al, 2000). Le NO⁻ est un agent hydroxylant puissant mais un faible agent nitrant.

Le NO⁻ peut réagir facilement avec les thiols, selon les équations suivantes :



L'hydrolyse du HNO formerait du HN(OH)₂ qui pourrait ensuite réagir avec de l'O₂ (Miranda et al, 2000). De nombreuses possibilités ont été proposées au sujet de la réactivité du NO⁻ avec l'O₂, mais elles ne seront pas décrites ici.

Ohshima et coll ont montré que le NO⁻ peut réagir avec du NO[•] pour former du N₂O et du HO⁻ (Ohshima et al, 1999).

1.1.2.2 Formation d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Le NO^\cdot est un radical libre qui peut réagir avec d'autres espèces oxygénées pour former d'autres composés bien plus réactifs.

- ONOO^-

Le NO^\cdot réagit très rapidement avec l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) pour former le peroxydinitrite (ONOOH) qui est un agent oxydant et nitrant très puissant (Beckman and Koppenol, 1996a; Ducrocq et al., 1999). Les différents effets du peroxydinitrite ont fait l'objet d'une revue par différents auteurs (Beckman and Koppenol, 1996b; Ducrocq et al., 1999; Pryor and Squadrito, 1995). La constante de vitesse entre le NO^\cdot et $\text{O}_2^{\cdot-}$ est de $6.7 \cdot 10^9 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est 3 fois supérieur au temps de réaction de la SOD qui transforme le $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 .

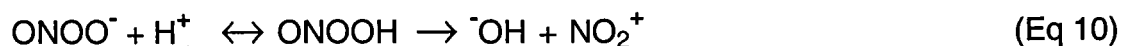
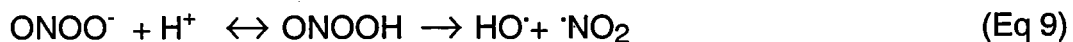


Ce composé, d'une demi-vie d'environ 1s dans des conditions physiologiques, peut diffuser du lieu d'où il a été produit. La forme *Cis* est relativement stable car sa charge négative est délocalisée sur la totalité de la molécule. Son pKa est de 6.8.



Le produit final du peroxydinitrite est le HNO_3 . Cependant les intermédiaires conduisant au HNO_3 n'ont pas encore été identifiés avec certitude. En effet, plusieurs types de réactions chimiques ont été successivement proposés, puis plus ou moins infirmés. 3 réactions principales ont été proposées : un clivage homolytique, un clivage hétérolytique et enfin l'existence du peroxydinitrite sous forme *Trans* excité.

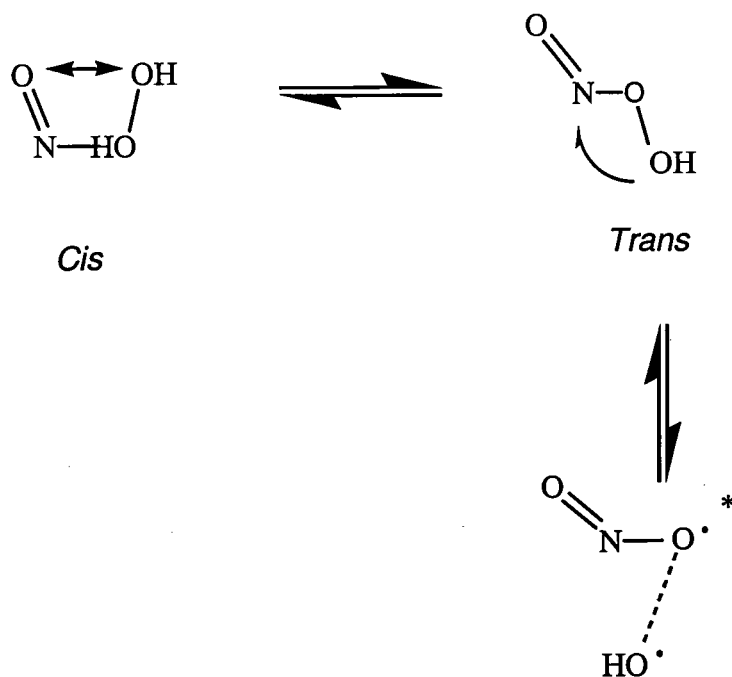
Différentes voies oxydatives sont possibles car la liaison O-O du peroxydinitrite peut réagir comme s'il était clivé de façon homolytique (Eq 9) ou hétérolytique (Eq 10).



Les ions métalliques semblent être nécessaires pour catalyser le clivage hétérolytique du peroxydinitrite pour former un cation nitrosonium. Les métaux

contenus dans le centre métallique de la SOD et de la MPO peuvent catalyser cette réaction (Beckman and Koppenol, 1996b). En absence d'ion métallique, le peroxyxynitrite subit une décomposition homolytique. De cette façon, le peroxyxynitrite exerce les mêmes effets que le radical hydroxyle tout en diffusant plus loin que le radical hydroxyle.

Koppenol et al ont conclu que la formation du radical hydroxyle était thermodynamiquement défavorable (Koppenol et al., 1992). Ces mêmes auteurs ont proposé l'existence de l'acide *trans*-peroxyxynitrique excité (HOONO*).



Etat excité du peroxyxynitrite qui réagit comme un radical hydroxyl plus du dioxyde d'azote, d'après Beckman et Koppenol, 1996.

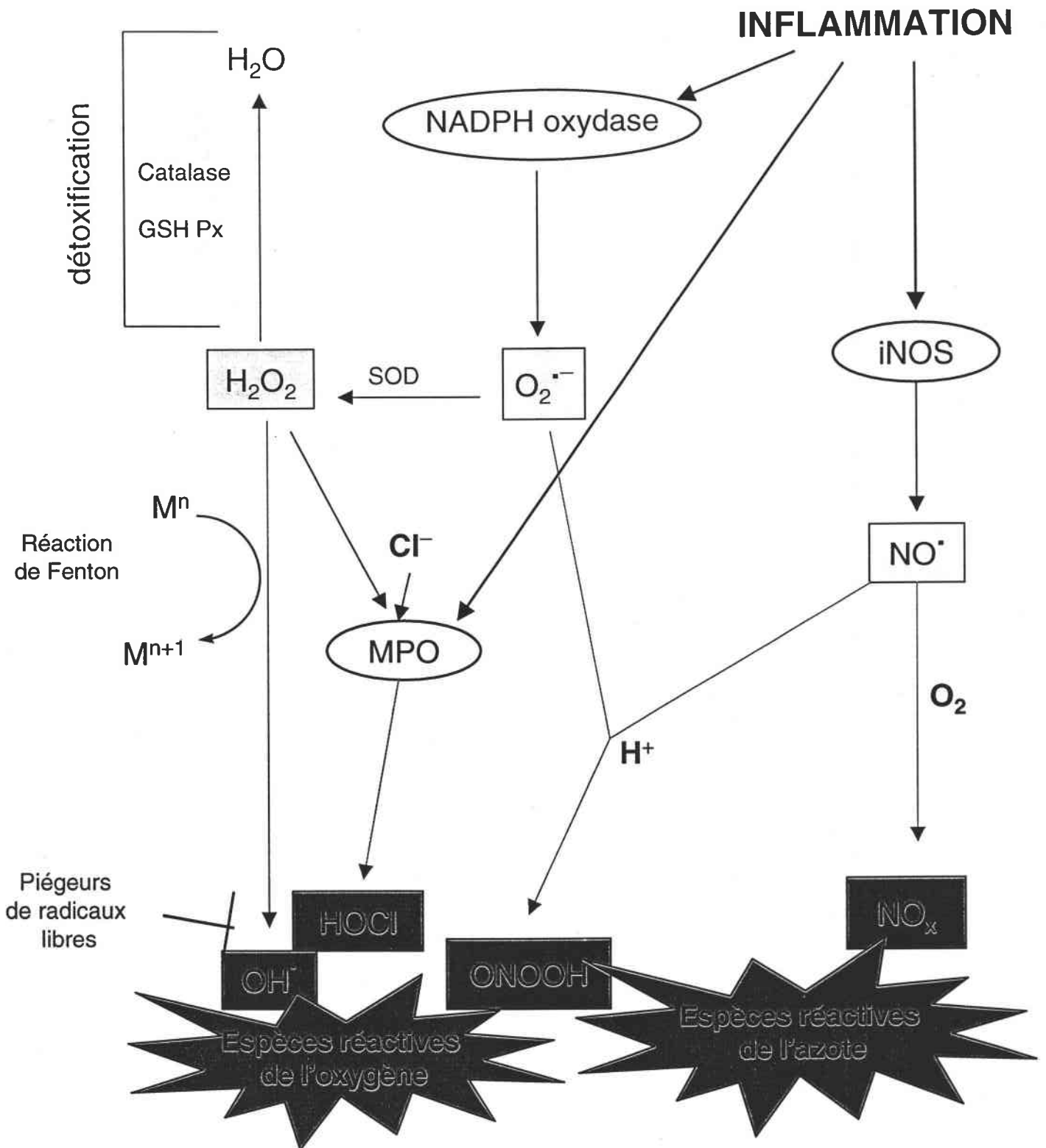
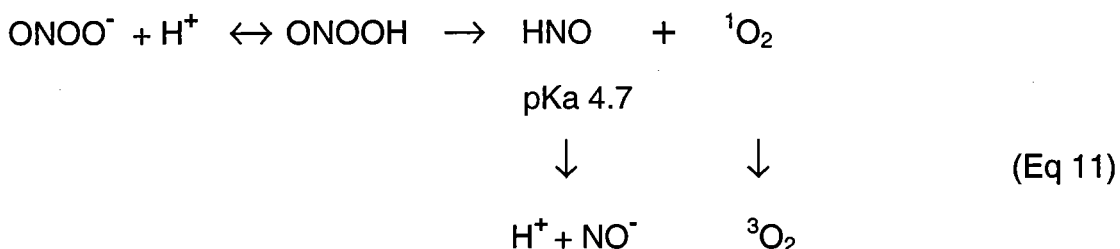


Figure 2: Génération et métabolisme des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les espèces potentiellement toxiques sont représentées par un : \square et les : \circ représentent les enzymes qui les produisent. Les : \star représentent les espèces réactives alors que les : \blacksquare symbolisent les composés qui permettent une détoxification.

Le peroxy-nitrite à l'état excité réagit comme un radical hydroxyle plus du dioxyde d'azote. Cette forme excitée du peroxy-nitrite expliquerait pourquoi les piègeurs de radical hydroxyle n'ont qu'un faible effet sur la toxicité exercée par le peroxy-nitrite (Pryor and Squadrito, 1995). La forme *Trans* du peroxy-nitrite excité peut réagir comme le radical hydroxyle et le radical nitrosonium.

Très récemment, une nouvelle hypothèse est apparue, proposant que le peroxy-nitrite se décomposerait en NO^- plus $^1\text{O}_2$ (Khan et al., 2000).



Dans cette expérience, la formation du NO^- par décomposition du peroxy-nitrite incubé dans du tampon PBS a été détectée en mesurant la transformation de la méthémoglobine en nitrosylhémoglobine. Ces résultats originaux sont néanmoins controversés. En effet, les données les plus récentes confirment les études déjà mentionnées démontrant que la coupure homolytique est la plus plausible (Merényi et al., 1998). Merényi et coll ont redémontré très récemment que la coupure homolytique était d'un ordre de réaction 23 fois supérieur à la formation de $^1\text{O}_2$ et de HNO. Ainsi, c'est le radical hydroxyle qui confère les propriétés oxydantes du peroxy-nitrite et le radical nitrosonium les propriétés nitrantes.

Il faut noter que toutes les expériences visant à élucider la réaction chimique de décomposition du peroxy-nitrite sont pratiquées *in vitro* et on peut facilement imaginer que *in vivo* cette chimie soit encore plus complexe.

Le peroxy-nitrite peut réagir avec du CO_2 . Cette réaction est possible *in vivo* car le CO_2 et le bicarbonate sont présents en concentration non

négligeable dans le plasma (1.3mM et 25mM, respectivement) (Ducrocq et al., 1999). Cette réaction se produirait via l'intermédiaire nitrosodioxydicarboxylate ($O=NOOCO_2^-$) (Eq 12) et formerait soit une paire de radicaux (Eq 13) soit du nitrosoperoxydicarbonate ($O_2NOCO_2^-$) (Eq 14)



D'un point physiologique, la réaction du peroxyde de nitrite avec le CO_2 augmente son pouvoir de nitration alors qu'il inhibe son pouvoir oxydant et hydroxylant.

- *Les NO_x*

Le NO^\cdot est oxydé par l' O_2 pour former le $\cdot NO_2$ qui peut lui même réagir avec le NO^\cdot et le $\cdot NO_2$ pour former respectivement du N_2O_3 , N_2O_4 .

- *NO_2Cl*

Les neutrophiles polymorphonucléaires convertissent le NO_2^\cdot en NO_2Cl et NO_2^\cdot à travers la production de HOCl produit par la myéloperoxydase (Eiserich et al., 1998).

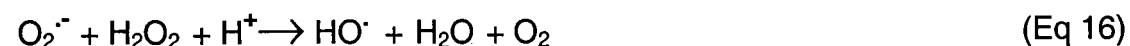
- *H_2O_2*

Le peroxyde d'hydrogène peut se former spontanément ou alors la réaction peut être catalysée par la SOD (ce qui sera décrit plus loin)



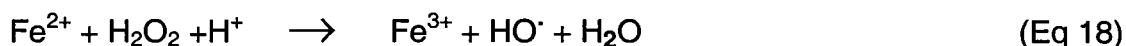
- *$\cdot OH$*

Le radical hydroxyle, qui est très réactif, peut se former soit par réaction entre l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène par la réaction d'Haber-Weiss (Eq 16):



soit par la réaction de Fenton (Eq 17 et 18) :

Agent réducteur (acide ascorbique, GSH, NADH...) + M^{n+1} (Fe^{3+} , Cu^{2+}) →
agent réducteur oxydé + Mn^n (Fe^{2+} , Cu^+ ...)



Dans ce système, les métaux de transition sont régénérés, la concentration nécessaire pour initier la réaction est donc faible. Le produit terminal de cette réaction est le radical hydroxyle qui est très toxique, comme il a été décrit précédemment. La présence ou non de métaux détermine telle ou telle réaction du NO avec les autres composés oxygénés et azotés, donnant lieu à des effets différents.

La formation de radical hydroxyle peut également se produire via la réaction entre le NO^{\cdot} et le $NO^{\cdot -}$, voir la figure 1.

1.1.3 Systèmes de détoxification et de contrôle intracellulaire des espèces oxygénées

Pour faire face à une production constante de ROS par le métabolisme cellulaire, les cellules doivent maintenir un statut réducteur permanent. Ce système peut être dépassé en cas de production massive de ROS, comme ce peut être le cas lors de l'inflammation. Dans ce cas, un stress oxydatif s'instaure.

1.1.3.1 Détoxification enzymatique de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène

Ces réactions de détoxification sont catalysées par essentiellement 3 enzymes : les SOD, la catalase et la glutathion peroxydase. Ces enzymes contiennent tous des métaux de transition utilisés pour leur capacité à changer facilement d'état d'oxydo-réduction. La fonction commune de ces enzymes est de transformer des espèces toxiques en eau.

- *Les SOD*

Les SOD (superoxyde dismutase) sont une famille de metallo-enzymes.

La SOD (Cu,Zn) contient un atome de Cu et un atome de Zn; elle est cytoplasmique.

La SOD (Mn) contient un atome de manganèse ; elle est mitochondriale.

Les SOD catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en dioxygène.



La constante de vitesse de cette réaction catalysée par la SOD est de l'ordre 10^4 fois supérieure à celle de la dismutation spontanée. Pour la dismutation spontanée, $k=1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et pour la réaction catalysée par la SOD, $k=2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Mc Cord et al, 1977).

Le système de détoxification par la SOD ne peut être efficace que si le H_2O_2 est réduit par la catalase (on parle du système SOD/catalase) ou la glutathion peroxydase.

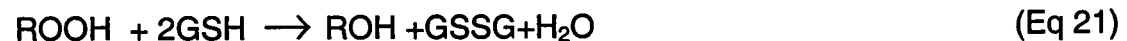
- *La catalase*

La catalase contient du fer ; elle catalyse la réaction suivante :



- *La glutathion peroxydase*

Cet enzyme contient également du fer et catalyse les réactions suivantes:



Ce système nécessite un couplage métabolique pour régénérer le GSH qui est décrit ci-dessous.

1.1.3.2 Systèmes impliquant l'oxydo-réduction de groupements thiols

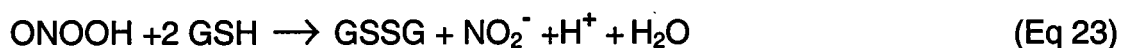
- *Le système GSH/GST/GSH reductase*

On ne peut pas parler du GSH en tant qu'une seule entité car bien qu'il puisse agir seul, il est généralement le substrat de différents enzymes et il est régénéré par la GSH réductase : il s'agit donc d'un véritable système.

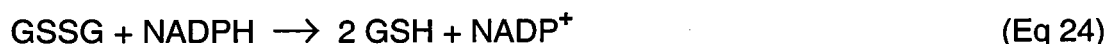
Le GSH joue un rôle protecteur vis à vis des différentes espèces réactives de l'oxygène, il agit comme un tampon anti-oxydant régissant l'homéostasie cellulaire. Le glutathion est un tripeptide (γ glutamate-cystéine-glycine) synthétisé à partir de la N-acétyl cystéine (NAC) grâce à la γ glutamyl cystéine

synthase. Il joue un rôle majeur contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Par des échanges thiol/disulfure, le GSH contribue au métabolisme des protéines et à la régulation de leur activité, ce qui le rapproche en ce sens de la thiorédoxine. La concentration intracellulaire du GSH varie de 1 à 10mM. Dans des conditions normales, le rapport GSSG/GSH est faible et celui-ci traduit l'état redox des cellules. Il existe un pool de GSH cytosolique qui est labile et un pool mitochondrial qui est stable.

Le glutathion peut agir seul pour piéger les radicaux libres de façon non enzymatique en agissant soit comme donneur d'hydrogène soit comme donneur d'électron via la base conjuguée GS⁻. Le GSH peut réagir par exemple avec le NO[•] pour former du GSNO (ceci sera décrit dans le paragraphe «modification des protéines, formation de nitrosothiols»). Le glutathion peut être nitrosé pour former du GSNO ou alors être oxydé pour former du GSSG, selon les circonstances. Une des conditions est la présence ou non de O₂⁻. En effet, lorsque les flux de NO et de O₂⁻ sont équivalents le ONOO⁻ se forme et la nitrosation est minimale, pour laisser la place à l'oxydation (Wink et al., 1997). Dans ce cas, le glutathion joue son rôle de détoxificateur de la cellule en formant du GSSG.



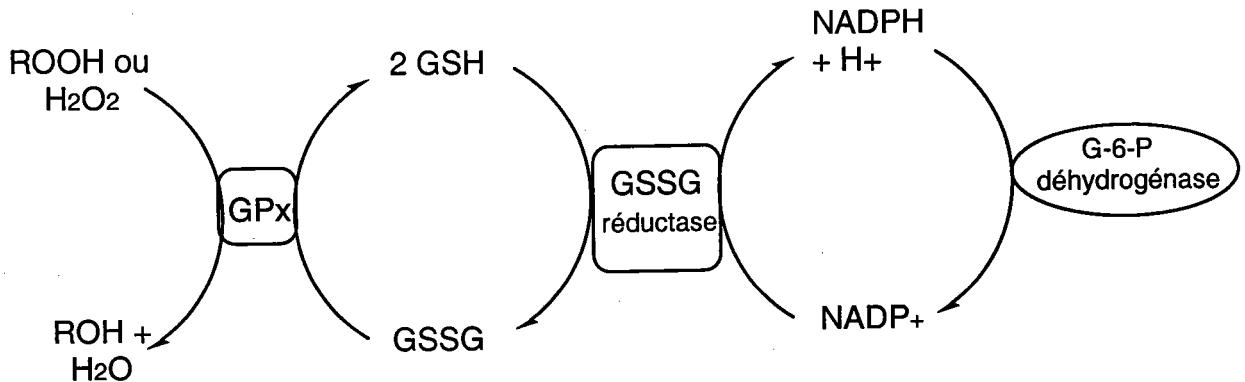
Le GSH est le substrat de la glutathion peroxydase, de la glutathion transférase et de la glutarédoxine. Dans tous les cas, le GSH est oxydé en GSSG qui est régénéré en GSH grâce à la GSH réductase qui utilise le NADPH comme équivalent réducteur.



La glucose-6-Ph-déhydrogénase permet ensuite de régénérer le NADPH mitochondrial.

La glutathion peroxydase utilise le GSH pour réduire les hydroperoxydes organiques (ROOH) ou pour réduire le peroxyde d'hydrogène. Cet enzyme est la voie prépondérante pour détoxifier le peroxyde d'hydrogène dans les globules rouges alors qu'elle est minoritaire dans les autres types cellulaires

où la catalase joue le rôle prépondérant. Le mécanisme de la glutathion peroxydase est explicité dans le schéma ci-dessous :



Les hydroperoxydes (ROOH), cytologiques, sont transformés en alcool (ROH) par l'action de la glutathion peroxydase (GPx) qui oxyde le GSH en GSSG. Le GSH sera régénéré par l'action de la GSSG réductase qui puise ses équivalents réducteurs (NAPH+H⁺) grâce à l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-Pdase) qui transforme le glucose-6-phosphate (G-6-P) en 6-phosphate gluconate (6-PG).

Les GST transférases peuvent être cytosoliques ou membranaires et fournissent une deuxième voie de réduction des hydroperoxydes mais elles ne réduisent pas le peroxyde d'hydrogène. Les GST détoxifient par conjugaison au GSH de nombreux substrats électrophiles. Elles joueraient un rôle important dans la détoxification de sous-produits de la peroxydation lipidique (ex : le 4-hydroxynonanal).

- *La glutarédoxine*

La glutarédoxine est une thiol transférase. Cet enzyme permet de réduire les ribonucléotides en désoxyribonucléotides et de maintenir sous forme réduite certains enzymes (pyruvate kinase, phosphofructokinase), elle se rapproche en ce sens de la thiorédoxine.

- *Le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase*

La thiorédoxine (Trx) est une petite protéine (11kDa) ubiquitaire qui possède deux résidus cystéines impliqués dans sa fonction redox. La Trx permet la réduction de protéines oxydées en s'oxydant par formation de ponts

disulfures. Elle est ensuite réduite par la thiorédoxine réductase. Ce système de régénération est comparable à celui de la glutathion réductase. La Trx permet de maintenir à l'état réduit certains facteurs de transcription, la ribonucléotide réductase ainsi que certaines protéines cytoplasmiques et nucléaires, permettant ainsi leur repliement conformationnel correct. Il a été rapporté très récemment que ce système, inductible, confère une protection vis à vis de la cytotoxicité du NO (Ferret et al., 2000). En effet, deux lignées de macrophages ont démontré une sensibilité différente au NO, la lignée résistante possédant la capacité d'induire la transcription de la thiorédoxine. Cette étude a démontré clairement que l'induction de la thiorédoxine permet aux cellules de résister à la toxicité générée par le NO. L'extrapolation de ces données permet de proposer un mécanisme expliquant les différentes sensibilités des lignées cellulaires face au NO.

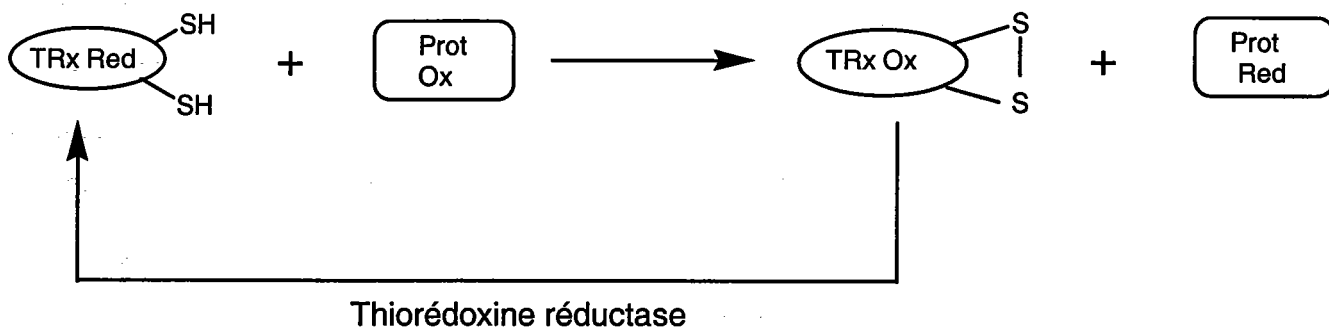


Schéma d'après Morel et Barouki, 1998

- *Ref-1*

Ref-1 (Redox factor 1) est une protéine nucléaire qui possède deux fonctions bien distinctes. La première est son activité de réduction, située dans sa partie N terminale, et la deuxième est son activité enzymatique de réparation de l'ADN (activité endonucléasique A/P) portée par sa partie C terminale (Xanthoudakis et al., 1994). Les cystéines 65 et 93 sont le site actif redox de cette protéine (Walker et al., 1993). Ref-1 stimule l'activité de liaison

à l'ADN de certains facteurs de transcription, probablement en réduisant un résidu cystéine crucial localisé dans le domaine de liaison à l'ADN de ces protéines (Arrigo, 1999). La thiorédoxine permet de réduire Ref-1 oxydé, de façon à régénérer ses propriétés redox, en réagissant avec les cystéines clés de Ref-1 (Hirota et al., 1997). Ref-1 a d'abord été identifié comme étant une molécule stimulant l'activité de liaison à l'ADN de AP-1 (activator protein 1), mais on s'est aperçu par la suite que Ref-1 appartient, en fait, à un système redox à part entière. En effet, la présence de Trx et de Ref-1 est requise pour conférer un environnement réducteur nécessaire pour l'activité de certains facteurs de transcription tels que NFκ-B, p53, HSF-1 et AP-1 ainsi que les dimères Fos/Jun. Ref-1 peut, en effet, stimuler l'activité de liaison à l'ADN d'une p53 oxydée, mais également stimuler la transactivation de ses gènes cibles, *in vivo* (Gaiddon et al., 1999; Jayaraman et al., 1997).

Cet exemple permet de montrer que tout est en inter-relation, la régulation redox joue un rôle majeur dans la régulation de facteurs de transcription et notamment dans notre protéine d'intérêt, p53.

1.1.3.3 Systèmes piègeurs de radicaux libres

Divers composés anti-radicalaires, hydrophobes et hydrophiles, sont présents dans les fruits et les légumes, c'est le cas notamment des vitamines C et E, de la pro-vitamine A et de divers flavonoides.

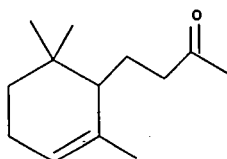
- *L'α tocophérol (vitamine E)*

Il se trouve dans les membranes et les lipoprotéines. Il bloque la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxydes.

- *Le β carotène (provitamine A)*

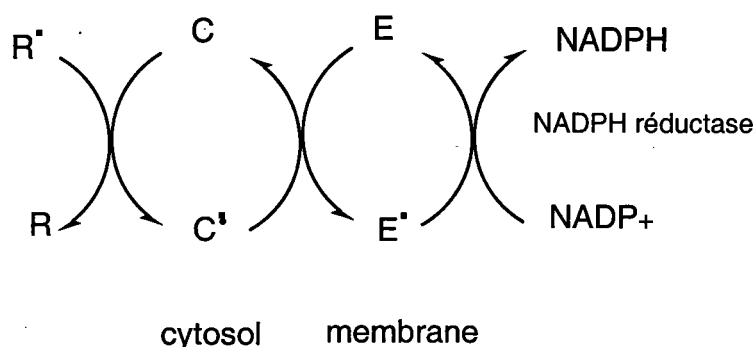
Il appartient à la grande famille des caroténoïdes qui sont constitués de 2 noyaux ionones reliés par une longue chaîne polyinsaturée. Il joue le même rôle que la vitamine E.

Structure d'un noyau ionone (nom générique du 4-(2,6,6-triméthyl-1-cyclohexen-1)-3-buten-2-one) :



• *L'acide ascorbique (vitamine C)*

Il s'agit d'un bon piègeur de radicaux libres, il se trouve dans le cytoplasme. Il participe également à inhiber la peroxydation lipidique en recyclant le radical tocophérol.



1.2 Réactivité du NO, et de ses dérivés, avec les constituants cellulaires

1.2.1 Acides gras insaturés

La réaction du NO avec les acides gras insaturés conduit à la peroxydation lipidique. Il s'agit d'une réaction en chaîne amorcée par un radical. L'attaque d'un radical libre oxyde un carbone d'un acide gras appartenant à une chaîne lipidique pour former un radical carbone. Celui-ci va ensuite réagir avec un atome d' O_2 pour former un radical peroxyde (LOO^\bullet). Ce dernier va attaquer un nouvel atome de carbone d'un autre acide gras et ainsi de suite, la réaction se propage en chaîne. L'apparition de peroxydes lipidiques rend la membrane lipidique plus faible et sensible aux cassures. La peroxydation des lipoprotéines de faible densité du plasma (LDL) contribue au développement de l'athérosclérose. Le NO joue un rôle complexe vis à vis de la peroxydation lipidique. En réagissant avec l'anion superoxyde, il peut initier la peroxydation lipidique via le peroxyde nitrite. Certaines études ont montré que le NO induisait la peroxydation des LDL, cependant il semble que ces effets observés étaient plutôt dus aux produits d'oxydation du NO tels que le NO_2 , N_2O_3 et N_2O_4 (Goss et al., 1995). Au contraire, le NO exercerait un effet anti-

oxydant en réagissant avec les radicaux peroxydes pour former un adduit nitrosé, ce qui inhibe la propagation de la peroxydation lipidique (Goss et al., 1995).



Le NO pourrait également posséder un rôle anti-oxydant en inhibant la réaction de Fenton, notamment en formant un complexe avec les métaux de transition. Rubbo et coll ont réussi à expliquer clairement les différents effets du NO[·] sur la peroxydation lipidique (Rubbo et al., 1994). Le NO[·] peut, en effet, stimuler ou inhiber la peroxydation lipidique induite par le système O₂^{·-} /H₂O₂/OH[·]. Le rôle pro ou anti-oxydant est déterminé par la concentration relative de chacun des réactifs. Il existe une balance complexe entre les effets apparents protecteurs et destructeurs du NO[·] *in vivo*. De multiples facteurs rentrent en jeu, comme par exemple son taux de production, son environnement radicalaire et sa compartimentation.

1.2.2 Acides nucléiques

Les dommages que le NO produit sur l'ADN constituent un facteur important pour la toxicité du NO et son rôle dans les étapes de la cancérogenèse. De plus, il est important de noter que le NO inhibe la réparation de l'ADN en inhibant la ribonucléotide réductase (ce qui sera développé un peu plus loin), ce qui conduit à une inhibition de la synthèse du pool des désoxyribonucléotides, ce qui potentialise son effet toxique.

1.2.2.1 Nitration

Le peroxyxynitrite, le radical nitrosonium (NO₂[·]) et le NO₂Cl ont la capacité de nitrer les bases de l'ADN.

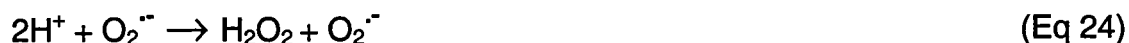
L'incubation d'ADN et d'ARN isolés en présence de peroxyxynitrite conduit à la formation de 8-nitroguanine d'une façon dose dépendante (Yermilov et al., 1995a). La 8-nitroguanine est le produit majoritairement formé par le peroxyxynitrite. La 8-nitroguanine peut ensuite être facilement dépurinée, ce qui pourrait conduire à la formation de sites apuriques qui peuvent induire des transversions de type: G :C → T :A (Yermilov et al., 1995b).

1.2.2.2 Oxydation

Les réactions d'oxydation sont principalement dues au radical hydroxyle et à l'oxygène singulet. La formation d'oxoguanine par le peroxydinitrite reste actuellement controversée.

DeRojas et coll ont montré la formation de xanthine et de 8-oxo-guanine dans l'ADN de macrophages activés. Les inhibiteurs de NOS peuvent inhiber la formation de tels dommages à l'ADN, démontrant le rôle de NO dans les réactions d'oxydation et de déamination de l'ADN (Derojas-Walker et al., 1995).

La formation de 8-oxo-déoxyguanosine a été détectée, *in vitro*, après incubation en présence de donneurs de NO⁻. Celle-ci pouvait être inhibée par des piègeurs de radical hydroxyle et des antioxydants (acide ascorbique, N-acétylcystéine), démontrant que le NO⁻ pourrait être une source de radical hydroxyle, soit par une réaction avec le NO[•] (équation 21 et 22) soit indirectement via la production de H₂O₂ provenant de la réaction entre le NO⁻ et l'O₂ qui produit de l'anion superoxyde (équations 23, 24 et 25) (Ohshima et al., 1998).



1.2.2.3 Alkylation

Le N₂O₃ peut réagir avec les amines secondaires pour former des nitrosamines et des nitrosoamides cancérigènes qui peuvent alkyler les bases de l'ADN. L'alkylation des bases de l'ADN induit des lésions *pro* mutagènes. La majorité des mutations induites par les composés N-nitrosés est due à la présence de bases modifiées au cours de la réplication de l'ADN.

Par exemple, la O⁶-méthylguanine s'apparie avec la thymine et donne lieu majoritairement à des mutations telles que des transitions G :C → A :T.

De telles modifications sont importantes dans le processus de la cancérogenèse. En effet, le proto-oncogène H-ras est activé chez des rats traités par une nitrosoamide, la N-méthylnitrosourée.

1.2.2.4 Déamination

Le N₂O₃ serait le responsable des réactions de déamination par nitrosation des purines et des pyrimidines (Wink et al., 1991).

La guanine, l'adénine, la cytosine et la 5-méthylcytosine peuvent être déaminées pour donner respectivement de la xanthine, de l'hypoxanthine, de l'uracile et de la thymine. Ces différentes transformations vont donner lieu à l'apparition de différentes mutations. Les réactions de déamination peuvent être classées en 5 types (Nguyen et al., 1992) :

Type 1 : 5-méthylcytosine → thymine → C:G → T:A

Type 2 : cytosine → uracil → C:G → T:A

Type 3 : adénine → hypoxanthine → A:T → G:C

Type 4 : guanine → xanthine → site apurinique → G:C → T:A

Type 5 : adénine → hypoxanthine → site apurinique → A:T → T:A.

Nguyen et col ont démontré la mutagénicité du NO, chez des cellules de mammifères en culture (Nguyen et al., 1992). La guanine serait la base la plus modifiée dans l'ADN (Tamir et al., 1996). En effet, la quantité de xanthine augmente significativement chez des macrophages activés par du LPS et de l'IFN γ (Derojas-Walker et al., 1995). *In vitro*, la majorité des mutations induites par un donneur de NO sont des transitions de type G:C → A:T (Nguyen et al., 1992; Routledge et al., 1994). Sur les codons Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 et Arg282 du gène p53 (qui sont des sites "points chauds"), les mutations sont en général de type C:G → T:A sur les sites CpG. Or, il a été démontré qu'une exposition simultanée à du NO \cdot et du O₂ \cdot^- , et non à du NO \cdot seul, sur des cellules humaines en culture induit une transition de type C:G → T:A sur le codon 248 du gène p53, ce qui conduit à une mutation Arg

→ Trp qui inactive la p53 (Souici et al., 2000). L'apparition de cette mutation s'explique par une déamination de la 5-méthyl cytosine qui forme de la thymine. Cette observation montre le potentiel mutagène des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. De plus, dans les cancers colorectaux, il a été démontré une corrélation positive entre la fréquence des mutations au niveau des sites CpG sur le gène *p53* et l'expression de la iNOS (Ambs et al., 1999a). Les transitions aux sites CpG via la méthylation de la cytosine, suivies d'une réaction de déamination, sur les "points chauds" pourraient être imputées à une inflammation chronique dans ce type de cancer.

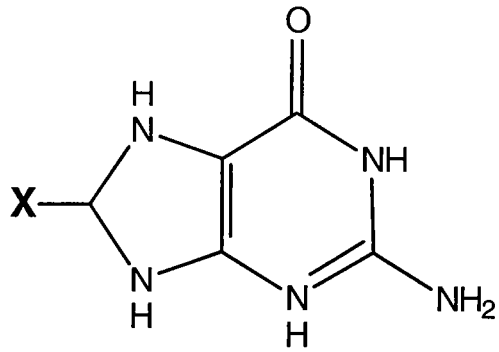
Murata et coll ont montré, en utilisant un essai fonctionnel sur les levures, que le $\text{NO} + \text{O}_2^{\cdot-}$ (relargués à partir du sydonimide (SIN-1)) induisent des mutations sur la p53 par déamination de la guanine (type 4) qui l'inactivent (Murata et al., 1997). Il découle de cette étude que la cible principale du NO sur l'ADN complémentaire de *p53* serait la guanine et que la déamination de la 5-méthylcytosine se ferait spontanément car le NO n'augmente pas significativement ce type de mutation sur de l'ADN méthylé par PCR (Murata et al., 1997). Il a été, en effet, proposé que la déamination de la 5-méthylcytosine sur les sites CpG pourrait être responsable des mutations C → T spontanées *in vivo* (Nguyen et al., 1992; Wink et al., 1991).

En fait, plusieurs voies de déamination semblent importantes pour le potentiel mutagène du NO et de ses dérivés. Cet effet mutagène du NO est très important pour son rôle pro-cancérogène.

1.2.2.5 Cassures de l'ADN

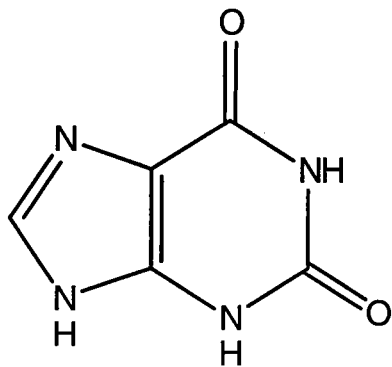
Les expériences sont, en général, effectuées *in vitro* au moyen de plasmides tels que PBR322, PM2, CMV et PUC19, passant de la forme superenroulée à la forme relaxée ou linéaire, visualisées par migration sur gel d'agarose. *In vitro*, le NO seul n'induit pas de cassure sur l'ADN, alors que l'exposition à du peroxy-nitrite, SIN-1 ou par une combinaison de NO \cdot et de $\text{O}_2^{\cdot-}$ induisent des cassures sur l'ADN. Il a été démontré qu'une concentration de peroxy-nitrite aussi faible que 1 μ M induit des cassures sur l'ADN. Le mécanisme d'action du peroxy-nitrite sur l'ADN a fait l'objet d'une revue par Szabo et Ohshima (Szabo and Ohshima, 1997). Il a été montré que des composés de type catéchol (la dopamine, les catéchol œstrogènes)

augmentent synergiquement les cassures de l'ADN plasmidique induites par le NO *in vitro* (Yoshie and Ohshima, 1997a; Yoshie and Ohshima, 1997b). Des cassures simple brin ont pu être observées chez des cellules exposées à du peroxy-nitrite et ces dommages étaient corrélés avec la cytotoxicité induite par le peroxy-nitrite (Szabo et al., 1996). Il semble qu'il soit nécessaire de distinguer les études *in vitro* de celles *in vivo* (dans des cellules dans ce cas) car par exemple le NO seul, *in vitro*, exposé à de l'ADN purifié n'induit pas de cassure sur l'ADN alors qu'il exerce cet effet sur des cellules en culture (Tamir et al., 1996). En effet, dans les conditions de culture, le NO peut réagir avec d'autres composés pour former par exemple du peroxy-nitrite. Des données très récentes provenant de notre laboratoire ont montré que le NO⁻ induit des cassures sur les brins de l'ADN *in vitro* et que cet effet est en partie inhibé par des accepteurs d'électron, ce qui suggère que l'anion nitroxyle est beaucoup plus puissant que le monoxyde d'azote pour induire ce type de lésion sur l'ADN (Ohshima et al., 1998b).

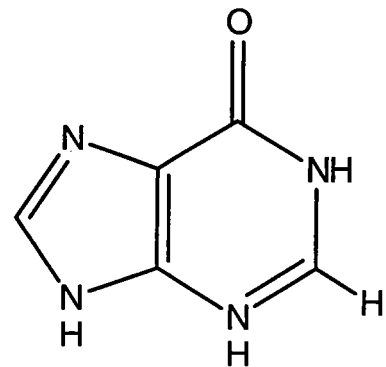


$X = =O$:8-oxoguanine

$X = -NO_2$:8-nitroguanine



Xanthine
(déamination de la guanine)



Hypoxanthine
(déamination de l'adénine)

Figure 3 : *Modifications des bases de l'ADN.*

1.2.3 Protéines

Le cas de l'hémoglobine illustre bien les différents effets que le NO peut avoir sur une protéine par nitrosation (formation de S-NO) et par nitrosylation (réaction avec les métaux). Ceux-ci dépendent de la concentration en NO et de son environnement radicalaire. Le NO peut, en effet, réagir avec le Fer de l'hème de l'hémoglobine pour former de l'hémoglobine nitrosylée (Hb(Fe²⁺)NO). Cette forme se retrouve *in vivo* dans les veines car la concentration en O₂ y est faible (Gow and Stamler, 1998). Cette forme représente environ 0.1% de l'hémoglobine totale et correspond à la structure tendue de l'hémoglobine (T). Lorsque plus de NO se lie à cette forme, un clivage hétérolytique libère de l'anion nitroxyde et de la méthémoglobine : Hb(Fe³⁺) + NO⁻ (Gow and Stamler, 1998). En revanche, en présence d'O₂ et d'une concentration plus forte de NO, le NO va réagir avec la cystéine 93 de la chaîne β, ce qui va conduire à la formation de s-nitrosohémoglobine (S-NO-Hb(Fe²⁺)O₂). Cette forme se retrouve dans le poumon et correspond à la structure R qui est capable de lier l'O₂. Le passage d'une forme à l'autre est totalement réversible, la transition de la structure R à T permet de libérer très efficacement de l'O₂. L'exemple de cette protéine montre que le NO peut réagir différemment selon sa concentration et son environnement proche et même exercer un effet sur la structure et la fonctionnalité de cette protéine.

1.2.3.1 Formation de nitrosothiols

La S-nitrosation présente quelques analogies avec la phosphorylation car elle est réversible, module l'activité de certaines protéines et a des cibles bien précises.

Les résidus cystéines sont les cibles principales de la S-nitrosation. Ces résidus sont en effet rapidement nitrosés. La formation de S-nitrosothiols (RSNO) a été démontrée *in vivo* pour plusieurs protéines. C'est le cas notamment de la S-nitrosoalbumine, de la S-nitroso-L-cystéine, et du S-nitrosoglutathion. La forme prédominante du NO dans le plasma humain est sous forme de nitrosothiols qui sont pour la plupart des nitrosoprotéines (96%), la nitroso albumine représentant 82% de celles-ci (Schwartz et al., 1999). La formation de nitrosoalbumine permet de moduler constamment la concentration de NO libre dans le milieu vasculaire et représente également

une forme de stockage relativement stable du NO. Il a été démontré que la nitroso BSA possède les mêmes effets biologiques que le NO, bien que son effet relaxant soit plus lent et persistant (Hsieh et al., 1999). La formation de RSNO permettrait de faciliter le transport du NO vers ses effecteurs, de prolonger sa demi vie dans le sang et les tissus et enfin de contrôler plus ou moins sa toxicité (Stamler et al., 1992).

Comme il a déjà été énoncé ci-dessus, le NO peut nitroser l'hémoglobine dans certaines conditions pour former de la S-nitrosohémoglobine (S-NO-Hb(Fe²⁺)O₂). La nitrosation de l'hémoglobine joue un rôle régulateur dans le transport de l'O₂.

La formation de nitrosothiols peut également inhiber l'activité de certains enzymes, notamment les caspases. Les caspases sont, en effet, des protéases à cystéines qui sont impliquées dans la cascade enzymatique de l'apoptose. Le NO nitrosyle la caspase 3, ce qui inhibe son activité protéasique et par la même, le processus apoptotique (Haendeler et al., 1997; Kim et al., 1997). La cystéine 163 de la caspase 3 a été identifiée comme étant la cystéine nitrosée responsable de sa perte d'activité (Rossig et al., 1999). Cette inhibition est réversible en présence de DTT (Kim et al., 1997; Li et al., 1997). Les caspases 1,2,4,6 et 7 perdent également leur activité après exposition au NO, *in vitro*, par nitrosation (Li et al., 1997). Ces données suggèrent que le NO peut inhiber l'apoptose en nitrosant les effecteurs de l'apoptose que sont les caspases. Cependant, le rôle inhibiteur ou inducteur du NO vis à vis de l'apoptose reste peu clair et semble dépendre fortement du type cellulaire. Ce point sera développé plus loin.

L'activité catalytique de l'alcool déshydrogénase est inhibée par le NO. Cet enzyme possède un complexe Fer-Soufre qui est essentiel pour son activité enzymatique (Crow et al., 1995). Son inactivation est corrélée avec la S-nitrosation de cystéines qui entraîne la destruction du complexe Zinc-Soufre et la libération du Zinc (Gergel and Cederbaum, 1996). Cet effet inhibiteur du NO est réversible par du DTT et du Zn²⁺. Le NO réagit également avec les groupements thiols d'un enzyme de réparation de l'ADN, la O-6-méthylguanine-DNA-méthyltransférase de façon réversible (Wink and Laval, 1994). La formation de nitrosothiols sur cet enzyme est corrélée avec son inactivation. Le NO jouerait donc un rôle important dans l'apparition de

mutations car d'une part, via la formation de nitrosamines, il induit la formation de la O-6-méthylguanine, et d'autre part il inhibe l'activité de l'enzyme qui pourrait réparer cette lésion sur l'ADN.

D'autres enzymes sont inhibés par S-nitrosation, mais ne sont pas mentionnés ici.

• *Le cas du GSNO*

Nous décrivons ici comment le GSNO est formé et comment il se décompose.

Le NO est d'abord oxydé par l'O₂ pour réagir avec le GSH pour former ensuite du GSNO, selon les équations suivantes :



En revanche, en condition anaérobie, le mécanisme est beaucoup plus complexe et le bilan de la réaction donne du GSSG et non du GSNO (Hogg et al., 1996).

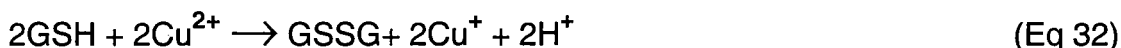
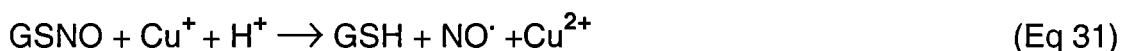
Une étude très récente démontre l'existence d'un nouveau composé (le GSNO₂) qui se décompose en NO[·] lorsque le peroxy-nitrite réagit avec un seul GSH (Kim et al., 1997).

Le GSNO présente les mêmes propriétés que le NO car il libère le NO lentement, ce qui suggère qu'il est impliqué dans le stockage et le transport.

Le GSNO est couramment utilisé comme donneur de NO dans les expériences car celui-ci est considéré comme étant un donneur de NO physiologique. La décomposition du GSNO a été étudiée en détails par Singh et coll (Singh et al., 1996a). La réaction majoritaire de décomposition des nitrosothiols serait un clivage homolytique qui donne naissance à 2 radicaux :



La décomposition du GSNO est catalysée en présence de Cu^+ ou de Ni^{2+} (Ho et al., 1999), d'acide ascorbique (Smith and Dasgupta, 2000) et de GSH (Singh et al., 1996a; Singh et al., 1996b).



Le GSNO reste relativement stable en absence de GSH (Singh et al., 1996b). Dans les cultures cellulaires, une certaine quantité de GSH est toujours présente, la libération du NO y est donc beaucoup plus importante que dans du PBS ou même dans un milieu de culture sans cellule.

La décomposition du GSNO peut également se produire par clivage hétérolytique pour former du NO^\cdot ou du NO^+ (Arnelle and Stamler, 1995; Hogg et al., 1996). La formation de NO^\cdot se fait lorsque la concentration de GSH est relativement forte, par attaque nucléophile du GS^- sur le GSNO (Hogg et al., 1996). Les effets biologiques des nitrosothiols ne sont donc pas dus uniquement à la production de NO^\cdot , mais également au NO^- et au NO^+ . Le GSNO peut donc servir à la fois de donneur de NO^\cdot , NO^- et NO^+ .

1.2.3.2 Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines forme des groupes carbonyle, cependant ce type de modification n'a pas encore été très étudié.

1.2.3.3 Réaction avec les métalloprotéines

La réaction du NO avec les métaux des protéines forme des complexes stables nitrosyle-métal ou conduit à une réaction redox du métal. Ces différentes réactions ont fait l'objet d'une revue par Radi (Radi, 1996). La réaction du NO, et de ses dérivés, avec les métalloprotéines conduit généralement à une perte de leur fonctionnalité. Le NO peut réagir avec les protéines contenant du Fer, du Cuivre ou un complexe Fer-Soufre.

• Réaction avec le Fer

* Sur un groupement hème

En général, la formation de complexes Fer-nitrosyle est mesurée expérimentalement par résonance électro paramagnétique (EPR). Le NO peut réagir avec l'ion ferreux (Fe^{2+}) ou l'ion ferrique (Fe^{3+}).

La réaction du NO avec l'hème peut avoir différentes conséquences. Un complexe stable hème-nitrosyle peut se former et ne conduit pas à un changement dans le statut redox du Fer. Un complexe hème-nitrosyle peut aussi se former comme intermédiaire avant un changement redox dans le Fer. Ces différentes stabilités sont illustrées dans le cas de la réaction du NO avec la myoglobine et l'hémoglobine. Le complexe hème-nitrosyle se dénomme nitrosohémoglobine et peut se transformer en méthémoglobine après changement redox du Fer.

Valence du Fer dans les différentes formes de l'hémoglobine :

Hémoglobine : $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$

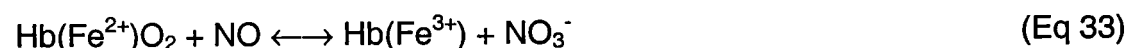
Oxyhémoglobine : $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2$

Nitrosylhémoglobine : $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{NO}$

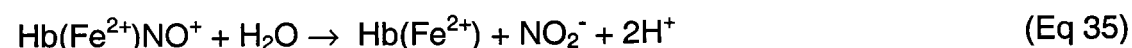
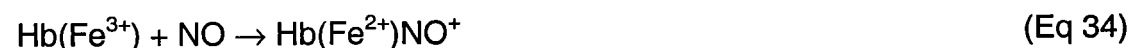
Méthémoglobine : $\text{Hb}(\text{Fe}^{3+})$

La formation de nitrosylhémoglobine est favorisée dans les tissus qui ont une faible tension d' O_2 . Cette forme se retrouve dans différentes conditions pathologiques où il y a une surproduction de NO (Lancaster, Jr. et al., 1992; Wizemann et al., 1994).

Le NO peut réagir également avec l'oxyhémoglobine pour former de la méthémoglobine et du nitrate. Cette réaction se ferait par l'intermédiaire du peroxy-nitrite.



Le NO peut aussi réagir avec la méthémoglobine pour former la déoxyhémoglobine et des espèces nitrosylantes



La réaction du NO^{\cdot} avec la déoxyhémoglobine conduit à la formation d'un complexe stable nitrosylhémoglobine



Dans les vaisseaux, la réaction du NO avec l'oxyhémoglobine donne principalement de la méthémoglobine car il y a un large excès d'oxyhémoglobine par rapport au NO dans les globules rouges. Par contre,

lorsque la tension en O_2 est faible, une partie de l'hémoglobine sous forme Fe^{2+} est déoxygénée, la nitrosylhémoglobine se forme.

La liaison du NO avec la cytochrome C oxydase inhibe son activité en se liant avec son hème. La constante de liaison du NO est d'ailleurs plus grande que celle de l' O_2 . L'inhibition de cet enzyme par le NO provoque l'inhibition de la respiration mitochondriale. (Brown and Cooper, 1994; Cassina and Radi, 1996; Cleeter et al., 1994).

* Sur la ferritine

La ferritine est une protéine qui permet de stocker le Fer; elle contient en effet 4500 atomes de Fer par molécule, pour la plupart sous forme ferrique. Le NO peut former un complexe réversible avec le Fe^{2+} de la ferritine, il pourrait ainsi favoriser la libération du Fer à partir de la ferritine (Reif and Simmons, 1990). La libération du Fer conduit à une augmentation du Fer libre dans la cellule, favorisant ainsi les réactions d'Haber-Weiss et de Fenton et ainsi la production du radical hydroxyle.

• Réaction avec les complexes Zn-Soufre:

Le Zinc est le second métal de transition, après le Fer, présent chez les animaux. Il se trouve principalement dans des structures « en doigt de Zinc ». Ces domaines sont constitués de Zinc lié soit au groupement thiol d'une cystéine soit au groupement imidazole d'une histidine. Les complexes Zinc-Soufre se retrouvent chez les facteurs de transcription et sont essentiels pour leur activité de liaison à l'ADN. Ce motif confère une structure particulière aux facteurs de transcription qui leur permet de pénétrer dans le grand sillon de l'ADN.

• Réaction avec les complexes Fer-Soufre

La liaison du NO aux complexes Fer-Soufre conduit à la formation de complexes Fe-nitrosyle (Henry et al., 1991). Ces complexes peuvent être stables et réversibles ou alors le NO peut progressivement conduire à l'oxydation du complexe et à sa destruction. Pour l'instant, le mécanisme par lequel le NO détruit le complexe n'est pas clair. Il pourrait impliquer du dioxyde de nitrogène ou le peroxyne. Le meilleur exemple pour illustrer ce

type de réaction du NO avec les protéines est l'aconitase qui est un enzyme impliqué dans le cycle de Krebs. La réaction du NO avec cet enzyme inhibe son activité catalytique (Castro et al., 1998). L'inhibition de l'aconitase est fortement impliquée dans la cytotoxicité exercée par le NO (Xiong et al., 1993; Yamakura et al., 1998). Il semble que ce soit plutôt les nitrosothiols que le NO en lui-même qui soient responsables de l'inactivation de l'aconitase. La destruction du complexe serait en fait due au caractère nitrosonium (NO⁺) des nitrosothiols qui sont des agents oxydants très puissants.

• Réaction avec le Cuivre

Le NO peut former des complexes stables Cuivre-nitrosyle ou alors exercer une action redox, de la même façon qu'avec le Fer.



On distingue trois types de protéines contenant du Cuivre, mais ils ne seront pas développés ici. La cytochrome c oxydase possède, en plus de son groupement hème, deux atomes de Cuivre. Seulement l'un d'eux se lie au NO pour former un complexe Cu-nitrosyle. Ainsi, le NO se lie à deux types de métaux au sein de la cytochrome c oxydase, bien que les effets de la formation du Fe-nitrosyle soient mieux connus que ceux du Cu-nitrosyle. Les protéines telles que l'hémocyanine, la tyrosinase et des oxydases du Cuivre (ex: l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine) réagissent également avec le NO (Gorren et al., 1987; Uiterkamp and Mason, 1973; Wever et al., 1973).

1.2.3.4 Formation de groupements nitrotyrosine

Ohshima et al ont proposé en 1990 que les protéines contenant des NTYR pouvaient être considérées comme un marqueur de nitration endogène des protéines (Durner et al., 1999). Depuis, de nombreuses études ont été menées dans différents laboratoires, afin de comprendre les mécanismes de formation des NTYR, déterminer quelles protéines pouvaient être touchées par cette transformation et enfin localiser les protéines nitrées *in vivo*.

• Réaction de nitration

Réaction chimique

*Le ONOOH

Ischiropoulos et coll (Ischiropoulos et al., 1992) ainsi que Beckman et coll (Beckman et al., 1992) ont montré que le peroxy-nitrite pouvait réagir rapidement avec des composés phénoliques, dont la tyrosine. Le peroxy-nitrite a d'abord été estimé comme étant le seul agent responsable de la nitration des tyrosines (Beckman, 1996). Van der Vliet et coll ont étudié précisément la nitration des protéines par le peroxy-nitrite. Il découle de leur étude que le peroxy-nitrite pourrait nitrer les tyrosines via la formation de NO_2^\cdot qui formerait tout d'abord le radical tyrosyle et qui serait ensuite nitré par une autre réaction avec le NO_2^\cdot (voir schéma) (van der Vliet et al., 1995).

Beckman et coll (Beckman et al., 1992) ont montré que la nitration des phénols est augmentée par la présence de SOD ou de Fe^{3+} -EDTA, probablement en catalysant le clivage hétérolytique du peroxy-nitrite pour donner du NO_2^\cdot .

La réaction du peroxy-nitrite avec du CO_2 accroît le rendement de nitration du peroxy-nitrite (Berlett et al., 1998; Uppu et al., 1996). Le pouvoir de nitration du peroxy-nitrite est augmenté par la présence de bicarbonate car le $\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$ (nitrosoperoxy-carbonate) possède un pouvoir de nitration encore plus important que celui du peroxy-nitrite (Lyman et al., 1996; Pfeiffer et al., 2000; van, V et al., 1994). De même, la présence de Fe^{3+} -EDTA augmente également le pouvoir de nitration du peroxy-nitrite (Beckman et al., 1992), probablement en formant un complexe stable avec la forme *Cis* du peroxy-nitrite qui libérerait du NO_2^+ (Kong et al., 1996). La Cu-Zn SOD exerce le même effet car elle permet également la formation d'un complexe stable Cu,Zn SOD- ONOO^- (Beckman et al., 1992; Kong et al., 1996).

Halliwell a ensuite proposé que les NTYR sont plutôt un biomarqueur de la production d'espèces nitrantes qu'un marqueur spécifique du peroxy-nitrite (Halliwell, 1997).

* Le NO^\cdot

Le NO^\cdot par lui-même ne réagit pas avec les tyrosines pour former des résidus nitrotyrosine. En revanche, il peut réagir avec le radical tyrosyle de la prostaglandine H synthase-2. Le NO^\cdot réagit avec le radical tyrosyle pour

former la nitrosotyrosine qui sera ensuite oxydée une première fois en radical tyrosyle iminoxyle puis une deuxième fois en NTYR (Gunther et al., 1997).

* Le HNO₂ (acide nitreux)

La nitration par l'acide nitreux est un processus lent et la nitration de la tyrosine ne semble pas être la modification majeure, comparée à celle d'autres acides aminés.

* H₂O₂/NO₂⁻ via la MPO

Ce système semble être un bon candidat pour la nitration *in vivo* des protéines (Eiserich et al., 1998; Sampson et al., 1998). En effet, la MPO peut utiliser le NO₂⁻ en présence de H₂O₂ pour nitrer des homogénats de cœur de rats. Selon Masuda et coll, le système H₂O₂/NO₂⁻ via la MPO serait un système très performant pour la nitration. L'oxydation d'un électron de la tyrosine se fait aisément pour former le radical tyrosyle par le système MPO/H₂O₂ qui réagit ensuite rapidement avec le NO₂⁻, NO₂Cl produits par la MPO en présence de NO₂⁻, Cl⁻ et H₂O₂ (Marquez and Dunford, 1995).

Bien que plusieurs études aient démontré que plusieurs composés sont capables d'induire la formation de NTYR, il reste cependant difficile d'évaluer quelle est l'efficacité relative de nitration de tel ou tel agent. Ceci a été le but de l'une de nos publications où nous avons étudié, grâce à une méthode sensible de détection par HPLC couplée à un détecteur électrochimique, la formation de NTYR, *in vitro*, par différents composés nitrant (ONNOH, NaNO₂, NaNO₂/HOCl, O₂⁻/NO[•], NO[•], NO⁻), voir la partie résultats.

Il a été suggéré que la nitration de la tyrosine pouvait être un phénomène réversible grâce à l'existence d'un enzyme « dénitrase » (Gow et al., 1996; Kamisaki et al., 1998). Gow et col ont suggéré qu'il pourrait exister un système enzymatique pour dénitrer les NTYR *in vivo* (Gow et al., 1996). Ces derniers ont en effet montré que des lysats d'érythrocytes humains avaient la capacité de modifier l'épitope NTYR de la BSA modifiée par le peroxy-nitrite. Cette notion a été étayée par la suite par Kamisaki et col (Kamisaki et al., 1998). Ces auteurs ont trouvé que des homogénats de langue et de rate de rats traités au LPS possédaient la capacité de dénitrer, *in vitro*, l'albumine

bovine, suggérant l'existence d'un enzyme spécifique et non ubiquitaire. Cet enzyme pourrait avoir une grande importance physiologique, bien qu'elle n'ait pas encore été isolée et caractérisée. Une réduction non enzymatique de la NTYR en aminotyrosine a également été rapportée (Balabanli et al., 1999). Cette réduction peut se produire, *in vitro*, en présence de protéines contenant un groupement hème ou d'un agent réducteur tel que le DTT ou le β mercaptoéthanol.

Compétition entre la formation de NTYR et diTYR

In vitro, de la tyrosine incubée en présence de peroxy-nitrite peut former de la NTYR et des diTYR. La diTYR se forme pour des concentrations en tyrosine plus élevées que celles requises pour la formation de NTYR et augmente en fonction de la concentration (van der Vliet et al., 1995). La formation de dityrosines implique de passer par le radical tyrosyle comme intermédiaire.

Pfeiffer et Mayer (Pfeiffer and Mayer, 1998) ont montré que, dans leur système, le NO^\bullet seul produisait plus de NTYR que le système de co-génération de $\text{O}_2^{\bullet-}/\text{NO}^\bullet$. Cependant, ce point a été remis en question car il semble que l'urate produit par le système de la xanthine oxydase pourrait réagir avec le peroxy-nitrite nouvellement formé. De nouveaux éléments ont été apportés par la suite par ces mêmes auteurs. Ils se sont ensuite intéressés à la formation de di-tyrosines et de NTYR après traitement par différents systèmes de co-génération de $\text{O}_2^{\bullet-}/\text{NO}^\bullet$ (Pfeiffer et al., 2000). Il se trouve que l'efficacité de nitration de la tyrosine par ces systèmes *in vitro* n'a aucune commune mesure avec celle obtenue par le peroxy-nitrite, ce qui est en accord avec les résultats de l'étude précédente (Pfeiffer and Mayer, 1998). Les auteurs expliquent ce phénomène par le fait que la formation de dityrosine prend le pied sur la nitration lorsque la concentration de peroxy-nitrite est faible. La réaction de la tyrosine avec du HO^\bullet (provenant du clivage du peroxy-nitrite), conduit à la formation du radical tyrosyle, qui pourra soit se dimériser pour former une dityrosine, soit réagir avec du NO_2^\bullet pour former une NTYR (figure 4).

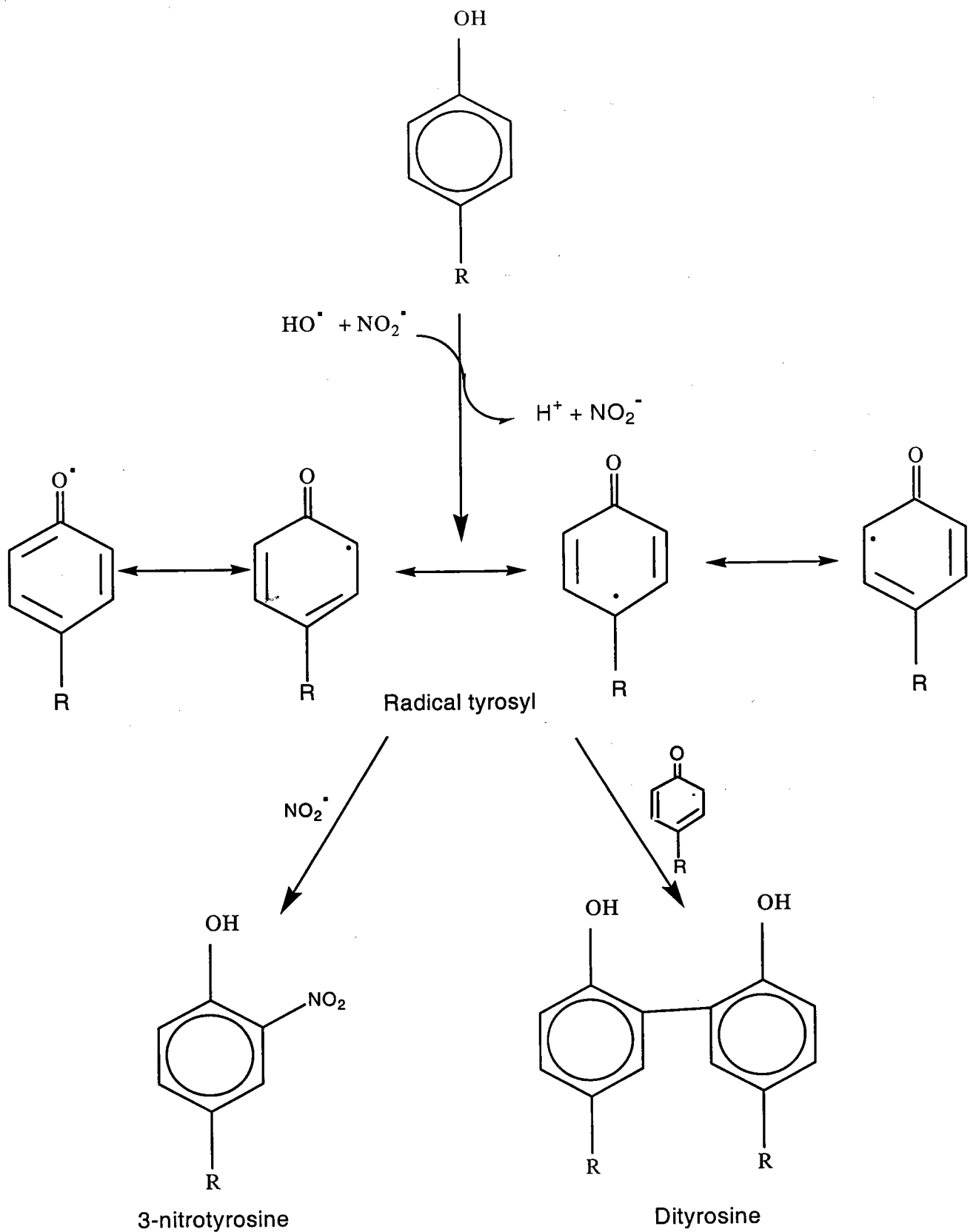
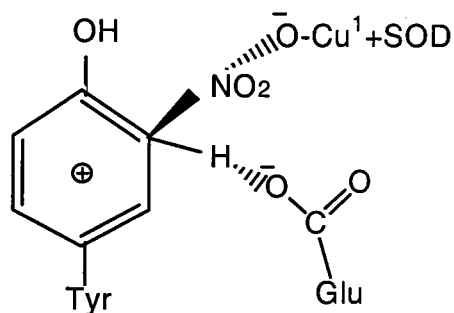


Figure 4 : *Compétition entre la formation de NYTR et de dITYR*
 D'après Pfeiffer et coll, 2000.

Facteurs déterminant la susceptibilité à la nitration des protéines

La nitration des tyrosines est un processus sélectif qui ne touche pas toutes les protéines. La nitration d'un seul résidu tyrosine peut être responsable de la perte de l'activité de la protéine concernée. Le nombre de tyrosines sur une protéine ne semble pas être un facteur déterminant pour la nitration de la protéine. Crow et coll avaient remarqué, chez les neurofilaments, que la présence d'un glutamate proche d'une tyrosine favorisait fortement la nitration de celle-ci (Crow et al., 1997). Crow et coll ont expliqué le rôle catalyseur du glutamate par la stabilisation de l'intermédiaire nitronium-carboxylate formé lorsque le complexe SOD-ONOOH nitre les neurofilaments (voir le schéma ci-dessous).



La charge négative pourrait augmenter la concentration locale de l'agent nitrant vers la tyrosine située à côté. Il y aurait en fait une répulsion entre l'acide aminé négatif et l'agent nitrant, ce qui pousserait celui-ci vers le centre aromatique de la tyrosine voisine. Les charges positives joueraient l'effet inverse. Récemment, Souza et coll ont publié une étude très intéressante visant à déterminer quelles caractéristiques déterminent la nitration des tyrosines sur les protéines (Souza et al., 1999a). Pour cela, les auteurs ont comparé 3 protéines différentes : la ribonucléase A, le lysozyme et la phospholipase A2. Les sites de nitration sur ces différentes protéines ont été comparés après exposition *in vitro* à différents agents nitrants. Il découle de cette étude que 3 facteurs semblent favoriser la nitration des tyrosines :

a) La tyrosine devrait être exposée à la surface de la molécule. Néanmoins, la nitration pourrait être contrecarrée par la présence de forces électrostatiques. Par exemple, la présence d'une arginine (R21) à côté de la

tyrosine (Y20) sur le lysozyme bloque l'accès de la structure aromatique vers la phase solvant.

b) Souza et col ont comparé les séquences de -5 à +5 acides aminés entourant les tyrosines nitrées reportées dans les autres études sur la protéine A du surfactant (qui est un complexe de lipides et de protéines) (Greis et al., 1996), la manganèse superoxyde dismutase (Yamakura et al., 1998), les neurofilaments L (Crow et al., 1997), la glutamine synthase (Berlett et al., 1998), plus les 3 protéines déjà citées ci-dessus (Souza et al., 1999b). Bien qu'il n'y ait aucune séquence particulière commune entre les tyrosines pouvant être nitrées, dans les -5 à +5 acides aminés entourant la tyrosine, il y a généralement un ou plusieurs résidus acides (ce qui rejoint ce qui avait été suggéré par Crow et col) et peu de cystéines, méthionines, et d'acides aminés basiques. Cette dernière observation peut être expliquée par le fait que les cystéines et les méthionines peuvent être nitrées par le peroxy-nitrite en présence de CO₂ (Radi et al., 1991).

c) Généralement, la tyrosine qui est susceptible d'être nitrée se trouve sur une structure en boucle (bien qu'il y ait une exception pour la MnSOD). Il faut néanmoins rajouter que ces caractéristiques restent plutôt des tendances car le nombre de protéines contenant des résidus nitrotyrosine analysées en spectrométrie de masse est encore trop faible pour déterminer des conditions nécessaires et suffisantes pour nitrer préférentiellement tel ou tel résidu tyrosine.

- *Analyse des résidus nitrotyrosine*

Il existe plusieurs approches pour étudier la nitration des protéines. Lorsque la protéine peut être purifiée, elle est exposée *in vitro* à différentes espèces nitrantes et, par hydrolyse protéique, les résidus nitrotyrosine sont ensuite analysés par HPLC couplée à un détecteur électrochimique (ce qui permet une quantification précise de la nitration). Une autre approche est possible : après séparation par HPLC, l'analyse peut être complétée par spectrométrie de masse ou séquençage d'acides aminés, ce qui permet d'identifier précisément quelle(s) tyrosine(s) est nitrée. Lorsque des cellules en culture sont traitées par différents agents nitrants, l'étude des NTYR se fait plutôt par immunoprécipitation et Western blot. Pour des études *in vivo*,

l'analyse peut se pratiquer sur des biopsies par immunoprécipitation ou encore par immunodétection sur lame.

- *Formation de résidus nitrotyrosine in vivo*

Le développement d'anticorps par le groupe de J.J. Beckman a permis de démontrer l'existence de résidus nitrotyrosine *in vivo* dans des tissus animaux et humains (Ye et al., 1996).

A l'origine, la production de ces espèces réactives de l'oxygène et de l'azote est liée à la défense de l'hôte. Les leukocytes polymorphonucléaires ont en effet la capacité de nitrer les bactéries ingérées (Evans et al., 1996). Cette nitration est inhibée par les inhibiteurs de iNOS, suggérant la présence simultanée de NO et O₂⁻. H. Ischiropoulos a publié récemment une revue répertoriant les différentes maladies humaines dans lesquelles des NTYR sont retrouvées (Ischiropoulos, 1998). Dans la plupart des études, les NTYR ont été détectées par immunohistochimie.

La co-localisation de la iNOS et des NTYR, démontrant le lien entre une inflammation chronique et la nitration des protéines *in vivo*, est retrouvée dans la plupart des maladies étudiées. Bon nombre d'études se sont intéressées aux maladies liées à une inflammation du système digestif. On peut citer par exemple : la maladie inflammatoire du côlon (Dijkstra et al., 1998; Singer et al., 1996), la colite ulcéreuse (Kimura et al., 1998) et les gastrites dues à l'infection par *Helicobacter Pylori* (Goto et al., 1999; Sakaguchi et al., 1999). Certaines études ont également montré l'existence de NTYR dans des maladies neurologiques. C'est le cas notamment de la maladie d'Alzheimer (Good et al., 1996; Oren, 1999) et de la maladie de Parkinson (ter Steege et al., 1997). Une co-localisation de la iNOS et des NTYR apparaît également dans les tissus de foie de patients atteints d'une hépatite virale chronique et l'abondance relative des NTYR est associée positivement avec la sévérité de la maladie (Garcia-Monzon et al., 2000).

La nitration des tyrosines est une modification post-traductionnelle des protéines qui peut avoir des implications au niveau biologique.

- *Conséquences de la nitration des protéines sur leur fonctionnalité*

La détection de NTYR sur les protéines était au départ utilisée simplement comme marqueur de production endogène de peroxy-nitrite et d'espèces nitrantes.

Ces dernières années, le nombre d'étude concernant les NTYR a fortement augmenté et de nombreuses équipes ont démontré que la nitration des NTYR était non seulement un marqueur de l'inflammation des tissus mais pouvait également exercer un effet sur la fonctionnalité des protéines.

Le premier type de perte de fonctionnalité d'une protéine par nitration des tyrosines auquel on peut penser est l'inhibition de la phosphorylation de ces mêmes tyrosines. Néanmoins, le nombre d'études démontrant ce phénomène reste encore faible. Gow et coll ont montré que dans les cellules endothéliales exposées à du peroxy-nitrite, le taux de protéines phosphorylées diminue alors que celui des protéines contenant des NTYR augmente fortement. De plus, la capacité des tyrosine kinases à phosphoryler un peptide synthétique exposé à du peroxy-nitrite est inhibée de 50%. Ces résultats suggèrent que la formation de NTYR pourrait interférer avec la phosphorylation (Gow et al., 1996). Le peroxy-nitrite nitre, *in vitro*, à la fois la tyrosine 15 et la tyrosine 19 d'un peptide synthétique contenant les sites de phosphorylation de la p34^{cdc2} kinase (Kong et al., 1996). La nitration de la tyrosine 15 inhibe complètement sa phosphorylation et la nitration de la tyrosine 19 exerce un effet inhibiteur sur la phosphorylation de sa tyrosine voisine (la tyrosine 15) (Kong et al., 1996). Ceci suggère que la nitration d'une tyrosine, en empêchant sa phosphorylation, pourrait inhiber, en partie, la transduction du signal.

La neurodégénérescence qui conduit à l'apparition de la maladie de Parkinson illustre parfaitement cette idée. Il a été démontré que la tyrosine hydroxylase (qui est impliquée dans le métabolisme de la dopamine) contenait des groupements nitrotyrosine chez des cellules exposées à du peroxy-nitrite et que celle-ci avait perdu son activité enzymatique (Ara et al., 1998a). La tyrosine hydroxylase est la protéine majoritairement nitrée dans le

cerveau de souris traité par du peroxy-nitrite. Sur la base de ces résultats, les auteurs ont proposé que l'inactivation de la tyrosine hydroxylase par le peroxy-nitrite pourrait être responsable de l'inhibition du métabolisme de la dopamine dans la maladie de Parkinson. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), qui est communément utilisé pour induire la maladie de Parkinson, inactive la tyrosine hydroxylase par nitration (Ara et al., 1998b). L'induction de la iNOS par le MPTP pourrait contribuer à la dégénérescence des cellules neuronales qui conduit à l'apparition de la maladie (Dehmer et al., 2000; Liberatore et al., 1999). Il semble, en effet, que le NO produit par les cellules gliales soit responsable, du moins en partie, de la neurodégénérescence chez les souris traitées au MPTP (Hirsch and Hunot, 2000). L'ensemble de ces résultats démontre donc que la production de NO dans les neurones est responsable de l'inactivation par nitration de la tyrosine hydroxylase ce qui contribuerait à l'apparition de la maladie de Parkinson, démontrant ainsi l'implication du stress oxydatif dans cette maladie.

Il a été démontré également qu'un traitement par du peroxy-nitrite en présence de SOD sur des neurofilaments L (NF-L) induisait la formation de NTYR sur ceux-ci et qu'ils avaient perdu leur capacité à s'assembler *in vitro* (Crow et al., 1997). Ceci suggère que la nitration pourrait interférer avec la construction d'une structure protéique particulière.

Les modifications induites par le peroxy-nitrite sur les différents types de SOD, qui sont des enzymes nécessaires à la détoxification de l'anion superoxyde, ont largement été étudiées. Le peroxy-nitrite réagit avec la Cu,Zn SOD de bovin, et les Mn et Fe SOD (de E.Coli) pour former des résidus NTYR sur celles-ci *in vitro* (Ischiropoulos et al., 1992). Néanmoins, seules les Mn et Fe SOD de Coli sont inactivées par la formation de NTYR (Ischiropoulos et al., 1992). Cette inactivation suite à une exposition au peroxy-nitrite a été confirmée chez la Mn SOD humaine (Good et al., 1996) et cette inactivation serait due à la nitration exclusive de la tyrosine 34 qui se trouve dans le site catalytique de l'enzyme (Yamakura et al., 1998).

La ribonucléotide réductase (RR), qui est essentielle pour la synthèse de l'ADN, possède un radical tyrosyle dans son site catalytique. Lepoivre et coll ont montré que le NO inhibe l'activité de la ribonucléotide réductase (Lepoivre et al., 1992; Lepoivre et al., 1994). Cette inhibition est corrélée avec la perte du radical tyrosyle. Le piégeage du radical tyrosyle par le NO[•] est réversible alors que celui induit par le peroxy-nitrite est irréversible, tout comme l'inhibition de l'activité catalytique qui en résulte (Guittet et al., 1998). Cette modification irréversible induite par le peroxy-nitrite serait la formation NTYR. Ceci a été confirmé en utilisant la protéine R2 de la RR de *E.Coli* sur laquelle il a été montré que le radical tyrosyle (la Tyr 122), mais également les Tyr 62 et 289 sont nitrés après exposition *in vitro* à du peroxy-nitrite (Guittet et al., 2000).

Il apparaît donc que l'inhibition de l'activité enzymatique de la RR ne soit pas due uniquement à la perte du radical tyrosyle et que la nitration des Tyr 62 et 289 soit également impliquée. La Tyr 122, que l'on attendrait plus facilement nitrée que les autres de part sa nature radicalaire, ne l'est finalement pas plus que les Tyr 62 et 289. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les Tyr 62 et 289 sont situées à la surface de la protéine alors que la Tyr 122 se trouve au cœur hydrophobe d'une hélice α (cf le paragraphe "réaction de nitration") et que seule la forme protonée du peroxy-nitrite pourrait nitrer un radical tyrosyle (car les charges négatives n'auraient pas accès au centre métal/radical de la protéine R2) (Guittet et al., 2000). Cette hypothèse reste néanmoins à être vérifiée. L'inhibition de la RR médierait l'effet cytostatique du NO et de ses dérivés dans les tumeurs.

D'autres enzymes sont également inhibés par la nitration sur leurs résidus tyrosine, c'est le cas notamment de la prostacycline synthase (Zou et al., 1997a), du cytochrome P450 2B1 (Roberts et al., 1998), de la phosphatidylinositol 3-Kinase (Hellberg et al., 1998), de COX-1 et de COX-2 (Boulos et al., 2000). Cette liste de protéines inhibées par la formation de nitrotyrosine n'est bien évidemment pas exhaustive; ne sont mentionnées ici que les protéines dont l'inhibition paraît importante d'un point de vue biologique.

Toutes ces études suggèrent que la nitration de tyrosines peut exercer des effets biologiques importants tant au niveau d'une perte d'activité enzymatique que pour la transduction du signal (inhibition de la phosphorylation) et favoriser l'apparition de certaines pathologies. Il apparaît donc maintenant que la présence de NTYR sur certains tissus ne doit plus être considérée comme un simple marqueur du stress oxydatif mais comme un facteur pouvant favoriser le développement de certaines maladies liées à une inflammation chronique.

1.3. Le NO dans la cancérogenèse

Le processus de cancérogenèse consiste en plusieurs étapes successives que l'on peut schématiquement séparer en phase d'initiation, de promotion et enfin de progression. La pathogenèse du cancer colorectal héréditaire a été bien décrite par Kinzler et Vogelstein et elle est résumée dans la figure 5 (Kinzler and Vogelstein, 1996).

L'initiation est une étape irréversible qui correspond à un changement génétique rendant la cellule moins sensible à certaines régulations. Cette étape favorisera l'expansion clonale de la cellule initiée lors des étapes ultérieures. Dans le modèle du cancer colorectal, la phase d'initiation se produit par une mutation sur le gène APC qui est impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales. Les patients porteurs d'une mutation sur ce gène présentent donc un risque plus élevé que la population générale de développer un cancer colorectal. L'altération de nombreux gènes (notamment des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs) peut promouvoir l'initiation d'une cellule.

La phase de promotion est produite par la stimulation de la division cellulaire de la cellule initiée par une expansion clonale sélective. Cette étape irréversible correspond à la formation d'un carcinome. La promotion dépend d'un défaut dans la différenciation, le contrôle de la croissance ou la résistance à la cytotoxicité. Ainsi, les agents promoteurs favorisent l'expansion de cellules porteuses de lésions génomiques, puis leur

aggravation. Une altération sur le gène de K-Ras, de p53 ou une déficience de l'activité d'enzymes de réparation de l'ADN contribuent à la survenue d'un carcinome.

La phase de progression permet une prolifération plus rapide des cellules tumorales et leur procure la capacité de métastaser. Les cellules ont alors acquis un développement autonome.

Néanmoins, ce processus en trois étapes est basé sur des modèles expérimentaux animaux et il est difficile de séparer complètement ces phases lorsqu'il s'agit de cancérogenèse humaine. On parle plutôt de lésions pré-malignes, de tumeurs primaires et de métastases. L'accumulation d'altérations sur des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs permettent de lever les barrières physiologiques et ainsi promouvoir le développement d'un cancer. Par exemple, la mutation du gène TP53 peut avoir des conséquences à différents stades du processus. La cancérogenèse pourrait d'ailleurs permettre en elle même la sélection des cellules ayant acquis une mutation sur le gène TP53.

Le NO joue un rôle complexe dans la cancérogenèse car c'est un composé à facettes multiples. En effet, certaines publications ont montré l'action anti-tumorale du NO alors que d'autres ont mis en exergue l'implication du NO dans la promotion tumorale. En fait, les espèces réactives de l'oxygène exercent à la fois un effet promoteur et un effet inhibiteur qui dépend du stade du processus de cancérogenèse.

Selon une vue personnelle et schématique, les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote influenceraient positivement l'apparition d'un cancer en agissant au niveau des phases d'initiation et de promotion alors qu'elles auraient un effet plutôt bénéfique lorsque les tumeurs sont à un stade relativement avancé. Ainsi, le NO est à la fois "Yin et Yang" vis à vis du processus de la cancérogenèse.

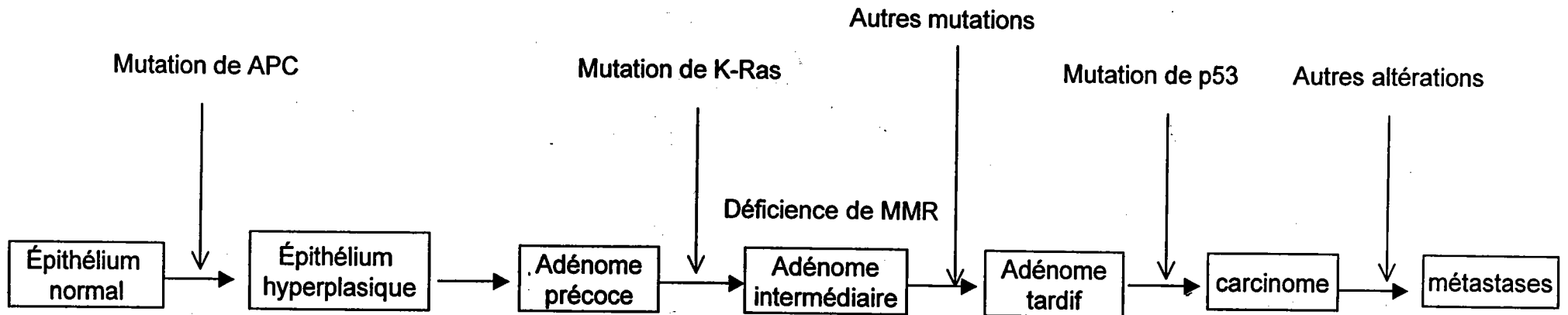


Figure 5: Modèle de progression tumorale du cancer colorectal proposé par Kinzler et Vogelstein, 1996.

La mutation du gène APC initie le processus de néoplasie alors que la progression résulte de mutations sur d'autres gènes. Une déficience en MMR (MisMatch Repair: réparation d'un mauvais appariement d'une seule paire de base lors de la réplication) accélère le processus de cancérogénèse. L'oncogène K-Ras est activé par un seul événement génétique.

1.3.1 Rôle pro-cancérogène

Le rôle promoteur du NO et de ses métabolites est supporté par des études épidémiologiques qui ont montré une association positive entre certains sites d'infection et d'inflammation chronique et l'apparition d'un cancer.

Infection/inflammation	Organes cibles
Virus de l'hépatite de types B et C, cirrhose	Foie
<i>Helicobacter. pylori</i> , gastrite atrophique chronique	Estomac
<i>Schistosoma Japonicum</i> , inflammation du colon	Côlon, rectum
Virus du papillome humain	Col de l'utérus
Virus d' <i>Epstein Barr</i> , malaria	Lymphome de Burkitt
<i>Schistosoma haematobium</i> , cystite	Vessie

Certains cancers semblent directement liés à une inflammation : 81% des cancers de l'estomac seraient attribuables à *H.Pilori* (Forman, 1995) et 89% du col de l'utérus seraient la conséquence d'une infection par le virus du papillome humain. Ces relations entre cancers et infection/inflammation s'expliquent de deux manières différentes. Certains agents infectieux comme le virus d'*Epstein Barr* sont impliqués dans la cancérogenèse de part leurs propriétés oncogéniques alors que les bactéries, les parasites et d'autres virus le sont à travers l'inflammation chronique qu'ils provoquent (Pisani et al., 1997). Il apparaît donc que le NO, produit lors de la réaction inflammatoire, soit un acteur très important dans la cancérogenèse.

1.3.1.1 Rôle génotoxique

Lors d'une inflammation chronique, les tissus proches sont exposés à de fortes concentrations d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Comme il a été exposé dans le paragraphe 1.2.2, ces composés exercent de nombreux effets sur les composants cellulaires. La première action du NO et

de ses dérivés que l'on peut noter est génotoxique, principalement par déamination, formation de nitrosamines, induction de cassures simple brin de l'ADN. L'effet génotoxique du NO serait renforcé par l'inhibition de certains enzymes de réparation de l'ADN telle que la O⁶-methylguanine methyl transférase (Felley-Bosco, 1998) et de la ligase de l'ADN (Graziewicz et al., 1996).

1.3.1.2 Rôle dans la progression et l'invasion tumorale

Les cytokines et l'hypoxie générées par les cellules d'une masse tumorale importante stimulent l'expression de NOS dans ces cellules (Moochhala and Rajnakova, 1999). Certaines tumeurs humaines expriment à la fois la iNOS et les cNOS, c'est le cas notamment du cancer du sein, de l'estomac, de l'utérus, de l'ovaire et du système nerveux central (Thomsen and Miles, 1998; Wink et al., 1998). Des études ont mis en évidence que les biopsies de certaines tumeurs humaines qui expriment fortement la iNOS sont plus agressives que celles qui n'expriment pas la iNOS, c'est le cas notamment des tumeurs du système nerveux central (Cobbs et al., 1995) et du cancer du sein (Thomsen and Miles, 1998). Ambs et coll ont montré qu'une production excessive de NO par la iNOS contribue à la progression du cancer du côlon du stade d'adénome au stade de carcinome *in situ* (Ambs et al., 1998a).

Néanmoins, d'autres études ont suggéré que l'expression des NOS était corrélée avec la réduction des métastases, notamment dans le cas du cancer du sein (Tschugguel et al., 1999) et dans certains modèles animaux (Juang et al., 1998; Xie et al., 1995). Pour l'instant, les études sont plutôt contradictoires et leur nombre n'est pas encore assez élevé pour pouvoir déterminer avec précision la relation qu'il existe entre l'expression de NOS et un quelconque pronostic quant à l'évolution de la maladie. Ceci pourrait dépendre du type de NOS exprimée et de l'organe touché.

La production de NO stimule l'angiogénèse et favorise la croissance tumorale. L'angiogénèse est une étape critique pour la croissance et l'invasion tumorale ainsi que pour l'apparition de métastases (Fukumura and Jain, 1998). Le NO stimule l'angiogénèse de deux manières différentes: le NO

induit un effet vasodilatateur et il augmente la perméabilité vasculaire. Le rôle vasodilatateur du NO a été mis en évidence lorsque Ignarro et coll ont identifié que l'EDRF (Endothelial-Derived Growth Factor) était en fait le NO (Ignarro et al., 1987; Ignarro et al., 1988). Le NO exerce cet effet via la production de cGMP par la guanylate cyclase.

L'hyperperméabilité de l'endothélium vasculaire stimulé par le VEGF (vascular Endothelial growth Factor), qui est un facteur de croissance des vaisseaux sanguins, se produit via la stimulation de la NOS dans les cellules endothéliales. L'augmentation de la perméabilité des vaisseaux via le NO est largement documenté (Fukumura et al., 1997; Hinder et al., 1997; Murohara et al., 1998; Wu et al., 1996). Il a été montré qu'un traitement par un inhibiteur de la NOS inhibe l'angiogénèse stimulée par le VEGF (Ziche et al., 1997). Il a été proposé que des inhibiteurs spécifiques de la iNOS pourraient représenter une thérapie intéressante pour limiter l'angiogénèse et l'invasion tumorale.

Cependant, comme le rôle du NO n'est pas encore compris dans sa globalité, il semble imprudent de préconiser ce type de traitement pour l'instant.

Le NO stimule aussi l'expression de la prostaglandine H2 synthase (ou cyclooxygénase 2 : Cox 2). Certaines prostaglandines augmentent la perméabilité vasculaire et stimulent la production de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales.

1.3.1.3 Effet immunosuppresseur

Les cellules Natural Killer (NK) et les lymphocytes T cytotoxiques sont les cellules les plus importantes pour défendre l'organisme contre les cellules tumorales. Néanmoins, ces dernières produisent des cytokines immunosuppressives qui diminuent le système de défense immunitaire (Chouaib et al., 1997). Lejeune et coll ont montré en 1994 le rôle immunosuppresseur du NO lors de la croissance des tumeurs de côlon. La production de NO par les tumeurs augmente lors de la croissance tumorale et inhibe la prolifération des lymphocytes T (Lejeune et al., 1994). Des quantités non toxiques d'un donneur de NO aussi bien que le NO produit par les macrophages activés inhibe la prolifération des lymphocytes Th1 et Th2 sans pour autant inhiber leur production de cytokines. (Van der Veen et al., 1999;

Van der Veen et al., 2000). Le NO inhibe la prolifération des lymphocytes T (Fukumura and Jain, 1998; Wink et al., 1998). De plus, le NO diminue l'infiltration des leucocytes dans les tumeurs et limite leur adhésion avec l'endothélium (Fukumura and Jain, 1998; Wink et al., 1998).

Les cellules NK (Natural Killer) représentent un mécanisme important dans la défense immunitaire précoce contre les tumeurs (Roberston et al., 1990). Ils exercent une action cytotoxique par exocytose de granules contenant de la perforine et en exprimant des granzymes (serine estérases).

L'IL 12 agit sur les cellules T et les NK comme co-stimulateur de la prolifération cellulaire. Chouaib et coll ont montré que l'IL 12 et le TNF α exercent une action synergique pour induire l'expression de la iNOS (Salvucci et al., 1998).

L'ajout de TNF α potentialise l'effet cytotoxique de l'IL12. Il apparaît cependant que cet effet cytotoxique ne soit pas produit par le NO. Au contraire, l'addition de NO exogène inhibe l'activité cytotoxique des NK et l'addition d'un inhibiteur de la iNOS augmente l'activité cytotoxique des NK. Ainsi, le NO produit de façon endogène par la iNOS après stimulation par ces cytokines contribue à diminuer le potentiel lytique des cellules NK.

L'effet inhibiteur du NO sur les cellules NK, sur la prolifération des lymphocytes T et sur les leucocytes montre clairement que le NO exerce un rôle immunosuppresseur, ce qui empêche l'organisme de lutter de façon immunologique contre les cellules tumorales.

1.3.2 Effet tumoricide

Le NO pourrait exercer un rôle bénéfique lorsque les cellules sont déjà cancéreuses. En effet, les macrophages, via leur production d'espèces réactives de l'oxygène, exercent un effet cytotoxique sur les cellules tumorales (Albina and Reichner, 1998). De fortes concentrations de NO sont cytotoxiques et permettent d'éliminer des cellules tumorales. Le NO produit par les macrophages bloque la respiration mitochondriale des cellules tumorales en inhibant l'aconitase et la cytochrome c oxydase. Le NO et ses

métabolites exercent également un effet cytostatique en culture cellulaire (Stuehr and Nathan, 1989). Lepoivre et coll ont montré que l'effet cytostatique du NO est directement lié à son effet inhibiteur sur la ribonucléotide réductase, enzyme essentiel pour la synthèse d'ADN (Lepoivre et al., 1992; Lepoivre et al., 1994).

Le rôle du NO dans la cancérogenèse pourrait se résumer de la manière suivante : les tissus exposés continuellement à de fortes concentrations de NO, comme c'est le cas lors d'une inflammation chronique, accumulent des mutations; le NO joue ici un effet initiateur. Le NO favorise également l'angiogénèse et donc le développement tumoral. En revanche, lorsque les tumeurs sont à un stade déjà avancé, les macrophages produisent du NO en fortes quantités et ralentirait la progression tumorale par action cytotoxique. Les différents effets du NO dans la cancérogenèse sont rassemblés dans la figure 6.

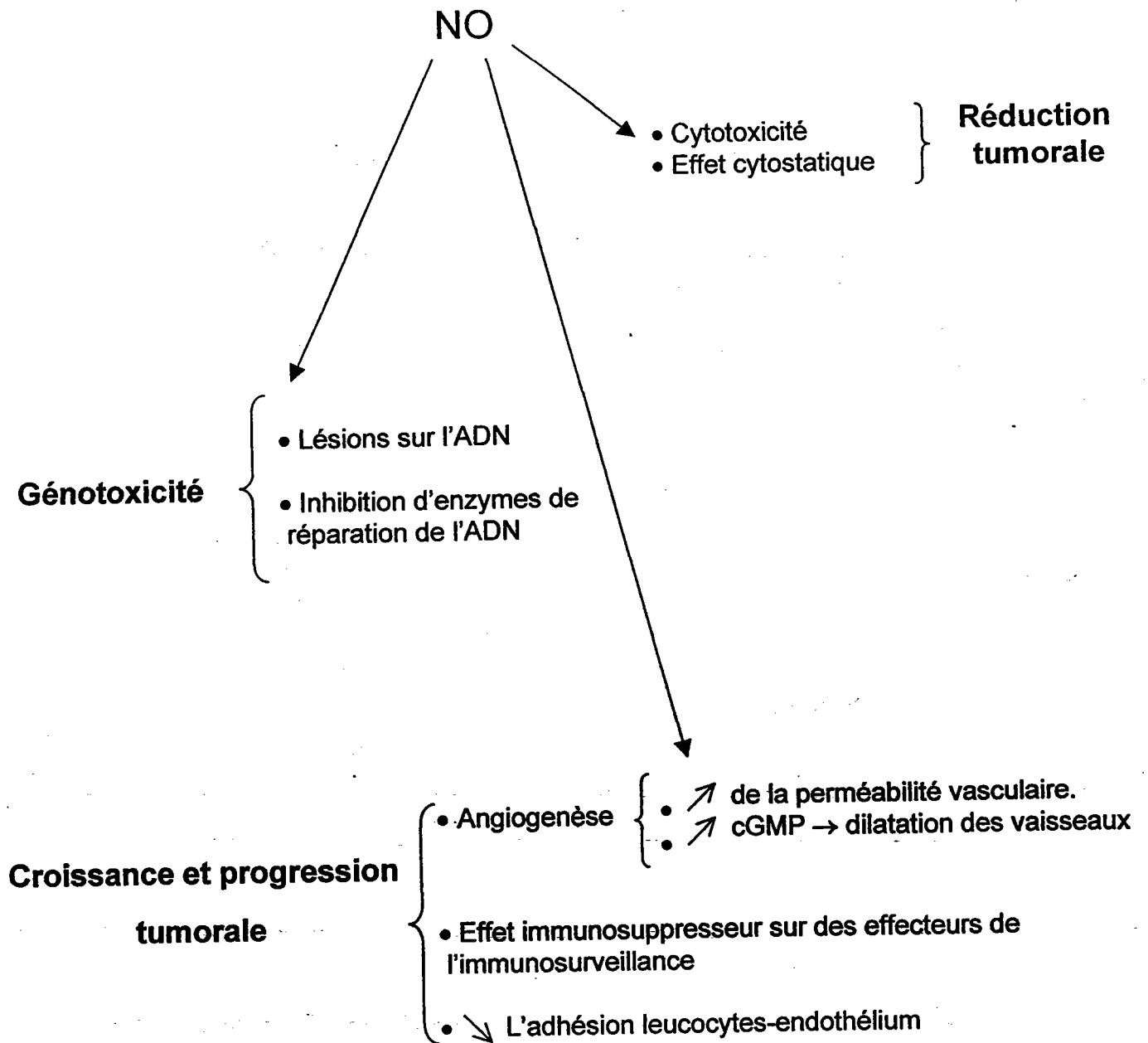


Figure 6 :Le NO: une substance cancérogène et anti-tumorale.

Pour les explications, se référer au texte.

2^{ème} PARTIE :

LA PROTEINE ONCO-SUPPRESSIVE P53

Dans un premier temps, nous présenterons brièvement la protéine p53: sa découverte, son rôle dans la cancérogenèse, ses fonctions (succinctement) et enfin son gène, sa phylogénie. Nous exposerons sa structure et son organisation complexe dans un deuxième temps. La troisième partie traitera de sa régulation et la quatrième développera ses fonctions biochimiques et biologiques.

2.1 Présentation générale de p53

2.1.1 P53 et cancérogenèse

La protéine p53 a été découverte il y a 20 ans et fut initialement identifiée comme un oncogène. La communauté scientifique s'est ensuite aperçue que les propriétés oncogéniques, que l'on avait attribuées à tort à p53, provenaient des formes mutées de p53. Il aura fallu 10 ans de recherche après sa découverte pour que p53 soit classée dans la catégorie des protéines onco-suppressives et pour qu'elle reçoive toutes ses lettres de noblesse (Lane, 1992; Oren, 1992). Elle a même été dénommée sympathiquement «gardienne du génome», ce qui révèle les espoirs qui ont été bâtis sur cette fameuse p53 (Lane, 1992).

La perte de fonction de p53 est considérée comme un élément clé dans le développement d'un cancer. En effet, plus de 50% des tumeurs contiennent une p53 mutée. Le nombre de mutations identifiées croît de façon exponentielle et atteint à ce jour le nombre impressionnant de 10 000 (Hainaut and Hollstein, 2000). Des sites Internet de bases de données recensent toutes les mutations de p53 associées avec certains types de cancers, c'est le cas notamment de la base de donnée maintenue par l'IARC (International Agency for Cancer Research) (www.iarc.fr/p53). P53 est préférentiellement mutée sur des «points chauds» («hot spots»). En fait, le processus de cancérogenèse sélectionne les cellules contenant une p53

inactive et favorise leur expansion clonale. La majorité des mutations du gène TP53 sont des mutations ponctuelles (substitution d'une seule paire de bases) et somatiques.

Les familles porteuses d'un allèle mutant pour p53 sont sujettes au syndrome de Li-Fraumeni qui est caractérisé par l'apparition précoce de cancers variés. Le développement d'un modèle de souris homozygotes pour l'allèle nulle de p53 (p53^{-/-}) a permis d'étudier précisément les effets de la perte de p53 *in vivo*. Ces souris se développent normalement mais sont sujettes à un développement spontané de tumeurs dès l'âge de 6 mois (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994). Ces souris portent des instabilités génomiques nombreuses (aneuploïdie, centrosomes multiples, amplification de gènes), ce qui met en exergue le rôle central de p53 dans le maintien de l'intégrité génomique (Fukasawa et al., 1997).

Au cours de l'évolution, la pression de sélection a maintenu le gène TP53. En effet, ce gène est commun à tous les vertébrés et très récemment un homologue de TP53 a même été identifié chez la drosophile (Brodsky et al., 2000; Ollmann et al., 2000). P53 possède 5 régions hautement conservées entre les espèces (Soussi and May, 1996).

P53 est le senseur de multiples formes de stress. Les stress génotoxiques (irradiation gamma, irradiation aux rayons UV, différents composés génotoxiques) mais également certains stress non génotoxiques (hypoxie, déplétion en ribonucléotides, hyperthermie, épuisement des facteurs de croissance...) induisent rapidement l'accumulation de p53 sous une forme active. Le niveau de p53 est relativement bas dans des cellules non stressées et la protéine est présente sous une forme inactive, dite latente. Après un stress, la protéine est stabilisée et activée. Le rôle schématique de p53 est d'induire un arrêt du cycle cellulaire ou de conduire la cellule vers l'apoptose après des lésions sur l'ADN ou à la suite de certains stress non génotoxiques afin de réparer ou d'éliminer les cellules «anormales».

2.1.2 Le gène TP53, membre d'une famille multigénique

Le gène TP53, long d'environ 20kb, est situé sur le bras court du chromosome 17 dans la région 17p13. Il code pour une protéine de 393 acides aminés chez l'homme et il est exprimé de façon constitutive dans presque tous les tissus. Il a été découvert récemment que TP53 n'est pas un gène isolé, mais un membre d'une famille multigénique (Kaelin, Jr., 1999). Le gène TP73 fut le premier découvert (Jost et al., 1997; Kaghad et al., 1997) suivi du gène TP63, initialement dénommé p40, p51 ou p73L (Osada et al., 1998; Schmale and Bamberger, 1997; Senoo et al., 1998). Différentes revues ont synthétisé les données récemment acquises sur p73 et p63 (Ikawa et al., 1999; Kaelin, Jr., 1999; Levrero et al., 1999; Lohrum and Vousden, 1999). Les gènes qui codent pour p73 et p63 sont situés respectivement en position 1p36 et 3p27-28. Ces deux gènes sont sujets à des épissages alternatifs et codent ainsi pour différents variants : p73 α/β et p63 $\alpha/\beta/\gamma$ et ΔN p63 $\alpha/\beta/\gamma$ (variants dépourvus du domaine N terminal).

Les régions centrales des protéines p63 et p73 partagent respectivement une homologie de 60% et 63% avec celle de p53. Il a été démontré que p73 et p63 peuvent lier la séquence consensus d'ADN de p53, induire la transcription de certains de ses gènes cibles et stimuler l'apoptose lorsqu'ils sont sur-exprimés (Jost et al., 1997; Kaghad et al., 1997; Sheikh and Fornace, Jr., 2000). Plusieurs équipes indépendantes ont démontré que p73 est régulée par c-Abl, une tyrosine kinase (voir plus loin), lors de la réponse apoptotique induite par des radiations ionisantes ou après exposition à des agents alkylants (Agami et al., 1999; Gong et al., 1999; Yuan et al., 1999). Ces données suggèrent que p73, comme p53, peut être stimulée après certains stress génotoxiques. Ainsi, les membres de la famille de p53 présentent quelques homologies avec leur cousine. P73 interagit avec certaines protéines de la même manière que p53 (c-Abl, p300, Mdm2), mais ces interactions n'ont pas forcément les mêmes conséquences qu'il s'agisse de p53 ou de p73. Par exemple, Mdm-2 interagit avec p53 et p73, mais cette liaison conduit à la dégradation de p53 exclusivement (Balint et al., 1999;

Zeng et al., 1999). Il apparaît également que p73 et p63 induisent l'apoptose via des mécanismes complètement distincts de ceux de p53 (Sheikh and Fornace, Jr., 2000).

Des souris nulles pour le gène TP63 connaissent de graves troubles du développement, ce qui n'est pas le cas des souris nulles pour p53. Ceci montre que ces protéines, bien que relativement proches, n'exercent pas les mêmes effets cellulaires. Les souris déficientes pour TP63 meurent à un stade précoce du développement car l'épithélium ne peut se différencier correctement et n'est donc pas structuré (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). Les publications récentes proposent que p63 et p73 jouent un rôle dans le processus du développement et que seule p53 possède une fonction de suppresseur de tumeur *in vivo* (Kaelin, Jr., 1999; White and Prives, 1999). Cette hypothèse s'appuie en grande partie sur le fait que les gènes TP73 et TP63 ne sont que très rarement mutés dans les cancers humains, contrairement au gène TP53, et que leur expression est limitée à certains tissus.

Bien que les homologies de structure entre p63, p73 et p53 soient connues, les relations structure/fonction restent à être déterminées. La caractérisation des mécanismes d'activation, de dégradation et de régulation de p63 et de p73 permettrait de mieux comprendre leurs rôles biologiques *in vivo*.

2.2 Structure et organisation fonctionnelle de p53

Pour revue, voir (Ko and Prives, 1996; May and May, 1999). La protéine p53 est constituée de 393 acides aminés qui forment trois régions distinctes : la région N terminale, la région centrale et la région C terminale. La figure 7 représente p53 dans sa totalité.

2.2.1 La région N terminale (résidus 1-102)

2.2.1.1 Structure

La figure 8 détaille la partie N terminale et ses divers sites de phosphorylation sont rassemblés dans le tableau de la même figure.

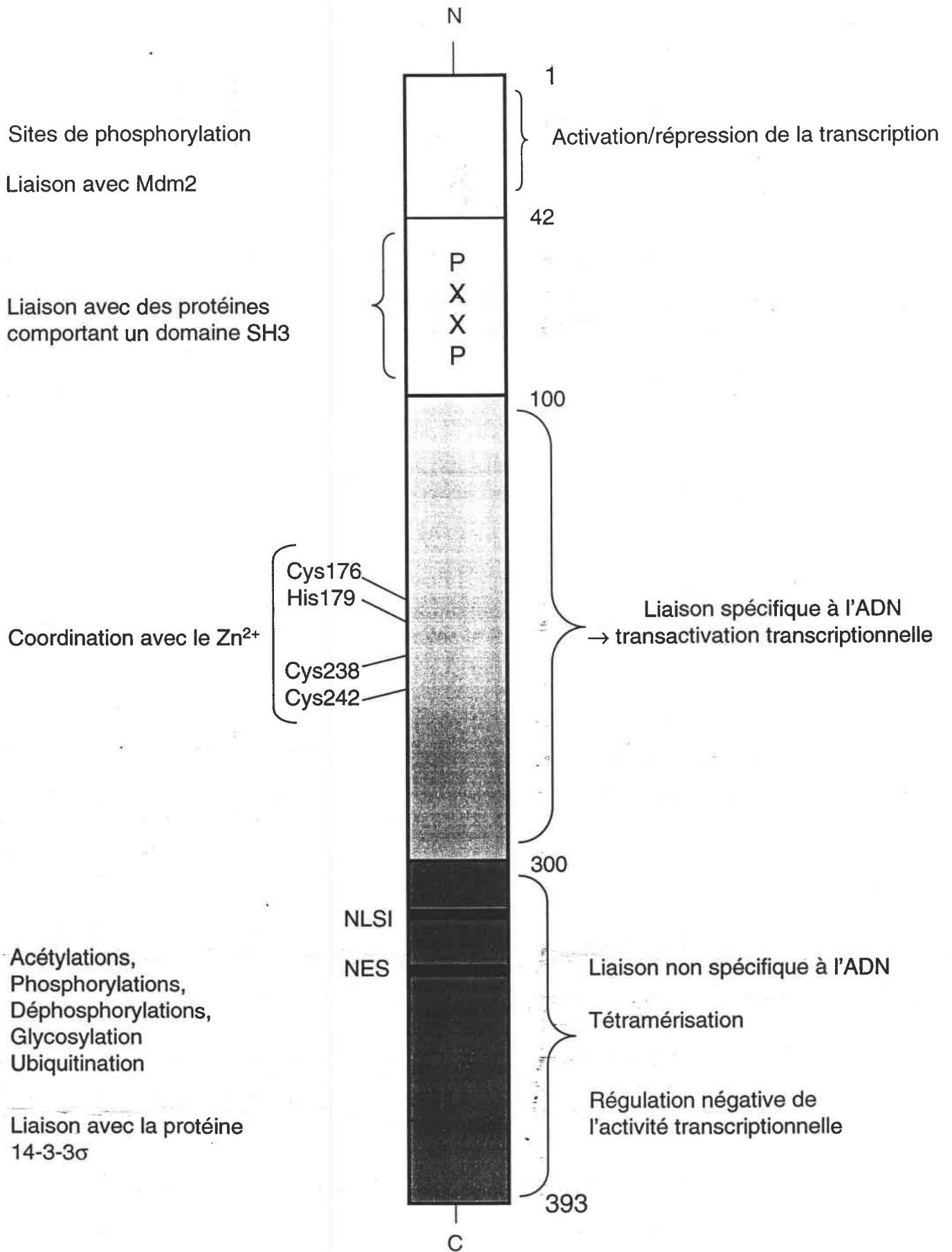
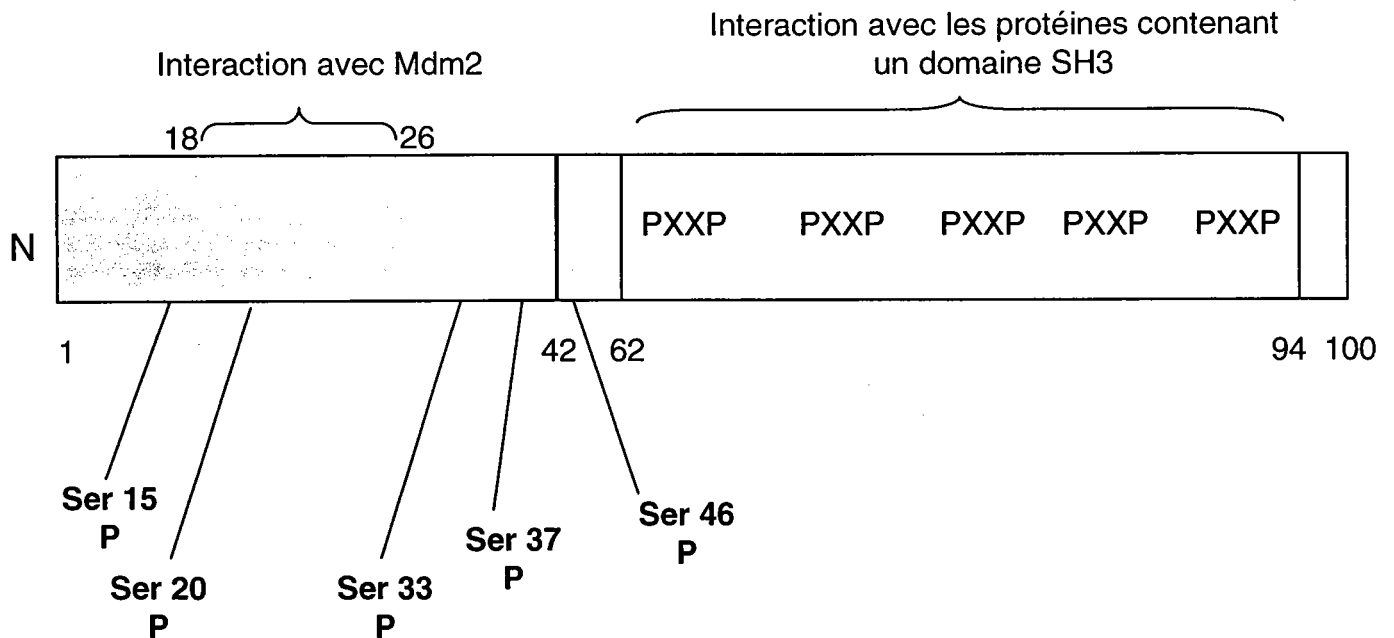


Figure 7: Structure de la p53 humaine.

Interaction avec les composants de la
machinerie transcriptionnelle (TBP, TAFIIID)

Répression de l'activité transcriptionnelle



Résidus	Types de modifications	Kinases	Stress inducteur
Ser 6	Phosphorylation	caséine kinase I (CKI)	IR et UV
Ser 9	Phosphorylation	caséine kinase I (CKI)	in vitro
Ser 15	Phosphorylation	ATM, DNA-PK , CAK, ATR	IR et UV
Thr 18	Phosphorylation	CKI	IR
Ser 20	Phosphorylation	Chk1 et 2	IR et UV
Ser 33	Phosphorylation	CAK	IR et UV
Ser 37	Phosphorylation	DNA-PK, ATR, kinase p38	UV
Ser 46	Phosphorylation	kinase p38	UV

Figure 8: Structure détaillée de la partie N terminale de la p53 humaine.

Le tableau rapporte toutes les phosphorylations qui existent, *in vivo*, mais également celles qui ont été identifiées qu'*in vitro* après incubation avec une kinase particulière. D'autres sites de phosphorylation ont été identifiés chez la souris (Meek, 98): les Ser 4, 6,9 par la CKI, les Ser 7, 15 et 18 par la DNA-PK, la Ser 34 par JNK1 et 2, les Thr 73 et 83 par les MAPK.

Cette région se sépare en 2 parties : le domaine acide (résidus 1 à 42) et le domaine polyproline (résidus 62-94).

Le domaine acide est typique des domaines de transactivation des facteurs de transcription. Unger et coll ont rapporté que les résidus 7 à 42 représentent le domaine minimal d'activation (Unger et al., 1992). Ce sous domaine est le siège d'interactions protéine-protéine pour la p53. Il permet à p53 de recruter la machinerie transcriptionnelle qui est composée de la sous-unité TBP (TATA Box Binding Protein) et des protéines associées au TAFIIID (Transcription Factor IID), c'est pourquoi on l'appelle également domaine de transactivation (Lu and Levine, 1995; Thut et al., 1995).

La protéine Mdm-2, qui est impliquée dans la dégradation de p53, interagit avec l'hélice α de p53 formée par les résidus 18 à 26 (Kussie et al., 1996). Les résidus Phe 19, Trp 23 et Leu 26 de p53 sont les plus impliqués dans cette interaction car ils s'insèrent profondément dans une crevasse de Mdm2. L'interaction de p53 avec les composants de la machinerie transcriptionnelle est impossible lorsque Mdm2 est liée à p53, ce qui conduit à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53 très rapidement. Au delà de l'inhibition de p53 par encombrement stérique, Mdm2 stimule la dégradation de p53 en médiant son ubiquitination (la dégradation sera traitée plus loin).

Le domaine polyproline (résidus 62 à 94) doit son nom à une séquence de 5 répétitions du motif PXXP (où X représente un résidu quelconque)(Walker and Levine, 1996). Ce domaine des polyprolines constituerait un site de fixation pour des protéines comprenant des domaines SH3 qui sont impliquées dans la transduction du signal (Xie et al., 1994; Yu et al., 1994). Ainsi, la protéine Grb-2 qui possède 2 domaines SH-3, se lie à p53 (Venot et al., 1998). L'utilisation de mutants ne contenant pas de PXXP a montré que ce domaine est requis pour l'arrêt de croissance et l'activité de répression transcriptionnelle de p53 (Venot et al., 1998; Walker and Levine, 1996). Cependant, la délétion de ces motifs n'affecte pas son activité transcriptionnelle, sauf celle pour le gène PIG-3. Cette particularité vis à vis de PIG-3 n'est cependant pas encore expliquée.

2.2.1.2 Modifications post-traductionnelles

La partie N terminale est le sujet de diverses phosphorylations qui sont résumées dans la figure 8. Le tableau distingue les résidus qui peuvent être phosphorylés *in vitro* après incubation avec une kinase particulière de celles qui sont phosphorylées après un stress cellulaire. Pour ces dernières, les kinases impliquées ont été déterminées *in vitro*, pour la plupart, mais il n'est pas certain que ce soit les mêmes qui phosphorylent ces résidus *in vivo*.

La Ser 9 peut être phosphorylée, *in vitro*, par la caséine kinase I (CKI) (Lees-Miller et al., 1992). La Ser 6 est également le substrat de cette kinase et elle est induite après exposition à des radiations ionisantes (IR) ou après exposition à des rayons UV. Les IR induisent des cassures doubles brins sur l'ADN et les rayons UV forment des adduits à l'ADN, comme par exemple des dimères de pyrimidines.

La Ser 15 est phosphorylée après des radiations ionisantes ou après exposition à des rayons UV (UV) (Siliciano et al., 1997). Il existe plusieurs candidats de la famille des PI-3 kinases susceptibles de phosphoryler cette Ser: la DNA-PK (Protéine Ser/Thr Kinase dépendante de l'ADN) (Lees-Miller et al., 1992; Shieh et al., 1997), l'ATM (Ataxia Telangectasia Mutated) (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998) et l'ATR (ATM Related) (Tibbetts et al., 1999). L'ATM est une kinase qui est activée spécialement après les IR. Les patients porteurs d'une mutation sur l'ATM développent la maladie Ataxia Telangectasia. Il a été démontré que la p53 de cellules déficientes pour la DNA-PK ou pour l'ATM pouvait toujours être phosphorylée sur la Ser 15, ce qui suggère un rôle redondant entre ces 2 kinases ou l'existence d'autres kinases qui interviendraient *in vivo* (Siliciano et al., 1997).

La Thr 18 est phosphorylée, *in vitro*, par la Ck1, si la p53 a été préalablement phosphorylée sur la Ser 15, ce qui laisse supposer qu'il existe une séquence bien spécifique des événements (Craig et al., 1999; Sakaguchi et al., 2000). La phosphorylation de la Thr 18, qui est directement située sur le site d'interaction de Mdm2, déstabilise leur liaison plus efficacement que la phosphorylation des ser 15 et 37 (Sakaguchi et al., 2000).

La Ser 20 est également phosphorylée après exposition à des rayons UV et γ (Shieh et al., 1999). Les Chk1 et chk2 (Checkpoint Kinases 1 et 2) ont été

récemment identifiées comme les kinases responsables de cette phosphorylation (Chehab et al., 2000; Shieh et al., 2000). Ces kinases sont connues pour être impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et ces résultats montrent qu'il existe une relation entre la phosphorylation d'un site précis de p53 et l'arrêt du cycle cellulaire qui est une des fonctions principales de p53. La phosphorylation de la Ser 20 déstabilise, comme celle de la Thr 18, la liaison avec Mdm-2. Une étude cinétique a permis de montrer que la vitesse d'apparition de la phosphorylation de la Ser 20 est beaucoup plus rapide après les UV qu'après exposition à des radiations ionisantes. Ceci suggère que la voie de signalisation des radiations UV et γ implique des kinases différentes. Ces mêmes auteurs ont également montré que la phosphorylation des Ser 15, 20 et 33 nécessite que p53 soit sous forme tétramérique (Shieh et al., 1999).

La Ser 33, la Ser 37 et la Ser 46 seraient phosphorylées par la kinase p38 après une exposition à des rayons UV (Bulavin et al., 1999). De plus, une diminution de l'apoptose médiée par p53 est observée si les Ser 33 et 46 sont substituées par un résidu Ala. Sagakuchi et coll ont montré que les Ser 33 et 37 sont phosphorylées après exposition à des rayons UV et après IR (Sakaguchi et al., 1998). La Ser 33 peut être également phosphorylée, *in vivo*, par une Cyclin-dépendent (CDK) Activating Kinase (CAK) (Ko et al., 1997).

Bien qu'il soit connu qu'un stress génotoxique régule la phosphorylation sur ces sites, pour l'instant, l'effet fonctionnel de cette modification reste encore mal compris (Bargonetti et al., 1993).

2.2.2 Région centrale (résidus 102-293)

80% des mutations non sens retrouvées dans les tumeurs sont localisées dans cette région. Elle comporte le domaine de liaison à une séquence d'ADN spécifique (Cho et al., 1994; Wang et al., 1993; Yu et al., 1994). Celle-ci a été identifiée par El-Deiry et coll en 1992, il s'agit de :

5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GpyPyPy-3' qui est répétée 2 fois à une distance de 0 à 13 paires de bases (El Deiry et al., 1992). La p53 transactive les gènes qui possèdent cette séquence dans leur promoteur. Bourdon et coll ont proposé une séquence consensus plus large acceptant une substitution de 3 pb par

rapport à celle de El-Deiry, ce qui a permis de découvrir de nouveaux gènes cibles potentiels de p53 (Bourdon et al., 1997).

La structure tertiaire de la région de liaison à l'ADN ressemble au domaine de liaison à l'ADN de NF κ B, un autre facteur de transcription (Muller et al., 1995). Ce domaine est en fait constitué de 2 feuillets β anti parallèles, de 2 grandes boucles (Loop1 et Loop2) et d'un motif boucle-feuillet-hélice (Loop-Sheet-Helix :LSH). Ces 2 boucles renferment les 4 résidus cruciaux de p53 pour sa conformation. L2 possède la cystéine 176 et l'histidine 179, L3 renferme les cystéines 238 et 242. Ces 4 résidus sont liés à l'atome de zinc qui joue ici un rôle structural pour le maintien de la conformation de p53 (voir figure 9). La cristallisation de p53 a démontré l'importance de la conformation de la p53 pour qu'elle puisse se lier à sa séquence consensus d'ADN (Cho et al., 1994), voir la figure 9. Les contacts avec l'ADN se font au niveau du grand et du petit sillon. Plusieurs résidus établissent le contact avec le grand sillon de l'ADN par liaisons électrostatiques avec les groupements phosphates (Lys 120, Ser 241, Arg 273, Ala 276, Arg 283) alors que d'autres font des ponts hydrogènes avec les bases (Lys 120, Cys 277 et Arg 280). En revanche, un seul résidu (Arg 248) suffit pour l'interaction avec le petit sillon (Cho et al., 1994).

On distingue 2 classes de mutations. La classe 1 concerne les « mutants de contact » c'est-à-dire les résidus qui sont en contact direct avec l'ADN, c'est le cas des codons 248 et 273 qui sont considérés comme étant les « points chauds ». La classe 2 comporte les mutants que l'on dit de structure comme par exemple les codons 175, 245, 249, 282 qui codent pour des acides aminés nécessaires au repliement conformationnel adéquat de la protéine. Ces types de mutations conduisent à l'inactivation de p53. Néanmoins, le gène peut ne pas être altéré et la protéine peut, elle, être présente sous une forme apparentée à une forme mutante. En effet, certaines modifications post-traductionnelles peuvent conduire à une inactivation par modification de la conformation de p53. Ce point sera clé pour la suite de mon travail de thèse qui s'articule autour d'une inactivation de p53 par modification(s) post-traductionnelle(s).

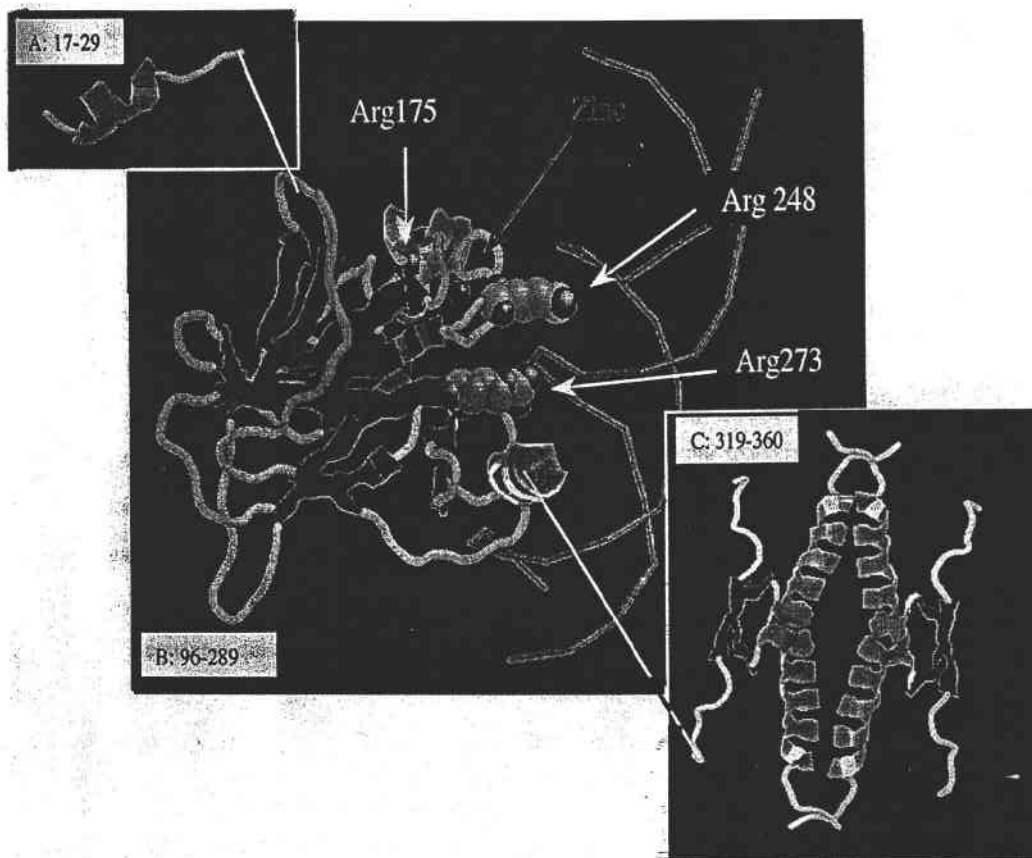


Figure 9: *Structure en 3 dimensions de la protéine p53*

La forme native (wt:wild type) est reconnue spécifiquement par l'anticorps pab 1620 (Milner et al., 1987). Lorsque la p53 se trouve sous une forme « mutante », un épitope qui est cryptique dans la forme sauvage est découvert, permettant sa reconnaissance par l'anticorps pab 240.

Ce domaine présente des homologies avec l'exonucléase III d'E.Coli. Une activité exonucléasique serait démasquée après association avec l'ADN endommagé, par clivage auto-protéolytique de p53 des côtés C et N terminaux (Molinari et al., 1996; Okorokov et al., 1997). Néanmoins, ce clivage auto-protéolytique n'est pas encore bien compris. La p53 pourrait jouer un rôle d'exonucléase dans les mécanismes de réplication, de recombinaison et de réparation grâce à son domaine central.

2.2.3 Domaine C-terminal (résidus 300-393)

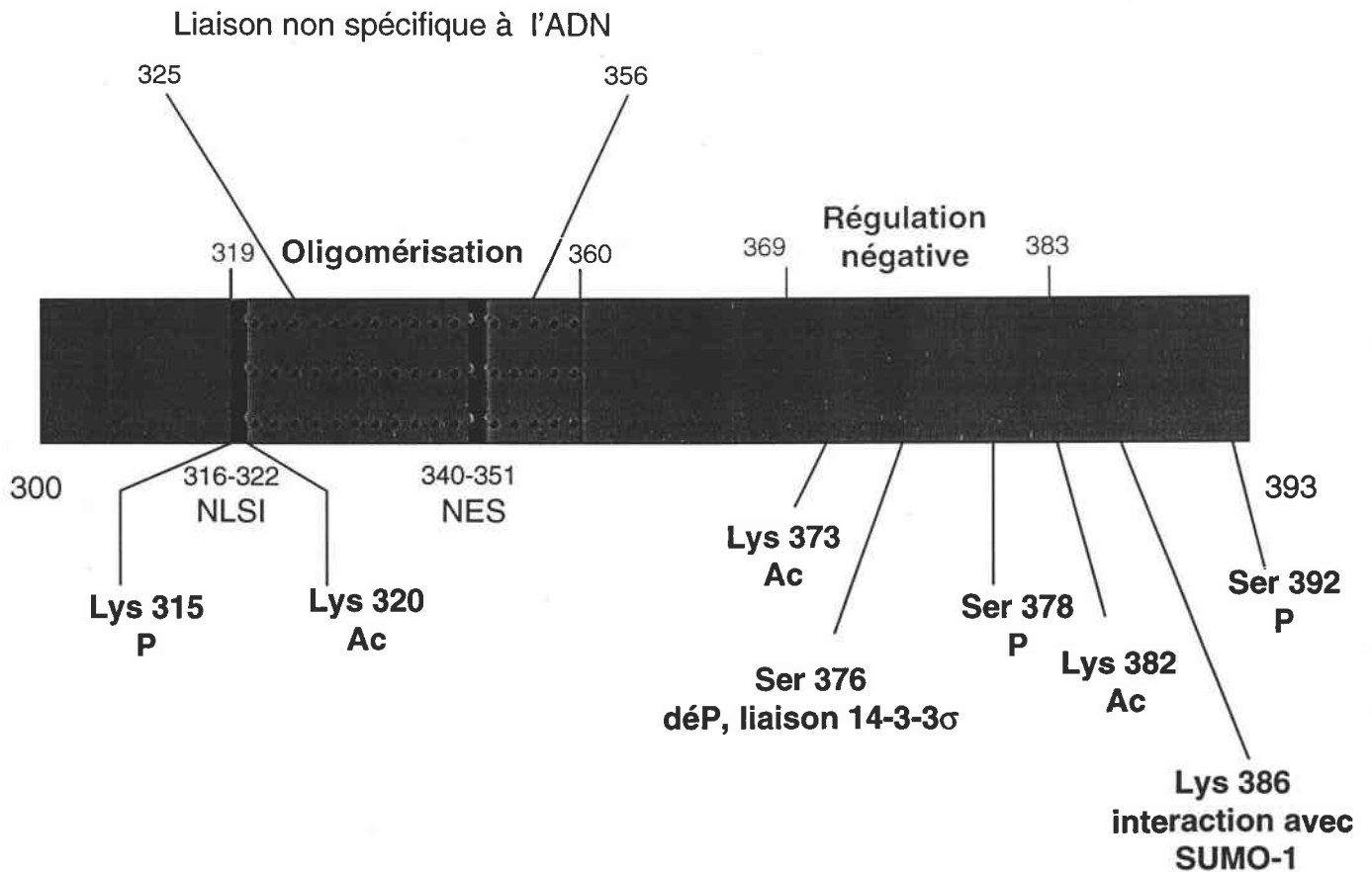
Ce domaine est le sujet de diverses modifications post-traductionnelles nécessaires pour le rôle multifonctionnel de p53. Cette partie est, elle aussi, redivisée en sous-domaines. On distingue ainsi la région charnière (résidus 300-320), le domaine de tétramérisation (résidus 320-360) et une région basique (résidus 363-393) qui reconnaît certains types de lésions sur l'ADN.

2.2.3.1 Structure

La structure précise du domaine C terminal ainsi que ses modifications post-traductionnelles sont rassemblées dans la figure 10.

La région charnière est flexible et connecte le domaine de liaison à l'ADN au domaine de tétramérisation.

La structure tertiaire du domaine de tétramérisation a été révélée par résonance paramagnétique (RMN) (Clore et al., 1994) et par cristallographie aux rayons X (Jeffrey et al., 1995). Un brin β (326-333) s'associe avec un autre brin β d'un autre monomère pour former un dimère. Ce dimère va lui-même s'associer avec un autre dimère par la surface hydrophobe de leur hélice α (Clore et al., 1994). L'oligomérisation de p53 est nécessaire à l'activité de liaison de p53 à sa (ses) séquence consensus *in vitro* (Friedman et al., 1993; Halazonetis and Kandil, 1993). En fait, sa tétramérisation lui permet une liaison optimale à sa séquence d'ADN spécifique.



Résidus	Type de modification	Enzyme catalysant la réaction	stress inducteur
Ser 315	Phosphorylation	cdc2/cycline A ou B	IR et UV
Lys 320	Acétylation	PCAF	IR et UV
Ser 371	Phosphorylation	PKC	<i>in vitro</i>
Lys 373	Acétylation	PCAF	<i>in vitro</i>
Ser 376	Déphosphorylation Liaison avec 14-3-3σ	phosphatase activée par ATM	IR et UV
Ser 378	Phosphorylation	PKC	constitutivement
Lys 382	Acétylation	P300/CBP	IR et UV
Ser 392	Phosphorylation	CKII	UV
Lys	Ubiquitination	Mdm2 (ubiquitine ligase)	stress génotoxique

Figure 10: Structure détaillée de la partie C terminale de la p53 humaine.

Le tableau rassemble toutes les modifications connues de la partie C terminale, y compris les phosphorylations induites *in vitro* par une kinase donnée.

Chez la souris, les sites de phosphorylation connus sont différents (Meek, 98) : les Ser 309 et 386 (par la CKII), Ser 370 et Thr 372 (par la PKC) et Ser 389 (par la p38MAPK).

De plus, certaines modifications post-traductionnelles telles que la liaison à Mdm2 et la phosphorylation de la Ser 20 nécessitent que p53 soit sous forme tétramérique (Maki, 1999; Shieh et al., 1999). Néanmoins, il a été démontré qu'une p53 mutante de souris incapable de former des tétramères, conserve la capacité de transactiver ses gènes cibles *in vivo*, ce qui pourrait expliquer pourquoi des mutants de la région de dimérisation ne sont pas particulièrement sélectionnés dans les tumeurs (Shaulian et al., 1993).

Dans la même région coexiste un signal d'export nucléaire (NES :Nuclear Export Signal) qui se situe entre les résidus 340 et 351 (Stommel et al., 1999). Les résidus cruciaux pour la fonction du NES et la tétramérisation sont communs, ce qui suggère que l'export nucléaire serait lié à l'association et à la dissociation des monomères. Lorsque ce signal est actif, la protéine est alors transportée du noyau vers le cytoplasme. En fait, lorsque p53 est sous forme de tétramère, le NES est masqué et ne peut interagir avec les protéines nécessaires à l'export de la p53 ce qui explique que lorsque p53 est sous forme de tétramère, elle est retenue dans le noyau.

Le domaine C terminal contient également les signaux de localisation nucléaire (Shaulsky et al., 1990). Le signal le plus actif, chez la p53 humaine, est le NLS1 qui est situé entre les acides aminés 316 et 325. Celui-ci est largement conservé entre les espèces et partage une homologie de séquence parfaite avec la séquence consensus des autres signaux de localisation nucléaire. Chez la souris, 2 autres signaux co-existent : NLS2 (369-375) et NLS3 (370-384).

Cette région est également très importante pour la reconnaissance des fragments d'ADN endommagé et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Reed et al., 1995). La région basique se lie de façon non spécifique à l'ADN et permet ainsi de reconnaître les dommages à l'ADN (Bakalkin et al., 1994; Wang et al., 1993). La région C-terminale de p53 lie fortement les cassures simple et double brins sur l'ADN ce qui induit la stabilisation et l'activation de la protéine (Roberts et al., 1998). Elle peut également catalyser, en présence d'ATP, l'appariement de brins complémentaires (Bakalkin et al., 1994; Brain and Jenkins, 1994).

La région C-terminale exerce une régulation négative sur l'activité de p53 en bloquant son interaction avec sa séquence d'ADN spécifique (Hupp et al., 1995) (Hupp and Lane, 1994; Waterman et al., 1995). En fait, cette région permet le maintien de p53 sous une forme latente qui est incapable de lier spécifiquement l'ADN (Hupp et al., 1995). Plusieurs expériences ont montré qu'un blocage ou une coupure sur la région C-terminale levaient l'inhibition exercée par cette région. (Bargonetti et al., 1993; Hupp et al., 1992). De même, p53 tronquée dans sa région C-terminale est capable de lier constitutivement l'ADN de façon spécifique, sans signal extérieur (Hupp et al., 1992). Il a été montré que l'interaction de la p53 avec de l'ADN simple brin induit un clivage de la partie C-terminale ce qui stimule l'activité de liaison à l'ADN de p53, probablement par une levée de la fonction inhibitrice de cette partie (Molinari et al., 1996; Okorokov et al., 1997).

2.2.3.2 Modifications post-traductionnelles

Ce domaine est le sujet de modifications post-traductionnelles diverses : phosphorylation, déphosphorylation, acétylation, O-glycosylation, ubiquitination et enfin interaction avec des protéines hétérologues. Le tableau de la figure 10 rassemble les sites des différentes modifications post-traductionnelles et distingue les phosphorylations observées uniquement *in vitro* de celles observées dans les cellules après des dommages sur l'ADN. En effet, certaines phosphorylations ont été rapportées uniquement *in vitro* après incubation avec une kinase donnée alors que d'autres sont observées après que les cellules aient été soumises à un stress génotoxique et les kinases responsables de ces phosphorylations ont ensuite été identifiées *in vitro*.

- *Phosphorylations et déphosphorylations*

De nombreux résidus sont phosphorylés et ce par différentes kinases. Ce schéma montre uniquement les modifications rapportées sur la p53 humaine. Les sites de phosphorylation sur la protéine murine sont juste cités pour mémoire et ont déjà été très bien décrits dans la revue de Meek (Meek, 1998). Chez la souris, la Ser 309 est phosphorylée par la CDK, la Ser 386 par la CKII, la Ser 389 par la p38MAPK et les Ser 370 et Thr 372 par la PKC.

Sur la protéine humaine, la Ser 315 est phosphorylée, *in vitro*, par le complexe cdc2/cycline A ou B (Meek, 1998). Les Ser 371 et 378 sont phosphorylées par la PKC (Takenaka et al., 1995). *In vitro*, la phosphorylation de p53 par la PKC ou par la CKII stimule la liaison spécifique à l'ADN (Delphin and Baudier, 1994; Hupp et al., 1992; Takenaka et al., 1995). La Ser 392 est phosphorylée uniquement après une exposition à des rayons UV, vraisemblablement par la caséine kinase II (CKII) (Blaydes and Hupp, 1998; Kapoor and Lozano, 1998). Cette phosphorylation augmente la capacité de liaison à l'ADN de p53 et favorise la stabilité du tétramère (Sakaguchi et al., 1997). Sur la base de ces résultats, il a été proposé que p53 possède une région C terminale flexible dont la phosphorylation produit un changement conformationnel qui permet l'accès aux séquences spécifiques d'ADN (Hupp and Lane, 1995).

La Ser 376 est phosphorylée constitutivement par la PKC et elle est déphosphorylée en réponse à des lésions sur l'ADN de façon dépendante de l'ATM. En effet, cette déphosphorylation n'existe pas dans les cellules déficientes pour l'ATM (Waterman et al., 1998). Cette déphosphorylation favorise ensuite la liaison avec la protéine de transduction du signal 14-3-3 σ et joue probablement un rôle majeur dans l'activation de p53 (Waterman et al., 1998).

• Acétylation

Le p300/CBP (CREB Binding Protein) et le PCAF (p300 CBP Associated Factor) sont deux histones acétylases qui acétylent des résidus Lys de la partie N terminale des histones, ce qui déstabilise la structure chromatidienne et permet aux facteurs de transcription d'accéder plus facilement à l'ADN du nucléosome (Ogryzko et al., 1998). Il a été démontré que ces deux facteurs peuvent également acétyler p53 (Scolnick et al., 1997). Il apparaît que le PCAF et p300/CBP ont des spécificités distinctes pour l'acétylation de p53, ce qui pourrait lui permettre de répondre à des signaux d'activation différents. L'acétylation de p53 par le PCAF (Liu et al., 1999) ou par p300 (Gu and Roeder, 1997a) augmente l'activité de liaison à l'ADN de p53 *in vitro*.

La Lys 382 est acétylée, *in vivo*, après une irradiation ou exposition à des rayons UV. Cette acétylation pourrait être régulée par la phosphorylation en N terminal et serait médiée par le facteur p300/CBP (Gu et al., 1997; Sakaguchi et al., 1998). La Lys 320 est acétylée, *in vivo*, très rapidement après les UV et tardivement après IR. Cette acétylation est médiée par le PCAF, *in vitro* (Liu et al., 1999; Niculescu, III et al., 1998). La Lys 373 est également acétylée après IR et UV et cette acétylation est médiée, *in vitro*, par le p300 (Liu et al., 1999). Néanmoins, la mutation des différents sites d'acétylation, tout comme pour les sites de phosphorylation, n'a qu'un effet minime sur la fonctionnalité de p53 (Kapoor and Lozano, 1998; Ogryzko et al., 1996; Shieh et al., 1999). Ces observations pourraient être expliquées par la possibilité qu'il existe des modifications post-traductionnelles redondantes.

- *O-glycosylation*

Shaw et coll ont montré que p53 était O-glycosylée sur sa partie basique (Shaw et al., 1996). La glycosylation masque la reconnaissance par l'anticorps Pab 421, ce qui suggère, qu'au moins un des sites de glycosylation serait situé entre les acides aminés 375 et 380.

- *Ubiquitination*

L'ubiquitination, qui consiste à greffer des chaînes d'ubiquitine, sur des résidus Lys, est également localisée dans cette partie de p53.

Il a été montré, très récemment, que la Lys 386 est un site d'attachement pour SUMO-1, qui est une ubiquitine-like. Cet attachement n'induit pas la dégradation de p53, contrairement à la liaison avec l'ubiquitine, mais augmente les capacités transactivatrices de p53 (Gostissa et al., 1999; Rodriguez et al., 1999)

Jusqu'à présent, les modifications post-traductionnelles de p53 ont été étudiées après exposition à des radiations UV ou ionisantes. Néanmoins, p53 répond à de nombreux autres stress et les modifications post-traductionnelles induites par ceux-ci n'ont pas encore été étudiées précisément. L'ensemble de ces modifications active la p53 en produisant un changement de conformation et joue ainsi un rôle majeur pour la régulation de p53.

2.3 Sa régulation

2.3.1 Son activation

P53 est régulée positivement après un stress de deux façons différentes. D'une part, la protéine est stabilisée et peut donc s'accumuler dans le noyau et d'autre part, son activité de liaison spécifique à l'ADN intrinsèque est augmentée. En effet, lorsque des cellules sont soumises à un stress, la p53 subit des modifications post-traductionnelles qui augmentent sa stabilité (et donc sa demi-vie) et elle est convertie d'une forme latente en une forme active pour la liaison à l'ADN. En général, ces 2 phénomènes sont concomitants, mais il peut arriver, dans des cas particuliers, que l'un se fasse sans l'autre.

Il existe plusieurs senseurs qui permettent de signaler un stress et qui conduisent à l'activation de p53.

2.3.1.1 La forme latente

Sous forme latente, bien que tétramérique, la protéine est incapable de lier spécifiquement l'ADN. Le C-terminus joue un rôle inhibiteur sur l'activité transactivatrice de p53, probablement par repliement conformationnel

Lorsque la cellule n'est pas soumise à un stress, p53 est présente en faible quantité. Sa demi-vie est courte (de l'ordre de 30 min) car elle est soumise à une dégradation continue. La dégradation, dont le mécanisme sera décrit plus loin est principalement médiée par Mdm2 (Freedman and Levine, 1999; Kubbutat et al., 1997; Midgley and Lane, 1997). La régulation de p53 par Mdm2 est cruciale, notamment au cours du développement. En effet, des souris déficientes pour le gène Mdm2 présentent une létalité à un stade précoce du développement embryonnaire qui peut être inhibée par la délétion du gène TP53 (Jones et al., 1995; Montes de Oca et al., 1995). En effet, le maintien d'une concentration basse de p53 est nécessaire afin d'éviter une mort cellulaire ou un arrêt de la division cellulaire inapproprié pour des cellules non soumises à un stress.

La dégradation continue de p53 dans des cellules non stressées serait également médiée de façon indépendante de Mdm2. Il a été démontré, en effet, que la Jun Kinase (JNK) s'associe avec le domaine central de p53 et stimule son ubiquitination (Fuchs et al., 1998). Néanmoins, le mécanisme

exact de cette dégradation n'est pas encore connu. Ces deux systèmes sont indépendants car les complexes JNK-p53 sont retrouvés préférentiellement en phase G0/G1 alors que les complexes Mdm2/p53 existent en phases S et G2/M (Fuchs et al., 1998)

Ainsi, la dégradation de p53 dans des cellules normales pour maintenir un niveau bas de p53 serait assurée à la fois par Mdm2 et JNK alors que la dégradation marquant la fin de l'activation de p53 serait plutôt médiée par Mdm2 qui est régulée finement en fonction des besoins de la cellule.

2.3.1.2 Signalisation en amont de son activation

Le fait qu'il existe une forme latente et une forme active de p53 implique qu'il existe des effecteurs cellulaires qui signalent le stress et permettent le passage d'une forme à l'autre. Ainsi, la cellule est à l'affût de tout stress et possède les moyens d'élever rapidement le niveau de p53 et de l'activer. Les mécanismes qui connectent les stress génotoxiques ou non génotoxiques à l'activation de p53 sont variés. Chaque voie est plus ou moins spécifique de tel ou tel stress, bien qu'il puisse exister un recouvrement partiel entre différents senseurs pour signaler certains stress. Cette redondance pourrait d'ailleurs être considérée comme salvatrice pour l'intégrité génomique de la cellule. L'ensemble des phosphorylations dont p53 est le sujet est vraisemblablement un élément clef pour la signalisation du stress.

La DNA-PK (protéine Ser/Thr kinase dépendante de l'ADN) serait un des activateurs en amont de p53 qui est directement activé en présence de cassures sur l'ADN. Elle possède un dimère formé par les sous unités Ku 70 et Ku 80 qui se lie aux points de cassures doubles brins de l'ADN. Cette kinase serait donc un senseur particulier pour les lésions sur l'ADN induites par les radiations. La DNA-PK phosphoryle la Ser 15 et probablement la Ser 37 de la p53 *in vitro* qui sont des éléments importants pour l'activation de p53 (Shieh et al., 1997; Siliciano et al., 1997). La DNA-PK semble essentielle pour l'activité de liaison à l'ADN de p53. Il a été démontré que des lignées de souris déficientes pour la DNA-PK (lignées *scid*, pour *Severe Combined Immuno Deficiency*) possèdent une p53 incapable de lier spécifiquement l'ADN (Woo et al., 1998) et de transactiver ses gènes cibles après un traitement induisant des cassures sur l'ADN (Kachnic et al., 1999).

Ce rôle crucial a cependant été remis en question par plusieurs études (Huang et al., 1996; Jimenez et al., 1999; Rathmell et al., 1997). En effet, il a été montré que les lignées *scid* pouvaient s'arrêter dans leur cycle, de façon p53 dépendante, en réponse à des dommages sur l'ADN et déplétion de nucléotides (Huang et al., 1996). Jimenez et coll ont démontré que des lignées cellulaires murines de phénotype DNA-PK^{-/-} présentaient une réponse normale de p53 après irradiation (phosphorylation de la Ser15, accumulation de la protéine, liaison spécifique à l'ADN et transactivation de ses gènes cibles). Il faut cependant noter que tous ces résultats ont été obtenus sur des lignées murines, et compte tenu des différences obtenues entre ces lignées, on peut imaginer que chez des cellules humaines et, *in vivo*, l'importance relative de la DNA-PK vis à vis de l'activation de la p53 soit encore tout autre.

L'Atm est impliquée spécifiquement pour la détection des lésions de l'ADN induites par les radiations ionisantes mais pas pour les autres formes de stress. (Kastan et al., 1992). L'Atm, tout comme la DNA-PK, phosphoryle la Ser 15 et probablement la Ser 37 et il serait un meilleur candidat que la DNA-PK pour activer p53 (Jimenez et al., 1999). En effet, l'Atm exerce d'autres fonctions: elle induit une phosphatase qui déphosphoryle la Ser 376 du C-terminus, démasquant ainsi le site de liaison à la protéine 14-3-3 σ . De plus, elle active la tyrosine kinase c-Abl, tout comme la DNA-PK, par phosphorylation après irradiation (Van Etten, 1999). La double phosphorylation de p53 et de C-Abl, conduirait à la formation d'un complexe C-Abl/p53/Atm qui se lie à l'ADN (Van Etten, 1999). C-Abl se fixerait par sa région SH3 sur le domaine PXXP de p53 (Van Etten, 1999). Cet exemple illustre le lien qu'il existe entre reconnaissance des lésions sur l'ADN et activation de p53. L'interaction de c-Abl avec p53 induit un arrêt de la prolifération dépendant de p53 (Yuan et al., 1996b; Yuan et al., 1996a).

La JNK (Jun terminal kinase) est impliquée dans la signalisation des radiations ionisantes et UV, des cytokines telles que TNF- α et lors d'un choc

thermique. Il a été montré que la JNK phosphoryle la Ser 34 de la p53 murine (Milne et al., 1995; Muller et al., 2000).

La CKII (caséine kinase) phosphoryle p53 après des radiations UV mais ne fonctionne pas pour des radiations ionisantes (Kapoor and Lozano, 1998), ce qui souligne la spécificité de cette kinase vis à vis d'un stress bien particulier.

La polyADP Ribose Polymérase (PARP) est impliquée dans la réparation de l'ADN car elle fournit des chaînes de polyADP-riboses nécessaires à la réparation des bases endommagées. Il a été démontré que cet enzyme pouvait greffer des polymères d'ADP-ribose sur la p53 dans la région centrale (151-178 et 231-253) et dans le domaine d'oligomérisation (326-348) (Malanga et al., 1998). Des cellules en culture déficientes pour la PARP ou possédant une PARP inactive n'induisent que faiblement p53 bien que son activité soit partiellement maintenue (Agarwal et al., 1997; de Murcia et al., 1997). Il semble donc que PARP jouerait un rôle d'intermédiaire entre les lésions sur l'ADN et l'induction de p53 bien que le lien exact ne soit pas encore bien défini.

La p14ARF est activée en réponse à des signaux de prolifération anormaux suite à l'activation d'oncogènes ou à une activité aberrante de l'E2F1. L'ARF stabilise la p53 indirectement en inhibant la dégradation de p53. Ainsi, l'ARF appartient aux différentes voies conduisant à la stabilisation de p53 après un stress, mais d'une façon indirecte.

Le facteur de transcription Hif-1 α (hypoxia-inducible factor 1 alpha) est, quant à lui, le médiateur d'une réponse à un stress non génotoxique : l'hypoxie. L'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose induits par l'hypoxie sont dépendants de l'activité de p53 (Carmeliet et al., 1998). En effet, l'hypoxie induit la stabilisation de p53 par interaction directe entre elle-même et Hif-1 α (An et al., 1998).

Pour l'instant, les signaux qui régissent l'activation de p53 après différents stress n'ont probablement pas encore été tous identifiés. La majorité de ces senseurs connus sont des kinases qui sont plus ou moins spécifiques d'un stress particulier.

2.3.1.3 Mécanismes d'activation de p53

Le mode d'activation de p53 est complexe et suppose des modifications post-traductionnelles successives. Hainaut et Hollstein ont proposé récemment un modèle d'activation de p53 en trois étapes impliquant des modifications covalentes et non covalentes qui ont pour conséquence un changement de conformation de la protéine, voir la figure 11. La première étape se passe au niveau de l'extrémité N terminale. La DNA-PK, l'Atm ou encore d'autres kinases non encore identifiées à ce jour, phosphorylent la Ser 15 et la Ser 37. Cette phosphorylation conduit à la dislocation du complexe Mdm2-p53 (Shieh et al., 1997). La p53 n'est alors plus dégradée et son domaine de transactivation est libéré.

La seconde étape a lieu dans le domaine C terminal. P53 interagit avec d'autres protéines telles que des membres de la famille de CBP/p300. (Gu et al., 1997; Scolnick et al., 1997). CBP acétyle des résidus lysines fortement conservés qui sont les Lys 320, 373, 382. Ces acétylations déplacent le domaine C terminal qui exerçait jusqu'alors une régulation négative sur le domaine N terminal et induit la capacité de liaison à l'ADN de p53 (Gu and Roeder, 1997b). Cependant, pour l'instant, le rôle précis de l'acétylation de p53 n'est pas encore très bien défini.

D'autres modifications covalentes viennent ensuite se greffer, en particulier la phosphorylation de la Ser 378 et la déphosphorylation de la Ser 376. La déphosphorylation de la Ser 376 génère un site de liaison pour la protéine de transduction du signal 14-3-3 σ . L'association avec cette protéine augmente l'affinité du site de liaison spécifique à l'ADN.

Après ces deux étapes, la p53 est prête, théoriquement, pour transactiver ses gènes cibles. Les auteurs proposent une troisième étape impliquant une régulation redox de p53.

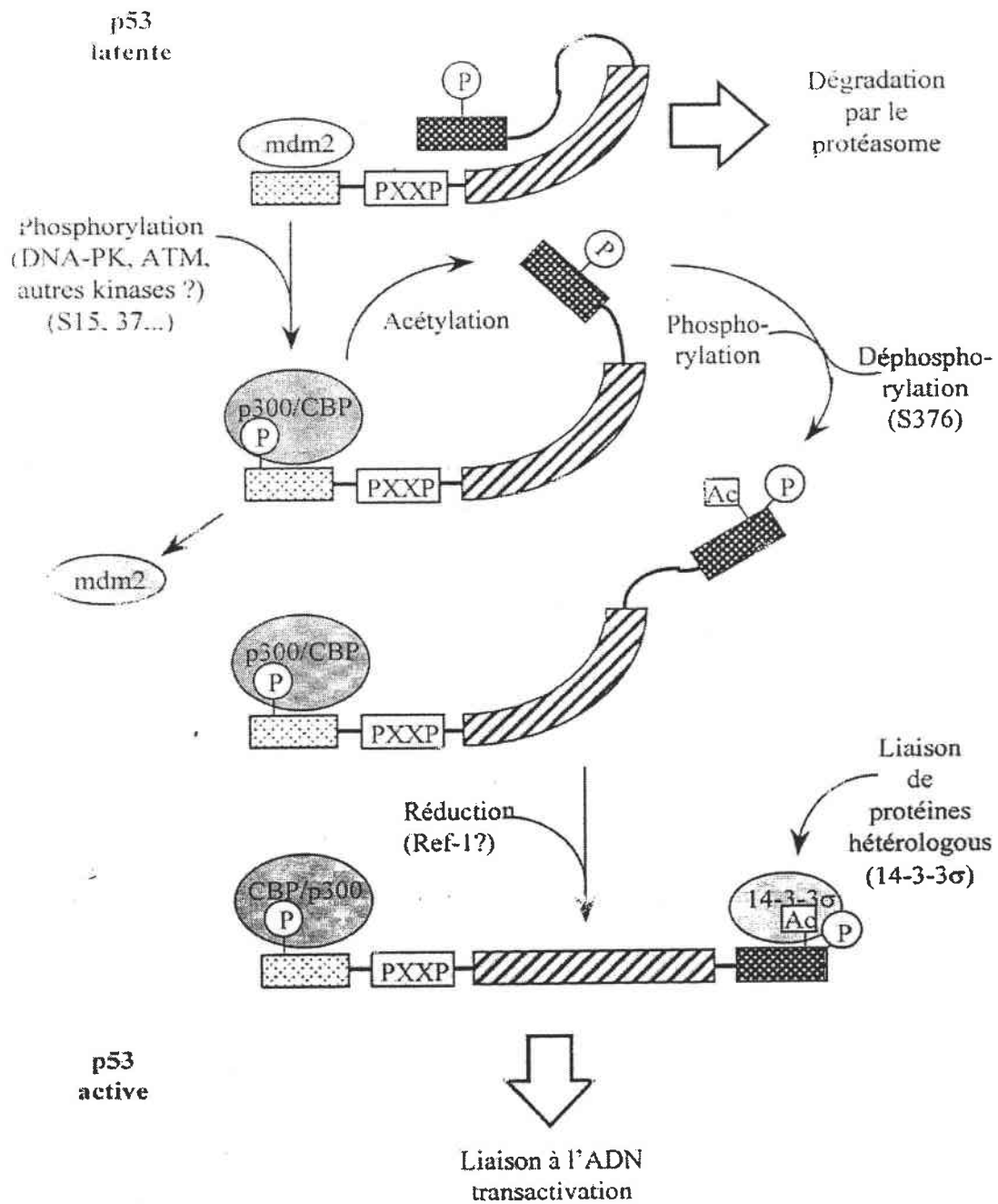


Figure 1A: Modèle d'activation en trois étapes de p53 par des signaux de stress (d'après Hainaut et Hollstein, 2000).

Pour les explications, se référer au texte.

En effet, le domaine de liaison spécifique à l'ADN est flexible et possède des résidus cystéines cruciaux pour la liaison avec le Zinc. Cette régulation redox de p53 sera développée un peu plus loin.

2.3.2 Sa dégradation

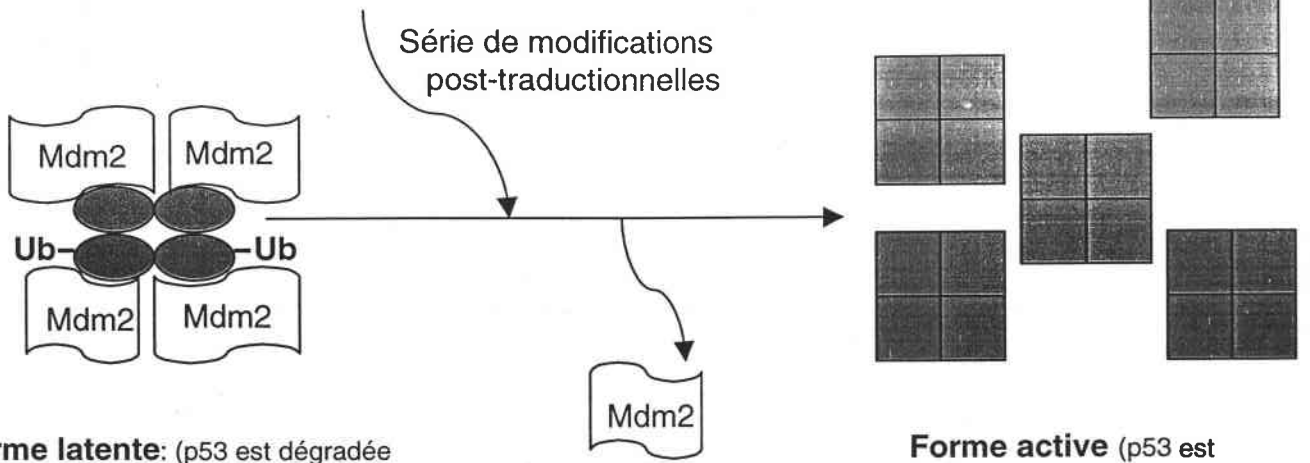
La dégradation de p53 implique plusieurs étapes successives : son interaction avec Mdm2, son ubiquitination, sa translocation vers le cytoplasme et enfin sa dégradation par le protéasome, voir la figure 12.

P53 régule elle-même sa dégradation : il s'agit d'une boucle d'auto-régulation négative (Wu et al., 1993). En fait, p53 stimule Mdm2 au niveau transcriptionnel (Barak et al., 1993) alors que l'onco-protéine Mdm2 inhibe l'activité de p53 (Haupt et al., 1997; Momand et al., 1992). En fait, Mdm2 agit de deux manières différentes. Dans un premier temps, l'interaction de Mdm2 avec p53 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 et dans un deuxième temps, Mdm2 induit la dégradation de p53. Cet effet double et rapide de Mdm2 permet de réguler finement la durée d'activation de p53 (Haupt et al., 1997).

D'un point de vue mécanistique, Mdm2 forme un complexe avec p53 en interagissant avec son domaine de transactivation. L'interaction de p53 avec les protéines de la machinerie transcriptionnelle est alors bloquée et p53 ne peut plus exercer son activité transactivatrice (Chen et al., 1993; Momand et al., 1992).

Sous forme active, p53 est phosphorylée et transactive ses gènes cibles, dont Mdm2. La phosphorylation dans le domaine de transactivation en particulier des Ser 15 et 37 et la Thr 18, empêche l'interaction avec Mdm2, probablement par un changement de conformation de la protéine (Shieh et al., 1997). Il a été suggéré également que la phosphorylation de la Ser 20 pourrait empêcher l'interaction avec Mdm2 car ce résidu est situé dans le site d'interaction entre ces 2 protéines (Shieh et al., 1999). Après l'action de phosphatases qui signalent la fin de l'activation, Mdm2 peut interagir avec la p53 déphosphorylée.

STRESS



Forme latente: (p53 est dégradée continuellement par Mdm2 ou encore via Junk, non représenté ici, afin de maintenir une concentration basse dans les cellules non stressées)

Forme active (p53 est stabilisée, s'accumule et transactive ses gènes cibles, dont Mdm2)

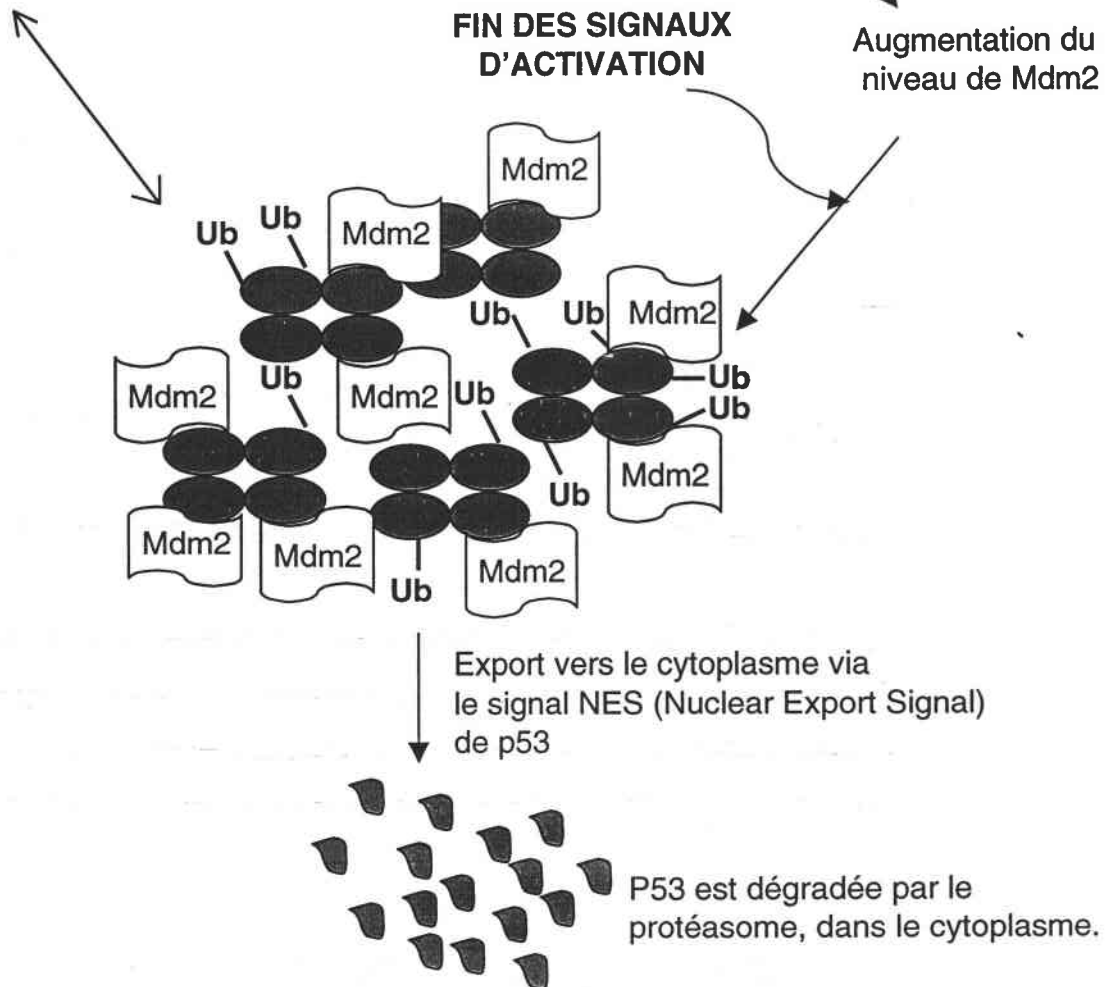


Figure 12: dégradation de p53 via Mdm2.

Ub représente les chaînes d'ubiquitine.

NB: le nombre de molécules de Mdm2 et d'ubiquitine représentées est arbitraire.

Comme cette interaction a lieu dans le noyau, Mdm2 est transloquée vers le noyau, grâce à son signal de localisation nucléaire (NLS). La mutation du NLS prévient la dégradation de p53. Mdm2 est une ubiquitine ligase (E3) qui stimule l'ubiquitination de la p53 lorsqu'elle est sous forme de tétramère (Maki, 1999).

Le domaine « RING finger » de Mdm2 (résidus 438-479) est essentiel pour son activité ubiquitine ligase vis à vis d'elle-même et pour celle de p53 (Fang et al., 2000; Honda and Yasuda, 2000). En effet, si les résidus cystéines du RING finger impliqués pour la coordination du Zinc sont mutés, Mdm2 est incapable d'ubiquitinyler p53 et de s'auto-ubiquitinyler (Honda and Yasuda, 2000). Les RING fingers se retrouvent chez d'autres enzymes, ils sont caractérisés par une séquence consensus. Il semble néanmoins qu'il existe une certaine spécificité de substrat pour chaque RING finger ; en effet, si le RING finger de Mdm2 est substitué par un RING finger d'un autre enzyme, Mdm2 est toujours capable de s'auto-ubiquitinyler mais ne peut pas ubiquitinyler p53. Lorsque p53 possède des chaînes d'ubiquitines (une protéine de 8kD), elle devient un substrat pour le protéasome 26S (Maki et al., 1996). L'inhibition du protéasome augmente de 4 fois le temps de demi vie de p53 (Maki et al., 1996).

La dégradation par le protéasome nécessite le transport de p53 du noyau vers le cytoplasme. Cette fonction est assurée par le signal d'export NES situé dans le domaine de tétramérisation de p53 qui est démasqué quand la protéine n'est pas sous forme tétramérique (Stommel et al., 1999). L'interaction de p19ARF avec Mdm-2 inhibe l'activité E3 de Mdm-2 (Midgley et al., 2000) et empêche leur export nucléaire (Ashcroft and Vousden, 1999; Lohrum et al., 2000; Midgley et al., 2000). La localisation de p53 et de Mdm-2 est une notion très importante car leur séquestration dans le noyau inhibe la dégradation de p53

Il a été démontré que Mdm2 se lie à p73 et inhibe son activité transcriptionnelle (probablement en empêchant son interaction avec p300/CBP (Zeng et al., 1999)), mais cette liaison n'induit pas la dégradation de p73 (Balint et al., 1999; Zeng et al., 1999). Il semble que p73 soit insensible à la dégradation médiée par Mdm2. En étudiant de près les

différences entre p53 et p73, Gu et coll, ont montré que la séquence entre les acides aminés 92 à 112 de p53 est nécessaire pour que la protéine soit sensible à la dégradation médiée par Mdm2. En effet, la délétion de ces acides aminés ou leur remplacement par la séquence d'acides aminés 92 à 112 de p73 conduit à une inhibition de la dégradation de p53 par Mdm2 (Gu et al., 2000).

Ainsi, p53 posséderait cette séquence particulière qui permettrait la liaison avec une protéine intermédiaire (encore inconnue) nécessaire pour la dégradation de p53 (Gu et al., 2000).

2.3.3 Régulation redox

L'expression "régulation redox de p53" est employée ici dans un sens large qui comprend les changements de p53 induits par un stress oxydant.

La structure tridimensionnelle de p53 est essentielle pour son activité de liaison spécifique à l'ADN. La figure 9 représente la p53 en trois dimensions en conformation sauvage. Les résidus cystéines, impliqués dans la coordination tétraédrique du Zinc, sont signalés. Si la protéine subit des modifications redox portant atteinte à l'intégrité de la conformation de la protéine, elle perd sa capacité à lier spécifiquement l'ADN même si elle a suivi le processus normal d'activation auparavant.

La conformation sauvage de la p53 est reconnue spécifiquement par l'anticorps Pab 1620 alors que la protéine apparentée à une forme mutée est reconnue par l'anticorps Pab 240. Ces deux phénotypes immunologiques correspondent à des organisations structurales du domaine de liaison spécifique à l'ADN différentes. La forme sauvage est correctement repliée et lie l'ADN alors que la forme dite mutante est dénaturée et incapable de transactiver ses gènes cibles.

La métallo régulation et la signalétique redox de p53 ont fait l'objet de revues (Meplan et al., 1999; Meplan et al., 2000). L'exposition à des agents chélateurs ou à certains métaux (Hg^{2+} et Cd^{2+}) induit un changement de conformation de la protéine, ce qui montre le rôle structural essentiel du Zn^{2+} pour p53. Ces métaux peuvent, en effet, déplacer et remplacer le Zinc, *in vitro* (Hainaut and Milner, 1993). Un pas supplémentaire a été franchi par la

démonstration que la protéine pouvait être renaturée (c'est-à-dire retrouver son phénotype sauvage et son activité de liaison à l'ADN) dans des cultures cellulaires par incorporation de Zn^{2+} ou de Co^{2+} (Meplan et coll, soumis). Il a été démontré également que le cuivre (le Cu^{1+} généré à partir du Cu^{2+} en présence de H_2O_2) réagit avec les cystéines de p53 pour former des complexes Cu^{1+} -cystéinyle thiolates (Hainaut et al., 1995). La chélation du Zinc est associée avec l'oxydation des thiols de p53 qui est réversible par addition de DTT, *in vitro* (Hainaut and Milner, 1993b). Les effets sur le Zinc et les cystéines sont intimement liés car l'atome de Zinc est coordonné de façon tétraédrique avec les résidus Cys176, His179, Cys238 et Cys242. Il a été montré que la substitution des Cys 173, 325 et 329 chez la p53 murine inhibe l'activité de liaison à l'ADN de p53 (Rainwater et al., 1995). Le rôle du cuivre en tant que régulateur de la conformation de p53 et de son activité de liaison à l'ADN a été confirmé dans des cultures cellulaires (Verhaegh et al., 1997). Le Cadmium induit une accumulation de p53, mais également un changement de conformation de la protéine et inhibe sa fonctionnalité (Meplan et col, 1999). Ainsi, la chélation du Zinc perturbe réversiblement le phénotype sauvage de p53 et inhibe sa capacité de liaison à l'ADN *in vitro*, mais également en culture cellulaire.

L'ensemble de ces données a montré l'existence d'une métallo-régulation de p53 qui permettrait éventuellement d'exercer une fonction physiologique car la métallo-régulation permet le passage d'une forme à une autre de façon réversible. Les métallothionéines pourraient ainsi jouer un rôle important pour la métallo-régulation de p53 comme il a déjà été démontré précédemment pour NF κ B (Abdel-Mageed and Agrawal, 1998; Freemerman et al., 1999; Sakurai et al., 1999). Les métallothionéines, qui peuvent stocker 7 atomes de Zinc, pourraient jouer un rôle de régulation en libérant les métaux en fonction des conditions redox de la cellule. Cette hypothèse de régulation redox de p53 est renforcée par la démonstration que Ref-1 peut, *in vitro*, stimuler l'augmentation d'affinité de p53 pour sa séquence d'ADN spécifique (Jayaraman et al., 1997). Il a été proposé que Ref1 et la thiorédoxine peuvent

agir de concert pour augmenter l'activité de p53 en réduisant des cystéines oxydées de p53 (Ueno et al., 1999).

2.4 Ses fonctions et leurs conséquences biologiques

La p53 possède plusieurs fonctions biochimiques : transactivation de gènes cibles, répression de la transcription de certains gènes, interaction avec des protéines hétérologues mais également une activité exonucléasique et protéolytique vis à vis d'elle-même. Les conséquences biologiques de ces fonctions biochimiques variées sont nombreuses. Parmi celles-ci, les deux fonctions les mieux documentées sont l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. La figure 13 schématise les fonctions biochimiques et biologiques de p53.

2.4.1 Activité transactivatrice

2.4.1.1 Généralités sur les cibles transcriptionnelles de p53

Comme il a été expliqué précédemment, p53 transactive ses gènes cibles en liant une séquence d'ADN bien spécifique via son domaine central. Les gènes transactivés ont tous en commun une séquence d'ADN bien spécifique contenue dans leur promoteur. L'activité de transactivation dépendant d'une séquence spécifique est essentielle pour le rôle de suppresseur de tumeur de p53. Par ailleurs, il a été démontré qu'il existe une différence d'affinité entre les promoteurs des différents gènes. Par exemple, p21^{Waf1} possède un site de liaison de plus forte affinité que Bax (Martinez et al., 1998).

L'émergence de nouvelles techniques d'analyse performantes a permis d'identifier de nouveaux gènes cibles (Yu et al., 1999; Zhao et al., 2000). Zhao et coll ont identifié environ 400 gènes potentiellement régulés par p53 en utilisant la technique d'"oligonucléotides microarrays" (Zhao et al., 2000). Cette étude a révélé que les gènes induits par les radiations γ , les radiations UV ou par une simple augmentation de p53 (non accompagnée de lésions sur l'ADN) sont différents et que seule une minorité de gènes sont communs à ces différents stress. La nature de la réponse induite par p53 dépend de la quantité de p53, de l'agent inducteur et du type cellulaire, ce qui renforce l'idée qu'il existe différentes voies d'activation.

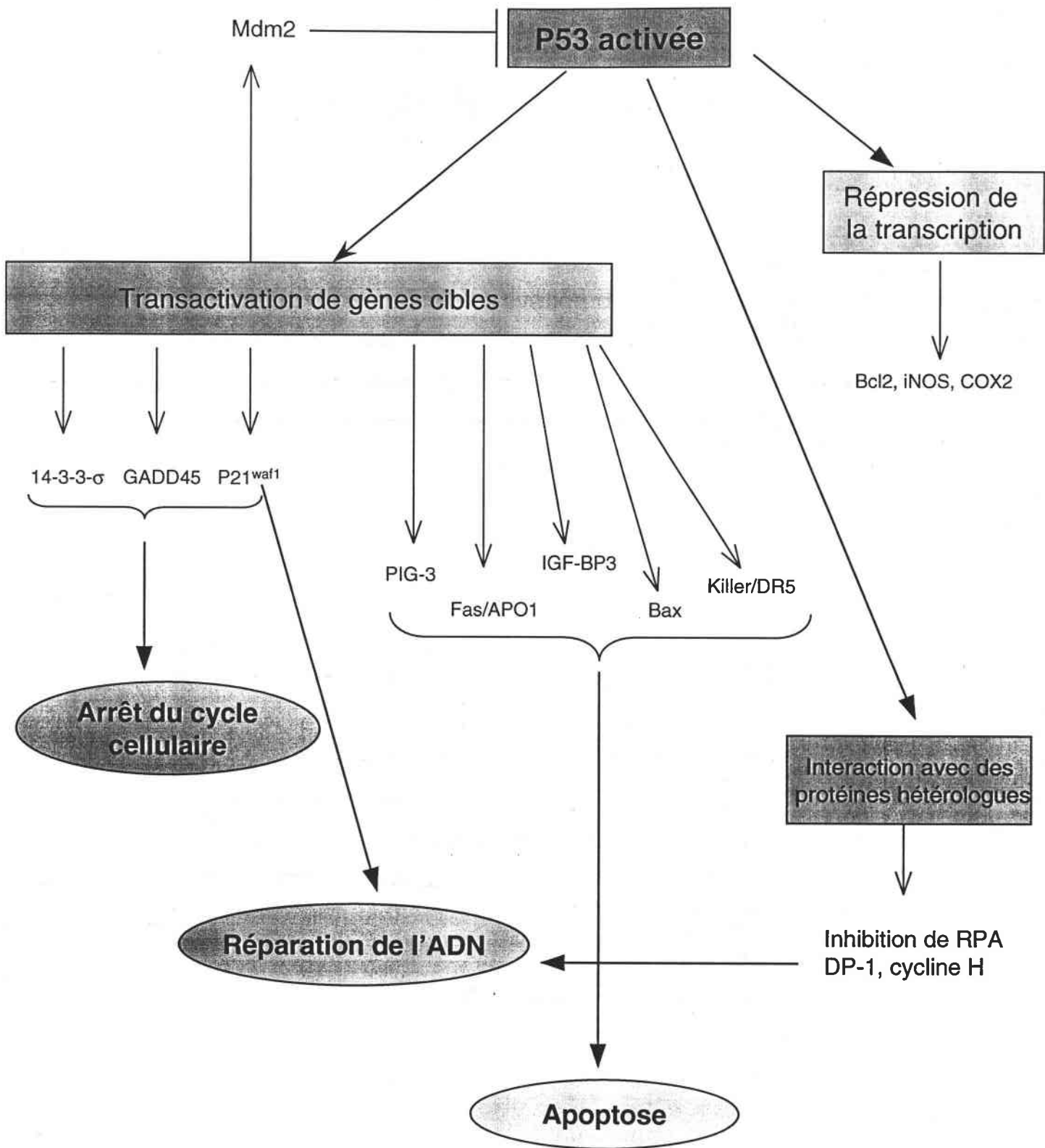


Figure 13: *Fonctions biochimiques et biologiques de p53*

Les : représentent les fonctions biochimiques de p53 et les représentent les fonctions biologiques qui en découlent.

De plus, le profil cinétique de transactivation de tel ou tel gène dépend du stress auquel la cellule est soumise.

En plus des gènes connus pour l'arrêt de la prolifération cellulaire et pour l'apoptose, Zhao et coll ont montré que p53 peut induire la transduction de nombreux gènes codant pour des protéines de la matrice nucléaire et extracellulaire et pour des inhibiteurs de l'angiogénèse. Néanmoins, nous n'exposerons ici que les gènes qui codent pour des protéines impliquées dans l'arrêt de la prolifération et l'apoptose car ce sont eux qui ont été le plus étudié et dont la fonction est connue précisément. Il existe néanmoins peu de données qui permettent de déterminer précisément comment la cellule choisit entre la réparation de l'ADN et l'apoptose. Il semble que lorsque des lésions sur l'ADN ne sont pas trop importantes, la cellule opte pour un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN alors que l'apoptose serait induite après des dommages plus importants.

2.4.1.2 Gènes codant pour des protéines impliquées dans l'arrêt cellulaire

Le rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire est décrit dans la figure 14.

- **P21^{Waf1}**

Le promoteur de ce gène contient 2 séquences spécifiques de liaison pour p53. La transactivation de p21^{Waf1} peut cependant être régulée indépendamment de p53 (Elbendary et al., 1994; Steinman et al., 1994). La fonction du produit de ce gène est la mieux comprise parmi ceux qui permettent un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dépendant de p53. Des fibroblastes dérivés de souris nulles pour p21^{Waf1} soumises à une irradiation exercent un arrêt en phase G1 qui n'est que partiel, ce qui suggère qu'il puisse exister d'autres facteurs pour stopper la cellule en phase G1. p21^{Waf1} est un inhibiteur de nombreuses cyclines kinases (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor). Dans la phase G1/S, cette protéine se lie aux complexes cyclines E/cdk2 et cycline D/cdk4-6 et bloque leur activité kinase. Ces kinases ont pour rôle de phosphoryler Rb (le produit du gène du rétinoblastome), ce qui inactive les fonctions de suppression de croissance. Rb régule négativement la progression du cycle cellulaire en réprimant l'activité du facteur de

transcription E2F lorsqu'il est hypophosphorylé (Weinberg, 1995). Il interagit avec E2F par sa partie C terminale (Endicott and Noble, 1998). Le E2F actif est libéré après que le Rb ait été phosphorylé par des membres de la famille des CDKs (Cyclin Dependent Kinase) et p21^{Waf1} inhibe précisément ces CDKs.

Donc, p21^{Waf1}, en prévenant l'inactivation de Rb, induit un arrêt du cycle cellulaire. Rb est ainsi une cible indirecte de p53 via p21^{Waf1}. Il a été démontré que la présence de Rb fonctionnel était nécessaire pour la régulation de la réplication de l'ADN médiée par p21^{Waf1} (Niculescu, III et al., 1998).

P21^{Waf1} se distingue des autres CDKI par sa capacité à s'associer avec le PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) qui est un facteur essentiel des polymérases de l'ADN δ et ϵ . P21^{Waf1} lie le PCNA sur sa partie N terminale (Chen et al., 1996). Alors que l'effet inhibiteur de p21^{Waf1} sur les complexes cyclines/CDK sur l'arrêt en phase G1 est bien connu, l'effet de l'interaction p21^{Waf1}/PCNA est plus complexe. PCNA est un facteur essentiel de la réplication mais il joue également un rôle dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides. La liaison de p21^{Waf1} avec le PCNA inhibe spécifiquement ses effets sur la progression du cycle mais pas ceux sur la réparation de l'ADN (Cayrol et al., 1998; Chen et al., 1996; Waga et al., 1994). Des cellules portant une p21^{Waf1} mutante incapable de lier PCNA perdent leur capacité de s'arrêter en phases G1 et G2, ce qui montre que cette liaison est impliquée à la fois pour l'arrêt en phases G1 et G2.

Le rôle de p53 dans l'arrêt en phase G2 est moins bien compris que celui en phase G1.

La sur-expression de p53 inhibe l'entrée en mitose, ce qui conduit à une accumulation des cellules en phase G2. Des cellules déficientes pour la p53 peuvent malgré tout s'arrêter dans leur cycle en phase G2. Plusieurs gènes transactivés par p53 sont des médiateurs potentiels de l'arrêt en phase G2 : 14-3-3 σ , GADD45 et également p21^{Waf-1}.

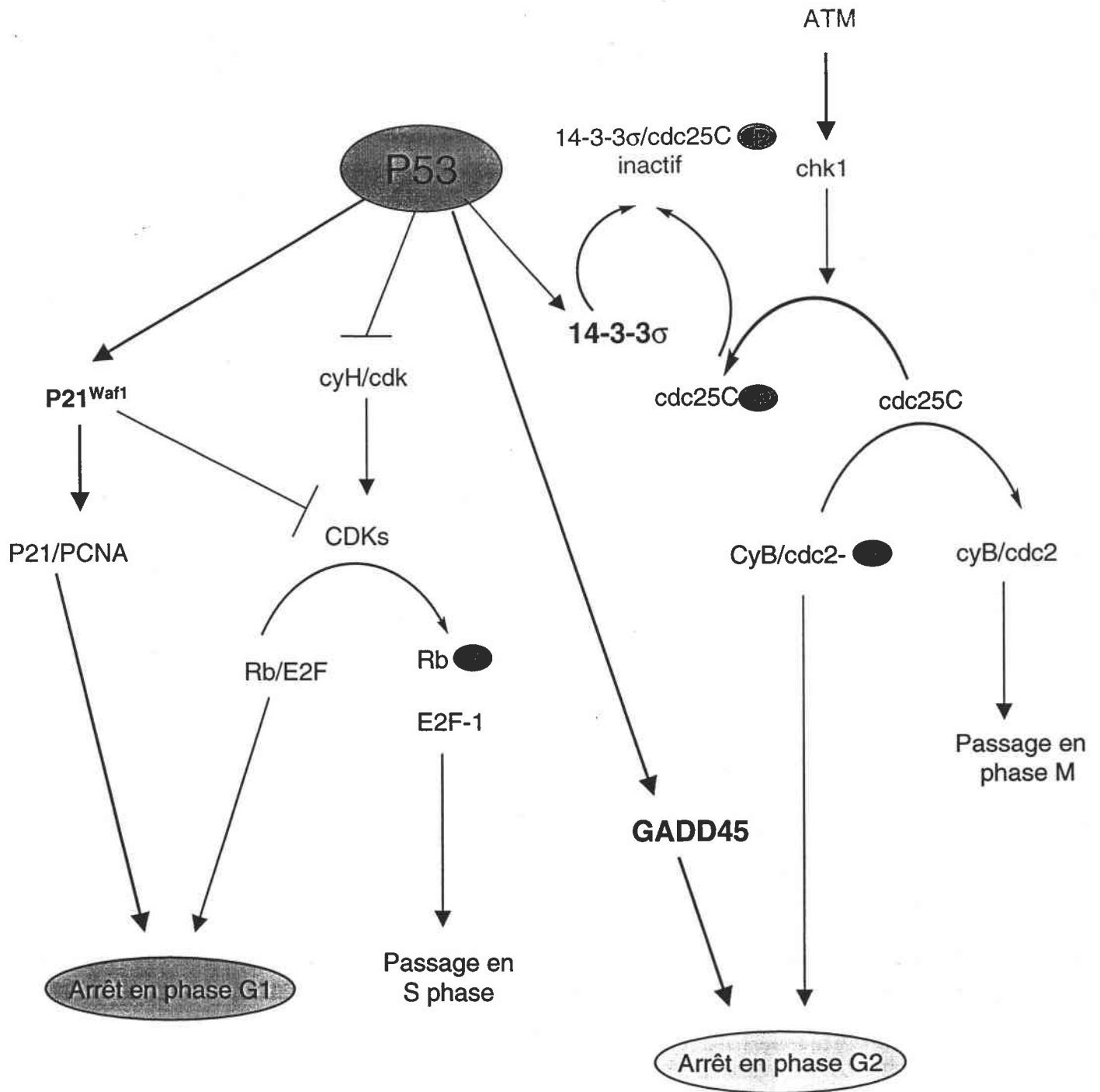


Figure 14: Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire

L'effet majeur de p53 vis à vis du cycle cellulaire est médié par ses gènes cibles : p21^{Waf1}, GADD45 et 14-3-3σ.

- P21^{Waf1} induit l'arrêt du cycle cellulaire de 2 façons: 1) elle se lie au PCNA et empêche ainsi l'activation de l'ADN polymérase σ essentielle pour la réplication de l'ADN. 2) elle inhibe l'activité des CDKs qui phosphorylent le Rb.
- GADD45 entraîne l'arrêt du cycle en phase G2 en inactivant le complexe cyB1/p34^{cdc2}.
- 14-3-3σ stimule un arrêt cellulaire en phase G2 en se complexant avec la tyrosine phosphatase cdc25C.

Schéma d'après Sionot et Haupt, 1999.

- *14-3-3 σ*

Il s'agit d'un homologue des protéines Rad 24 et 25 qui sont connues pour induire un arrêt du cycle chez les levures. L'arrêt induit par 14-3-3 σ résulterait de l'inhibition de la tyrosine phosphatase *cdc25c* qui déphosphoryle et active la *cdc2* kinase lors de la transition G2/M. Cet effet serait renforcé par le fait que p53 forme des complexes stables et spécifiques avec *cdc2*.

- *Gadd45*

Une sur-expression de ce gène inhibe la croissance de cultures cellulaires. *Gadd45* est, en effet, un inducteur de l'arrêt en phase G2/M dépendant de p53. Il induirait l'arrêt en phase G2/M en modulant l'activité du complexe cycline B1/p34^{*cdc2*} qui est impliqué spécifiquement dans le passage de la phase G2 à M. *Gadd45* pourrait inactiver le complexe cycline B1/p34^{*cdc2*} en créant sa dissociation soit par interaction physique avec *cdc2* soit en diminuant l'expression de la cycline B1 (Wang et al., 1999; Zhan et al., 1999). Cet effet de *Gadd45* est spécifique pour un traitement par un agent alkylant et pour des radiations UV mais pas pour les radiations ionisantes (Wang et al., 1999), ce qui suggère l'existence de médiateurs différents qui dépendent du type de stress. Cette protéine se lierait aussi à p21 et PCNA pour moduler l'activité de complexe (Smith et al., 1994)

- *BTG2*

Cette protéine appartient à une famille de gènes récemment identifiés qui exercent des effets anti-prolifératifs (Cortes et al., 2000; Rouault et al., 1996). La sur-expression de *BTG-2* induit un ralentissement de la progression cellulaire en phase G1/S. La protéine *BTG-2* interagit avec une protéine appartenant à un complexe général de la transcription et avec un enzyme arginine méthyl transférase 1 (PRMT1). Elle pourrait ainsi exercer un rôle de modulateur en méthylant certaines protéines (Cortes et al., 2000). L'induction de *BTG2* est très précoce et précède l'expression de p21^{Waf-1}. Néanmoins, son rôle exact et sa régulation ne sont pas encore bien définis.

2.4.1.3 Gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN

P53 est impliquée dans la réparation de certaines lésions sur l'ADN, mais à ce jour peu de gènes exerçant cette fonction ont été identifiés comme étant des gènes cibles de p53. Bien que des souris nulles pour le gène p53 se développent normalement, les cellules non cancéreuses de ces souris âgées d'environ 5 semaines possèdent des modifications génétiques importantes telles que l'amplification de gènes, aneuploïdie et de multiples centrosomes (Fukasawa et al., 1997)

- *P53R2*

Ce nouveau gène cible a été identifié récemment par Tanaka et coll. Cette protéine présente des homologies avec la sous-unité R2 de la ribonucléotide réductase et semble impliquée dans la réparation de l'ADN après un stress induisant p53 (Tanaka et al., 2000). Cependant, l'induction de cette protéine a été observée tardivement après le stress génotoxique.

- *PCNA*

Le promoteur de PCNA contient la séquence consensus d'ADN reconnue par p53. Cependant, sa transactivation dépend du type cellulaire et de la concentration de p53 (North and Hainaut, 2000). Une faible expression de p53 active et stimule la réparation de l'ADN alors qu'une forte expression réprimerait le promoteur de PCNA (Shivakumar et al., 1995). Cet effet dual de p53 n'est pas très bien documenté, mais il pourrait expliquer, en partie, le choix entre apoptose et réparation de l'ADN.

2.4.1.4 Gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques

Les premiers médiateurs apoptotiques dépendant de p53 identifiés étaient Bax et Fas/APO1. Récemment d'autres gènes ont été identifiés, comme par exemple : KILLER/DR5, PIG, IGF-BP3 et PAG608. Il existe, schématiquement, 2 voies apoptotiques différentes régulées par p53 : la voie mitochondriale (figure 15) et la voie des récepteurs membranaires (figure 16).

- *Bax*

Cette protéine de 21kDa appartient à la famille Bcl-x. Pour revue, voir (Reed, 1998). Bax interagit via son domaine BH3 avec les domaines BH1,

BH2 et BH3 de Bcl2 et Bcl-x. Alors que Bax est pro-apoptotique, Bcl2 a un caractère anti-apoptotique. C'est le ratio Bax/Bcl2 qui détermine le potentiel apoptotique de la cellule. Bax et Bcl2 contrôlent l'apoptose au niveau mitochondrial. Il est supposé que les homodimères Bax/Bax forment un pore dans la membrane mitochondriale, ce qui permet la libération du cytochrome C dans le cytoplasme. Ensuite, une cascade d'évènements, expliquée dans la figure 15 va conduire la cellule vers l'apoptose. Apaf-1 (Apoptotic Factor 1) stimule l'activation auto catalytique de la caspase 9, dans le cytoplasme, en présence d'ATP et du cytochrome c (Srinivasula et al., 1998; Zou et al., 1997b). La caspase 9 va ensuite cliver la pro-caspase 3, pour donner la caspase 3 qui est une des caspases effectrices de l'apoptose. La caspase-3 clive la PARP et ce clivage peut être utilisé comme un marqueur de l'apoptose dans certaines cellules. Ce modèle suppose que Bcl-2 prévienne l'apoptose en séquestrant Apaf-1. Très récemment, une nouvelle hypothèse est apparue à partir de résultats qui ont montré que Apaf-1 est une protéine soluble et de localisation distincte de celle de Bcl-2 et de Bcl-x (Hausmann et al., 2000). Ceci suggère que le rôle de Bcl-2 serait plutôt de réguler un adaptateur et une caspase, encore inconnus, en amont d'Apaf-1 et non pas de séquestrer directement Apaf-1.

Des thymocytes ne possédant pas de Bax conservent leur capacité apoptotique suite à une irradiation γ , ce qui n'est pas le cas de thymocytes déficients pour p53. Cependant, des fibroblastes knock-out pour Bax sont déficients pour l'apoptose induite par les lésions sur l'ADN. Ainsi, Bax serait un médiateur important pour l'induction de l'apoptose dépendante de p53. Il semble crucial pour l'apoptose médiée par p53 dans les tumeurs cérébrales et les fibroblastes mais pas pour les thymocytes. De plus, l'activité apoptotique de Bax est importante pour la suppression tumorale. L'expression de Bax peut augmenter la chimiosensibilité de lignées cancéreuses mammaires. De nouveaux médicaments anti-cancéreux visant à diminuer l'expression de bcl2 ou à augmenter l'expression de Bax sont d'ailleurs développés. Certains sont d'ailleurs en phase d'essais cliniques.

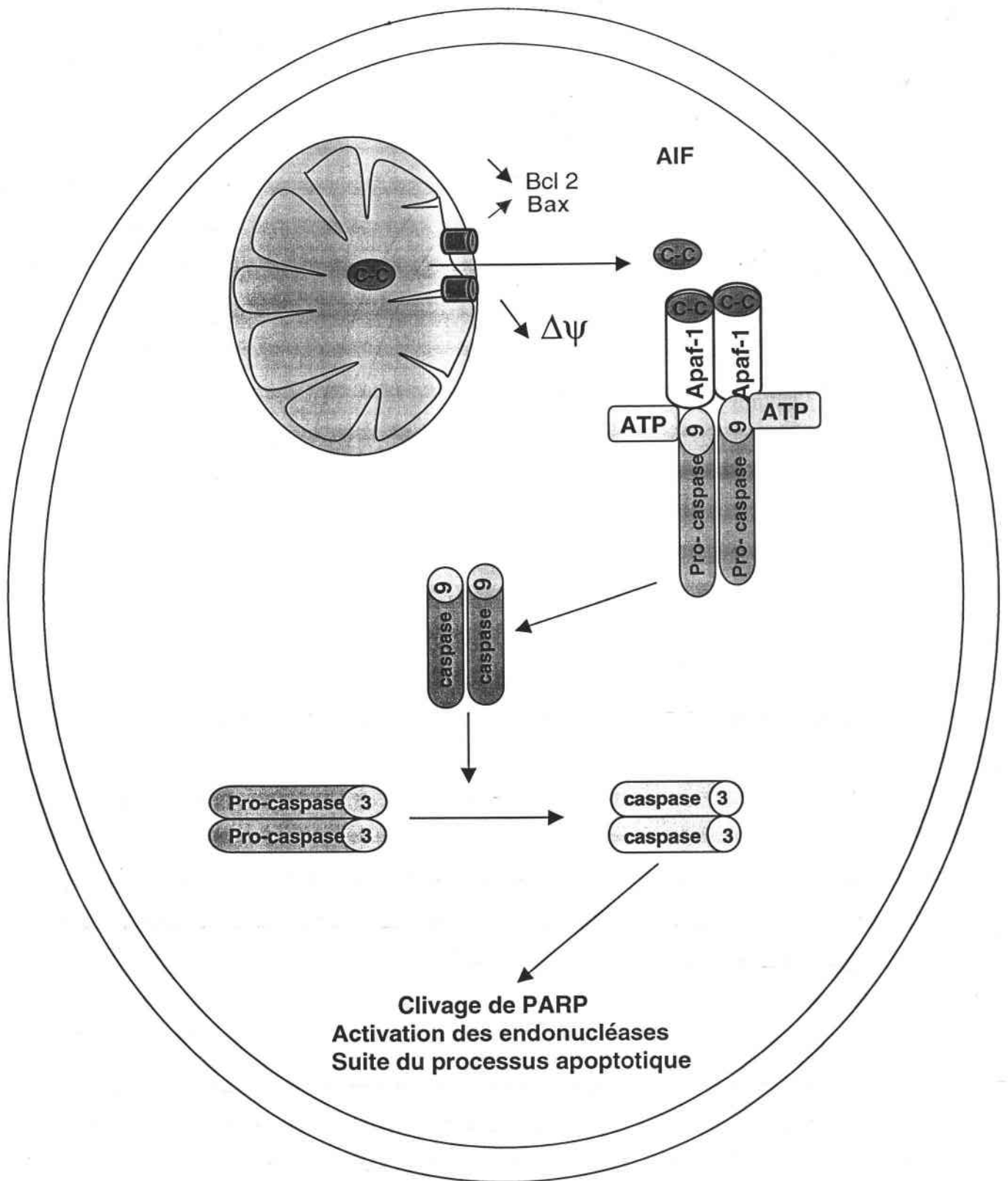


Figure 15: Apoptose par voie mitochondriale

P53 transactive Bax et réprime la transcription de Bcl-2. Lorsque le ratio Bax/Bcl2 est élevé, Bax, sous forme d'homodimère engendre un pore dans la membrane mitochondriale. Celui-ci permettra la migration du cytochrome C et du facteur AIF (Apoptotic Inducer Factor) dans le cytoplasme. Un complexe Cyt c/Apaf-1/pro-caspase 9 se forme et, en présence d'ATP, la procaspase 9 est clivée pour donner sa forme active: la caspase 9. Celle-ci activera à son tour la caspase 3 grâce à son activité protéasique. Cette caspase effectrice clive alors la PARP et les endonucléases sont activées...

- *Fas/Apo1/CD95*

APO1 est en fait le récepteur de Fas. Lorsqu'il est exposé à son ligand, Fas, il se trimérise et recrute le FADD (Fas-associated Death Domain). Le FADD, va ensuite activer une caspase initiateur, la caspase 8, via son DED (Death Effector Domain). Fas est nécessaire pour l'apoptose médiée par les cellules tumorales en réponse à des drogues anti cancéreuses (Friesen et al., 1996) et pour l'apoptose médiée par Myc (Hueber et al., 1997). Bien que l'expression de Fas/APO1 soit régulée par p53 (Owen-Schaub et al., 1995) il semble que les cellules déficientes pour Fas puissent néanmoins médier une apoptose dépendante de p53 (Fuchs et al., 1997). Une étude a suggéré que la translocation du récepteur Fas/APO1 de l'appareil de Golgi vers la surface de la cellule pourrait être un mécanisme apoptotique dépendant de p53 mais indépendant de son activité transcriptionnelle (Benett et al., 1998).

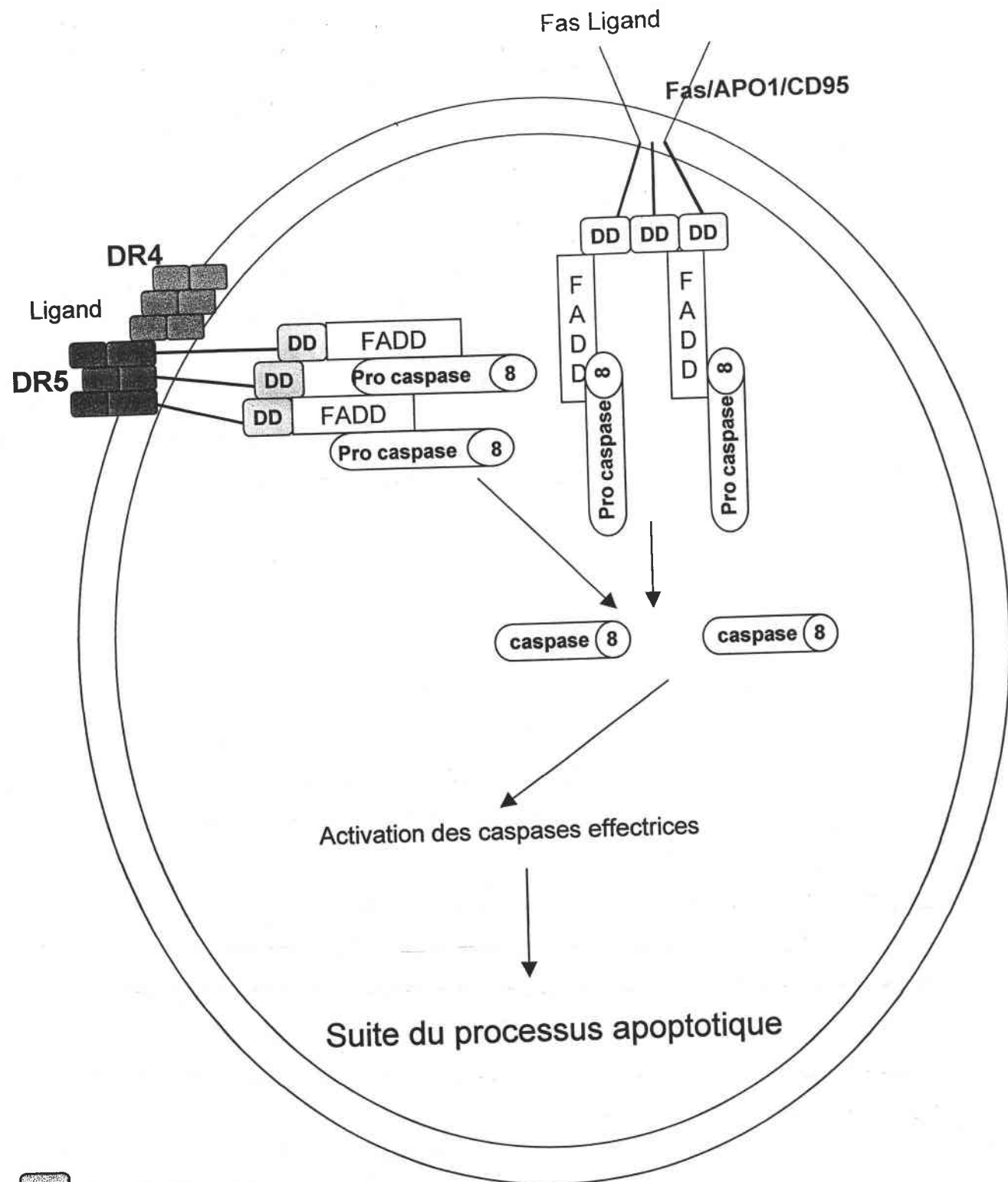
- *Killer/DR5*

Il appartient à la famille des récepteurs TRAIL (TNF-Related-Apoptosis-Inducing Ligand). C'est un gène régulé par p53 à la suite de lésions sur l'ADN induites par exemple par la doxorubicine, l'étoposide et des radiations γ . La voie d'activation par p53 semble impliquer Atm-p53 (Wu et al., 1999). Ce gène est transactivé uniquement dans les cellules en apoptose par voie dépendante de p53.

L'activation de récepteurs de type TRAIL implique une activation des caspases. L'importance de ce système dans l'induction de l'apoptose via p53 n'est pas encore bien déterminée.

- *PIG-3*

PIG-3 est un des gènes parmi la grande famille des PIGs dont la fonction a été récemment identifiée grâce à la technique SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) (Polyak et al., 1997). Il a été démontré que des espèces réactives de l'oxygène sont générées avec une cinétique qui suit l'induction des PIGs dans les cellules subissant le processus apoptotique via une voie dépendante de p53. Cependant, la sur-expression de PIG-3 seule n'induit pas l'apoptose ce qui suggère que d'autres signaux doivent être activés en parallèle (Polyak et al., 1997).



DD Death Domain

Figure 16: Apoptose induite via des récepteurs de TRAIL transactivés par p53.

1) Fas est un membre de la famille des récepteurs de TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducer Factor) et contient un domaine cytoplasmique de mort (DD:Death Domain). Quand le ligand de Fas est lié, le DD de Fas se trimérise et recrute la molécule adaptatrice FADD et la procaspase 8. Ensuite, la procaspase 8 est auto-clivée pour donner la caspase 8 active. Celle-ci va ensuite activer la cascade des autres caspases.

2) KILLER/DR5 peut former des homodimères ou des hétérodimères avec DR4 et stimule le recrutement de FADD et de la pro-caspase 8, ce qui active la caspase 8..

• IGF-BP3

La séquence de transactivation de l'IGF-BP3 (Insulin Growth Factor-Binding Protein 3) pour p53 a été identifiée dans son promoteur par Buckbinder (Buckbinder et al., 1995). Son induction est relativement tardive (Zhao et al., 2000). Cette protéine séquestre IGF1, qui est un signal de survie, ce qui inhibe la stimulation du récepteur de l'IGF1. La répression du récepteur de l'IGF-1 par p53 bloque les voies de survie cellulaire (Prisco et al., 1997). L'action pro-apoptotique de l'IGF-BP3 est médiée par une voie indépendante du récepteur de l'IGF car chez des cultures de fibroblastes nuls pour le récepteur de l'IGF, l'IGF-BP3 induit quand même l'apoptose (Rajah et al., 1997).

Cependant, la nécessité d'une activité transcriptionnelle de p53 pour l'induction de l'apoptose est controversée (Bates and Vousden, 1999). En effet, plusieurs études ont montré que des mutants déficients pour l'activité transactivatrice de p53 peuvent induire l'apoptose, notamment dans les HeLA (provenant de carcinomes utérins), les Saos-2 d'ostéosarcome et les A431 (kératinocytes tumoraux) et des cellules leucémiques (Bates and Vousden, 1999; Guillouf et al., 1998; Haupt et al., 1995). La réponse apoptotique de p53 peut être influencée par de nombreuses variables comme le type cellulaire et le contexte cellulaire. Il a été montré que E2F1 et p53 agissent synergiquement pour induire l'apoptose (Wu and Levine, 1994). Cependant, le mécanisme permettant l'induction de l'apoptose reste mal compris et plusieurs hypothèses coexistent.

2.4.1.5 Gènes codant pour une protéine possédant une autre fonction

p53 transactive le gène de la glutathion peroxydase qui code pour une protéine impliquée dans la défense anti-oxydante (Tan et al., 1999).

P53 transactive également pour des protéines membranaires ou de la matrice nucléaire et pour certains inhibiteurs de l'angiogénèse (Zhao et al., 2000).

2.4.2 Activité de répression

L'activité de répression de p53 participe pleinement à la médiation des effets de suppresseur de tumeur exercée par cette protéine. P53 réprime la

transcription via son domaine N terminal. Son domaine C terminal est également nécessaire car la protéine doit être sous forme tétramérique pour exercer cette fonction (Subler et al., 1994).

P53 réprime la transcription d'un grand nombre de gènes comme par exemple : la topoisomérase II α (Sandri et al., 1996; Wang et al., 1997), la map4 (une protéine associée aux microtubules) (Murphy et al., 1996), la O-6-DNA méthyltransférase (Harris et al., 1996), COX-2 (Subbaramaiah et al., 1999), la iNOS, le mdr1 (MultiDrug Resistance 1) (Chin et al., 1992), Bcl-2 (Haldar et al., 1994; Miyashita et al., 1994), la cycline A, c-fos (Ginsberg et al., 1991) et certains promoteurs viraux (Subler et al., 1992). Il apparaît que p53 réprime l'activité des promoteurs dont l'initiation dépend de la présence de la boîte TATA. P53 agit par interaction protéine-protéine en s'associant avec des facteurs de la machinerie transcriptionnelle, comme par exemple avec la TBP (TATA Binding Protein) (Martin et al., 1993). Dans le cas des gènes de la HSP 70 et de cdc2, p53 réprime leur transcription différemment. En effet, p53 module la liaison d'une protéine à la séquence CCAAT contenue dans leur promoteur (il s'agit de la protéine CBF (CCAAT Binding Factor) pour la HSP70 et de la protéine NF-Y pour cdc2) (Agoff et al., 1993; Yun et al., 1999).

La répression de la transcription de plusieurs gènes participe à l'arrêt de la prolifération médié par p53 ; c'est le cas notamment de la topoisomérase II α , de la primase de l'ADN, de cdc2 et de la protéine de liaison au rétinoblastome RbAp46 (Zhao et al., 2000).

La répression de Bcl2, qui est une protéine anti-apoptotique, agit de concert avec l'induction de Bax pour induire l'apoptose.

La répression de la iNOS et de COX-2 participe à l'atténuation du processus inflammatoire qui induit des lésions sur l'ADN. L'inhibition de la transcription de la O-6-DNA méthyltransférase, par contre, inhibe le processus de réparation de certains types de lésions sur l'ADN (bases méthylées). La SOD 3 (extracellulaire), qui participe à la détoxification

cellulaire est réprimée par la p53. Le rôle de p53 vis à vis des espèces oxygénées est complexe car d'une part, elle inhibe la transcription d'enzymes tels que la iNOS et stimule la transcription de la glutathion peroxydase et d'autre part, elle inhibe certains enzymes de détoxification comme la SOD 3. Cette activité de répression est caractéristique de la p53 sauvage car certains mutants ne possèdent pas cette activité.

2.4.3 Liaison avec des protéines hétérologues

p53 se lie à des protéines variées. L'interaction de p53 avec certaines protéines participe à l'activation de p53 alors que l'interaction avec d'autres protéines permet de médier certains des effets biologiques de p53.

2.4.3.1 Implication dans la régulation de p53

L'interaction des protéines p300/CBP et PARP avec p53 augmente la stabilité de celle-ci (Sionov and Haupt, 1999). D'autres protéines lient p53 et augmentent son activité de liaison spécifique à l'ADN sans affecter sa stabilité; c'est le cas notamment de 14-3-3 σ (Waterman et al., 1998), BRCA1 (Breast Cancer 1) (Zhang et al., 1998) et de SUMO-1, nouvellement découvert. Pour l'instant, l'effet de la sumolation de p53, n'est pas encore bien défini. Il a été proposé que la sumolation de p53 pouvait activer p53 en empêchant son interaction avec d'autres protéines qui se lient sur la partie C terminale de p53, en inhibant la dégradation de p53 par compétition avec l'ubiquitine sur ce résidu, ou encore en séquestrant p53 dans le noyau (Gostissa et al., 1999; Rodriguez et al., 1999). Les conséquences de l'interaction avec 14-3-3 σ ont été décrites précédemment.

C-Jun régulerait négativement p53 en réprimant la transcription de p53 en se liant à un variant du site AP-1 du promoteur de p53.

Mdm 2, comme il a déjà été décrit précédemment, interagit avec p53 et cette interaction a comme effet immédiat d'inhiber l'activité transcriptionnelle de p53 et dans un second temps, de stimuler sa dégradation. L'ubiquitine compte parmi les protéines interagissant avec p53 et qui ont des conséquences sur la stabilité de la protéine.

Certaines oncoprotéines virales, comme par exemple l'antigène du Simian Virus (SV40), la protéine E6 du virus du papillome humain et la

protéine adénovirale E1B interagissent avec p53 et l'inactivent, ce qui favorise l'infection virale.

2.4.3.2 Implication pour les effets biologiques de p53

Comme il a été souligné précédemment, p53 inhibe la transactivation de certains gènes en interagissant avec des protéines de la machinerie transcriptionnelle.

P53, via ses 20 premiers acides aminés, interagit avec RPA (Replication Protein A) et inhibe son activité (Abramova et al., 1997; Dutta et al., 1993). RPA est une protéine essentielle pour la réplication de l'ADN car elle lie l'ADN simple brin et elle possède une activité de réparation des nucléotides par excision. Après des radiations UV, RPA est phosphorylée et ne lie plus p53, ce qui permet à RPA de réparer l'ADN endommagé par excision de nucléotides et à p53 de transactiver ses gènes cibles (Abramova et al., 1997). En fait, la liaison avec p53 permet de réguler l'activité de réparation par excision de nucléotides nécessaire après une exposition à des rayons UV. Le complexe RPA/p53 joue un rôle physique qui lie la réparation de l'ADN avec le contrôle du cycle dépendant de p53.

P53 lie, par sa partie C terminale, et inhibe les hélicases XPB et XPD du complexe TFIIH, *in vitro* et XPB *in vivo* (Wang et al., 1995). P53 inhibe ainsi l'activité hélicase du complexe TFIIH, ce qui pourrait faciliter l'initiation de la réparation par excision de nucléotides (Wang et al., 1995). Ainsi, p53 possède la capacité de moduler la réparation de l'ADN par excision de nucléotides en interagissant avec les hélicases du complexe TFIIH et avec RPA. L'inhibition de l'activité hélicase du complexe TFIIH pourrait conduire à l'apoptose car TFIIH est essentiel pour la viabilité cellulaire. Wang et coll ont identifié les facteurs XPD et XPB comme étant des composants de la voie apoptotique dépendante de p53 (Wang et al., 1996). En effet, des fibroblastes de possédant pas de XPD ni de XPB ne présentent pas d'apoptose dépendante de p53.

P53 lie également des protéines contenant des SH3, via son domaine PXXP. Parmi celles-ci, certaines pourraient être impliquées dans l'apoptose médiée par p53 indépendamment de son activité transcriptionnelle.

P53 interagit avec p33ING1 qui serait une protéine suppresseur de tumeur potentielle. Elle semble impliquée dans l'inhibition de croissance médiée par p53 car la transfection d'ADN anti-sens de p33ING1 inhibe la fonction d'inhibition de croissance de p53.

2.5 NO et p53

2.5.1 Induction de mutations sur p53 par le NO et ses dérivés

Ce sujet a été traité principalement par l'équipe de C.Harris. La iNOS, exprimée lors de l'inflammation, peut produire des quantités de NO suffisantes pour qu'il soit mutagénique. Ambs et coll ont analysé l'expression de la iNOS et les mutations sur le gène TP53 sur 118 tumeurs de côlon (Ambs et al., 1999b). Cette étude a montré que la présence de iNOS est maximale dans les adénomes et que l'activité de la iNOS diminue avec le stade tumoral, pour atteindre le niveau le plus bas dans les tumeurs métastatiques. Une relation dose-réponse a même été mise en évidence entre l'expression de la iNOS et les transitions de type C:G → T:A sur les sites CpG de p53. L'équipe de Souici a confirmé que le NO favorise l'apparition de transition G :C → A :T sur les 5-meC situés principalement sur les sites CpG de la p53. En effet, une co-génération de NO et d'anion superoxyde induit ce type de mutation sur le codon 248 de p53 (Souici et al., 2000).

Les mutations sur les "hot spots" de p53 sont majoritairement des transitions de C vers T. Cependant, les données publiées pour l'instant, n'ont pas montré que des mutations sur d'autres codons étaient associées à l'expression de la iNOS .

2.5.2 Accumulation de p53 dans le noyau de cellules exposées à du NO

Plusieurs études ont mis en évidence une accumulation de p53 dans le noyau de cellules traitées par un donneur de NO (Messmer and Brune; 1996a and b, Sandau et al; 1997). Il est vraisemblable que p53 soit activée via les

lésions induites par le NO et ses dérivés (voir le chapitre lésions sur l'ADN). En effet, le NO et ses dérivés induisent, entre autres, des cassures double brins sur l'ADN et il est connu que ce type de lésions active p53. Brune et coll ont récemment proposé une nouvelle hypothèse qui implique l'inhibition du protéasome (Glockzin et al., 1999). Ces auteurs ont montré que le NO inhibait l'activité du protéasome et que celle-ci serait responsable de l'accumulation de la protéine p53. Néanmoins, cette hypothèse ne peut, pour l'instant, expliquer l'accumulation transitoire de p53. En effet, après un pic d'accumulation de p53, la protéine revient à son niveau basal, ce qui montre que p53 est dégradée après son activation, toujours en présence de NO (Messmer et al., 1994; Messmer and Brune, 1996a; Sandau et al., 1997).

Plusieurs publications ont montré que de fortes concentrations de NO induisent l'accumulation de p53, suivie de l'accumulation de Bax et de l'apoptose. La majorité de ces études ont été pratiquées sur des macrophages RAW 264. D'après Messmer et coll, le niveau de p53 reflète les dommages sur l'ADN et indique le potentiel apoptotique de la cellule exposée (Messmer and Brune, 1996b).

Brockaus et Brune ont étudié précisément l'apoptose induite par le NO dans les macrophages RAW 264.7. Ces derniers ont montré qu'un traitement par un donneur de NO induit l'accumulation de p53, suivie d'une diminution de l'expression de Bclx, de la libération du cytochrome c dans le cytoplasme et enfin de l'activation de la caspase 3 (Brockaus and Brune, 1999). Ceci confirme les résultats d'une étude précédente montrant qu'un traitement par un donneur de NO induisait l'accumulation de p53, un clivage de la PARP et la fragmentation de l'ADN (Messmer et al., 1996a).

De plus, il a été montré que chez des cellules sur-exprimant Bcl2 les caspases ne sont pas activées bien que p53 s'accumule, confirmant ainsi que p53 se situe en amont de la libération du cytochrome c et que l'activation de la caspase 3 est en aval de la libération du cytochrome c. Il a été montré également dans cette publication que la libération du cytochrome c induite par le NO était très diminuée chez des macrophages transfectés par un ADN anti-sens de p53, comparée à la libération qui a lieu chez des macrophages non modifiés. Lorsque les macrophages sont cultivés en présence d'un inhibiteur

de la synthèse d'ATP, ils meurent par nécrose, et non par apoptose, après avoir été exposés à du NO. Ceci confirme que le processus apoptotique comprend des étapes qui nécessitent de l'énergie.

L'ensemble des résultats de cette étude menée par Brockaus et Brune montre le rôle central de la mitochondrie vis à vis de l'apoptose provoquée par le NO.

Des souris homozygotes pour l'allèle nulle de p53 expriment un niveau basal plus élevé que les cellules qui possèdent p53 et produisent beaucoup plus de NO après une infection (Ambs et al., 1998b). Ces résultats ont confirmé l'existence d'une boucle de régulation négative de p53 sur l'expression de la iNOS, qui avait été montrée uniquement *in vitro* auparavant (Forrester et al., 1996). Ainsi, le manque de p53 entraîne une forte expression de la iNOS et une production de NO très importante.

Mortensen et coll ont montré d'une part, que les MCF-7 expriment la eNOS et que la production de NO endogène réduit le taux basal de cellules apoptotiques et que d'autre part, l'apport exogène de NO stimule l'apoptose. Ces mêmes auteurs ont montré que p53 était capable de diminuer la transcription de la eNOS exprimée chez les cellules MCF-7. Ce travail illustre parfaitement le fait que de faibles quantités de NO peuvent inhiber l'apoptose alors que des quantités plus importantes induisent le processus apoptotique (Mortensen et al., 1999).

Il a été démontré dans notre laboratoire que le NO induit un changement de conformation de p53, *in vitro*, ainsi qu'une perte d'activité de liaison à l'ADN. De plus, dans des cellules en culture, la p53 s'accumule de façon temps et concentration dépendante après le traitement par différents donneurs de NO, mais celle-ci a perdu sa capacité de liaison à l'ADN. Il a été suggéré que cette inhibition pourrait être due, notamment, à la formation de ponts disulfures, conséquence de l'oxydation de cystéines. Mon travail de thèse a débuté sur la base de ces résultats. Mon hypothèse de travail est que le NO, bien qu'induisant une accumulation de la protéine, puisse inhiber la fonctionnalité de la p53 en réagissant directement avec elle par modification(s) post-traductionnelle(s).

La notion de régulation de la réponse cellulaire par des stress oxydatif et nitrosant commence à être bien documentée dans la littérature. Très récemment, Marshall et coll ont publié une revue portant sur la régulation redox de l'expression de certains gènes. Ces auteurs ont mentionné p53 parmi d'autres facteurs de transcription qui sont régulés par les conditions redox (par exemple : NFkB, AP-1, c-Jun, c-Fos...) (Marshall et al.,2000).

RESULTATS

1^{ère} PARTIE DES RESULTATS

1.1 Le monoxyde d'azote nitrate des résidus tyrosine de la protéine suppresseur de tumeur p53 chez des cellules MCF-7.

1.1.1 Problématique et objectifs du travail

Il a été démontré, dans notre laboratoire, qu'un traitement par 0,5mM de GSNO (utilisé comme donneur de NO) induisait l'accumulation de p53 dans le noyau des cellules traitées, et parallèlement une augmentation de son activité de liaison à l'ADN *in vitro*. Cependant, pour des concentrations plus fortes en GSNO, la protéine s'accumulait mais celle-ci avait perdu sa capacité de liaison à l'ADN (Calmels et al; 1997). De plus, lorsqu'une protéine recombinante de souris était traitée, *in vitro*, par du S-Nitroso Acétyl Penicillinamine (SNAP, un autre donneur de NO), la p53 passait d'une conformation sauvage (reconnue par l'anticorps Pab 1620) à une forme mutante (reconnue par le Pab240). Ces résultats ont suggéré que le NO puisse modifier chimiquement la protéine p53.

De part la nature de cette protéine, plusieurs types de modifications induites par le NO sont possibles. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées: un effet oxydo réducteur sur le Zn^{2+} , la formation de nitrosothiols et de ponts disulfures ou de NTYR.

Parmi ces différentes possibilités, nous avons choisi de nous concentrer sur la formation de NTYR. La présence de NTYR a été montrée dans des tissus humains de patients atteints de diverses maladies liées à une inflammation chronique. De plus, il a été montré que la formation de NTYR provoque la perte de fonctionnalité de certaines protéines.

1.1.2 Résultats

Afin d'étudier la possibilité que p53 puisse être nitrée par le NO, nous avons traité des cellules MCF-7 par du GSNO et par d'autres agents génotoxiques inducteurs de p53, le Méthylméthane Sulfonate (MMS) et l'irradiation γ . Après 4h de traitement, les protéines totales ont été immunoprécipitées par un anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement

p53 (anticorps CM1) ou par un anticorps dirigé contre les NTYR. Les immunoprécipitats ont ensuite été analysés par Western blot en utilisant un anticorps monoclonal dirigé soit contre p53 (anticorps DO7) soit contre les résidus NTYR. De nombreux contrôles ont été réalisés afin de vérifier que l'on ne détectait pas les chaînes lourdes des IgG dans nos conditions expérimentales.

Nous avons observé une forte augmentation du niveau de NTYR sur la p53 dépendante de la concentration en GSNO (IP p53/WB NTYR). Dans l'expérience inverse (IP NTYR/WB p53), nous avons détecté une augmentation très importante du niveau de p53 dans les immunoprécipitats contenant uniquement les protéines nitrées. Cette formation de NTYR résulte d'un effet bien spécifique du NO car le MMS et l'irradiation γ provoquent une accumulation de p53 sans former de résidus NTYR.

1.1.3 Discussion

Cette étude a démontré que le NO peut réagir directement avec p53 en formant des NTYR lorsque les cellules sont traitées par du GSNO. La nitration de p53 pourrait être un mécanisme d'inactivation de p53 par le NO et ses dérivés. Les concentrations de NO libérées par le GSNO sont proches de celles qui existent lors d'une inflammation chronique. De fait, cette modification post-traductionnelle pourrait exister, *in vivo*, dans des tissus infectés et enflammés de façon chronique et pourrait expliquer, en partie, le rôle de l'inflammation dans l'apparition d'un cancer.

Nitric Oxide Nitrates Tyrosine Residues of Tumor-Suppressor p53 Protein in MCF-7 Cells

Laurence Chazotte-Aubert, Pierre Hainaut, and Hiroshi Ohshima¹

International Agency for Research on Cancer, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France

Received December 9, 1999

It has been reported that mammalian cells incubated with excess nitric oxide (NO) accumulate p53 protein but concomitantly this p53 loses its capacity for binding to its DNA consensus sequence. As nitration of tyrosine residues in various proteins has been shown to inhibit their functions, we examined whether NO nitrates tyrosine residues in p53 protein. MCF-7 cells expressing wild-type p53 were incubated with S-nitrosoglutathione for 4 h and cellular extracts were immunoprecipitated with an anti-p53 antibody. Western blot analyses of immunoprecipitates for p53 or for nitrotyrosine revealed low levels of nitrotyrosine in p53 from untreated cells. Incubation with 2 mM S-nitrosoglutathione induced a significant increase in the nitrotyrosine level in p53 protein compared to nontreated cells. These results suggest that excess NO produced in inflamed tissues could nitrate p53 protein, playing a role in carcinogenesis by impairing functions of this tumor-suppressor protein.

© 2000 Academic Press

Key Words: S-nitrosoglutathione; p53; nitrotyrosine.

Chronic infection and inflammation have been associated with an increased risk of human cancers at various sites (1). During the inflammatory process, large quantities of nitric oxide (NO) are produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS), which is often expressed in inflamed tissues. NO produced in low amounts by constitutive NOS acts as a mediator of physiological functions such as vasodilatation and neurotransmission. In the case of massive production by iNOS, NO plays a role as an essential component of non-specific immune defense, killing invading bacteria or parasites. However, overproduction of NO has also been implicated as a cause of various pathological conditions. This cytotoxic effect of NO has been attributed to reactive nitrogen species such as NO_x and peroxy-

nitrite, which are formed by reactions of NO with oxygen and superoxide anion, respectively. NO and its derivatives can activate or inhibit functions of various enzymes and proteins by reacting with their thiol groups (2, 3) and tyrosine residues (4, 5). Several studies have recently shown that enzymes such as tyrosine hydroxylase (6), manganese superoxide dismutase (7), prostacyclin synthase (8), and cytochrome P450 2B1 (9) are nitrated at tyrosine residues and this nitration has been associated with inactivation of their functions. Ischiropoulos (5) has recently reviewed the biological significance of NTYR, which is present in a variety of human tissues. NTYR levels increase significantly in diverse human diseases such as Alzheimer's disease (10, 11) and inflammatory bowel disease (12) as well as in animal models of diseases such as skin and liver carcinogenesis (13, 14)

The tumor-suppressor p53 protein plays an important role in the cellular response following DNA damage (15, 16). p53 binds specific DNA sequences and regulates the expression of target genes which encode for proteins that control cell cycle progression or lead cells to apoptosis. A close relationship between NO and p53 may exist because, on the one hand, p53 accumulates in cells following incubation with NO-releasing compounds (17–20) and on the other, p53 mediates transcriptional transrepression of iNOS mRNA expression by a negative feedback loop (19, 21). Mutant p53 is unable to exert this function. We have recently reported that high levels of NO can induce a conformational change of wild-type p53 resulting in impairment of its DNA binding activity *in vitro* (20).

In this study, we have shown that incubation of MCF-7 cells with an NO donor results in nitration of tyrosine residues in p53 protein. This tyrosine nitration of p53 is a possible mechanism that could contribute to p53 functional impairment induced by NO. Since p53 isolated from control cells contains low levels of NTYR, it is also possible that p53 functions are regulated, at least in part, by nitration of its tyrosine residues by NO and its derivatives.

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: 33 4 72 73 80 88. E-mail: Ohshima@iarc.fr.



MATERIALS AND METHODS

Materials. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), L-glutamine and penicillin/streptomycin were from Gibco BRL-Life Technology (Grand Island, USA). Fetal bovine serum, protein A sepharose, methyl methanesulfonate (MMS), leupeptin, phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), pepstatin A and aprotinin were from Sigma (St. Louis, MO). S-Nitrosoglutathione (GSNO) was a generous gift of Dr. J.-C. Decout and Professor M. Fontecave (Joseph Fourier University, Grenoble, France). Polyclonal and monoclonal antibodies against NTYR were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, USA), CM1 polyclonal antibody against p53 was obtained from Novocastra (Newcastle, UK). DO7 monoclonal antibody against p53 was from DAKO (Glostrup, Denmark) and monoclonal anti-cytochrome c antibody was from Pharmingen (San Diego, USA). The peroxidase-conjugated goat anti mouse second antibody used for Western blot was from Pierce (Rockford, IL). Chemiluminescence reagent (ECL) and Hyperfilm for enhancement of chemiluminescence came from Amersham Corp (Arlington Heights, USA).

Cell lines and treatment. MCF-7 human breast cancer cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 5% glutamine and 0.5% penicillin-streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 10% CO₂. When cells were at 80% of confluence, they were incubated for 4 h with 1 or 2 mM GSNO or with 2 mM methylmethane sulfonate (MMS). Cells were gamma-irradiated at 7 Gy and harvested 4 h after the irradiation. The cells were also incubated in the presence of 1 mM N-monomethyl-L arginine (NMA) for 20 h.

Protein extraction and immunoprecipitation. To extract total proteins, cells were scraped and lysed for 20 min on ice in IP buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, 0.1% NP40, supplemented in 0.5 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.7 µg/ml pepstatin A). Insoluble material was removed by centrifugation at 10000 g for 10 min and the protein concentration in the supernatant was measured using the Bradford method (Biorad, Munich, Germany). For each sample, supernatant (~3 mg of protein) was precleared by incubation with 1 µg of a non-anti-p53 antibody (mouse anti-cytochrome c monoclonal antibody) for 20 min, then 50 µl of protein A sepharose was added and incubated for 20 min. After centrifugation at 10000 g for 10 min, the supernatant was divided into two tubes. Each tube contained 1.2 mg protein and the final volume (500 µl) was adjusted using IP buffer. The samples were incubated for 2 h at 4°C either with 10 µg of a rabbit polyclonal anti-p53 (CM1) or with 10 µg of a rabbit polyclonal anti-NTYR. Protein A Sepharose beads were added to the immunoprecipitation mixture and incubated for 1 h. After centrifugation at 10000 g for 5 min, the pellet was washed with 1 ml of IP buffer. This procedure was repeated five times. After the last centrifugation, the pellet was resuspended in 80 µl of Laemmli buffer and heated for 5 min at 95°C before electrophoresis to release the proteins from immunoglobulins.

Western-blotting (WB) analysis. Immunoprecipitated proteins (10 µl) were electrophoresed through a 10% polyacrylamide gel and transferred to an Immobilon p15 membrane (Millipore Corp., Bedford, MA). The membranes were blocked for 2 h at room temperature with blocking solution (5% non-fat dry milk, 0.2% Tween 20 in Tris-NaCl, pH 7.4). The membranes were then incubated overnight at 4°C either with an anti-p53 monoclonal antibody (DO7), diluted 1/1000 or with an anti-NTYR monoclonal antibody diluted 1/3500 in a solution containing 1% non-fat dry milk and 0.2% Tween 20 in Tris-NaCl, pH 7.4. After three washes, the membranes were incubated for 2 h with a goat anti-mouse IgG antibody horseradish peroxidase conjugated diluted in the above solution. After three final washes, bands were visualized by chemiluminescence reagent and subsequently exposed to Hyperfilm.

RESULTS

We have examined whether tyrosine residues in p53 protein obtained from GSNO-treated MCF-7 cells are nitrated using immunoprecipitation and WB analyses. In order to avoid the recognition of the heavy and light chain of immunoglobulins of the antibody in the immunoprecipitation by the second antibody used for WB analysis, we employed a rabbit polyclonal antibody for immunoprecipitation and a mouse monoclonal antibody for WB. We performed two control experiments to verify the specificity of our antibodies. Cellular extracts from GSNO-treated MCF-7 cells were immunoprecipitated with an antibody raised against p53 (CM1) and then subjected to WB analysis using either anti-NTYR or anti-p53 antibody (DO7) (Figs. 1A and 1B). We observed a significant increase in NTYR level in GSNO treated cells (Fig. 1A). However, when WB analysis for NTYR was performed in the presence of 10 mM of free NTYR, the band corresponding to NTYR-containing proteins disappeared (Fig. 1C). Similarly, when WB analysis for NTYR was carried out without the first antibody, no band was observed (Fig. 1D), confirming that the results were due to a specific reaction of the antibody against NTYR.

As shown in Fig. 2, we first immunoprecipitated p53 protein from the homogenates of cells treated with 1 or 2mM GSNO and analyzed for NTYR-containing proteins by WB analysis. Although the levels of p53 were not significantly different (Fig. 2A) compared to non-treated cells, a dose-dependent increase in NTYR levels in p53 protein was detected in the same immunoprecipitates (Fig. 2B). We observed increases of 83% and 220%, compared to untreated cells, in cells treated with 1 mM and 2 mM GSNO, respectively (Fig. 2B). In order to confirm these observations, we carried out reverse-order experiments. We first immunoprecipitated NTYR-containing proteins with anti-NTYR antibody and then subjected these extracts to WB analysis using an antibody raised against p53 (Fig. 2C). We found that p53 was present at much higher levels (190% and 280%) in cells treated with 1 mM or 2 mM GSNO than in controls. These results confirmed our observation in Fig. 2B. It should be noted also that control cells, which had not been treated with GSNO, contained p53 protein with a low level of NTYR. Interestingly, this background level decreased by about 10% (Figs. 1B and 1C) when cells were cultured in the presence of NMA, an inhibitor of NOS, whereas the level of p53 increased by 68% (Fig. 2A). This implies that the level of NTYR in p53 protein decreased by about 50% in the presence of an inhibitor of NOS. Taken together, these results show that the GSNO treatment induced nitration of tyrosine residues of p53 protein in a dose dependent manner.

In order to prove that this increase in NTYR levels in p53 was specific to NO or its derivatives, cells were

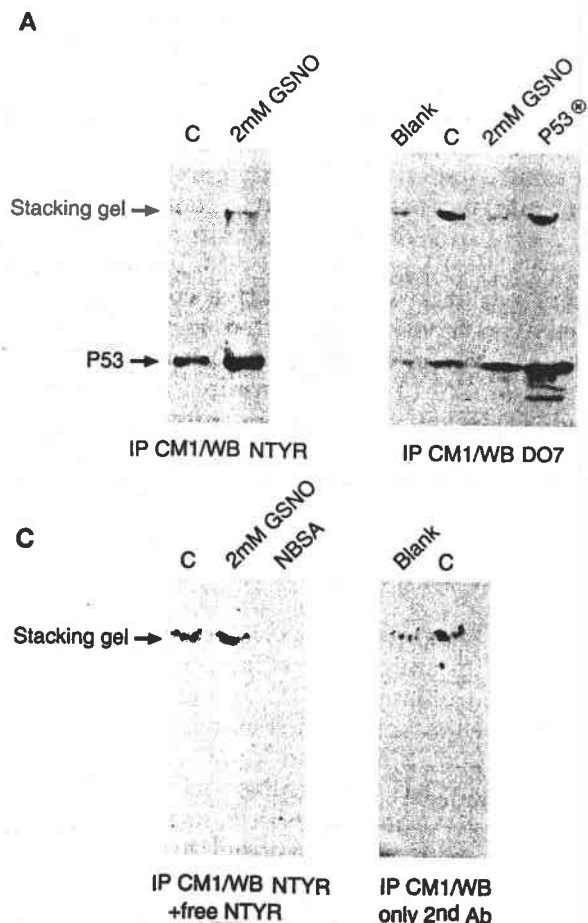


FIG. 1. The presence of NTYR in p53 protein immunoprecipitated from MCF-7 cells and its confirmation by control experiments. MCF-7 cells were incubated in the presence or absence of 2 mM GSNO for 4 h and cellular extracts were immunoprecipitated using a polyclonal antibody raised against p53 (CM1). Immunoprecipitates were analyzed by WB using antibody for either NTYR (A) or p53 (DO7) (B). The same extracts were subjected to WB using anti-NTYR antibody in the presence of 10 mM of free NTYR. Note that BSA containing NTYR residues (NBSA) was also not recognized (C). The same extracts were analyzed without incubation with the first antibody (anti-NTYR antibody) (D). Blank was a negative control obtained by replacing cellular extract with IP buffer during the immunoprecipitation step.

either irradiated (Fig. 2) or treated with MMS for 4 h (Fig. 3) and we repeated the same immunoprecipitation and WB analysis for NTYR and p53. When we performed a WB analysis with anti-p53 antibody on immunoprecipitated p53 protein from irradiated cells (Fig. 2A), we observed a small increase (11%) in p53 level compared to untreated cells. When the same extracts were subjected to WB using an antibody against NTYR, no increase in NTYR levels was detected. There was also no increase in the levels of p53 when proteins immunoprecipitated with anti-NTYR antibody were analyzed with anti-p53 antibody (Fig. 2C). We observed a 2.2-fold increase in p53 level in MMS-treated cells, compared to untreated cells (Fig. 2A) and a small

decrease in NTYR level (Figs. 3B and 3C). Overall, these results indicate that (i) GSNO induced nitration of p53 protein and (ii) MMS and gamma irradiation induced an increase in p53 level without any increase in NTYR level in p53 protein.

DISCUSSION

In this report, we have shown, for the first time, that tyrosine residues in p53 protein are a target for nitration within MCF-7 cells. We have previously reported that recombinant murine wild-type p53 changed its conformation upon treatment with an NO donor, *S*-nitroso-*N*-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) and also lost its DNA-binding activity (20). The loss of DNA-binding activity was also observed with p53 extracted from MCF-7 cells incubated with GSNO (20). This alteration could be due to modification(s) of p53 protein by NO. In the present study, MCF-7 cells incubated with GSNO were found to contain p53 protein with high levels of NTYR residues, compared to untreated cells. In order to confirm this, we carried out several control experiments as well as reverse-order immunoprecipitations and WB analyses with both anti-p53 and anti-NTYR antibodies. Gamma irradiation or MMS treatment increased p53 protein levels without any increase in the level of NTYR, demonstrating that de-

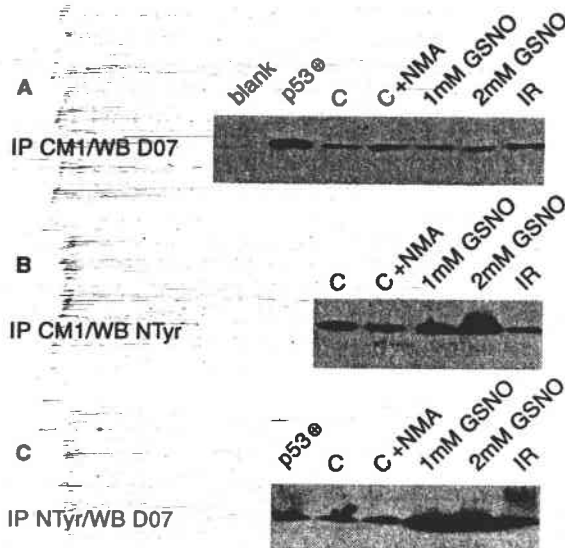


FIG. 2. WB analysis of NTYR contained in p53 protein following immunoprecipitation from MCF-7 cells. Cells were incubated in the presence of 1 mM NMA (iNOS inhibitor) for 20 h or in the presence of 1 and 2 mM GSNO for 4 h. Some cells were also gamma-irradiated and harvested 4 h later. Total protein extracts were then immunoprecipitated either with an antibody raised against p53 (CM1) (A and B), or with an antibody against NTYR (C). Immunoprecipitated proteins were resolved in 10% gels by SDS/PAGE in the presence of a reducing agent and analyzed by WB using either a monoclonal antibody (DO7) which recognizes both mutant and wild-type forms of p53 (A and C) or a monoclonal antibody against NTYR (B).

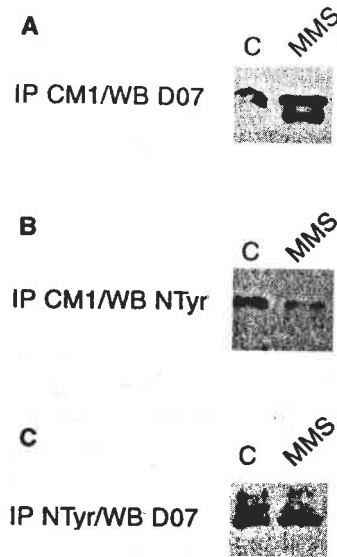


FIG. 3. Effect of MMS treatment on p53 nitration in MCF-7 cells. Cells were treated with 2 mM MMS for 4 h. Total protein extracts were immunoprecipitated either with an antibody raised against p53 (CM1) (A and B) or with an antibody against NTYR. WB analysis was performed using the monoclonal antibody against p53 (DO7) (A and C) or using the monoclonal antibody against NTYR (B).

tion of NTYR is not due to an artefact and that NTYR formation is specifically mediated by NO or its derivatives. Preliminary experiments also showed that p53 protein in MCF-7 cells was nitrated following incubation with other NO donors than GSNO (spermine NONOate and SIN-1). On the basis of these results, we conclude that p53 tumor suppressor protein is nitrated in MCF-7 cells following GSNO treatment. Although the effects of tyrosine nitration on p53 protein conformation and DNA-binding activity remain to be determined, our results suggest that this phenomenon may play a role in the inhibition of p53 protein function by high levels of NO. Many recent studies have demonstrated that nitration of tyrosine residues in proteins and enzymes results in their inactivation (see introduction).

A low level of nitrated p53 was detected in the extracts from untreated cells, indicating that low levels of NTYR were present endogenously in p53 protein of MCF-7 cells. When cells were cultured in the presence of NMA (an inhibitor of NOS), the NTYR level decreased, suggesting that NO produced by NOS is involved in NTYR formation in p53. MCF-7 cells, like other human breast cancer cells, have been reported to express endothelial NOS constitutively (22). Some other proteins such as prostacyclin synthase have also been reported to be nitrated endogenously in normal aortic bovine vessels (23). Our present study also suggests that p53 functions may be regulated post-translationally by tyrosine nitration. A recent study suggests the occurrence of a new enzyme, which removes nitro groups from NTYR-containing proteins (24).

The increased levels of NTYR have been correlated with the expression of iNOS in inflamed human colonic epithelium (12) and also in many other human diseases (5). The concentrations of NO that were released by the NO donor in the present study are similar to those formed locally under intense inflammatory conditions. GSNO (1 mM) has been reported to generate NO at the rate of 1 to 4 $\mu\text{mol/liter/min}$ in culture medium containing 10% fetal bovine serum (25). In inflamed mucosa from patients with ulcerative colitis, increased NOS activities have been reported, ranging from 0.55 to 10 nmol/min/g of tissue (26, 27), corresponding to production of 0.5–10 $\mu\text{mol/liter/min}$ in these tissues. Although GSNO is not a strong nitrating agent by itself *in vitro* (28), within the cell NO released from GSNO could react with superoxide anion to form peroxynitrite, a strong nitrating agent. NO may also react directly with tyrosyl radicals to form 3-nitroso or O-nitroso tyrosine, which is in turn oxidized to NTYR (29, 30).

It has been suggested that tyrosine residues next to glutamate in an amino acid sequence could be easily nitrated in neurofilaments (31). In human p53 protein there are three tyrosines which match these characteristics, i.e., Y 205, Y 220 and Y 327. These tyrosine-glutamate sequences are localized in the central core domain as well as in the tetramerisation domain of p53. Further studies are required to identify which tyrosine residues are nitrated in p53 and whether the nitration of tyrosine residues is associated with the loss of p53 functionality.

In summary, we have shown that p53 protein can be nitrated after treatment of MCF-7 cells with the NO donor GSNO. This tyrosine nitration may be, at least in part, a mechanism for functional impairment of wild-type p53, which we reported previously (20). This post-translational modification of p53 may occur through overproduction of NO in inflamed tissues, playing an important role in cell growth and cell death as well as in carcinogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

The work reported in this paper was undertaken during the tenure of a fellowship awarded by the International Agency for Research on Cancer to Mrs. L. Chazotte-Aubert. The authors thank Mrs. C. Meplan for her advice concerning the protocol for immunoprecipitation.

REFERENCES

- Ohshima, H., and Bartsch, H. (1994) *Mutat. Res.* **305**, 253–264.
- Mohr, S., Hallak, H., de Boitte, A., Lapetina, E. G., and Brune, B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9427–9430.
- Li, J., Billiar, T. R., Talanian, R. V., and Kim, Y. M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 419–424.
- Ducrocq, C., Blanchard, B., Pignatelli, B., and Ohshima, H. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 1068–1077.
- Ischiropoulos, H. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 1–11.

6. Ara, J., Przedborski, S., Naini, A. B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R. R., Horwitz, J., and Ischiropoulos, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7659-7663.
7. MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P., Kerby, J. D., Beckman, J. S., and Thompson, J. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11853-11858.
8. Zou, M., Martin, C., and Ullrich, V. (1997) *Biol. Chem.* **378**, 707-713.
9. Roberts, E. S., Lin, H., Crowley, J. R., Vuletich, J. L., Osawa, Y., and Hollenberg, P. F. (1998) *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1067-1074.
10. Good, P. F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C. W., and Perl, D. P. (1996) *Am. J. Pathol.* **149**, 21-28.
11. Smith, M. A., Richey, H. P., Sayre, L. M., Beckman, J. S., and Perry, G. (1997) *J. Neurosci.* **17**, 2653-2657.
12. Singer, I. I., Kawka, D. W., Scott, S., Weidner, J. R., Mumford, R. A., Riehl, T. E., and Stenson, W. F. (1996) *Gastroenterology* **111**, 871-885.
13. Robertson, F. M., Long, B. W., Tober, K. L., Ross, M. S., and Oberyszyn, T. M. (1996) *Carcinogenesis* **17**, 2053-2059.
14. Ahn, B., Han, B. S., Kim, D. J., and Ohshima, H. (1999) *Carcinogenesis* **20**, 1337-1344.
15. Lane, D. P. (1992) *Nature* **358**, 15-16.
16. Levine, A. J. (1997) *Cell* **88**, 323-331.
17. Messmer, U. K., Ankarcrone, M., Nicotera, P., and Brune, B. (1994) *FEBS Lett.* **355**, 23-26.
18. Messmer, U. K., and Brune, B. (1996) *Biochem. J.* **319**, 299-305.
19. Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S. E., Kapust, R. B., Spillare, E. A., Weinberg, W. C., Felley-Bosco, E., Wang, X. W., Geller, D. A., Tzeng, E., Billiar, T. R., and Harris, C. C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2442-2447.
20. Calmels, S., Hainaut, P., and Ohshima, H. (1997) *Cancer Res.* **57**, 3365-3369.
21. Ambs, S., Hussain, S. P., and Harris, C. C. (1997) *FASEB J.* **11**, 443-448.
22. Zeillinger, R., Tantscher, E., Schneeberger, C., Tschugguel, W., Eder, S., Sliutz, G., and Huber, J. C. (1996) *Breast Cancer Res. Treat.* **40**, 205-207.
23. Zou, M. H., Leist, M., and Ullrich, V. (1999) *Am. J. Pathol.* **154**, 1359-1365.
24. Kamisaki, Y., Wada, K., Bian, K., Balabanli, B., Davis, K., Martin, E., Behbod, F., Lee, Y. C., and Murad, F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11584-11589.
25. Wink, D. A., Cook, J. A., Pacelli, R., DeGraff, W., Gamson, J., Liebmann, J., Krishna, M. C., and Mitchell, J. B. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **331**, 241-248.
26. Boughton-Smith, N. K., Evans, S. M., Hawkey, C. J., Cole, A. T., Balsitis, M., Whittle, B. J., and Moncada, S. (1993) *Lancet* **342**, 338-340.
27. Rachmilewitz, D., Stamler, J. S., Bachwich, D., Karmeli, F., Ackerman, Z., and Podolsky, D. K. (1995) *Gut* **36**, 718-723.
28. Ohshima, H., Celan, I., Chazotte, L., Pignatelli, B., and Mower, H. F. (1999) *Nitric Oxide* **3**, 132-141.
29. Gunther, M. R., Hsi, L. C., Curtis, J. F., Gierse, J. K., Marnett, L. J., Eling, T. E., and Mason, R. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17086-17090.
30. Goodwin, D. C., Gunther, M. R., Hsi, L. C., Crews, B. C., Eling, T. E., Mason, R. P., and Marnett, L. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8903-8909.
31. Crow, J. P., Ye, Y. Z., Strong, M., Kirk, M., Barnes, S., and Beckman, J. S. (1997) *J. Neurochem.* **69**, 1945-1953.

1.2 Le NO inhibe la réponse de p53 face à l'irradiation et induit l'apoptose chez des cellules MCF-7.

1.2.1 Problématique et objectifs du travail

Il a été montré précédemment qu'une concentration de 1mM GSNO induisait un changement de conformation de p53 *in vitro* et inhibait son activité de liaison spécifique à l'ADN (Calmels et al., 1997). De plus, nous avons démontré que le NO réagit directement avec p53 pour former des résidus NTYR.

Dans cette étude, notre but est d'analyser l'impact du NO sur la fonctionnalité de p53 et sur ses effets biologiques. Nous avons également été amené à étudier si le NO exerçait une action pro-apoptotique sur les cellules MCF-7.

1.2.2 Résultats

1.2.2.1 Accumulation de la protéine p53 et effets sur son activité de liaison à l'ADN.

Nous avons montré que la protéine p53 s'accumule dans le noyau des cellules traitées par le GSNO. L'activité de liaison spécifique à l'ADN de p53 augmente très fortement lorsque les cellules ont été traitées par 0.5mM GSNO. Cependant, cette activité diminue pour des concentrations plus élevées en GSNO. Ceci suggère que des quantités relativement élevées de NO inhibe l'activité de p53.

1.2.2.2 Le NO inhibe la réponse à l'irradiation γ

- *Analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux*

Des cellules MCF-7 ont été incubées pendant 4h en présence de différentes concentrations de GSNO puis soumises à une irradiation γ de 5 grays. Le milieu de culture a été remplacé 1h après l'irradiation et les cellules sont récupérées 12h après pour être analysées en cytométrie de flux.

L'irradiation induit un arrêt du cycle cellulaire en phases G1 et G2 (les cellules en phase S ne représentent que 4% de la population cellulaire). Les cellules pré-incubées en présence de 0,25mM GSNO sont arrêtées dans leur cycle en phases G1 et G2, comme les cellules soumises uniquement à l'irradiation. En revanche, il est très intéressant de remarquer qu'une pré-incubation en présence de 0,5, 0,75 et 1mM GSNO inhibe l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'irradiation et stimule même la division cellulaire (les cellules en phase S représentent environ 20%).

- *Etude de l'activité de liaison spécifique à l'ADN de p53*

Les cellules ont été traitées de la même façon que précédemment, excepté le fait que les protéines nucléaires ont été extraites 3h après le changement de milieu.

Nous avons observé que la protéine p53 a perdu sa capacité de lier spécifiquement l'ADN chez les cellules qui ont été exposées à 0,5 et 0,75mM GSNO avant l'irradiation. Ces résultats suggèrent que la perte d'arrêt du cycle cellulaire soit due à l'inactivation de p53 par la présence de NO.

- *Etude de l'expression de p53 et p21^{Waf-1}*

Afin de vérifier l'hypothèse ci-dessus, nous avons étudié l'expression de p53 et de son gène cible p21^{Waf-1} qui est considéré comme le responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 après l'irradiation. Nous avons observé une forte accumulation de la protéine p53 dans le noyau des cellules irradiées. Cette accumulation est visualisée également pour les cellules prétraitées par 0,25, 0,5 et 0,75 mM de GSNO avant l'irradiation. Il est très intéressant de remarquer que l'expression de la protéine p21^{Waf-1} est élevée chez les cellules irradiées et celles prétraitées par 0,25mM GSNO alors qu'elle est très faible chez celles qui ont été prétraitées par des concentrations plus élevées de GSNO. L'expression de p21^{Waf-1} est ainsi corrélée avec le cycle cellulaire visualisé par cytométrie de flux ce qui démontre le rôle décisif de p53 dans l'arrêt du cycle. L'ensemble de ces résultats prouve que le NO inhibe la réponse cellulaire à l'irradiation médiée par p53. Nous avons observé que 40% des cellules traitées par 1mM de GSNO, avec ou sans irradiation, étaient en phase subG1.

1.2.2.4 Induction de l'apoptose par le NO

- *Etude par cytométrie en flux*

Nous avons également analysé le cycle cellulaire de cellules incubées pendant 16h en présence de 1mM GSNO: nous avons observé que 50% des cellules étaient en phase SubG1.

- *Analyse en microscopie en fluorescence et en contraste de phase*

Nous avons confirmé l'apoptose chez des cellules traitées pendant 16h en présence de 1mM GSNO par microscopie en fluorescence après coloration par du Hoechst.

Nous avons ensuite tenté de déterminer si l'apoptose induite par le GSNO se passe de manière indépendante de p53. Etant donné que la sensibilité au NO varie d'un type cellulaire à l'autre, nous avons choisi d'utiliser les cellules MN1/MDD2 qui sont dérivées de la lignée MCF-7. Les cellules MDD2 ont été transfectées de façon stable par un plasmide contenant un fragment d'ADNc de p53 codant pour le domaine d'oligomérisation (DD2) inséré dans un vecteur *Neo*. L'expression de DD2 rend la p53 inactive. Les cellules MN1 ont été transfectées par le plasmide vide.

Nous avons été surpris de constater que les MN1/MDD2 sont toutes les 2 insensibles au traitement par le GSNO (résultat non présenté dans le papier soumis).

Il est très intéressant de remarquer que l'ajout de L-NAC (L-N-Acétyl Cystéine, qui est un précurseur du glutathion) inhibe complètement l'apoptose induite par 1mM GSNO chez les cellules MCF-7. Nous pouvons ainsi proposer que les MN1/MDD2 pourraient exprimer des niveaux plus élevés de systèmes de défense anti-oxydante, ce qui expliquerait leur insensibilité apparente au NO.

- *Etude de l'expression de Bax*

Des études précédentes ont montré qu'un traitement par un donneur de NO induisait l'accumulation de p53 et de Bax, suivie de l'apoptose chez des macrophages murins. Comme nous avons montré que p53 perd sa capacité

de liaison spécifique à l'ADN, nous avons voulu examiner si nous observions une accumulation de Bax dans notre modèle.

Nous avons montré une accumulation de Bax en fonction du temps et de la concentration en GSNO, ce qui confirme les études précédentes mais semble infirmer nos résultats qui montrent, qu'après un traitement par 1mM GSNO, p53 est incapable de transactiver ses gènes cibles. Nous avons donc étudié la possibilité que Bax soit transactivé indépendamment de la voie p53.

Etant donné que les MN1/MDD2 sont insensibles au GSNO, ce ne sont pas de bons modèles pour étudier l'expression de Bax. Nous avons donc utilisé les cellules HCT 166 qui existent en 2 génotypes: p53^{+/+} et p53^{-/-}. Il a été observé que Bax s'accumule chez les cellules traitées par 0.5mM et 1mM GSNO aussi bien chez les cellules p53^{+/+} que chez les p53^{-/-}. Ce résultat original montre que Bax peut être transactivé de façon indépendante de p53 chez des cellules exposées à du GSNO.

1.2.3 Discussion

Nous avons montré qu'un traitement par 1mM GSNO induit la perte d'activité de liaison spécifique à l'ADN de p53 qui permet la transactivation de ses nombreux gènes cibles. De plus, les cellules prétraitées par une certaine concentration de GSNO (effet observé à partir de 0,5mM) sont incapables de s'arrêter dans leur cycle après exposition à des radiations ionisantes. Il est admis que l'arrêt du cycle cellulaire après exposition à une irradiation γ est principalement médié par p53, notamment pour l'arrêt en phase G1 via l'induction de p21^{Waf-1}. Dans le cas d'une pré-incubation en présence de 0,5mM et de 0,75mM GSNO, les cellules continuent à se diviser en présence de lésions sur l'ADN induites à la fois par le NO et par l'irradiation. Ces données démontrent clairement que le NO empêche p53 d'exercer ses fonctions biologiques et ainsi de jouer son rôle onco-suppressif.

Nous avons également montré que le NO exerce une action pro-apoptotique sur les cellules MCF-7. Il apparaît néanmoins que cet effet dépend du type cellulaire car les MN1/MDD2, dérivées des cellules MCF-7 sont, quant à elles, résistantes au GSNO. La première explication serait que

les cellules MN1/MDD2 possèdent des défenses anti-oxydantes beaucoup plus performantes que celles des MCF-7, notamment un niveau de glutathion plus élevé car nous avons observé que la L-NAC protégeait les MCF-7. Il est également possible que les cellules MN1/MDD2 expriment des niveaux plus élevés de thioredoxine, un composé aux propriétés anti-oxydantes vis à vis des protéines. Il est également possible que la sélection par l'antibiotique à laquelle les MN1/MDD2 ont été soumises ait permis de sélectionner des cellules plus résistantes que la lignée d'origine. La troisième possibilité serait que ces types cellulaires n'expriment pas les mêmes caspases. En effet, une étude a comparé l'induction de l'apoptose sur des cellules MCF-7 de plusieurs laboratoires et a constaté des différences inter-laboratoires importantes. Il a été observé que la plupart ne possède pas de caspase-3 (une des caspases effectrices du processus apoptotique) et que certaines se soient différenciées de la lignée originelle.

Nos résultats sont en accord avec des études précédentes montrant une accumulation de p53 et de Bax suivie de l'apoptose. Nous avons cependant démontré que la succession de ces 2 évènements n'est pas de cause à effet car la protéine Bax peut s'accumuler indépendamment de p53, ce qui est original.

NO suppresses p53 function and induces apoptosis in MCF-7 cells

Laurence Chazotte-Aubert, Olivier Pluquet, Pierre Hainaut and Hiroshi Ohshima

Molecular carcinogenesis

ABSTRACT

The p53 tumor suppressor protein is a transcription factor which plays a major role in DNA damage response. The p53 protein binds to DNA specific sequence to transactivate its target genes involved either in cell cycle arrest, DNA repair or apoptosis. We had previously reported that NO nitrates tyrosine residues of p53 protein within human breast cancer MCF-7 cells (6). Here, we demonstrated that the presence of relative high concentration of GSNO impaired the DNA binding capacity of p53 protein, thus confirming our previous data (Calmels et al, 1997). Furthermore, MCF-7 cells pretreated in the presence of 0.5 and 0.75mM GSNO for 4h prior to γ irradiation failed neither to arrest in G1 phase of the cell cycle nor to express the p53 target gene p21^{Waf-1}. These data were well correlated with the loss of DNA binding capacity of p53 protein. Altogether, our results strongly suggest that NO impaired the functionality of p53 tumor suppressor protein.

We also found that a treatment in the presence of 1mM GSNO for 16h induced apoptosis of MCF-7 cells and this was in good agreement with the accumulation of the pro-apoptotic protein Bax. However, we demonstrated that, following a treatment with GSNO, Bax could accumulate by a p53 independent pathway.

(208 words)

INTRODUCTION

Chronic infection and inflammation is associated with an increased risk of human cancers at various sites (24). During the inflammatory process, large quantities of nitric oxide (NO) are produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS), which is expressed in immune cells such as macrophages, monocytes and neutrophils. When NO is produced in a low amount by constitutive NOS, it acts as a mediator of various physiological functions such as vasodilatation, platelet aggregation and neurotransmission. However, in the case of massive production by iNOS during inflammation, NO is considered as an essential component of non-specific immune defense. NO kills invading bacteria or viruses, but can also damage the normal cells and tissues of the host. These detrimental effects have been attributed to reactive nitrogen species such as NO_x and peroxynitrite, which are formed by the reaction of NO with oxygen and anion superoxide, respectively.

Reactive nitrogen and oxygen species are considered as major compounds responsible for tissue damage induced during inflammation. NO and its derivatives can activate or inhibit the activity of various proteins and enzymes by reacting with their thiol (11; 32) and tyrosine residues (14; 21) or by oxidizing their metals (Zn²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺) (3; 26). NO and its derivatives can also nitrate (35; 36), oxidize (7) or deaminate (19) DNA bases and also induce DNA strand breaks (29; 30).

The p53 protein, which is a zinc dependent transcription factor, plays a major role in the cellular response following DNA damage. It has been previously shown that p53 accumulated in the nuclei of cells exposed to a NO donor (8; 18; 27). In normal cells, p53 levels are low, due to its rapid turn-over through proteolytic degradation which is mediated by Mdm2 (34) and probably also by JNK (9; 10). Following DNA damage, p53 is activated and stabilized through various post-translational modifications such as phosphorylation, acetylation and glycosylation (12). The target genes of p53 transcriptional activity include p21^{Waf1} (a cyclin dependant kinase

inhibitor) (1; 4), 14-3-3 σ (13) and GADD45 (37), all involved in cell cycle arrest and also Bax, Fas/APO-1 (2; 22) or killer/DR5 and p53AIP1 (20), all involved in apoptosis.

The mechanisms that lead damaged cells to select apoptosis or cell cycle arrest as response to p53 induction are poorly understood. Several studies have shown that the p53 protein is intrinsically sensitive to oxidation-reduction (17; 23). The DNA binding domain of the protein contains reactive system, and this oxidation can lead to conformational change and to inhibition of DNA-binding capacity.

We have previously reported that NO could induce a conformational change of wild type p53, which resulted in impairing its DNA binding activity *in vitro* (5). Recently, we also demonstrated that NO could react with p53 protein to form nitrotyrosine residues within MCF-7 cells and we proposed that nitrotyrosine formation could be another post-translational modification of p53 protein (6). In the present study, we have evaluated the effects of NO on p53-mediated response in intact cells. We found that MCF-7 cells pre-incubated in the presence of sub-toxic doses of a NO donor failed to arrest in their cycle following γ irradiation. This loss of γ irradiation response was correlated with the non-accumulation of p21^{Waf-1} protein and the loss of DNA binding activity of p53 of GSNO treated cells. We also demonstrated that NO could induce apoptosis of MCF-7 cells and that the pro-apoptotic Bax protein could be induced by a p53 independent manner.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and extracts

Human breast cancer MCF-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagles medium (Gibco-BRL, Life technologie, Inc) supplemented with 10% fetal bovine serum, 5% glutamine and 0.5% penicillin-streptomycin at 37°C in humidified

atmosphere containing 10% of CO₂. Human colon carcinoma cell lines HCT 116 are isogenic excepted for the presence versus absence of p53. HCT 116 cells were cultured in Mc Coy's 5 α medium supplemented in the same manner than MCF-7 cells in humidified atmosphere containing 5% CO₂. HCT 116 cell lines were a generous gift from P. Vogelestein (John Hopkins hospital, Baltimore, USA).

Cells were treated at 80% of confluence with different concentrations of GSNO dissolved in culture medium. GSNO was a generous gift of Dr J-C Decout and Prof M. Fontecave (Joseph Fourier University, Grenoble, France). TNF α and cycloheximide were purchased from Sigma (Sigma Chemical Co ; USA)

Nuclear proteins extraction

Control and treated cells were washed with PBS, scraped into a solution containing 20mM HEPES pH 7.6, 20% glycerol, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% NP40 and 10mM NaCl, supplemented in 0.5 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.7 μ g/ml pepstatin A. After a centrifugation at 2000g for 5 min, the supernatant containing the cytoplasmic extracts were discarded. The pellet was resuspended in the same solution excepted NaCl concentration (500mM instead of 10mM) and incubated on ice for 30 min. Nuclear extracts were obtained after a centrifugation at 15000g for 15 min at 4°C and stored at -80°C.

Total proteins extraction:

Cells were washed with PBS, scraped and incubated for 10 min on ice in a solution containing 20mM HEPES pH 7.6, 20% glycerol, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% NP40 and 500mM NaCl, supplemented in the same proteases inhibitors as described previously. Then, supernatant containing total protein, was collected following a centrifugation at 2500 rpm at 4°C and stored at -80°C.

Western-blotting

20 μ g of protein dissolved in Laemmli buffer were electrophoresed through a 12% polyacrylamide gel and electrophoretically transferred to an immobilon p15 membrane (Millipore Corp., Bedford, MA). The PVDF membranes were blocked for 2 h at room temperature with blocking reagent (5% non-fat dry milk, 0.2% Tween 20 in Tris-NaCl pH 7.4). Then, the membranes were cut and the upper part was incubated with the monoclonal antibody anti-P53 DO7 (DAKO, Denmark) or with the anti-actin antibody C-2 (Santa Cruz, USA). The lower part of the membrane was incubated either with a rabbit polyclonal antibody anti-Bax, N-20 (Santa Cruz, USA) or with a monoclonal antibody anti-p21^{Waf-1}, C-19 clone, (Santa Cruz, USA). The membranes were incubated overnight at 4°C with these antibodies diluted in a solution containing 1% non-fat dry milk, 0.2% Tween 20 in Tris-NaCl pH 7.4. After three washes, the membranes were incubated for 2h with the corresponding second antibody (goat anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat peroxidase conjugated, Pierce), diluted in the above buffer. After three final washes, the proteins were visualized by chemiluminescence reagent (ECL, Amersham Corp; UK), and subsequently exposed to hyperfilm-enhanced chemiluminescence (Amersham Corp, UK).

DNA binding assay

The double-stranded p53 consensus binding sequence 5'-GGGCATGTCCGGGCATGTCC-3' and an oligonucleotide containing the OCT-1 binding sequence 5' GACCACCTGGGTAATTTGCATTTCTAAAATA-3' were end labeled with [γ ³²P] ATP (Amersham, UK). as described previously (31). Binding assays contained 0.5 ng ³²P-labeled double stranded oligomers, 2 μ g sonicated herring sperm DNA (Promega, USA), 5 μ g BSA, 4mM DTT, 100ng Pab 421 antibody (Oncogene Science) and 10 μ g nuclear extracts. The Pab421 supershifts and stabilizes p53-DNA complexes. Binding reactions were incubated for 30min at room temperature. Reaction products were analyzed by electrophoresis onto a 4% non-denaturing polyacrylamide gel in Tris Borate EDTA buffer for 2h at 120V (31).

Cell cycle analysis using flow cytometry

Cells were pretreated, or not, in the presence of GSNO for 4 h and then γ irradiated (5 Grays). 1h after irradiation, cell culture medium was replaced by conditioning medium and collected 12 h later. Cells were lysed, RNase treated and nuclei were stained with propidium iodide, using the cell cycle TEST-PLUS DNA-staining kit, according to the manufacturer's instructions (Becton Dickinson, San Jose, USA). The DNA content was measured on a FACSCalibur flow cytometer using Cell Quest software (Becton Dickinson).

Hoechst staining

Cells were collected and, after centrifugation at 1000 g for 5 min, were resuspended in staining solution containing 0.6% Nonidet P-40, 3.7% formaldehyde and 0.01 mg/ml Hoechst 33258 (Sigma) diluted in PBS. After the appropriate dilution, cells are photographed under fluorescence microscopy.

RESULTS

Accumulation of p53 in response to GSNO and effects on DNA binding activity

MCF-7 cells were exposed to various concentrations of *S*-nitrosoglutathione (GSNO) for 5 h; then cell culture medium was changed and nuclear proteins were extracted 3 h later. Nuclear extracts were analyzed by Western blot analysis and electrophoretic mobility shift assay. As shown in Figure 1, cells treated with 0.5mM GSNO demonstrated a 3.5 fold increase in DNA binding activity of p53 compared to control. This increase was correlated with nuclear accumulation of p53 protein. However, the DNA binding activity of p53 decreased in cells exposed to concentrations of GSNO higher than 0.5mM, although p53 protein was still accumulated at high levels. These data suggest that, at doses of GSNO higher than 0.5mM, p53 accumulated in a form that has lost its DNA binding capacity. We found that treatment in the presence of 1mM GSNO for 4h did not inhibit the DNA binding activity of another transcription factor, OCT-1, used as a control (data not shown). This observation indicates that the

inhibitory effect of NO was specific to p53 and not a general effect of NO on a non-redox sensitive transcription factor.

GSNO inhibits p53-dependent G1 arrest after γ irradiation

In order to assess whether NO truly inhibited p53 function, we analyzed p53-dependent cell cycle arrest, a preferential response of MCF-7 cells to irradiation. γ irradiation represents one of the best characterized source of DNA-strand breaks that activate p53 (15). It has been shown that, in these cells, ionizing irradiation activates p53 and induces cell cycle arrest both in G1 and G2/M phases (16; 31) with a found relation between the level of p53 protein and the extent of arrest (28).

We analyzed cell cycle distribution of cells exposed to various doses of GSNO for 4h prior to γ irradiation (5 Grays) (Figure 2 and table 1). Cell culture medium was replaced 1h after irradiation and cells were harvested 12h later, labeled with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Following irradiation, we observed marked cell G1 and G2/M arrests, with a percentage of cells in S phase 3.6 times lower than in controls ($12.4\% \pm 0.8$ and $3.4\% \pm 0.8$ for control and irradiated cells, respectively). Cell cycle arrest was maintained for cells pretreated with 0.25mM GSNO. However, this checkpoint was lost for cells exposed to higher doses of GSNO. The percentage of cells in S phase was $19.7\% \pm 6.3$ when cells were exposed to 0.5mM GSNO prior irradiation (5.8 times higher than for irradiated cells). Indeed, instead of being arrested in their proliferation, cells continued to divide after stress induced both by irradiation and NO. Interestingly, γ irradiated cells exposed to 0.5, 0.75 and 1mM GSNO displayed the same cell cycle distribution than those treated with GSNO alone (without subsequent exposure to irradiation).

These results clearly demonstrate that MCF-7 cells exposed to GSNO have lost their capacity to induce cell-cycle arrest following γ irradiation, a well characterized p53-dependent response.

Effects of GSNO on p53 induction by irradiation

As shown in figure 3A, the high DNA-binding activity of p53 in irradiated cells was further increased by a pre-treatment with 0.25mM GSNO, but dramatically decreased at concentration higher than 0.5mM. In contrast, p53 protein levels remained high, at all concentrations although a slight decrease was detected at 1mM GSNO. These observations confirm those presented in figure 2 and indicate that in the presence of GSNO at concentration higher than 0.5mM, p53 protein still accumulated but has lost its capacity to bind DNA in a sequence-specific manner.

In order to assess whether the loss of this capacity was reflected in a loss of transcriptional activity, we studied the expression of p21^{Waf-1}, which is an essential downstream effector of p53 in cell cycle arrest in G1 phase following ionizing irradiation (4). Figure 3B shows that γ irradiation induced p21^{Waf-1} to accumulate to high levels. However, in cells pre-treated with 0.5mM GSNO, the levels of p21^{Waf-1} were identical, if not slightly below, to those of control cells. Thus, p53-dependent expression of p21^{Waf-1} after irradiation is correlated with cell-cycle arrest. Pre-treatment with GSNO, by inactivating p53, impaired the accumulation of p21^{Waf-1}, allowing cells to progress in cell-cycle in conditions where they should otherwise arrest (see figure 2).

Effect of GSNO on apoptosis

MCF-7 cells exposed to high concentrations of GSNO were found to undergo cell death with 12-24h. Figure 4 shows that, in the presence of GSNO at 1mM, cells adopted with 16h a rounded phenotype (4b, upper panel). This effect was prevented by adduction of 1mM of N-acetyl cysteine before treatment with GSNO (Fig 4c), in accordance with the notion that an increase in intracellular levels of reduced glutathione can protect cells against NO toxicity.

As shown in Fig 5, control cells demonstrated a homogenous staining of their nuclei after Hoechst staining. In contrast, cells treated with 1mM GSNO exhibited irregular staining of their nuclei as a result of chromatin condensation and nuclear

fragmentation, a typical morphological feature of cells undergoing apoptosis. This was also confirmed by detection of DNA laddering after migration on agarose gel (data not shown). As shown in Fig 6, $50\% \pm 0.3\%$ of cells treated by 1mM GSNO for 16h had a sub-G1 fragmented DNA content, [in contrast with $5.4\% \pm 1.1\%$ of cells exposed to 0.5mM GSNO (data not shown)].

We then examined the expression of the pro-apoptotic protein Bax following exposure to GSNO. We observed that Bax protein expression increased after exposure to 1mM GSNO (Fig 7). Bax has been described as a downstream effector of p53. The result in figure 7 were therefore in apparent contradiction with data in figures 1 to 3 showing that 1mM GSNO inhibits p53 protein activity. However, several studies have shown that Bax is a poor target of p53 in MCF-7 cells (20). We therefore made the hypothesis that the induction of Bax could be enhanced by GSNO via p53 independent mechanisms. To assess this hypothesis, we used a pair of HCT 116 cells that exist in 2 genotypes: p53^{-/-} and p53^{+/+}. Interestingly, we found that the level of Bax protein increased upon treatment with GSNO in HCT116 p53^{+/+} as well as in HCT 116 p53^{-/-}, demonstrating a-p53 independent regulation (Fig 8A and B).

DISCUSSION

We had previously shown that NO induced a conformational change and loss of DNA binding activity of p53 tumor suppressor protein expressed *in vitro* (5). In the present study, we further extent the results by showing that exposure to NO inhibited DNA binding capacity and its transcriptional activity of p53 protein in intact cells. Furthermore, we observed that sub-toxic doses of GSNO (0.5 and 0.75mM) prevented cell cycle arrest induced by γ irradiation in MCF-7 cells. This was correlated with the inhibition of the accumulation of p21^{Waf-1} protein and loss of DNA binding capacity of p53. Instead of arresting in cycle, these cells undergo replication more intensively than non-GSNO treated cells, as shown by the slight increase in the

number of cells in S-phase, as compared to control cells (see figure 2 and table 1). Overall, these results suggest that pre-exposure to GSNO is able to switch-off the p53-dependent response of MCF-7 cells to irradiation. However, the range of GSNO concentrations crucial to determine its effects since 0.25mM GSNO did not impair the accumulation of p21^{Waf-1} and consequently cell cycle arrest induced by ionizing irradiation.

All together, our data showed that NO could effectively inhibited p53 function.

The mechanism by which NO affects p53 activity is not fully elucidated. At low concentration, NO has clearly been shown to activate p53 and this effect probably results from induction of DNA damage by NO and its derivatives (8) The effects reported here as well as the results published by Calmels et al (5), suggest that, in addition to its effect on DNA damage, NO at high concentration may directly or indirectly modulate the activity of the p53 protein. The notion that p53 can be modified by NO has received recent support from our observations showing that NO induced nitration of tyrosine residues of p53 protein (6). We proposed that this mechanism could, at least in part, explain why NO impair the functionality of p53, as it has been reported for number of other proteins. However, as p53 is a redox sensitive protein (17), it is also possible that NO could impair p53 activity by reacting with its cysteine residues to S-nitrosylate thiol groups or to form disulfide bonds. A similar mechanism of perturbation of redox regulation of p53 has been suggested to explain the effect of cadmium which induced a conformational change of p53 protein and consequently impaired its activity (16).

The biological consequences of the effects of NO on p53 activity are twofold. First, switching-off p53 function may allow cells undergoing DNA damage to replicate this DNA and to propagate potentially oncogenic lesions to daughter cells. Second, abrogation of p53-dependent cell-cycle arrest may allow the cell to undergo a different fate than non cell-cycle arrest, namely apoptosis. In the first case, it is clear

that exposure to NO would represent an additional rise of acquisition of oncogenic damage. This effect would be particularly significant at intermediate concentrations of NO, where cells have impaired p53 protein but do not undergo apoptosis. In the second case, cells would be eliminated by a process of apoptosis, independently of p53 function, thus helps to get ride of cells which carry very high levels of damaged DNA.

In MCF-7 cells, our results indicate that Bax is induced in a p53-independent manner. Whether this phenomenon is responsible for the activation of apoptotic cascade remains to be determined. It is interesting to note that, in RAW macrophages, ectopic expression of Bcl2 could rescue cells from NO-induced apoptosis. Our results fully agree with the data of Messmer and Brune and further indicate that induction of Bax may occur by a p53-independent manner, at least in some cell types such as MCF-7 and HCT 116 cells.

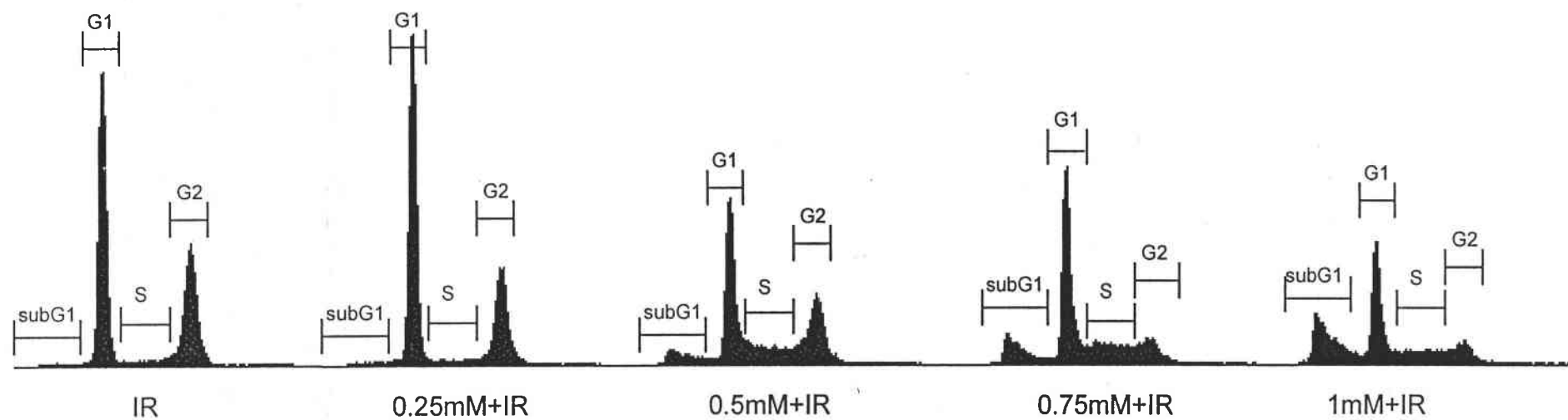
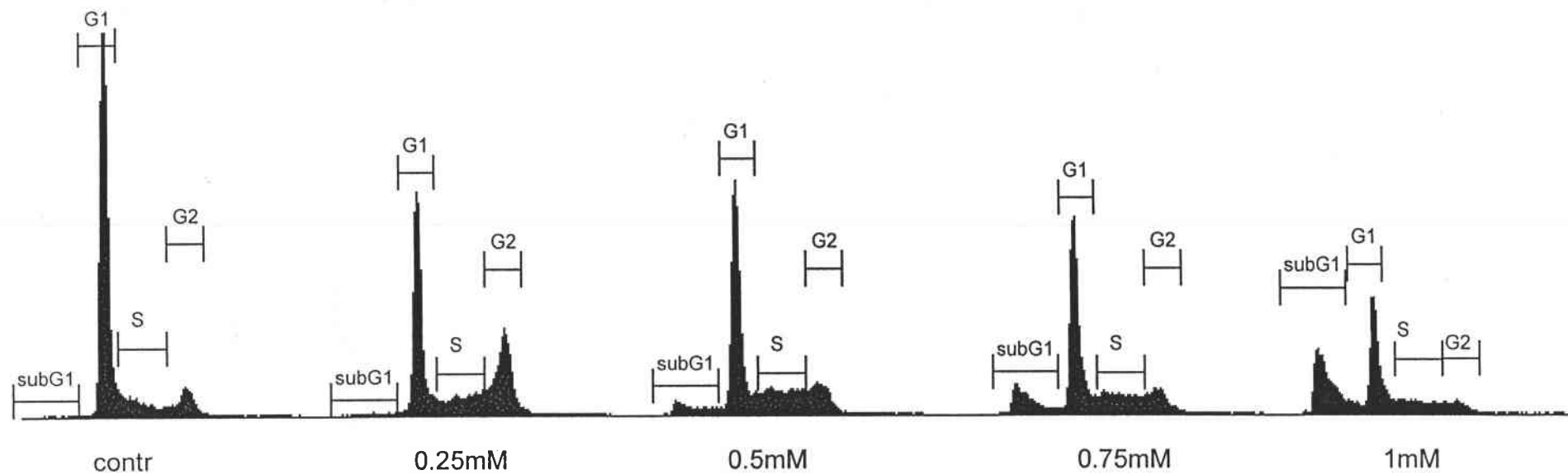
Overall, our results demonstrate that NO may act as a regulator of the cellular response to DNA-damage by modulating the function of p53 protein.

It is important to note that the concentrations of NO that are formed locally in intensive inflammatory conditions may be similar to those released by the NO donors in the present study. 1mM GSNO has been shown to generate NO at the rate of ~1 to ~4 $\mu\text{mol/liter/min}$ in culture medium containing 10% fetal bovine serum (33). In inflamed mucosa from patients with ulcerative colitis, increased NOS activities have been reported, ranging from 0.55 to 10 nmol/min/g of tissue (3; 25). This suggests that the amount of NO produced may reach 0.5-10 $\mu\text{mol/liter/min}$ in these tissues.

Thus partial inactivation of p53 through overproduction of NO in inflamed tissues may occur, playing an important role in cell growth, death control as well as tumor development.

Clearly, NO production and p53 activity are two closely integrated processes, as shown by the observation that p53 can negatively regulate the expression of iNOS,

thus controlling intracellular NO levels (8). Thus, our results and those of Harris co-workers suggest the existence of a double loop of mutual regulation between NO levels and p53 activity.



	% in SubG1	% in G1	% in S	% in G2
Control		73.9 ± 1.9	12.4 ± 0.8	11.8 ± 1.42
IR		57.3 ± 2.6	3.4 ± 0.8	39 ± 2.1
0.5mM +IR	7.5 ± 2.6	53.8 ± 5.4	19.7 ± 6.3	17.5 ± 1.7
0.5mM	6.76 ± 1.56	55.1 ± 6.2	18.9 ± 4.6	19.5 ± 0.9

Table1 : *Percentage of cells in subG1, G1, S and G2 phase.*
Mean values are calculated from 2 independent experiments, each in duplicate.

Fig 3A

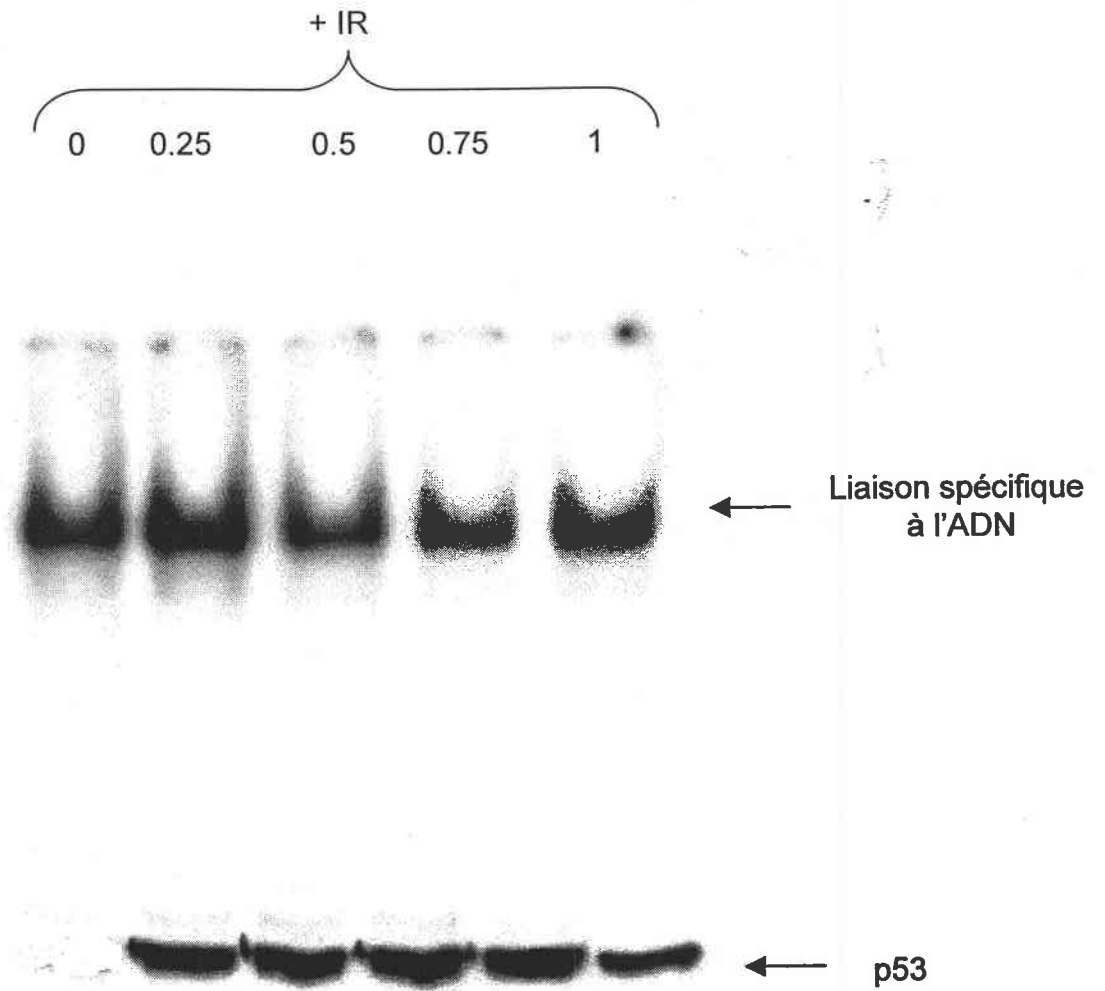
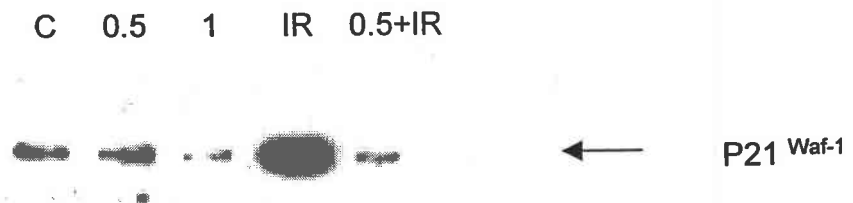
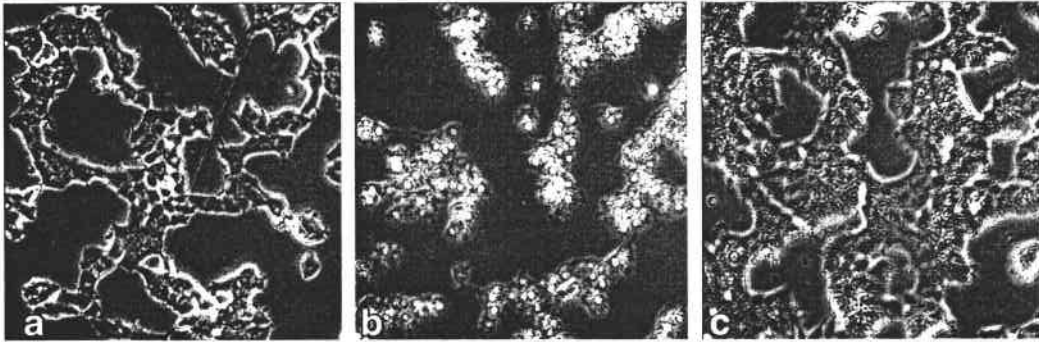


Fig 3B



4



5

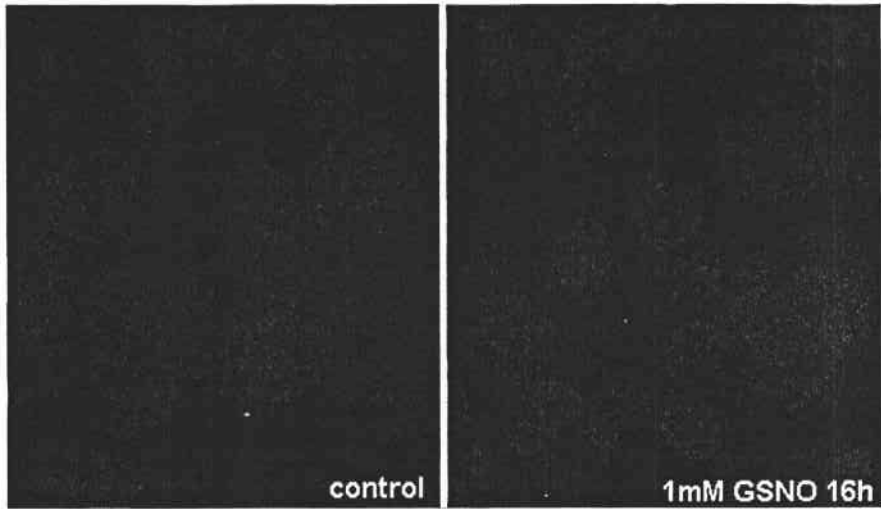


Fig 6

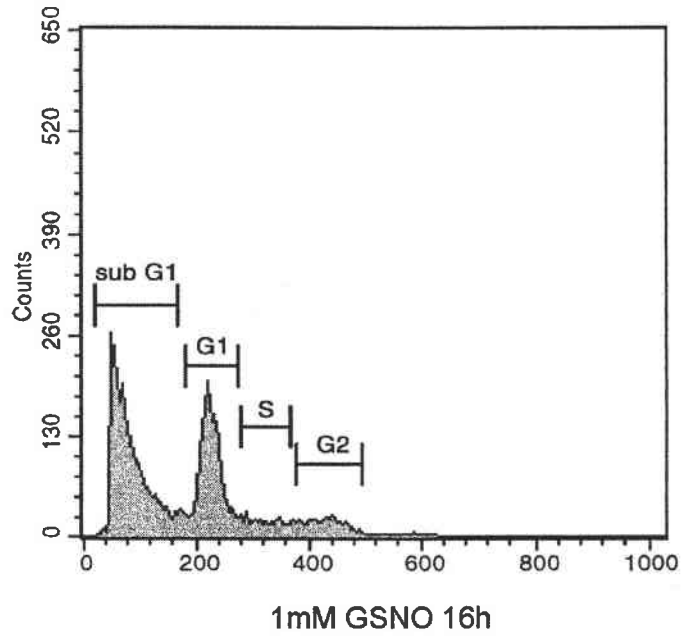


Fig 7

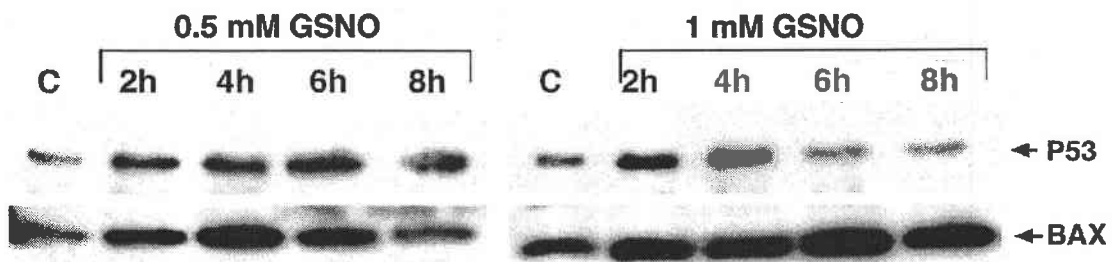


Fig8A : HCT 116 p53^{+/+}

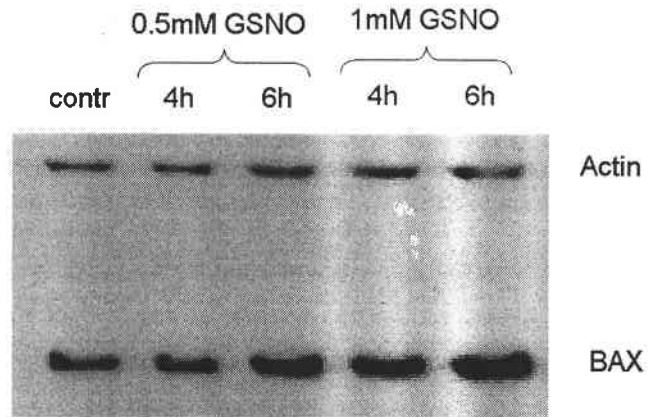
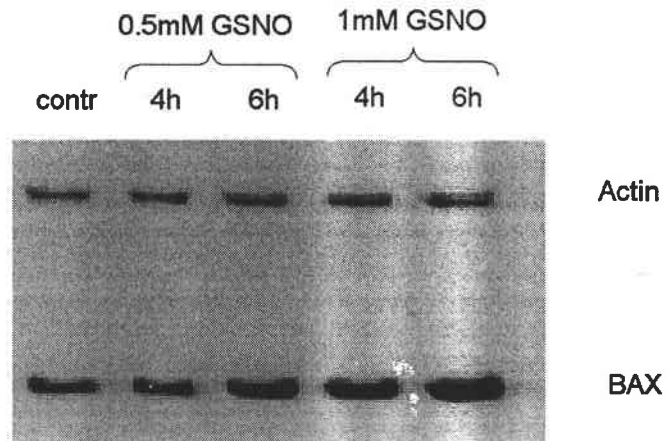


Fig8B : HCT 116 p53^{-/-}



LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: *Accumulation of p53 protein in response to GSNO and effects on DNA binding activity.*

MCF-7 cells were exposed to various concentrations of GSNO for 5h, then cell culture was replaced with conditioning medium and nuclear proteins were extracted 3h later. The nuclear extracts were subjected to Western blot analysis using the monoclonal antibody DO7 raised against p53. Same nuclear extracts were analyzed by electrophoretic shift assay for p53, as described in Materials and Methods.

Figure 2: *GSNO inhibits p53-dependent G1 arrest after γ irradiation.*

MCF-7 cells were incubated in the absence or presence of 0.25, 0.5, 0.75 or 1mM GSNO for 4h, then cells were γ irradiated (5 Gy) and the medium was changed 1 hour later. 12h after the medium change, cells were harvested and labeled with propidium iodide for flow cytometry analysis, as described in materials and methods. Analysis was performed using a FACSCalibur and Cell Quest software.

Figure 3: *Effect of GSNO on p53 induction by γ irradiation*

A: DNA binding activity of p53 protein in nuclei of MCF-7 cells exposed to GSNO prior to γ irradiation. Following a pre-incubation of 4h in the presence of 0.25, 0.5, 0.75 or 1mM GSNO, cells were γ irradiated and the cell culture medium was changed 1h later. 3h after medium change, cells were harvested and nuclear extracts were obtained as described in Materials and Methods. Nuclear extracts were subjected to Western Blot analysis using DO7 antibody and to DNA binding assay using DNA consensus sequence for p53, as described in Materials and Methods.

B: p21^{Waf-1} protein levels in the nuclei of cells exposed to GSNO prior to γ irradiation. Nuclear extracts were analyzed by Western blot for p21^{Waf-1} expression, using the C-19 antibody

Figure 4: *Phase contrast microscopy of MCF-7 cells subjected to various treatments.*

(a): non treated MCF-7 cells, (b): MCF-7 cells exposed for 16h to 1mM GSNO, (c): MCF-7 cells pretreated for 1h with 1mM of L-NAC and then incubated for 16h in the presence of 1mM GSNO.

Figure 5: *Fluorescence microscopy of Hoechst staining cells.*

Cells were either non-treated (control) or incubated for 16h in the presence of 1mM GSNO. Then, cells were harvested and stained with Hoechst 33258 and photographed under fluorescence microscopy.

Figure 6: *Cell cycle distribution of MCF-7 cells treated for 16h in presence or in absence of 1mM GSNO.*

Cells were harvested 16h after the treatment and analysed as described in figure 2.

Figure 7: *Expression of p53 and Bax in MCF-7 cells exposed to GSNO.*

MCF-7 cells were treated with 0.5 and 1mM GSNO for the indicated times. Total protein extracts were subjected to Western blot analysis. The upper part of the membrane was incubated with DO7 antibody raised against p53 and the lower part was incubated in the presence N-20 antibody for the detection of Bax.

Figure 8: *Expression of Bax in HCT 166^{+/+} and HCT 116 p53^{-/-} cells exposed to GSNO.*

Cells were treated with either 0.5 or 1mM GSNO for 4 and 6h. Total proteins were extracted as described in Materials and Methods and subjected to Western blot analysis. The membrane was cut and the upper part was incubated with the antibody raised against actin and the lower part was used for Bax detection using N-20 antibody. (A): HCT 166^{+/+} cells, (B): HCT 116 p53^{-/-}.

References

1. Bae,I., Fan,S., Bhatia,K., Kohn,K.W., Fornace,A.J., Jr. and O'Connor,P.M. Relationships between G1 arrest and stability of the p53 and p21Cip1/Waf1 proteins following gamma-irradiation of human lymphoma cells. *Cancer Res* 55:2387-2393, 1995.
2. Bennett,M., Macdonald,K., Chan,S.W., Luzio,J.P., Simari,R. and Weissberg,P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis [see comments]. *Science* 282:290-293, 1998.
3. Boughton-Smith,N.K., Evans,S.M., Hawkey,C.J., et al. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 342:338-340, 1993.
4. Brugarolas,J., Chandrasekaran,C., Gordon,J.I., Beach,D., Jacks,T. and Hannon,G.J. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377:552-557, 1995.
5. Calmels,S., Hainaut,P. and Ohshima,H. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 57:3365-3369, 1997.
6. Chazotte-Aubert,L., Hainaut,P. and Ohshima,H. Nitric Oxide Nitrates Tyrosine Residues of Tumor-Suppressor p53 Protein in MCF-7 Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* %19;267:609-613, 2000.
7. Derojas-Walker,T., Tamir,S., Ji,H., Wishnok,J.S. and Tannenbaum,S.R. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 8:473-477, 1995.
8. Forrester,K., Ambs,S., Lupold,S.E., et al. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:2442-2447, 1996.
9. Fuchs,S.Y., Adler,V., Buschmann,T., Wu,X. and Ronai,Z. Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17:2543-2547, 1998.
10. Fuchs,S.Y., Adler,V., Buschmann,T., et al. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.* 12:2658-2663, 1998.
11. Haendeler,J., Weiland,U., Zeiher,A.M. and Dimmeler,S. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide* 1:282-293, 1997.
12. Hainaut,P. and Hollstein,M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77:81-137, 2000.
13. Hermeking,H., Lengauer,C., Polyak,K., et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1:3-11, 1997.
14. Ischiropoulos,H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch.Biochem.Biophys* 356:1-11, 1998.

15. Kastan,M.B., Zhan,Q., el-Deiry,W.S., et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71:587-597, 1992.
16. Meplan,C., Mann,K. and Hainaut,P. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem* 274:31663-31670, 1999.
17. Meplan,C., Richard,M.J. and Hainaut,P. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem Pharmacol* 59:25-33, 2000.
18. Messmer,U.K., Ankarcona,M., Nicotera,P. and Brune,B. p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 355:23-26, 1994.
19. Nguyen,T., Brunson,D., Crespi,C.L., Penman,B.W., Wishnok,J.S. and Tannenbaum,S.R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3030-3034, 1992.
20. Oda,K., Arakawa,H., Tanaka,T., et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53 [In Process Citation]. *Cell* 102:849-862, 2000.
21. Ohshima,H., Friesen,M., Brouet,I. and Bartsch,H. Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem.Toxicol* 28:647-652, 1990.
22. Owen-Schaub,L.B., Zhang,W., Cusack,J.C., et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15:3032-3040, 1995.
23. Parks,D., Bolinger,R. and Mann,K. Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucleic Acids Res* 25:1289-1295, 1997.
24. Pisani,P., Parkin,D.M., Munoz,N. and Ferlay,J. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:387-400, 1997.
25. Rachmilewitz,D., Stampler,J.S., Bachwich,D., Karmeli,F., Ackerman,Z. and Podolsky,D.K. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 36:718-723, 1995.
26. Radi,R. Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem Res Toxicol* 9:828-835, 1996.
27. Sandau,K., Pfeilschifter,J. and Brune,B. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int* 52:378-386, 1997.
28. Siles,E., Villalobos,M., Valenzuela,M.T., et al. Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines. *Br.J Cancer* 73:581-588, 1996.

29. Szabo,C. and Ohshima,H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric.Oxide.* 1:373-385, 1997.
30. Tamir,S., Burney,S. and Tannenbaum,S.R. DNA damage by nitric oxide. *Chem Res Toxicol* 9:821-827, 1996.
31. Verhaegh,G.W., Richard,M.J. and Hainaut,P. Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper. *Mol Cell Biol* 17:5699-5706, 1997.
32. Wink,D.A., Cook,J.A., Kim,S.Y., et al. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* 272:11147-11151, 1997.
33. Wink,D.A., Cook,J.A., Pacelli,R., et al. The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys* 331:241-248, 1996.
34. Wu,X., Bayle,J.H., Olson,D. and Levine,A.J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7:1126-1132, 1993.
35. Yermilov,V., Rubio,J., Becchi,M., Friesen,M.D., Pignatelli,B. and Ohshima,H. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis* 16:2045-2050, 1995.
36. Yermilov,V., Rubio,J. and Ohshima,H. Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett* 376:207-210, 1995.
37. Zhan,Q., Antinore,M.J., Wang,X.W., et al. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18:2892-2900, 1999.

2^{ème} PARTIE DES RESULTATS

conditionnement est de 0 mV). La colonne de réduction utilisée est en acier inoxydable contenant du platine. Lorsque l'on utilise la colonne de réduction, la cellule de conditionnement est réglée à un potentiel de -1000mV. Il a été déterminé que les meilleures conditions sont les suivantes: les électrodes 1 et 2 sont réglées respectivement à un potentiel de +800mV et +1000mV et utilisation de la colonne de réduction avec la cellule de conditionnement réglée à -1000mV. Dans ces conditions, la NTYR est réduite à la fois dans la colonne de réduction et dans la cellule de conditionnement en 3-aminoTYR qui est détectée spécifiquement par les électrodes 1 et 2. La TYR est, quant à elle, détectée par un spectrophotomètre UV réglé à 280 nm.

2.1.2.2 Comparaison du pouvoir de nitration de différents composés *in vitro*

Plusieurs donneurs ont été testés:

- Peroxynitrite (ONOO⁻).
- Angeli's salt (AS): NO⁻
- S-nitrosoglutathione (GSNO): NO[•]
- Spermine-NO (SPER-NO): NO[•]
- 3-morpholino-sydonimine chloride (SIN-1): NO[•]+O₂^{-•}
- Sodium nitreux NaNO₂: NO₂⁻
- NO₂⁻+HOCl: forme du NO₂Cl.

• Sur la BSA

Le temps d'incubation est de 5 min pour le peroxynitrite, 15 min pour NaNO₂ et de 1h pour les autres composés. Lorsque la concentration en agent nitrant est 100 fois supérieure à celle de la BSA, le peroxynitrite est le composé qui possède le rendement de nitration le plus élevé, suivi par NO₂⁻/HOCl, NO₂⁻, AS, Sper-NO, SIN-1 et enfin le GSNO. Ce dernier ne forme que de très faibles quantités de NTYR car il ne se décompose pas en absence de thiol. Il faut noter que le peroxynitrite est de loin l'agent nitrant le plus puissant car la formation de

NTYR en présence des autres agents ne représente qu'entre 8,9% et 1,4% de celle provoquée par le peroxy-nitrite.

Lorsque la concentration en donneur d'espèces nitrantes est la même que celle de la BSA, le peroxy-nitrite est la substance la plus réactive, viennent ensuite, par ordre décroissant, NaNO₂, SIN-1 et AS.

- *Sur les protéines de plasma humain*

Pour cette expérience, 0,8ml de plasma humain ont été incubés pendant 3h en présence de 1 ou 10 mM d'agents nitrants, excepté pour le peroxy-nitrite où le temps d'incubation est de seulement 5 min. Les quantités de NTYR liées et de NTYR libres ont été déterminées. Les protéines ont été précipitées par de l'acétonitrile et hydrolysées enzymatiquement. Les NTYR libres, contenues dans le surnageant, ont été récupérées après évaporation du liquide, puis dissoutes dans un tampon ammonium sulfamate, purifiées par passage sur une colonne C18 Sep-pak et enfin éluées par 100% de méthanol.

Le peroxy-nitrite produit de fortes quantités de NTYR liées (75nmol/mmol TYR), suivi par SIN-1, AS, Sper-NO et NO₂⁻/HOCl. La formation de NTYR libre est beaucoup plus importante avec le peroxy-nitrite et SIN-1 qu'avec tous les autres composés.

2.1.3 Discussion

Cette nouvelle méthode est très spécifique des NTYR et pratique à utiliser. Elle nous a permis de comparer le pouvoir de nitration, *in vitro*, de nombreux composés sur la BSA et sur les protéines du plasma humain.

Nous avons observé que le peroxy-nitrite est effectivement l'agent nitrant le plus puissant. Néanmoins, l'utilisation de peroxy-nitrite synthétique ne reflète pas réellement les conditions physiologiques. SIN-1 (qui est supposé former du peroxy-nitrite par réaction entre NO⁺+O₂⁻), est un agent nitrant puissant. On remarque que l'efficacité respective des agents nitrants n'est pas la même vis à

vis de la BSA isolée que vis à vis du plasma humain. Ainsi, les agents donneurs d'espèces réactives de l'azote ne se comportent pas de la même façon suivant leur substrat.

La détection de protéines contenant des NTYR *in vivo* est considérée comme une indication des lésions tissulaires créées par les espèces réactives de l'azote. Cette méthode de détection présentée ici donne les moyens de quantifier précisément les NTYR présentes dans le plasma de patients atteints de diverses maladies. Ceci permettrait de déterminer s'il existe une relation précise entre la quantité de NTYR présente et le degré de la maladie liée à une inflammation chronique.



Analysis of 3-Nitrotyrosine in Biological Fluids and Protein Hydrolyzates by High-Performance Liquid Chromatography Using a Postseparation, On-line Reduction Column and Electrochemical Detection: Results with Various Nitrating Agents

Hiroshi Ohshima,¹ Irena Celan, Laurence Chazotte, Brigitte Pignatelli, and Howard F. Mower²

Unit of Endogenous Cancer Risk Factors, International Agency for Research on Cancer, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France

Received January 5, 1999, and in revised form March 5, 1999

Nitric oxide reacts rapidly with superoxide to form the strong nitrating agent peroxynitrite, which is responsible for much of the tissue damage associated with diverse pathophysiological conditions such as inflammation. The occurrence of free or protein-bound nitrotyrosine (NTYR) has been considered as evidence for *in vivo* formation of peroxynitrite. However, various agents can nitrate tyrosine, and their relative significance *in vivo* has not been determined due to lack of a sensitive method to analyze NTYR in tissue proteins and biological fluids. We have developed a new HPLC-electrochemical detection method to analyze NTYR in protein hydrolyzates or biological fluids. The sample is injected directly into a reversed-phase HPLC column and NTYR is subsequently reduced by a platinum column to 3-aminotyrosine, which is quantified with an electrochemical detector. The method is simple, selective, and sensitive (detection limit, 0.1 pmol per 20- μ l injection). We have applied this method to compare *in vitro* the ability of vari-

ous nitrating agents to form NTYR in bovine serum albumin and human plasma. Yields of NTYR formed in human plasma proteins incubated with 1 or 10 mM nitrating agent decreased in the following order: synthetic peroxynitrite > 3-morpholino-sydonimine, a generator of both NO and superoxide > Angeli's salt, which forms nitroxyl anion (NO⁻) > spermine-NONOate, which releases NO > sodium nitrite plus hypochlorite, which forms the nitrating agent nitryl chloride (NO₂Cl). A simple purification method using a C18 Sep-Pak cartridge is also described for analysis of free NTYR in human plasma. © 1999 Academic Press

Key Words: 3-nitrotyrosine; high-performance liquid chromatography; electrochemical detection; human plasma; tyrosine nitration; peroxynitrite; nitroxyl anion.

Nitric oxide (NO) is a physiologically important signal molecule, regulating a variety of biological functions such as smooth muscle relaxation, neurotransmission, and immune processes. Excess production of NO, however, has also been implicated as a cause of diverse pathological conditions such as inflammation, neurodegenerative diseases, cardiovascular disorders, and possibly cancer. These detrimental effects of NO have been attributed to reac-

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: 33 4 72 73 85 75. E-mail: Ohshima@iarc.fr.

² Present address: Department of Biochemistry and Biophysics, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii at Manoa, Biomedical Sciences Building, 1960 East-West Road, Honolulu, HI 96822.

tive nitrogen species such as oxides of nitrogen (NO_x) and peroxyxynitrite (ONOO⁻), which are formed by the reaction of NO with oxygen and superoxide, respectively (1, 2). Reactive nitrogen species can oxidize, nitrate, and nitrosate biomolecules such as proteins, DNA, and lipids, thus altering their functions. In 1990, we proposed that 3-nitrotyrosine (NTYR)³ could be measured as a biomarker of endogenous nitrosation and nitration (3). Ischiropoulos *et al.* (4) and Beckman *et al.* (5) demonstrated that peroxyxynitrite reacts easily with phenolic compounds, including free and protein-bound tyrosine (TYR), to form nitrated phenolic derivatives. Development of poly- and monoclonal antibodies against NTYR-containing proteins by Beckman's group (6) allowed demonstration of the *in vivo* localization of NTYR-containing proteins in a variety of human and animal tissues. Since peroxyxynitrite is a strong nitrating agent, especially in the presence of bicarbonate or CO₂ (7), and may be formed *in vivo* by a rapid reaction of NO with superoxide (8), the occurrence of NTYR-containing proteins has often been regarded as evidence for *in vivo* generation of peroxyxynitrite. However, other reactive nitrogen species such as nitrous acid (HNO₂), NO_x, nitronium cation (NO₂⁺), nitrogen dioxide (*NO₂), and nitryl chloride (NO₂Cl) formed from nitrite and hypochlorous acid (HOCl) can also nitrate TYR (3, 9–11). The relative importance of these nitrating agents, compared with peroxyxynitrite with respect to their activity in forming NTYR in proteins, has not been determined *in vivo*.

Various methods to analyze NTYR have been reported that use high-performance liquid chromatography (HPLC) with either electrochemical detection (ED) (12–14), fluorescent (15), or UV (16) detection, as well as gas chromatography with a chemiluminescence detector (3, 17) or mass spectrometry (18). Immunoassays such as ELISA (19) and dot-blot (20, 21) have also been reported. Although HPLC with ED is sensitive and selective for certain compounds,

NTYR has a high oxidation potential (> +800 mV), making it difficult to analyze this modified amino acid among other components present in protein hydrolyzates or in biological fluids. To overcome this problem, Shigenaga *et al.* (22) recently developed a method that involves dithionite reduction of NTYR to aminotyrosine, an electrochemically active compound with a low oxidation potential. However, as aminotyrosine is poorly retained on a C18 reversed-phase column, they measured it as an *N*-acetyl derivative. Thus, a complicated four-step procedure (acetylation of NTYR with acetic anhydride, extraction by ethyl acetate, *O*-deacetylation, and chemical reduction with dithionite to *N*-acetylaminoxytyrosine) was required before HPLC-ED analysis.

In the present study, we developed a new HPLC-ED method to analyze NTYR in protein hydrolyzates or biological fluids. The sample is injected directly into the chromatograph and separated by a C18 reversed-phase column, and NTYR is subsequently reduced by a platinum column to aminotyrosine, which is then detected by ED. The method is simple and selective, compared with other published methods, and is also as sensitive as that of Shigenaga *et al.* (22). We have used this method to compare formation of NTYR in bovine serum albumin (BSA) and human plasma incubated with various nitrating agents *in vitro*. A simple purification method using a C18 Sep-Pak cartridge is also described for analyses of free and bound NTYR in human plasma.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. The following chemicals were obtained from Sigma Chemical Company, (St Louis, MO): TYR, NTYR, L-DOPA, 3-chlorotyrosine (Cl-TYR), L-tryptophan (TRP), bovine serum albumin (BSA, fatty acid free), pronase E (EC 3.4.24.31 from *Streptomyces griseus*), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), sodium phosphate monobasic (ultrapure), Angeli's salt (AS), *S*-nitrosoglutathione (GSNO), spermine-NONOate (SPER-NO), and 3-morpholino-sydonimine chloride (SIN-1) were obtained from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). Peroxyxynitrite was synthesized in a quenched flow reactor and excess hydrogen peroxide was destroyed by granular manganese dioxide (23,

³ Abbreviations used: AS, Angeli's salt; BSA, bovine serum albumin; Cl-TYR, 3-chlorotyrosine; DTPA, diethylenetriaminepentaacetic acid; ED, electrochemical detection; GSNO, *S*-nitrosoglutathione; NTYR, 3-nitrotyrosine; SIN-1, 3-morpholino-sydonimine chloride; SPER-NO, spermine-NONOate; TRP, L-tryptophan; TYR, *p*-tyrosine.

24). All other chemicals were obtained from either Aldrich (Milwaukee, WI) or Merck (Darmstadt, Germany).

Reaction of BSA with nitrating agents. The experiments were carried out by incubating BSA (10 mg/ml, 150 μ M) in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.1 mM DTPA, with various concentrations of nitrating or nitrosating agent (SIN-1, GSNO, SPER-NO, AS, NO_2^- plus HOCl) at 37°C for 1 h (final volume 1 ml, final pH \sim 7.4). When peroxyntirite, SPER-NO, and AS were used, the reaction mixture contained an appropriate amount of HCl to neutralize the NaOH present in these solutions (solutions of peroxyntirite were prepared in 0.5 N NaOH, and those of SPER-NO and AS were prepared in 0.01 N NaOH). Experiments with peroxyntirite were carried out at room temperature (\sim 24°C) for 5 min. When sodium nitrite was examined, the reaction was performed in 0.5 M HCl at 37°C for 15 min. After incubation, all nitrosation or nitration reactions were terminated by adding 0.1 ml of 2 M ammonium sulfamate in 0.5 N HCl. The reactions were carried out in triplicate.

After the reaction, precipitation and hydrolysis of BSA were carried out as described by Shigenaga *et al.* (22) with minor modifications. Briefly, to the reaction mixture, 3 vol of cold ethanol (-20°C) was added and the BSA was precipitated by centrifugation (2000g) at 4°C for 10 min. The BSA was resuspended in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 7.2) and reprecipitated by adding 3 vol of cold acetonitrile (4°C), followed by centrifugation (2000g). This process was repeated once more and the pellet was finally suspended in 0.5 ml of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 7.2. The samples were incubated overnight (16 h) at 50°C with 1 mg of dialyzed pronase E (pronase E was prepared by dialysis against excess 0.1 M sodium acetate buffer, pH 7.2). After enzymatic hydrolysis, 3 vol of cold acetonitrile (4°C) was added and centrifuged (2000g). The supernatant (1.4 ml) was then evaporated under vacuum to dryness in a Savant Speed-Vac. The residue was dissolved in 140 μ l HPLC buffer (see below).

Reaction of human plasma with nitrating agents. Similarly, human plasma (0.8 ml) was incubated with nitrating agents (peroxyntirite, SIN-1, SPER-NO, AS, NO_2^- plus HOCl) at 0.1, 1.0, and 10 mM

concentrations and an appropriate amount of HCl to neutralize the NaOH present in the solutions of nitrating agents (peroxyntirite, SPER-NO, and AS) (final volume 1 ml, final pH \sim 7.4). After incubation at 37°C for 3 h (except for experiments with peroxyntirite, which was incubated at room temperature for 5 min), all nitrosation or nitration reactions were terminated by adding 0.1 ml of 2 M ammonium sulfamate in 0.5 N HCl. The reactions were carried out in duplicate.

Purification of free NTYR from human plasma and hydrolysis of plasma proteins. To 1 ml of human plasma or the samples from the above nitration experiments, 3 vol of cold acetonitrile (4°C) was added and centrifuged (2000g) at 4°C for 10 min. The protein pellet was resuspended in 0.5 ml of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 7.2, and reprecipitated with 3 vol of cold acetonitrile (this procedure was repeated twice). For analysis of free NTYR, the supernatants were combined and dried under vacuum. The residue was dissolved in 0.5 ml of 0.04 M ammonium sulfamate in 0.1 N HCl and applied to a Sep-Pak C18 column, which was prewashed with 2 ml 100% methanol, followed by washing with 10 ml water. After the sample was applied, 5 ml of water was passed through the Sep-Pak to eliminate water-soluble polar compounds. NTYR was then eluted from the column with 3 ml of 100% methanol, which was evaporated under vacuum, and the residue was dissolved in 100 μ l HPLC buffer.

For analysis of NTYR in proteins, the protein pellet obtained above was finally suspended in 1 ml sodium acetate buffer, pH 7.2, and incubated overnight (16 h) at 50°C with 2 mg of dialyzed pronase E as described above.

HPLC-electrochemical/UV analysis of NTYR and TYR. Figure 1 shows the HPLC system. A Model 580 ESC pump (ESA Inc., Chelmsford, MA), equipped with a reversed-phase column (25 \times 0.46 cm i.d., Ultrasphere 5- μ m ODS column, Beckman, Palo Alto, CA), was used under isocratic conditions with 10 mM aqueous sodium phosphate (monobasic, NaH_2PO_4) containing 10% methanol. A stainless-steel column (10 mm \times 4.6 mm i.d., packed with platinum-black powder; Type RC-10-1, IRICA purchased from RIX, Souka-city, Saitama, Japan) was used as a reduction column. The same reduction

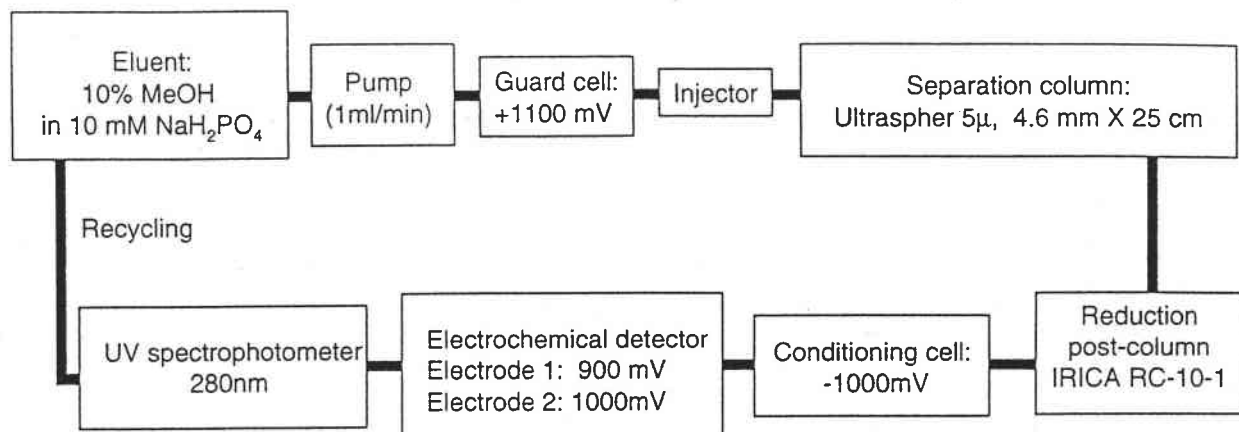


FIG. 1. HPLC system for detection of NTYR.

column has been used to analyze vitamin K (25) and ubiquinone-10 (26) by fluorescence and ED, respectively. When the reduction capacity decreased, the reduction column was activated by washing with distilled water, aqueous ascorbic acid (0.1 M), and then distilled water for 15 min each at a flow rate of 0.5 ml/min, as recommended by the manufacturer. A Coulochem II electrochemical detector (ESA Inc., Chelmsford, MA) was used for NTYR detection with a guard cell (Model 5020, +1100 mV), a conditioning cell (Model 5021, -1000 mV), and an analytical cell (Model 5010; electrode 1, +900 mV; electrode 2; +1000 mV). Under these conditions, NTYR was reduced in the reduction column as well as in the conditioning cell (reduction mode at -1000 mV) to 3-aminotyrosine, which was detected selectively by electrodes 1 and 2. TYR was analyzed with a UV spectrophotometer (Spectra SERIES UV 100, Thermo Separation) at 280 nm.

RESULTS

-To determine optimal conditions for analyses of NTYR, TYR, and other related compounds, we first obtained hydrodynamic voltammograms for each compound. The standard mixture was injected into the HPLC column in the presence or absence of a postseparation reduction column. Figure 2A shows the hydrodynamic voltammograms generated for five different compounds in the absence of the reduction column. As reported previously (12), L-DOPA could be detected under a low oxidation

potential (>400 mV), but the other compounds, especially NTYR, required a high oxidation potential (>900 mV). Figure 3B shows typical chromatograms obtained for a standard mixture of DOPA, TYR, Cl-TYR, NTYR, and TRP. The compounds were analyzed without the reduction column and by ED under conditions similar to those reported by Skinner *et al.* (13) (conditioning cell, 0 mV; electrodes 1 and 2, +850 and +1000 mV, respectively). Electrode 1 detected four compounds (DOPA, TYR, Cl-TYR, TRP), but no NTYR (Fig. 3Ba), whereas electrode 2 detected NTYR in addition to the other four standards (Fig. 3Bb).

Under identical buffer and HPLC column conditions, the same standard mixture was injected in the presence of the reduction column. Hydrodynamic voltammograms for each compound determined using the reduction column (Figs. 2B and 2C) showed that setting a conditioning cell at the reduction mode (-700 to -1000 mV) and electrodes 1 and 2 at >+800 and +1000 mV, respectively, gave the highest responses for NTYR and DOPA (Figs. 2B and 2C). TYR and Cl-TYR were detected by neither electrode 1 nor electrode 2 under these conditions, although a UV spectrophotometer detected five peaks corresponding to each of the standards. Typical chromatograms of the five standard compounds (DOPA, TYR, Cl-TYR, NTYR, TRP) injected into the chromatograph with the reduction column are shown in Figs. 3Aa, 3Ab, and 3Ac. The calibration curves for NTYR detected by electrodes 1 and 2 under these conditions are shown in Fig. 4. The

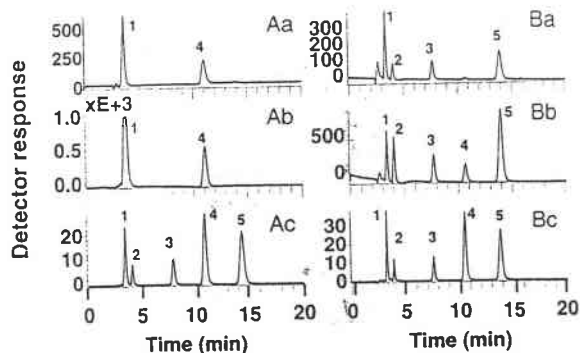
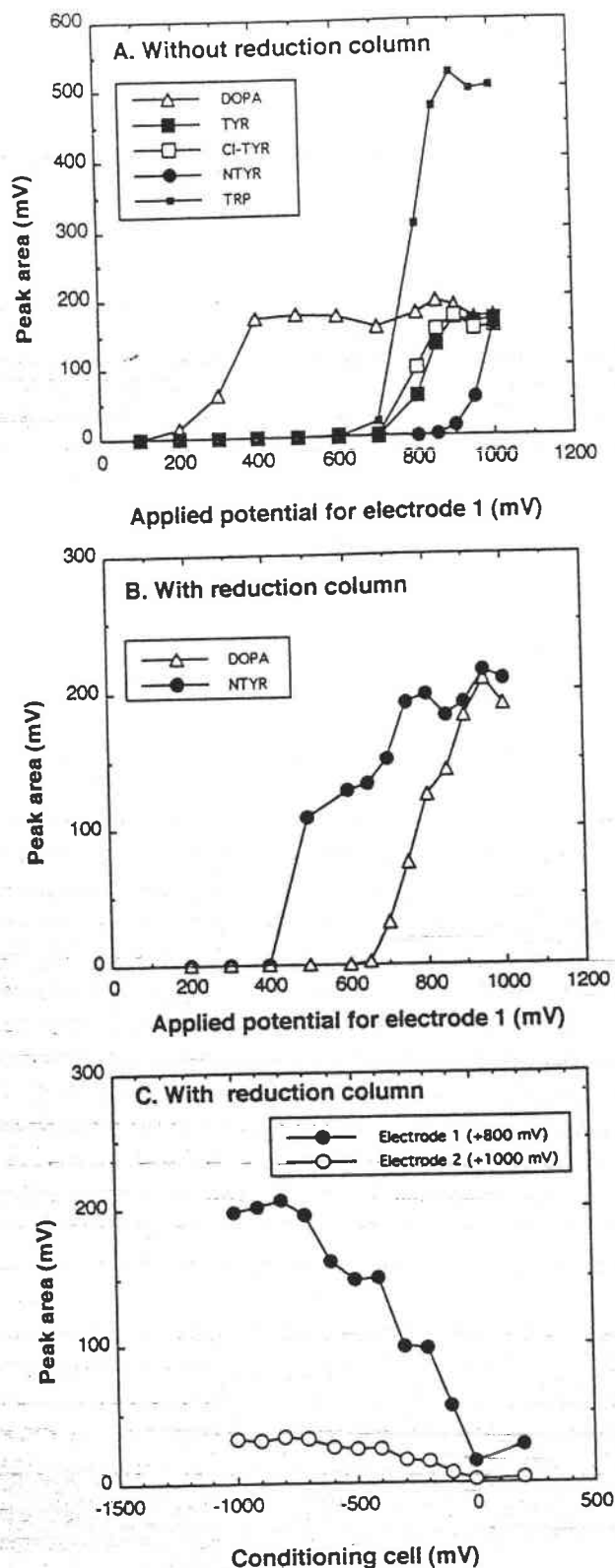


FIG. 3. Typical chromatograms analyzed for a standard mixture (L-DOPA, TYR, Cl-TYR, NTYR, and TRP) by HPLC-EC. (A) The analysis was carried out in the presence of the reduction column. A guard cell (+1100 mV), a conditioning cell (-1000 mV), electrode 1 (+900 mV) (Aa), and electrode 2 (+1000 mV) (Ab) were set as indicated. Chromatogram obtained with a UV detector at 280 nm (Ac). (B) The analysis was carried out in the absence of the reduction column. A guard cell (+1100 mV), a conditioning cell (0 mV), electrode 1 (+850 mV) (Ba), and electrode 2 (+1000 mV) (Bb) were set as indicated. Chromatogram obtained with a UV detector at 280 nm (Bc). Peaks 1, 2, 3, 4, and 5 are L-DOPA, TYR, Cl-TYR, NTYR, and TRP, respectively.

detection limits (0.1 pmol per 20 μ l) were similar in both channels.

When hydrolyzates of 10 μ M peroxyxynitrite-treated BSA (which contained 0.03 μ mol NTYR/mmol TYR) were analyzed by ED without the reduction column (conditioning cell, electrode 1, and electrode 2: 0, +850, and +1000 mV, respectively), many peaks appeared on the chromatograms detected by both electrodes 1 and 2. A typical chromatogram for detection of NTYR by electrode 2 is shown in Fig. 5A. It was difficult to identify the NTYR peak among many other peaks. On the other hand, analysis of the same BSA hydrolyzate using ED with the reduction column gave a single peak corresponding to NTYR (Fig. 5B).

When we analyzed human plasma for free NTYR,

FIG. 2. Hydrodynamic voltammograms generated for five compounds (L-DOPA, TYR, Cl-TYR, NTYR, and TRP). (A) Varying electric potential of electrode 1 was applied in the absence of the reduction column (conditioning cell, 0 mV). (B) Varying electric potential of electrode 1 was applied in the presence of the reduction column (conditioning cell, -900 mV). (C) Varying electric potential of the conditioning cell was applied in the presence of the reduction column (electrode 1, +800 mV; electrode 2, +1000 mV).

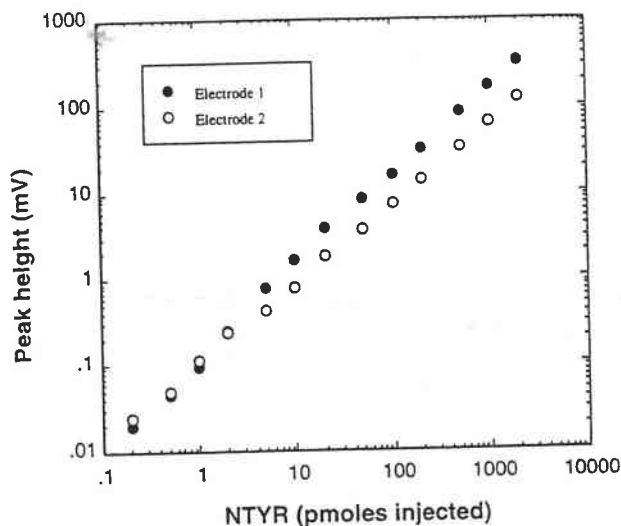


FIG. 4. Calibration curves for NTYR detected by HPLC-ED in the presence of the reduction column. Conditions were set as described in Fig. 3A.

it was difficult to concentrate samples to a small volume, because plasma contained proteins, lipids, and many other compounds. For these reasons, we developed a method to purify free NTYR in human plasma as described under Materials and Methods. Most proteins could be precipitated with acetonitrile and polar materials in the supernatant could be eliminated by purification with a C18 cartridge. As human plasma could be easily concentrated 10 to 20 times, the sensitivity for analysis of free NTYR in

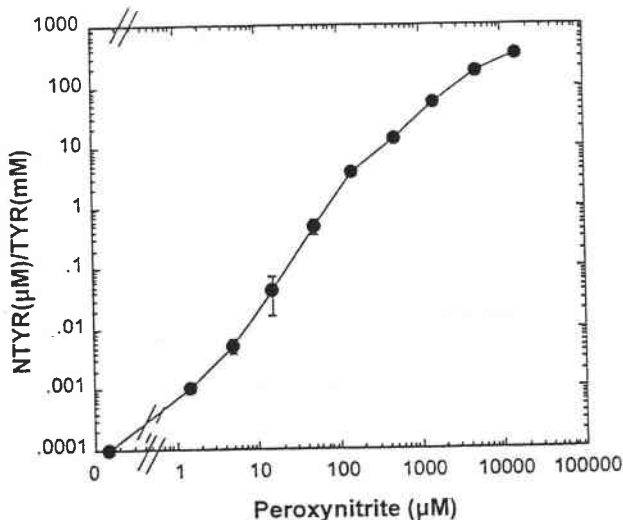


FIG. 6. Effects of peroxynitrite concentration on NTYR formation in BSA.

human plasma increased significantly, the detection limit being around $0.005 \mu\text{mol/liter}$, when 1 ml of the sample was analyzed. The recovery of NTYR, added at a $10 \mu\text{M}$ concentration to 1 ml of human plasma, was $86.9 \pm 5.4\%$ ($n = 5$).

The method was used to compare the nitration activity of various NO-related compounds. NTYR was formed dose-dependently in BSA incubated with various concentrations of peroxynitrite (Fig. 6). NTYR (5 nmol/mmol TYR) was formed in $150 \mu\text{M}$ BSA incubated with a low concentration ($3 \mu\text{M}$) of peroxynitrite. The nitrating agents included nitrous acid (acidified NaNO_2), NO_2^- plus HOCl , SIN-1 (which generates both NO and superoxide, thus probably forming peroxynitrite), AS [which generates nitroxyl anion (NO^-)], and two NO-releasing compounds (SPER-NO and GSNO). When BSA was incubated with 100 times excess amounts of these reagents, NTYR was formed at levels ranging between 4.57 and $325 \mu\text{mol/mmol TYR}$, except with GSNO. At these reagent concentrations, the yield of NTYR was highest with peroxynitrite, followed by NO_2^- plus HOCl (8.9% of that formed by peroxynitrite), nitrous acid (7.3%), AS (3.0%), SPER-NO (2.5%), and SIN-1 (1.4%). GSNO formed only low levels of NTYR under the present conditions. This could be related to the fact that no NO is released from GSNO in the absence of free thiols (27). On the other hand, when lower concentrations of nitrating

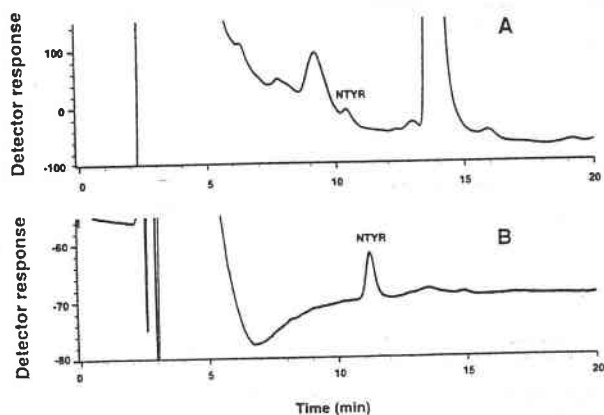


FIG. 5. Typical chromatograms obtained from HPLC-ED analyses of NTYR in the absence (A) or presence (B) of the reduction column. The enzymatic hydrolyzate of peroxynitrite-treated BSA, which contained $0.03 \mu\text{mol/TYR mmol}$, was analyzed.

TABLE I
Comparison of NTYR Formation ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ TYR) in BSA Incubated with Various Nitrating Agents

Concentration (μM)	Peroxynitrite	NaNO_2	$\text{NaNO}_2 + \text{HOCl}$	SIN-1	SPER-NO	AS	GSNO
150	3.88 ± 0.72	0.32 ± 0.08	0.020 ± 0.021^a	0.12 ± 0.07	0.011 ± 0.005	0.91 ± 0.85	n.d.
1,500	54.8 ± 8.5	9.92 ± 2.59	0.91 ± 0.036^b	2.14 ± 0.26	0.48 ± 0.035	2.59 ± 0.26	n.d.
15,000	325 ± 34	23.6 ± 7.8	29.1 ± 2.7^c	4.57 ± 1.18	8.18 ± 1.25	9.86 ± 2.08	0.11 ± 0.05

Note. BSA (10 mg/ml, 150 μM) was incubated in 100 mM sodium phosphate buffer containing 0.5 mM DTPA (pH 7.0) with a nitrating agent at 37°C for 1 h, except for peroxynitrite (room temperature, 5 min) and NaNO_2 (15 min in 0.5 M HCl). n.d., below detection limit (0.005 μmol NTYR/mmol tyrosine). The reaction was carried out in triplicate and means \pm SD are presented. The levels of Cl-TYR formed under these conditions were $^{a}1.27 \pm 0.55$, $^{b}9.60 \pm 0.33$, and $^{c}164 \pm 37$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ TYR.

agents (10 times excess or the same concentration as BSA) were used, nitrous acid, SIN-1, and AS yielded relatively larger amounts of NTYR, compared with other reagents such as NO_2^- plus HOCl and SPER-NO (Table I).

Human plasma was similarly incubated with some nitrating agents and both free and protein-bound forms of NTYR were determined (Table II). No appreciable amounts of NTYR as either the free-

or protein-bound form were detected. However, large amounts of free NTYR were formed in human plasma incubated with SIN-1 and peroxynitrite, compared with incubations with SPER-NO, AS, and NO_2^- plus HOCl. The yield of protein-bound NTYR was highest when human plasma was incubated with peroxynitrite, followed by SIN-1, AS, SPER-NO, and NO_2^- plus HOCl. When the concentrations of these nitrating agents were less than 0.1 mM, no appreciable amount of either free or protein-bound NTYR was detected, suggesting that human plasma contains compounds that react with nitrating species more rapidly than TYR.

TABLE II
Formation of NTYR in Human Plasma Incubated with Various Nitrating Agents

Compound	Concentration (mM)	Free NTYR (μM)	Protein-bound NTYR ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ TYR)
Peroxynitrite	10	3.68, 4.10	75.1, 63.5
	1	0.21, 0.08	1.10, 1.76
SIN-1	10	10.7, 9.96	1.92, 1.95
	1	0.05, 0.09	0.37, 0.10
SPER-NO	10	0.71, 0.38	0.95, 1.10
	1	n.d., n.d.	0.02, 0.03
AS	10	0.04, 0.04	1.55, 0.98
	1	0.02, n.d.	0.20, 0.15
$\text{NaNO}_2 + \text{HOCl}$	10	0.06, 0.02	0.50, 0.37
	1	0.01, 0.01	0.07, 0.02

Note. Human plasma (0.8 ml) was incubated in the presence of the nitrating agent at 37°C for 3 h, except for the experiments with peroxynitrite, which was incubated at room temperature (24°C) for 5 min (final volume, 1 ml, final pH \sim 7.5). Plasma proteins were precipitated with acetonitrile and hydrolyzed enzymatically. Supernatant was purified with a Sep-Pak C18 cartridge as described under Materials and Methods. The experiment was carried out in duplicate and individual values are listed in the table. This human plasma sample contained no detectable levels of preformed NTYR as either the free or protein-bound form.

DISCUSSION

We have described a new method to analyze NTYR in proteins and biological specimens, using HPLC with a postseparation reduction column containing a platinum black powder. This platinum column catalyzed the conversion of NTYR to aminotyrosine. This is a six-electron reaction and is not as easy as the reduction of a quinone to a hydroquinone. However, in the presence of the platinum column together with assistance of the electrochemical detector (a reduction mode), NTYR could be easily converted to aminotyrosine, which can then be analyzed electrochemically with ED. This method does not require any derivatization procedure; it is simpler than other published methods. It is also selective and sensitive. We have applied it to compare the capacity of various NO-related compounds to nitrate TYR in BSA and human plasma *in vitro*.

Our *in vitro* studies using human plasma and

various nitrating agents showed that in addition to peroxyxynitrite, SIN-1 yielded high levels of both free and protein-bound forms of NTYR, suggesting that cogeneration of NO and O_2^- from SIN-1 formed peroxyxynitrite, which nitrated TYR in plasma efficiently. In addition, AS, which generates NO^- [a one-electron reduction product of NO (28)], also nitrated plasma proteins well. Two recent publications have suggested that NO synthase does not generate NO, but may form NO^- , which can then be converted to NO by superoxide dismutase (SOD) and other electron acceptors (29, 30). NO^- can also be produced from S-nitrosothiols in the presence of thiols (27, 31–33). NO^- has been reported to be cytotoxic, reducing intracellular glutathione levels and causing DNA strand breakage in cultured cells (34). We have recently shown that NO^- can induce DNA strand breakage and oxidative damage, possibly through hydroxyl radical generation (35). The results of the present study suggest that NO^- may be converted to nitrating agents such as peroxyxynitrite and NOx (28), thus probably contributing to NTYR formation *in vivo* in inflamed tissues, where inducible NO synthase is often highly expressed. On the other hand, the levels of NTYR formed by the reaction of human plasma with NO_2^- plus HOCl were lower than with the other nitrating agents. This suggests that NO_2^- and HOCl are scavenged by some components in human plasma before forming the nitrating agent NO_2Cl (11).

The nitration of TYR and TYR-containing proteins and its role in pathophysiology have recently been reviewed by Ischiropoulos (36). The occurrence of NTYR and its increase in inflamed tissues have often been considered as evidence for formation of peroxyxynitrite by the reaction of NO and superoxide *in vivo*. However, NTYR could also be formed by other nitrating agents, including nitrous acid, N_2O_3 , and *NO_2 (3, 37). NO may also react directly with tyrosinyl radicals (e.g., that found in prostaglandin H synthase-2) to form an iminoxyl radical, which is in turn oxidized to NTYR (38). Activated human polymorphonuclear neutrophils convert NO_2^- into NO_2Cl and *NO_2 radical through myeloperoxidase-dependent pathways (39). Myeloperoxidase and horseradish peroxidase have been reported to use nitrite and hydrogen peroxide as substrates to catalyze TYR nitration in proteins (40). Thus, the oc-

currence of NTYR-containing proteins *in vivo* should be regarded as a general indication of tissue damage induced by reactive nitrogen species such as peroxyxynitrite and NOx. The method described here will be useful to measure NTYR in human plasma and tissues as a marker of exposure to endogenous nitrating or nitrosating agents.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. J. Cheney for editing the manuscript and Mrs. P. Collard for secretarial work.

REFERENCES

1. Wink, D. A., and Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radicals Biol. Med.* **25**, 434–456.
2. Beckman, J. S., and Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxyxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**, C1424–C1437.
3. Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I., and Bartsch, H. (1990). Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem. Toxicol.* **28**, 647–652.
4. Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D., and Beckman, J. S. (1992). Peroxyxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 431–437.
5. Beckman, J. S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., Harrison, J., Martin, J. C., and Tsai, M. (1992). Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxyxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 438–445.
6. Ye, Y. Z., Strong, M., Huang, Z. Q., and Beckman, J. S. (1996). Antibodies that recognize nitrotyrosine. *Methods Enzymol.* **269**, 201–209.
7. Lyman, S. V., Jiang, Q., and Hurst, J. K. (1996). Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxyxynitrite. *Biochemistry* **35**, 7855–7861.
8. Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G., and Koppenol, W. H. (1997). Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1285–1292.
9. Kikugawa, K., Kato, T., and Okamoto, Y. (1994). Damage of amino acids and proteins induced by nitrogen dioxide, a free radical toxin, in air. *Free Radicals Biol. Med.* **16**, 373–382.
10. Kono, Y. (1995). The production of nitrating species by the reaction between nitrite and hypochlorous acid. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **36**, 275–283.

11. Eiserich, J. P., Cross, C. E., Jones, A. D., Halliwell, B., and van der Vliet, A. (1996). Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid: A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J. Biol. Chem.* **271**, 19199–19208.
12. Hensley, K., Maidt, M. L., Pye, Q. N., Stewart, C. A., Wack, M., and Floyd, R. A. (1997). Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection. *Anal. Biochem.* **251**, 187–195.
13. Skinner, K. A., Crow, J. P., Skinner, H. B., Chandler, R. T., Thompson, J. A., and Parks, D. A. (1997). Free and protein-associated nitrotyrosine formation following rat liver preservation and transplantation. *Arch. Biochem. Biophys.* **342**, 282–288.
14. Maruyama, W., Hashizume, Y., Matsubara, K., and Naoi, M. (1996). Identification of 3-nitro-L-tyrosine, a product of nitric oxide and superoxide, as an indicator of oxidative stress in the human brain. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **676**, 153–158.
15. Kamisaki, Y., Wada, K., Nakamoto, K., Kishimoto, Y., Kitano, M., and Itoh, T. (1996). Sensitive determination of nitrotyrosine in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **685**, 343–347.
16. Fukuyama, N., Takebayashi, Y., Hida, M., Ishida, H., Ichimori, K., and Nakazawa, H. (1997). Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radicals Biol. Med.* **22**, 771–774.
17. Petruzzelli, S., Puntoni, R., Mimotti, P., Pulera, N., Baliva, F., Fornai, E., and Giuntini, C. (1997). Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 1902–1907.
18. Crowley, J. R., Yarasheski, K., Leeuwenburgh, C., Turk, J., and Heinecke, J. W. (1998). Isotope dilution mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine in proteins and tissues is facilitated by reduction to 3-aminotyrosine. *Anal. Biochem.* **259**, 127–135.
19. Khan, J., Brennan, D. M., Bradley, N., Gao, B., Bruckdorfer, R., and Jacobs, M. (1998). 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem. J.* **330**, 795–801.
20. Coeroli, L., Renolleau, S., Arnaud, S., Plotkine, D., Cachin, N., Plotkine, M., Ben-Ari, Y., and Charriaut-Marlangue, C. (1998). Nitric oxide production and perivascular tyrosine nitration following focal ischemia in neonatal rat. *J. Neurochem.* **70**, 2516–2525.
21. Mesenge, C., Charriaut-Marlangue, C., Verrecchia, C., Allix, M., Boulu, R. R., and Plotkine, M. (1998). Reduction of tyrosine nitration after *N* omega-nitro-L-arginine-methylester treatment of mice with traumatic brain injury. *Eur. J. Pharmacol.* **353**, 53–57.
22. Shigenaga, M. K., Lee, H. H., Blount, B. C., Christen, S., Shigeno, E. T., Yip, H., and Ames, B. N. (1997). Inflammation and NO(X)-induced nitration: Assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3211–3216.
23. Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H., and Crow, J. P. (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* **233**, 229–240.
24. Reed, J. W., Ho, H. H., and Jolly, W. L. (1974). Chemical syntheses with a quenched flow reactor: Hydroxytrihydroborate and peroxynitrite. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 1248–1249.
25. Usui, Y., Nishimura, N., Kobayashi, N., Okanoue, T., Kimoto, M., and Ozawa, K. (1989). Measurement of vitamin K in human liver by gradient elution high-performance liquid chromatography using platinum-black catalyst reduction and fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* **489**, 291–301.
26. Yamashita, S., and Yamamoto, Y. (1997). Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as a marker of oxidative stress. *Anal. Biochem.* **250**, 66–73.
27. Singh, S. P., Wishnok, J. S., Keshive, M., Deen, W. M., and Tannenbaum, S. R. (1996). The chemistry of the *S*-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14428–14433.
28. Wink, D. A., and Feelisch, M. (1996) in *Methods in Nitric Oxide Research* (Feelisch, M., and Stamler, J., Eds.), pp. 403–412, Wiley, New York.
29. Hobbs, A. J., Fukuto, J. M., and Ignarro, L. J. (1994). Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: Direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10992–10996.
30. Schmidt, H. H., Hofmann, H., Schindler, U., Shutenko, Z. S., Cunningham, D. D., and Feelisch, M. (1996). No NO from NO synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14492–14497.
31. Arnelo, D. R., and Stamler, J. S. (1995). NO⁺, NO, and NO⁻ donation by *S*-nitrosothiols: Implications for regulation of physiological functions by *S*-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 279–285.
32. Hogg, N., Singh, R. J., and Kalyanaraman, B. (1996). The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett.* **382**, 223–228.
33. Wong, P. S. Y., Hyun, J., Fukuto, J. M., Shirota, F. N., DeMaster, E. G., Shoeman, D. W., and Nagasawa, H. T. (1998). Reaction between *S*-nitrosothiols and thiols: Generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry. *Biochemistry* **37**, 5362–5371.
34. Wink, D. A., Feelisch, M., Fukuto, J., Chistodoulou, D., Jourdeuil, D., Grisham, M. B., Vodovotz, Y., Cook, J. A., Krishna, M., DeGraff, W. G., Kim, S., Gamson, J., and Mitchell, J. B. (1998). The cytotoxicity of nitroxyl: Possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch. Biochem. Biophys.* **351**, 66–74.
35. Ohshima, H., Glibert, I., and Bianchini, F. (1999). Induction of DNA strand breakage and base oxidation by nitroxyl anion

- (NO⁻) through hydroxyl radical production. *Free Radicals Biol. Med.*, in press.
36. Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: A pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 1-11.
 37. Halliwell, B. (1997). What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation *in vivo*? *FEBS Lett.* **411**, 157-160.
 38. Gunther, M. R., Hsi, L. C., Curtis, J. F., Gierse, J. K., Marnett, L. J., Eling, T. E., and Mason, R. P. (1997). Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J. Biol. Chem.* **272**, 17086-17090.
 39. Eiserich, J. P., Hristova, M., Cross, C. E., Jones, A. D., Freeman, B. A., Halliwell, B., and van der Vliet, A. (1998). Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* **391**, 393-397.
 40. Sampson, J. B., Ye, Y., Rosen, H., and Beckman, J. S. (1998). Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 207-213.

3^{ème} PARTIE DES RESULTATS

3.1 Cytotoxicité et lésions de l'ADN sur des sites spécifiques par l'anion nitroxyde en présence de peroxyde d'hydrogène, implications dans diverses conditions pathophysiologiques

3.1.1 Problématique et objectifs du travail

Une production excessive de NO est impliquée dans l'apparition de diverses pathologies comme par exemple les maladies neurodégénératives et le cancer. La majorité des effets néfastes du NO a été attribuée à ses dérivés chimiques, comme par exemple les NOx et le peroxydinitrite. Il a été démontré récemment que le NO⁻ pouvait être produit dans des conditions physiologiques. Notre laboratoire a précédemment montré que le NO⁻ induit la formation de cassures sur le plasmide pBR322, de 8-oxo-dG (8-oxo-déoxyguanosine) sur l'ADN de thymus de veau et de MDA (malondialdéhyde) à partir de désoxyribose, *in vitro*. L'ensemble de ces résultats suggère que le HO[•] se forme à partir de NO⁻, soit par réaction avec du NO[•], soit indirectement par formation de H₂O₂ (voir analyse bibliographique §1.1.2.1). Lors de l'inflammation, le NO[•] et le NO⁻ ne sont pas les seuls composés produits. En effet, du H₂O₂ est également généré indirectement par les macrophages activés, par dismutation du O₂^{-•}.

Le but de notre étude est de comparer les effets génotoxiques et cytotoxiques du NO⁻ et du NO[•], en présence de H₂O₂. De plus, nous avons étudié les réactions chimiques qu'il peut exister entre le NO⁻ et H₂O₂ et le NO[•] et H₂O₂ en présence de métaux de transition. Pour cela, plusieurs tests *in vitro* ont été utilisés.

3.1.2 Résultats

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'un donneur de NO⁻, le sel d'Angeli (AS), sur les réactions d'oxydation médiées par H₂O₂ en présence

d'ions métalliques. Pour cela, nous avons pratiqué plusieurs tests *in vitro*: la formation de MDA à partir de désoxyribose, la détection de 8-oxo-dG, l'induction de cassures des brins d'ADN. Nous avons également étudié si les cassures de l'ADN sont produites au niveau de sites spécifiques.

Les mélanges réactionnels suivants ont été testés:

- AS
- FeCl₃/H₂O₂
- AS/FeCl₃
- AS/H₂O₂
- AS/FeCl₃/H₂O₂
- AS/H₂O₂
- AS/CuCl₂
- AS/CuCl₂/H₂O₂

Les concentrations sont fixées à 50 μ M pour FeCl₃ et CuCl₂ et à 500 μ M pour H₂O₂.

3.1.2.1 Production de MDA

La formation de MDA à partir de désoxyribose est un marqueur du stress oxydatif. La quantité de MDA est déterminée, après réaction avec de l'acide 2-thiobarbiturique, par analyse en HPLC au moyen d'un détecteur à fluorescence.

La formation de MDA est environ 8 fois plus importante en présence du mélange AS/H₂O₂/FeCl₃, que pour tous les autres mélanges. On remarque que la production de MDA est systématiquement beaucoup moins importante lorsque le métal de transition utilisé est le Cu²⁺. On remarque que le mélange DEA-NO/FeCl₃/H₂O₂ forme beaucoup moins de MDA que AS/FeCl₃/H₂O₂.

3.1.2 Formation de 8-oxo-dG sur l'ADN de thymus de veau

La production de 8-oxo-dG, un autre marqueur du stress oxydatif, est quantifiée par HPLC au moyen d'un détecteur électrochimique.

La formation de 8-oxo-dG est maximale pour le mélange AS/CuCl₂/H₂O₂. Le fait que la production de 8-oxo-dG soit plus importante en présence de CuCl₂ qu'avec du FeCl₃ a déjà été rapportée pour d'autres agents réducteurs comme le NADH et l'acide ascorbique. Des accepteurs d'électrons inhibent la formation de 8-oxo-dG induite par les mélanges AS/FeCl₃/H₂O₂ et AS/H₂O₂, ce qui est corrélé avec la production minimale de 8-oxo-dG par le DEA-NO quelque soit le mélange et la concentration utilisés.

La présence de piègeurs de HO· (DMSO, éthanol, mannitol) inhibe la formation de 8-oxo dG induite par AS/H₂O₂/Fe³⁺, ce qui prouve que la formation de cette base oxydée est due à la présence de HO·.

3.1.3 Cassures des brins d'ADN

Cet essai a été pratiqué sur le plasmide pBR322 incubé en présence des différents mélanges. Les différentes formes ont été visualisées après migration de l'ADN sur gel d'agarose. La forme I correspond à la forme super-enroulée, la II à la forme ouverte (cassure simple brin) et la III correspond à la forme linéaire (cassure double brin). Pour le mélange AS/H₂O₂/FeCl₃, ne sont détectées que les formes II et III, ce qui montre l'existence de cassures doubles brins. Dans le cas du mélange AS/CuCl₂/H₂O₂, plus aucune forme n'est distinguée, ce qui suggère que l'ADN a été totalement coupé.

3.1.4 Effets de piègeurs du HO· et de la bathocuproïne sur les lésions induites par l'AS

Pour cette étude, nous avons utilisé une technique d'analyse particulière décrite précédemment par Oikawa et Kawanishi. Des fragments d'ADN correspondant à une partie du gène TP53 ou du protooncogène c-Ha-ras-1, marqués au ³²P à l'extrémité 5', sont incubés *in vitro* en présence de 100 μM d'AS + 20 μM CuCl₂ + 20 μM H₂O₂. Après une incubation de 30 min, les fragments d'ADN sont chauffés et traités par 1M de pipéridine. Les fragments d'ADN sont ensuite analysés après migration sur gel de polyacrylamide/8M d'urée, ce qui permet de visualiser les cassures de l'ADN.

Nous avons observé que l'AS seul induit des lésions sur l'ADN qui sont inhibées par des piègeurs de HO[•]. Le mélange AS/CuCl₂/H₂O₂ induit des cassures sur l'ADN bien plus importantes que celles induites par l'AS seul. Ce type de lésions est inhibé par le carboxy-PTIO (un piègeur de NO[•] et d'autres oxydants) et par la bathocuproïne (un agent chélateur spécifique du Cu¹⁺) alors qu'il ne l'est pas pour des piègeurs de radical hydroxyle.

3.1.2.5 Sites préférentiels de clivage de l'ADN

La même méthode que précédemment a été utilisée, suivie d'un séquençage.

L'AS seul induit un clivage de l'ADN sans spécificité particulière. En revanche, après incubation en présence d'AS/CuCl₂/H₂O₂, le profil de clivage est tout à fait différent. Ce type de traitement induit, en effet, des sites labiles à la pipéridine préférentiellement sur les résidus thymines situés principalement sur les séquences: 5'-CTG-3', 5'-GTG-3' et 5'-GTA-3'.

3.1.2.6 Cytotoxicité

Nous avons étudié la toxicité induite par l'AS et le DEA-NO (un donneur de NO[•]) en présence ou non de H₂O₂ en mesurant la libération de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture cellulaire. Le milieu de culture contenant déjà des traces de Fe³⁺, nous n'avons pas rajouté de métaux de transition dans le mélange réactionnel. Le temps d'incubation a été fixé à 4h30.

Les différents composés incubés séparément exercent une cytotoxicité négligeable pour les concentrations utilisées. La libération de LDH induite par 500μM H₂O₂ et par 2mM AS seuls est de 9% et 17%, respectivement, alors qu'elle est de 72% lorsque ces deux composés sont incubés simultanément. Cet effet synergique est retrouvé pour le DEA-NO mais une concentration de 2 mM est nécessaire pour égaler la toxicité produite par 250μM d'AS, en présence de H₂O₂.

3.1.3 Discussion

Les essais *in vitro* nous ont permis de démontrer que la présence simultanée de NO⁻ et de H₂O₂ provoque la formation du très réactif radical hydroxyle en présence de FeCl₃ (Eq 1 et 2) et d'un complexe Cu⁽¹⁺⁾-peroxyde en présence de CuCl₂ (Eq 1 et 3). Ainsi, le NO⁻ agit comme d'autres agents réducteurs, comme par exemple l'acide ascorbique, le glutathion ou le NADH.



La formation de HO[·] ou de Cu⁽¹⁺⁾-OOH conduit à la formation de 8-oxo-dG, de cassures simple et double brins de l'ADN. De plus, nous avons montré que le mélange AS/H₂O₂/CuCl₂ induit des lésions sur l'ADN plus fréquemment sur les résidus thymines situés sur les séquences 5'-CTG-3', 5'-GTG-3' et 5'-GTA-3'.

Nous avons également montré que la présence d'AS augmente de façon synergique la cytotoxicité induite par H₂O₂. Nous avons remarqué que le DEA-NO, en présence de H₂O₂, est cytotoxique, mais moins que l'AS. La cytotoxicité induite par la présence simultanée de DEA-NO et de H₂O₂ a déjà été décrite dans d'autres types cellulaires. Ces résultats diffèrent cependant de ceux obtenus *in vitro* où seul l'AS induit des lésions sur l'ADN. Nous proposons plusieurs hypothèses pour expliquer cette différence entre les résultats obtenus dans des cellules en culture et ceux obtenus *in vitro*.

La première hypothèse est que le mélange DEA-NO/H₂O₂ soit cytotoxique par des mécanismes indépendants de la formation de HO[·]. En effet, le NO[·] inhibe la respiration mitochondriale et le H₂O₂ augmenterait cette toxicité. La deuxième possibilité est que du HO[·] puisse être formé à partir de NO[·] et de H₂O₂ dans des cellules en culture, comme il a été montré précédemment par Farias-Eisner et coll.

Cytotoxicity and Site-specific DNA Damage Induced by Nitroxyl Anion (NO^-) in the Presence of Hydrogen Peroxide

IMPLICATIONS FOR VARIOUS PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS*

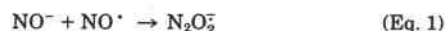
(Received for publication, April 5, 1999)

Laurence Chazotte-Aubert‡, Shinji Oikawa§, Isabelle Gilibert‡, Franca Bianchini‡, Shosuke Kawanishi§, and Hiroshi Ohshima†¶

From the ‡Unit of Endogenous Cancer Risk Factors, International Agency for Research on Cancer, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France and the §Department of Hygiene, Mie University School of Medicine, Mie 514, Japan

Nitroxyl anion (NO^-), the one-electron reduction product of nitric oxide (NO^\bullet), is formed under various physiological conditions. We have used four different assays (DNA strand breakage, 8-oxo-deoxyguanosine formation in calf thymus DNA, malondialdehyde generation from 2'-deoxyribose, and analysis of site-specific DNA damage using ^{32}P -5'-end-labeled DNA fragments of the human *p53* tumor suppressor gene and the *c-Ha-ras-1* protooncogene) to study the effects of NO^- generated from Angeli's salt on DNA damage. It was found that strong oxidants are generated from NO^- , especially in the presence of H_2O_2 plus Fe(III)-EDTA or Cu(II). NO^- released from diethylamine-NONOate had no such effect. Distinct effects of hydroxyl radical (HO^\bullet) scavengers and patterns of site-specific DNA cleavage caused by Angeli's salt alone or by Angeli's salt, H_2O_2 plus metal ion suggest that NO^- acts as a reductant to catalyze the formation of the HO^\bullet from H_2O_2 plus Fe(III) and formation of Cu(I)-peroxide complexes with a reactivity similar to HO^\bullet from H_2O_2 and Cu(II). Angeli's salt and H_2O_2 exerted synergistically cytotoxic effects to MCF-7 cells, determined by lactate dehydrogenase release assay. Thus NO^- may play an important role in the etiology of various pathophysiological conditions such as inflammation and neurodegenerative diseases, especially when H_2O_2 and transition metallic ions are present.

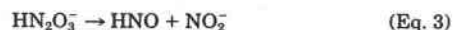
Excess production of nitric oxide (NO^\bullet) has been implicated as a cause of diverse pathophysiological conditions such as inflammation, neurodegenerative diseases, cardiovascular disorders, and cancer. These detrimental effects of NO^\bullet have been attributed to reactive nitrogen species such as NO_x and peroxynitrite (ONOO^-), which are formed by the reaction of NO^\bullet with oxygen and superoxide, respectively. Reactive nitrogen species can oxidize, nitrate, and nitrosate biomolecules such as proteins, DNA, and lipids, thus altering their functions. We have recently reported that NO^- , which is the one-electron reduction product of NO^\bullet , can also cause strand breakage and oxidative damage in DNA *in vitro* (1). We have proposed that a highly toxic hydroxyl radical (HO^\bullet) generated from the reaction between NO^- and NO^\bullet is responsible for the oxidation reactions (Equations 1 and 2).



NO^- has been also reported to be cytotoxic, reducing intracellular glutathione levels and causing DNA strand breakage in cultured cells (2). However, it can also be converted under physiological conditions *in vitro*, as well as in cells, to NO^\bullet and other reactive oxygen and nitrogen species including superoxide, hydrogen peroxide (H_2O_2), and peroxynitrite (3–5), and the actual mechanisms and reactive species responsible for the cytotoxic effects of NO^- have not been established.

Three recent publications have suggested that NO^\bullet synthase generates NO^- , which can be then converted to NO^\bullet by superoxide dismutase and other electron acceptors (6–8). NO^- can also be produced from *S*-nitrosothiols in the presence of thiols (9–11). It has been reported that, in the absence of oxygen, nitrosylhemoglobin liberates NO^- in a reaction producing methemoglobin (12). Ferrocycytochrome *c* also reacts with NO^- to form ferricytochrome *c* and NO^- , which may have implications for inhibition of mitochondrial oxygen consumption by NO^- (13). In our previous reports, NO^- was proposed as one of the possible agents responsible for DNA strand breakage induced by NO^\bullet and catechol-type compounds such as catecholamines, catechol-estrogens, and certain flavonoids (14). NO^- can be formed by one-electron reduction of NO^\bullet by the quinone/hydroquinone redox system in a manner similar to that of the formation of O_2^- from oxygen (14).

In the present study, we have studied the effects of NO^- generated from Angeli's salt (sodium trioxodinitrate, $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) on DNA strand breakage and DNA base modifications *in vitro* mediated by H_2O_2 in the presence of metallic ions. At physiological pH, Angeli's salt exists predominantly in the form of the monoanion HN_2O_3^- , which decomposes to NO^- and nitrite (NO_2^-) (Equation 3) (15). As HNO is a weak acid ($\text{p}K_a = 4.7$), NO^- is the predominant form in aqueous solution at neutral pH (Equation 4) (15).



We have found that NO^- generated from Angeli's salt dramatically enhances DNA damage mediated by H_2O_2 in the presence of the ferric ion (Fe(III))-EDTA or copper ion (Cu(II)), indicating that NO^- acts as an endogenous reductant to catalyze formation of strong oxidants. Furthermore, Angeli's salt and H_2O_2 cooperatively exerted cytotoxic effects toward human breast cancer cells. We discuss possible implications of our

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33 (0)4 72 73 85 09; Fax: 33 (0)4 72 73 85 75; E-mail: Ohshima@iarc.fr.

findings as a cause of diverse pathophysiological conditions mediated by activation or overexpression of NO^- synthase.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals—Angeli's salt and diethylamine-NONOate (DEA-NO)¹ were obtained from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI). Plasmid pBR322 was purchased from Amersham Pharmacia Biotech. [γ -³²P]ATP (222 TBq/mmol) was supplied by NEN Life Science Products. Bathocuproinedisulfonic acid, and 1H-imidazol-1-yloxy,2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide, potassium salt (carboxy-PTIO) were from Dojin Chemicals Co., Kumamoto, Japan. All other chemicals including EDTA, ferric chloride, cuprous chloride, diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 8-oxo-2'-deoxyguanosine, 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy free radical (4-OH-TEMPO), potassium ferricyanide (III) [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], superoxide dismutase (from bovine erythrocytes), catalase (from bovine liver, thymol-free), and 2-thiobarbituric acid were obtained from Sigma, Aldrich, or Wako Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan.

Measurement of Malondialdehyde (MDA) Produced from Oxidation of Deoxyribose by Angeli's Salt—MDA formed from the oxidation of 2'-deoxyribose was measured as a marker of HO^\cdot generation, according to the method of Hogg *et al.* (16). The reactions were carried out in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 10 μM DTPA, 1 mM 2'-deoxyribose, 500 μM H_2O_2 , 50 μM either FeCl_3 -EDTA or CuCl_2 , an appropriate amount of HCl to neutralize the NaOH present in the Angeli's salt solution, and 200 μM Angeli's salt prepared in 0.01 N NaOH at 37 °C (final volume, 1 ml; final pH, ~7.5). The MDA content was determined after reaction with 2-thiobarbituric acid using HPLC with a fluorescence detector, as reported previously (1, 17). All experiments were carried out in triplicate.

Analysis of 8-oxo-2'-Deoxyguanosine (8-oxo-dG) in Calf Thymus DNA Incubated with Angeli's Salt—Angeli's salt prepared in 0.01 N NaOH (0–5 mM, 100 μl) was added to a reaction mixture (final volume, 1 ml) containing 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, calf thymus DNA (1 mg), 10 μM DTPA, 500 μM H_2O_2 , either 50 μM FeCl_3 -EDTA or CuCl_2 , and an appropriate amount of HCl to neutralize the NaOH present in the Angeli's salt solution (final pH ~7.5), and the solution was incubated at 37 °C for 30 min. After the reaction, ethanol-precipitated DNA was hydrolyzed enzymatically, and 8-oxo-dG and 2'-deoxyguanosine were analyzed by HPLC with a Coulchem II electrochemical detector (ESA Inc., Chelmsford, MA) and a Shimadzu UV spectrophotometer (model SPD-2A), respectively, according to a modification of the method of Yamaguchi *et al.* (18). All experiments were carried out in duplicate or triplicate.

Induction and Analysis of DNA Single Strand Breaks—The experiments were carried out by incubating plasmid pBR322 DNA (100 ng) at 37 °C for 30 min in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 10 μM DTPA, 500 μM H_2O_2 , either 50 μM FeCl_3 -EDTA or CuCl_2 , 200 μM Angeli's salt prepared in 0.01 N NaOH, and an appropriate amount of HCl to neutralize the NaOH present in the Angeli's salt solution (final volume, 10 μl ; final pH, ~7.5). After the reaction, electrophoresis was carried out as described previously (1, 14, 19–21). The average number of single strand breaks/pBR322 DNA molecule was calculated according to Epe and co-workers (22, 23), taking into account that the relaxed form (form II) when stained with ethidium bromide gives a fluorescence intensity 1.4-fold higher than the supercoiled form (form I) and that a relaxation is caused by one single strand break/DNA molecule. All experiments were carried out in triplicate, and statistical significance was calculated using the Student's *t* test.

Site-specific DNA Damage—³²P-5'-end-labeled DNA fragments of the human p53 tumor suppressor gene² and the c-Ha-ras-1 protooncogene (25) were prepared as previously reported (26, 27). The standard reaction mixture in a microtube (1.5-ml, Eppendorf) contained 100 μM Angeli's salt, 20 μM CuCl_2 , 20 μM H_2O_2 , 20 μM /base of sonicated calf thymus DNA, and a ³²P-5'-end-labeled DNA fragment in 200 μl of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8) containing 5 μM DTPA. After incubation at 37 °C for 30 min, the DNA fragments were heated at

90 °C in 1 M piperidine and treated as described previously (26). The treated DNA fragments were electrophoresed on an 8% polyacrylamide/8 M urea gel, and the autoradiogram was obtained by exposing x-ray film to the gel. The preferred cleavage sites were determined by direct comparison of the positions of the oligonucleotides with those produced by the procedure of Maxam and Gilbert (28) using a DNA-sequencing system (LKB 2101 Macrohor). A laser densitometer (LKB 2222 UltraScan XL) was used for the measurement of the relative amounts of oligonucleotides from treated DNA fragments.

Lactate Dehydrogenase (LDH) Cytotoxicity Assay—Human breast cancer cells (MCF-7) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere containing 10% CO_2 . Cells were seeded into 96-well microculture plates one day before the treatment, at a density of 10^5 cells/well with 100 μl of Dulbecco's modified Eagle's medium without phenol red containing 5% fetal bovine serum. Cells were treated with Angeli's salt or DEA-NO prepared in 0.01 N NaOH in combination with H_2O_2 prepared in water (0–10 mM). The NaOH present in the Angeli's salt or DEA-NO solutions was neutralized with the same volume of 0.01 N HCl. The LDH assay was performed using the CytoTox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI). To obtain maximal LDH release, nontreated cells were incubated in the presence of lysis solution (9% Triton X-100) for 45 min at 37 °C. After 4.5 h of incubation in the presence of the different products, the plate was centrifuged at $250 \times g$ for 4 min, and 50 μl of supernatant was used for the LDH assay. The percentage of cytotoxicity was calculated according to the following equation,

$$\% \text{ LDH release} = (\text{exp} - \text{back}_1) / (\text{max} - \text{back}_2) \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

where exp = experimental value, max = mean of cell maximum LDH release, back₁ = mean of cell culture background, and back₂ = mean of cell culture background plus lysis solution. All experiments were carried out at least in triplicate, and the results are expressed as means \pm S.D.

RESULTS

Four different assays were used to study the effects of Angeli's salt on oxidation reactions mediated by H_2O_2 in the presence of $\text{Fe}(\text{III})$ -EDTA or $\text{Cu}(\text{II})$.

MDA Production from 2'-Deoxyribose—The first assay was based on oxidation of 2'-deoxyribose leading to the formation of MDA, which has been measured as a marker of HO^\cdot generation (29). The formation of MDA in the presence of Angeli's salt, H_2O_2 , and $\text{Fe}(\text{III})$ -EDTA was very rapid and reached a plateau in 10 min, whereas H_2O_2 and $\text{Fe}(\text{III})$ -EDTA alone catalyzed the formation of MDA linearly up to 60 min of incubation (Fig. 1A). Lower concentrations of MDA were formed when the reaction was carried out in the presence of H_2O_2 plus $\text{Cu}(\text{II})$ than with H_2O_2 plus $\text{Fe}(\text{III})$ -EDTA. MDA was also formed dose dependently with different concentrations of Angeli's salt in the presence of H_2O_2 and metallic ions (Fig. 1B). However, its formation was inhibited by a high concentration (2 mM) of Angeli's salt, especially when the reaction was carried out in the presence of $\text{Fe}(\text{III})$ -EDTA. Fig. 2 compares the levels of MDA formation mediated by H_2O_2 and metallic ion in the presence of Angeli's salt, DEA-NO, or some reducing agents. NO^- generated from Angeli's salt catalyzed MDA formation from 2'-deoxyribose, as did other reducing agents such as ascorbic acid, glutathione, and NAD(P)H. In contrast, NO^- generated from 200 μM DEA-NO inhibited MDA formation mediated by 500 μM H_2O_2 and 50 μM $\text{Fe}(\text{III})$ -EDTA or $\text{Cu}(\text{II})$ by 43 and 19%, respectively (Fig. 2). Formation of MDA from 2'-deoxyribose mediated by 200 μM Angeli's salt, 500 μM H_2O_2 , and 50 μM $\text{Fe}(\text{III})$ -EDTA was also inhibited by 83 and 80% by the inclusion of 200 μM ferricyanide or 4-OH-TEMPO (electron acceptors), respectively (data not shown).

Formation of 8-oxo-dG in Calf Thymus DNA—As shown in Fig. 3, the levels of 8-oxo-dG increased dose dependently in calf thymus DNA incubated with Angeli's salt in the presence of H_2O_2 and metallic ions. As previously reported for other reducing agents such as ascorbic acid and NADH (27), Angeli's salt

¹ The abbreviations used are: DEA-NO, diethylamine-NONOate; carboxy-PTIO, 1H-imidazol-1-yloxy,2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide; DTPA, diethylenetriamine pentaacetic acid; LDH, lactate dehydrogenase; MDA, malondialdehyde; 4-OH-TEMPO, 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy free radical; 8-oxo-dG, 8-oxo-2'-deoxyguanosine; HPLC, high pressure liquid chromatography; bp, base pair(s).

² P. Chumakov, GenBank™/EBI Data Bank accession number X54156, 1990.

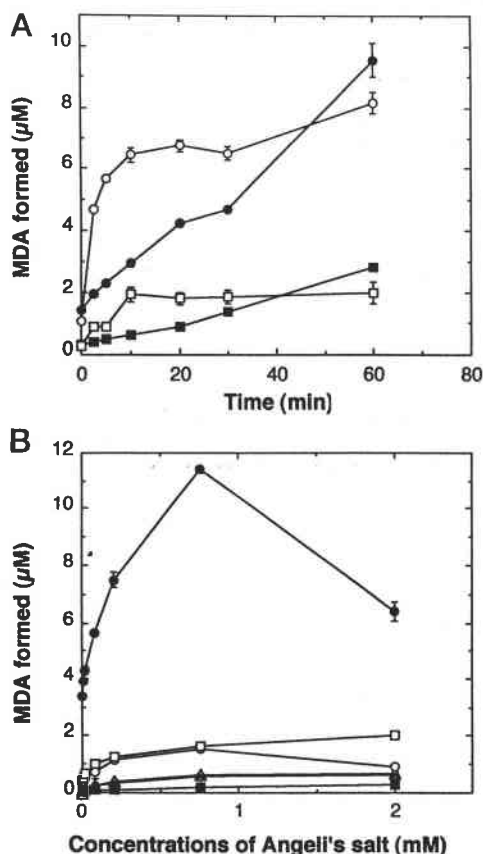


FIG. 1. Effect of incubation time (A) and Angeli's salt concentrations (B) on MDA formation from 2'-deoxyribose by H_2O_2 and Fe(III)-EDTA or Cu(II). A, the reactions were carried out in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 10 μM DTPA, 1 mM 2'-deoxyribose at 37 °C (final volume, 1 ml; final pH, ~7.5) in the presence of 200 μM Angeli's salt, 500 μM H_2O_2 , and 50 μM FeCl₃-EDTA (○); 500 μM H_2O_2 and 50 μM FeCl₃-EDTA (●); 200 μM Angeli's salt, 500 μM H_2O_2 , and 50 μM CuCl₂ (□); and 500 μM H_2O_2 and 50 μM CuCl₂ (■). B, the reactions were carried out at 37 °C for 10 min in the presence of Angeli's salt alone (Δ) and Angeli's salt plus 50 μM FeCl₃-EDTA (○); Angeli's salt plus 500 μM H_2O_2 (x); Angeli's salt plus 50 μM FeCl₃-EDTA and 500 μM H_2O_2 (●); Angeli's salt plus 50 μM CuCl₂ (■); and Angeli's salt plus 50 μM CuCl₂ and 500 μM H_2O_2 (□). The MDA contents were determined after the reaction with 2-thiobarbituric acid using HPLC with a fluorescence detector, as reported previously (1, 17). All experiments were carried out in triplicate.

catalyzed the hydroxylation of 2'-deoxyguanosine in DNA more efficiently in the presence of Cu(II) than in the presence of Fe(III)-EDTA. As shown in Table I, hydroxyl radical scavengers (ethanol, D-mannitol, Me₂SO) inhibited 8-oxo-dG formation mediated by Angeli's salt, H_2O_2 , and Fe(III)-EDTA more effectively than that mediated by Angeli's salt, H_2O_2 , and Cu(II). Two electron acceptors, ferricyanide and 4-OH-TEMPO, also inhibited the formation of 8-oxo-dG by H_2O_2 and either Fe(III)-EDTA or Cu(II). NO^- generated from 0.02, 0.2, or 2 mM DEA-NO did not increase 8-oxo-dG levels in DNA induced with 500 μM H_2O_2 and 50 μM Fe(III)-EDTA or Cu(II), but rather reduced the hydroxylation of deoxyguanosine mediated by H_2O_2 and Fe(III)-EDTA or Cu(II) (40–55% inhibition) (data not shown).

DNA Strand Breakage—The pBR322 plasmid DNA was incubated with 200 μM Angeli's salt in the presence or absence of 500 μM H_2O_2 plus 50 μM Fe(III)-EDTA or Cu(II), and the percentages of form I (supercoiled form), form II (open ring form), and form III (linear form) were measured (Table II). As we previously reported (1), incubation of plasmid pBR322 with Angeli's salt alone formed 52.6% of form II, corresponding to ~1.25 single strand breaks/ 10^4 bp. Increased levels of DNA

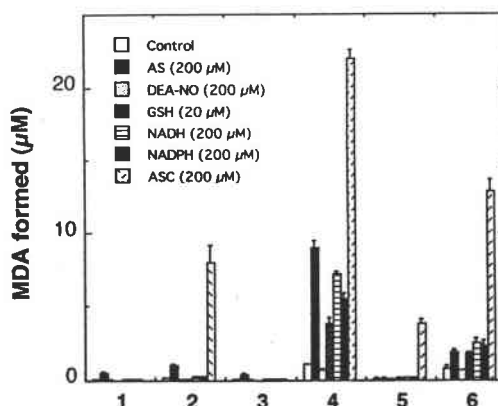


FIG. 2. Comparison of the effect of Angeli's salt and DEA-NO with that of other reducing agents on MDA formation from 2'-deoxyribose by H_2O_2 and Fe(III)-EDTA or Cu(II). The reactions were carried out in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 10 μM DTPA, 1 mM 2'-deoxyribose at 37 °C for 10 min (final volume, 1 ml; final pH, ~7.5). 1, reductant alone; 2, reductant plus 50 μM FeCl₃-EDTA; 3, reductant plus 500 μM H_2O_2 ; 4, reductant plus 500 μM H_2O_2 plus 50 μM FeCl₃-EDTA; 5, reductant plus 50 μM CuCl₂; 6, reductant plus 500 μM H_2O_2 plus 50 μM CuCl₂. The compounds tested were: H_2O (none, Control), Angeli's salt (AS), DEA-NO, glutathione (GSH), NADH, NADPH, and ascorbic acid (ASC). The concentrations were 200 μM , except for GSH, which was 20 μM .

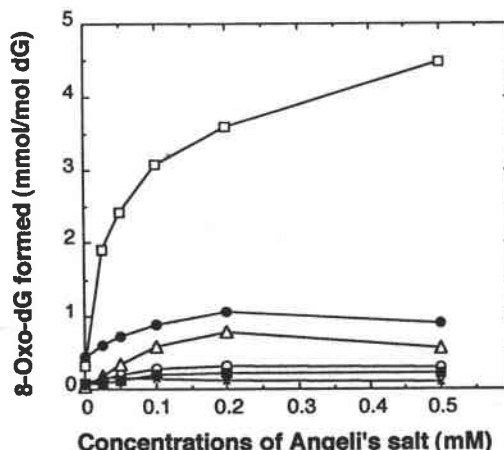


FIG. 3. Effect of Angeli's salt concentration on 8-oxo-dG formation in calf thymus DNA. The reactions were carried out in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing calf thymus DNA (1 mg) and 10 μM DTPA at 37 °C for 30 min (final volume, 1 ml) in the presence of Angeli's salt alone (Δ) and Angeli's salt plus 50 μM FeCl₃-EDTA (○); Angeli's salt plus 500 μM H_2O_2 (x); Angeli's salt plus 50 μM FeCl₃-EDTA and 500 μM H_2O_2 (●); Angeli's salt plus 50 μM CuCl₂ (■); and Angeli's salt plus 50 μM CuCl₂ and 500 μM H_2O_2 (□). After the reaction, ethanol-precipitated DNA was hydrolyzed enzymatically, and 8-oxo-dG was analyzed by HPLC with an electrochemical detector, according to a modification of the method of Yamaguchi *et al.* (18). Means of duplicate analyses are shown.

strand breakage were also observed when plasmid DNA was incubated with metallic ions (Fe(III)-EDTA or Cu(II)) alone or in combination with H_2O_2 and Fe(III)-EDTA or Cu(II) compared with nontreated plasmid. However, the addition of Angeli's salt dramatically enhanced strand breakage induced by H_2O_2 plus Fe(III)-EDTA or Cu(II). In particular, when the reaction was carried out in the presence of Angeli's salt, H_2O_2 , and Cu(II), none of forms I, II, and III were clearly detected, indicating that the DNA was completely fragmented. When the plasmid was incubated with Angeli's salt, H_2O_2 , and Fe(III), only forms II and III were formed, indicating that in addition to single strand breakage, double strand breaks were also induced.

Effects of OH Scavengers and Bathocuproine on DNA Dam-

TABLE I

Effects of hydroxyl radical scavengers and electron acceptors on 8-oxo-dG formation in calf thymus DNA incubated with Angeli's salt plus H_2O_2 in the presence of Fe(III)-EDTA or Cu(II)

Calf thymus DNA (1 mg/ml) was incubated with 200 μM Angeli's salt, 500 μM H_2O_2 , and 50 μM Fe(III)-EDTA or Cu(II) in the presence of HO \cdot scavengers and electron acceptors in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 10 μM DTPA at 37 $^\circ\text{C}$ for 30 min. Mean \pm S.D. ($n = 3$) are presented.

	8-Oxo-dG (μmol)/dG (mmol)	
	Fe(III)-EDTA	Cu(II)
Control ^a	0.427 \pm 0.070 (100)	3.12 \pm 0.15 (100) ^b
Ethanol (0.2 M)	0.039 \pm 0.009 (9)	3.71 \pm 0.12 (119)
Me_2SO (0.2 M)	0.036 \pm 0.010 (9)	2.68 \pm 0.27 (86)
D-Mannitol (0.1 M)	0.075 \pm 0.009 (18)	2.74 \pm 0.16 (88)
Ferricyanide (0.02 M)	0.172 \pm 0.055 (40)	0.90 \pm 0.17 (29)
4-OH-TEMPO (0.02 M)	0.021 \pm 0.008 (5)	1.17 \pm 0.22 (38)

^a Control; in the absence of scavengers.

^b Numbers in parentheses are the percentages of controls (100%).

TABLE II

DNA strand breakage induced by Angeli's salt in the absence or presence of H_2O_2 and/or Fe(III)-EDTA or Cu(II)

Plasmid pBR322 DNA (100 ng) was incubated in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 10 μM DTPA at 37 $^\circ\text{C}$ for 15 min. Concentrations of compounds used: Angeli's salt (200 μM), H_2O_2 (500 μM), FeCl₃-EDTA (50 μM), and CuCl₂ (50 μM). Mean \pm S.D. ($n = 3$) are presented. AS, Angeli's salt.

	Percentages of form		
	I (Supercoiled)	II (Ring-open)	III (Linear)
Control	94.8 \pm 1.6	5.2 \pm 1.6	— ^a
H_2O_2	91.7 \pm 1.7	8.3 \pm 1.7	—
Fe(III)-EDTA	80.7 \pm 1.8	19.3 \pm 1.8	—
Cu(II)	89.2 \pm 3.1	10.8 \pm 3.1	—
AS	47.4 \pm 3.2	52.6 \pm 3.2	—
AS + H_2O_2	40.9 \pm 1.3	59.1 \pm 1.3	—
AS + Fe(III)-EDTA	24.2 \pm 5.7	75.8 \pm 5.7	Trace
AS + Cu(II)	49.5 \pm 2.8	50.5 \pm 2.8	—
H_2O_2 + Fe(III)-EDTA	47.1 \pm 3.2	52.9 \pm 3.2	Trace
H_2O_2 + Cu(II)	—	80.7 \pm 3.8	19.3 \pm 3.8
AS + H_2O_2 + Fe(III)-EDTA	—	64.7 \pm 8.6	35.3 \pm 8.6
AS + H_2O_2 + Cu(II)	—	—	—

^a Not detected.

age Induced by Angeli's Salt—Fig. 4 shows that incubation of the ^{32}P -5'-end-labeled 261-bp fragment (Aval^I 1645-Xba^I 1905) of the human c-Ha-ras-1 protooncogene with 200 μM Angeli's salt alone can induce DNA damage (lane 2). Hydroxyl radical scavengers such as ethanol, D-mannitol, and sodium formate inhibited the damage induced by Angeli's salt (lanes 3–5). Carboxy-PTIO, an NO \cdot -trapping agent, which may also scavenge other oxidants (20, 30), inhibited the Angeli's salt-mediated DNA damage (lane 6), whereas bathocuproine, a Cu(I)-specific chelating agent, did not affect it (lane 7). On the other hand, 40 μM Angeli's salt in the presence of 20 μM CuCl₂ and 40 μM H_2O_2 exerted much stronger effects on the DNA than Angeli's salt alone (lane 8). This DNA damage was not inhibited by hydroxyl radical scavengers (lanes 9–11), whereas it was inhibited by carboxy-PTIO and bathocuproine almost completely (lane 12 and 13).

Site Preference of DNA Cleavage—The DNA cleavage sites were examined using ^{32}P -5'-end-labeled DNA fragments of the human p53 tumor suppressor gene and the c-Ha-ras-1 protooncogene by the procedure of Maxam and Gilbert (28). As seen in Fig. 5, B and D, Angeli's salt alone caused DNA cleavage at every nucleotide position without marked site preference. On the other hand, Angeli's salt in the presence of H_2O_2 and Cu(II) induced piperidine-labile sites frequently at thymine residues

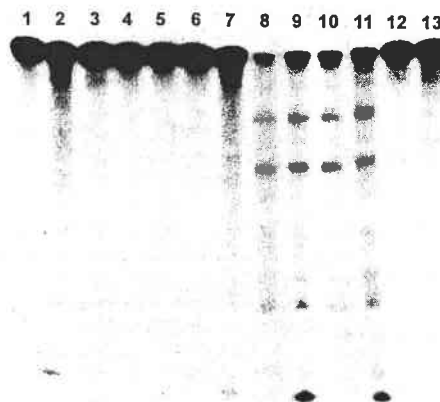


FIG. 4. Effects of OH scavengers and bathocuproine on DNA damage induced by Angeli's salt alone (lanes 2–7) or Angeli's salt in the presence of H_2O_2 and Cu(II) (lanes 8–13). The ^{32}P -5'-end-labeled 261-bp fragment (Aval^I 1645-Xba^I 1905) of the human c-Ha-ras-1 was incubated in 200 μl of 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.8 containing 5 μM DTPA with Angeli's salt and CuCl₂, H_2O_2 and 20 μM /base of sonicated calf thymus DNA in the presence of the scavenger indicated at 37 $^\circ\text{C}$ for 30 min. After piperidine treatment, DNA fragments were analyzed by the method described under "Experimental Procedures." Lane 1, control; lane 2, 200 μM Angeli's salt alone; lane 3, + 0.8 M ethanol; lane 4, + 0.2 M D-mannitol; lane 5, + 0.2 M sodium formate; lane 6, + 500 μM carboxy-PTIO; lane 7, + 50 μM bathocuproine; lane 8, 40 μM Angeli's salt, 20 μM CuCl₂, and 40 μM H_2O_2 ; lane 9, + 0.8 M ethanol; lane 10, + 0.2 M D-mannitol; lane 11, + 0.2 M sodium formate; lane 12, + 500 μM carboxy-PTIO; lane 13, + 50 μM bathocuproine.

(Fig. 5, A and C). The most preferred site was the thymine residue, especially in the 5'-CTG-3', 5'-GTG-3', and 5'-GTA-3' sequences.

Cytotoxicity—Human breast cancer cells (MCF-7) were incubated for 4.5 h with various concentrations of H_2O_2 in the presence or absence of 500 μM Angeli's salt or DEA-NO (Fig. 6A). Either 500 μM Angeli's salt or DEA-NO or 0–0.5 mM H_2O_2 alone did not elicit significant cytotoxic effects in MCF-7 cells. However, in the presence of Angeli's salt or DEA-NO, LDH release was increased by H_2O_2 dose dependently with the increase reaching 48.6 \pm 5.2% and 30.3 \pm 0.2%, respectively, at the 500 μM concentration. On the other hand, Angeli's salt alone showed weak cytotoxic activity after 4.5 h of incubation. However, increased cytotoxicity was observed when the cells were analyzed after 8 h of incubation (data not shown). The presence of H_2O_2 increased dramatically the cytotoxicity mediated by Angeli's salt. The increases in LDH release induced by 500 μM H_2O_2 alone or 2 mM Angeli's salt alone were only 9.0 \pm 2.0% and 17.0 \pm 0.3%, respectively, but up to 72.4 \pm 1.7% when both compounds were incubated together. Although no cytotoxic effects were found with even the highest concentration (2 mM) of DEA-NO alone, the presence of H_2O_2 also enhanced cytotoxicity mediated by DEA-NO (Fig. 6B). However, the cytotoxic effect with DEA-NO plus H_2O_2 was, in general, weaker than that with Angeli's salt plus H_2O_2 . It should be noted that Angeli's salt and DEA-NO have similar half-lives (~2.5 min) under physiological conditions.

DISCUSSION

Four different assays (DNA strand breakage, MDA formation from oxidation of 2'-deoxyribose, hydroxylation of 2'-deoxyguanosine in DNA, and analysis of site-specific DNA damage using ^{32}P -5'-end-labeled DNA fragments of the human p53 tumor suppressor gene and the c-Ha-ras-1 protooncogene) have been used to study the effects of Angeli's salt, an NO \cdot generating compound (2–5), on DNA damage. It was found that Angeli's salt alone produced oxidants as previously reported (1), whereas the presence of H_2O_2 and either Fe(III)-EDTA or

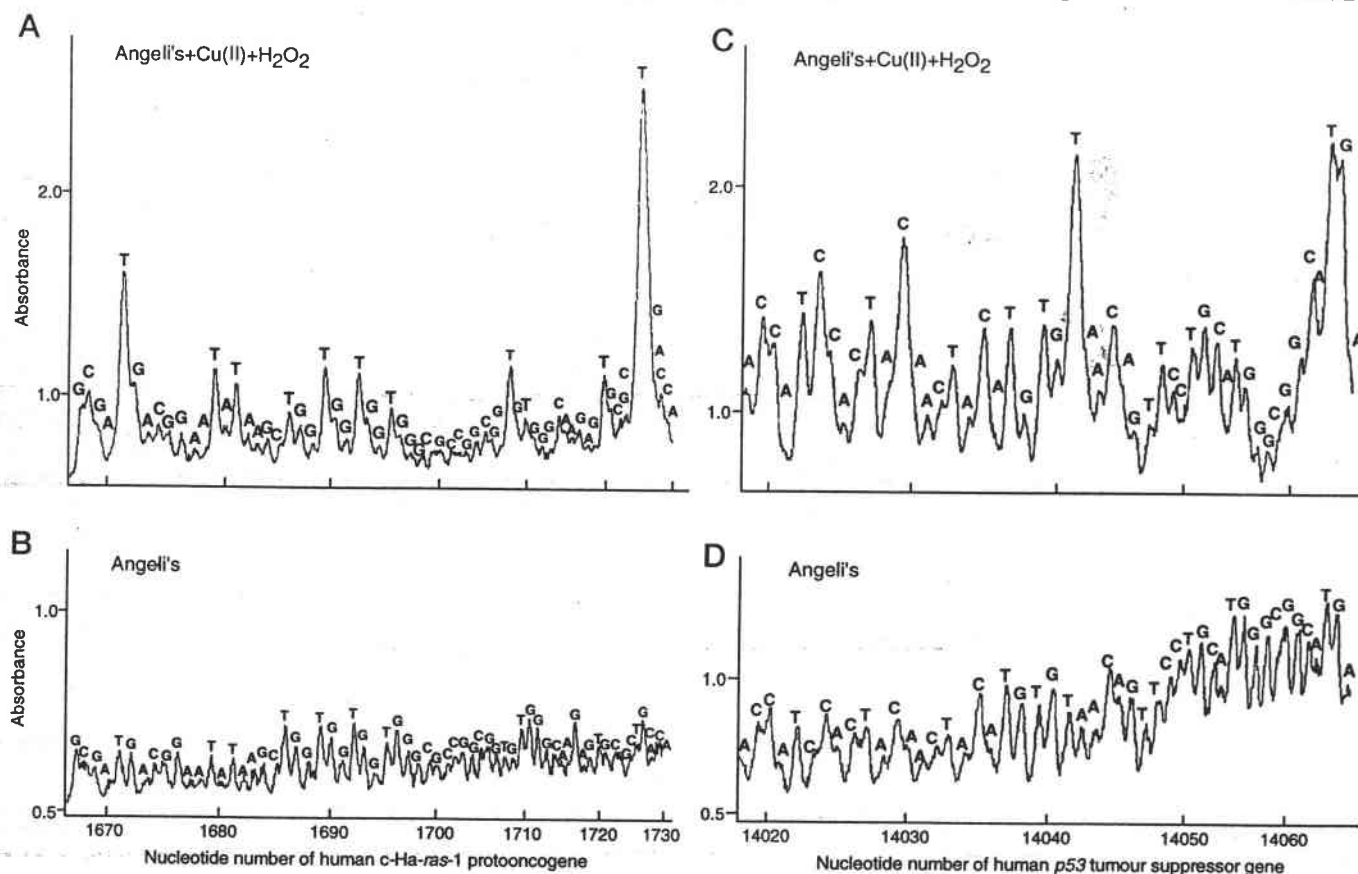


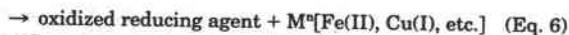
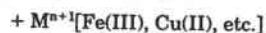
FIG. 5. Site preference of DNA cleavage induced by Angeli's salt alone (B and D) or Angeli's salt in the presence of H_2O_2 and Cu(II) (A and C). The ^{32}P -5'-end-labeled 261-bp fragment (*Ava*I* 1645-*Xba*I 1905) from *c-Ha-ras-1* (A and B) or the 211-bp fragment (*Apa*I 13972-*Hind*III* 14182) from *p53* (C and D) in 200 μl of 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.8 containing 5 μM DTPA and 20 μM sonicated calf thymus fragments were electrophoresed on an 8% polyacrylamide/8 M urea gel using a DNA-sequencing system, and the autoradiogram was obtained by exposing x-ray film to the gel. The relative amounts of oligonucleotides produced were measured using a laser densitometer (LKB 222) Ultrascan XL. The piperidine-labile sites of the treated DNA were determined by direct comparison with the same DNA fragment after undergoing DNA sequencing reactions according to the Maxam-Gilbert procedure (28). The horizontal axis shows the nucleotide number of the *c-Ha-ras-1* protooncogene (25) (A and B) or the *p53* tumor suppressor gene² (C and D). A and C, 100 μM Angeli's salt + 20 μM CuCl_2 + 20 μM H_2O_2 ; B and D, 100 μM Angeli's salt.

Cu(II) dramatically enhanced the production of oxidants mediated by Angeli's salt. NO^- generated from DEA- NO did not enhance the formation of oxidants even in the presence of H_2O_2 and metallic ions but rather inhibited it. Electron acceptors, ferricyanide and 4-OH-TEMPO, which have been reported to convert NO^- to NO^+ (2), inhibited Angeli's salt-mediated oxidation reactions even in the presence of H_2O_2 and metallic ions, suggesting that NO^- , but not NO^+ , is responsible for the oxidation reactions. As previously reported for other reducing agents such as ascorbic acid and NADH (27), Angeli's salt induced DNA strand breakage and catalyzed the hydroxylation of 2'-deoxyguanosine in DNA more efficiently in the presence of Cu(II) than in the presence of Fe(III)-EDTA. Distinct effects of HO^\cdot scavengers on the oxidation reactions mediated by Fe(III)-EDTA and Cu(II) were also similar to those reported for ascorbic acid, glutathione, and NADH (27). The DNA cleavage sites examined using ^{32}P -5'-end-labeled DNA fragments of the human *p53* tumor suppressor gene and the *c-Ha-ras-1* protooncogene indicate that Angeli's salt alone caused DNA cleavage at every nucleotide position without marked site preference. This cleavage pattern was similar to that reported for DNA damage induced by HO^\cdot (with reductants such as ascorbic acid, glutathione, and NADH in the presence of H_2O_2 and Fe(III)-EDTA) (27). On the other hand, Angeli's salt in the presence of H_2O_2 and Cu(II) induced damage frequently at thymine residues, which was also similar to the pattern reported for DNA damage

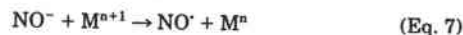
induced by the reductant, H_2O_2 , and Cu(II) (27). These findings together lead us to conclude that NO^- can act as a reducing agent to generate strong oxidants in the presence of H_2O_2 and transition metallic ions.

It has been reported that reducing agents such as ascorbic acid and NADH can reduce transition metallic ions (M^{n+1}) to their reduced forms (M^n), which stimulate production of reactive oxygen species from H_2O_2 (Equation 6).

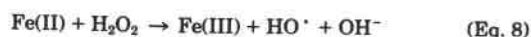
Reducing agent[ascorbic acid, glutathione, NADH, etc.]



Similarly NO^- can act as a reducing agent to reduce transition metallic ions (Equation 7).



In the case of Fe(III)-EDTA, the Fenton reaction mediated by Fe(II) forms HO^\cdot , which is responsible for DNA damage (Equation 8), because HO^\cdot scavengers effectively inhibit the oxidation reactions. Conversely, Cu(II)-mediated DNA damage is not inhibited by HO^\cdot scavengers, suggesting that a Cu(I)-peroxide complex, which exhibits HO^\cdot -like activities, may be responsible for the DNA damage (Equation 9) (27, 31-33).



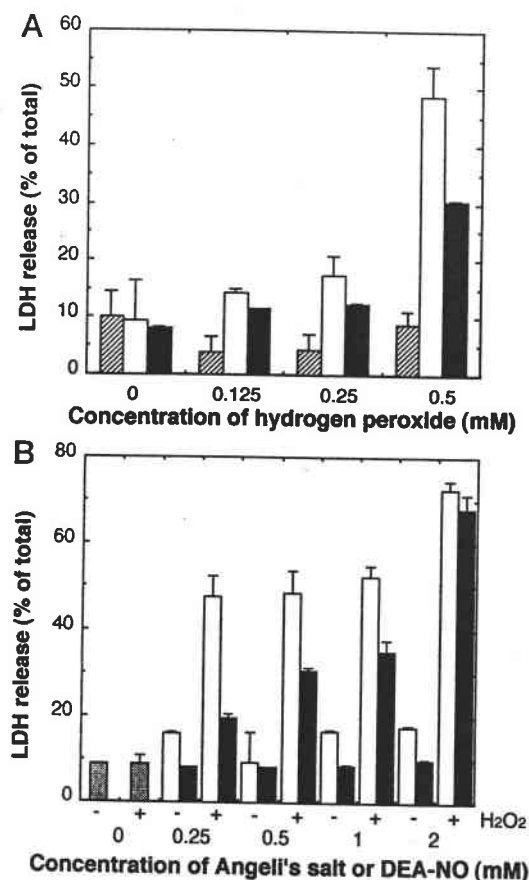
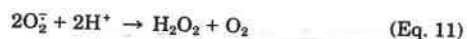
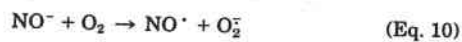


FIG. 6. Effects of concentrations of H_2O_2 (A) and Angeli's salt or DEA-NO (B) on the cytotoxicity toward MCF-7 cells. A, the cells were incubated for 4.5 h with various concentrations of H_2O_2 (0–500 μM) in combination either with 500 μM Angeli's salt or DEA-NO. B, Angeli's salt or DEA-NO at various concentrations (0–2 mM) was incubated in the presence or absence of 500 μM of H_2O_2 . Results are expressed as the percentage (mean \pm S.D.) of total LDH release into supernatant. Hatched bar, controls without Angeli's salt or DEA-NO; open bar, with Angeli's salt; closed bar, with DEA-NO.



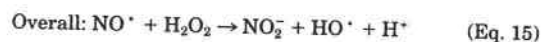
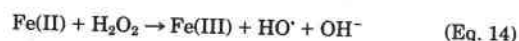
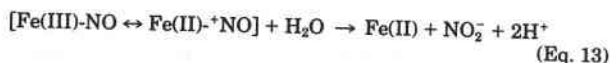
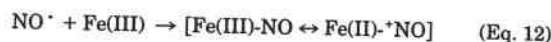
In a previous study (1), we demonstrated that Angeli's salt and Piloty's acid (NO^- -generating compounds) can produce strong oxidant(s) capable of inducing DNA strand breakage and oxidizing 2'-deoxyribose and calf thymus DNA to form MDA and 8-oxo-dG, respectively. These results led us to propose that NO^- is a possible endogenous source of HO^\cdot , which may be formed either directly from the reaction product of NO^- with NO^- (N_2O_2^-) (Equations 1 and 2) or indirectly through H_2O_2 formation (Equations 10 and 11).



In the present study, we observed that Angeli's salt alone induced DNA damage in the absence of H_2O_2 and transition metallic ions, confirming our previous findings (1). The inclusion of both H_2O_2 and transition metallic ions, however, synergistically enhanced DNA damage induced by Angeli's salt. On the other hand, the DNA damage induced by Angeli's salt was suppressed by the addition of either Fe(III)-EDTA or Cu(II) (Fig. 3), suggesting that NO^- was converted to NO^\cdot , which was inactive in generating oxidant(s) through the above mechanisms via either Equations 1 and 2 or Equations 10 and 11. In addition, NO^\cdot possibly formed complexes with reduced transition metallic ions, inhibiting the generation of O_2^- and

also the formation of oxidants from H_2O_2 (19, 34).

Several groups have recently reported that H_2O_2 and NO^\cdot cooperatively enhance their cytotoxic activity toward hepatoma cells (35), lymphoma cells (36), ovarian cancer cells (37), and *Escherichia coli* (38). Using aromatic hydroxylation of salicylate as an indicator, the reaction of H_2O_2 with NO^\cdot generated from DEA-NO was shown to produce an HO^\cdot -like oxidant (39). Farias-Eisner *et al.* (37) also reported that NO^\cdot , H_2O_2 , and ferric ion in combination produce a potent oxidant, which can oxidize benzene to produce phenol, and they proposed the following mechanism for HO^\cdot generation (Equations 12–14).



In contrast, our results demonstrated inhibitory effects of NO^\cdot on the Fenton reaction and no production of oxidants, at least under our experimental conditions using DEA-NO, H_2O_2 , and Fe(III)-EDTA or Cu(II) *in vitro*. This NO^\cdot -mediated inhibition of the Fenton reaction was in agreement with results from our previous study (19) and others (34, 40, 41).

On the other hand, Angeli's salt alone at higher concentrations (1 and 2 mM) exerted weak cytotoxicity, as reported for cultured Chinese hamster V79 lung fibroblasts by Wink *et al.* (2), whereas no cytotoxic effects were observed with even the highest concentration (2 mM) of DEA-NO alone under our experimental conditions. However, the presence of H_2O_2 increased cooperatively the cytotoxicity mediated by Angeli's salt. These results are in good agreement with those from our present *in vitro* study. This cytotoxic effect is probably because of the generation of HO^\cdot through the Fenton reaction, which could occur in our cell culture system because $\text{Fe(NO}_3)_3$ was present in the medium. Conversely, synergistic cytotoxic effects of DEA-NO and H_2O_2 against MCF-7 cells were also observed, although the effects were, in general, lower than with Angeli's salt plus H_2O_2 . Similar cooperative effects of NO^\cdot and H_2O_2 on cytotoxicity were reported for other types of cells (35–38). These results are not in agreement with our *in vitro* study, which showed that DEA-NO did not generate oxidants even in the presence of H_2O_2 and metallic ions. There are several possible explanations for this discrepancy between *in vitro* and *in vivo* results. One possibility is that DEA-NO plus H_2O_2 induced cytotoxicity by a mechanism independent of HO^\cdot formation. For example, NO^\cdot inhibits the mitochondrial respiratory chain reaction, and H_2O_2 further enhances its toxicity. Alternatively, NO^\cdot may be converted in cells to NO^- , which exerts toxic effects with H_2O_2 . NO^\cdot has been reported to be converted to NO^- by ferrocyanide (13).

In conclusion, we have demonstrated that the NO^- -releasing compound, Angeli's salt, can catalyze the formation of strong oxidants in the presence of H_2O_2 and metallic ions, inducing DNA strand breakage, oxidation of DNA to form 8-oxo-dG *in vitro*, and exerting cytotoxic effects toward human breast cancer cells. Recent studies have demonstrated that NO^- may be formed *in vivo* under a variety of physiological conditions, including by NO^\cdot synthase (6–8) and from *S*-nitrosothiols (9–11) and nitrosylhemoglobin (12). NO^\cdot can be also converted to NO^- in the presence of biomolecules such as superoxide dismutase (42) and ferrocyanide (13) and by the quinone/hydroquinone redox system in a manner similar to that of the formation of O_2^- from oxygen (14). As stimulated immune cells including neutrophils and macrophages can produce H_2O_2 , one

can expect that, during an inflammatory process, the formation of both NO⁻ and H₂O₂ could enhance dramatically the antimicrobial and anti-tumoricidal activity. In addition to the inflammatory process, under a number of pathological conditions (e.g. ischemia reperfusion injury, etc.), increased production of reactive oxygen species and activation of NO⁻ synthase have been shown to occur (24). Activated NO⁻ synthase produces NO⁻, which may then encounter H₂O₂ to generate strong oxidants, as shown in this study. Thus NO⁻ may also play an important role as a cause of diverse pathophysiological conditions such as inflammation, neurodegenerative diseases, and cardiovascular disorders, especially when H₂O₂ and transition metallic ions are present together.

Acknowledgments—We thank Dr. J. Cheney for editing the manuscript and P. Collard for secretarial assistance.

REFERENCES

- Ohshima, H., Glibert, I., and Bianchini, F. (1999) *Free Radical Biol. Med.* **26**, 1305–1313
- Wink, D. A., Feilisch, M., Fukuto, J., Chistodoulou, D., Jourdeuil, D., Grisham, M. B., Vodovotz, Y., Cook, J. A., Krishna, M., DeGraf, W. G., Kim, S., Gamson, J., and Mitchell, J. B. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.* **351**, 66–74
- Fukuto, J. M., Hobbs, A. J., and Ignarro, L. J. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 707–713
- VanUffelen, B. E., Van der Zee, J., de Koster, B. M., VanSteveninck, J., and Elferink, J. G. R. (1998) *Biochem. J.* **330**, 719–722
- Wink, D. A., and Feilisch, M. (1996) in *Methods in Nitric Oxide Research* (Feilisch, M., and Stamler, J., eds) pp. 403–412, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Hobbs, A. J., Fukuto, J. M., and Ignarro, L. J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10992–10996
- Schmidt, H. H., Hofmann, H., Schindler, U., Shutenko, Z. S., Cunningham, D. D., and Feilisch, M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14492–14497
- Rusche, K. M., Spiering, M. M., and Marletta, M. A. (1998) *Biochemistry* **37**, 15503–15512
- Arnelle, D. R., and Stamler, J. S. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 279–285
- Hogg, N., Singh, R. J., and Kalyanaraman, B. (1996) *FEBS Lett.* **382**, 223–228
- Wong, P. S. Y., Hyun, J., Fukuto, J. M., Shiota, F. N., DeMaster, E. G., Shoeman, D. W., and Nagasawa, H. T. (1998) *Biochemistry* **37**, 5362–5371
- Gow, A. J., and Stamler, J. S. (1998) *Nature* **391**, 169–173
- Sharpe, M. A., and Cooper, C. E. (1998) *Biochem. J.* **332**, 9–19
- Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., and Glibert, I. (1998) *Free Radical Biol. Med.* **25**, 1057–1065
- Bazylinski, D. A., and Hollocher, T. C. (1985) *Inorg. Chem.* **24**, 4285–4288
- Hogg, N., Darley Usmar, V. M., Wilson, M. T., and Moncada, S. (1992) *Biochem. J.* **281**, 419–424
- Draper, H. H., Squires, E. J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., and Hadley, M. (1993) *Free Radical Biol. Med.* **15**, 353–363
- Yamaguchi, R., Hirano, T., Asami, S., Chung, M. H., Sugita, A., and Kasai, H. (1996) *Carcinogenesis* **17**, 2419–2422
- Yoshie, Y., and Ohshima, H. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **342**, 13–21
- Yoshie, Y., and Ohshima, H. (1997) *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1015–1022
- Vasquez-Vivar, J., Santos, A. M., Junqueira, V. B., and Augusto, O. (1996) *Biochem. J.* **314**, 869–876
- Epe, B., and Hegler, J. (1994) *Methods Enzymol.* **234**, 122–131
- Epe, B., Ballmaier, D., Roussyn, I., Briviba, K., and Sies, H. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 4105–4110
- Slezak, J., Tribulova, N., Pristacova, J., Uhrík, B., Thomas, T., Khaper, N., Kaul, N., and Singal, P. K. (1995) *Am. J. Pathol.* **147**, 772–781
- Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H., and Goeddel, D. V. (1983) *Nature* **302**, 33–37
- Oikawa, S., and Kawanishi, S. (1996) *Biochemistry* **35**, 4584–4590
- Oikawa, S., and Kawanishi, S. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1399**, 19–30
- Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1980) *Methods Enzymol.* **65**, 499–560
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., and Aruoma, O. I. (1987) *Anal. Biochem.* **165**, 215–219
- Pfeiffer, S., Leopold, E., Hemmens, B., Schmidt, K., Werner, E. R., and Mayer, B. (1997) *Free Radical Biol. Med.* **22**, 787–794
- Masrwa, M., Cohen, H., Meyerstein, D., Hickman, D. L., Bakac, A., and Espenson, J. H. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 4293–4297
- Chiu, S. M., Xue, L. Y., Friedman, L. R., and Oleinick, N. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 2653–2661
- Rodriguez, H., Drouin, R., Holmquist, G. P., O'Connor, T. R., Boiteux, S., Laval, J., Doroshov, J. H., and Akman, S. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 17633–17640
- Kanner, J., Harel, S., and Granit, R. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **289**, 130–136
- Ioannidis, I., and de Groot, H. (1993) *Biochem. J.* **296**, 341–345
- Filep, J. G., Lapierre, C., Lachance, S., and Chan, J. S. (1997) *Biochem. J.* **321**, 897–901
- Farias-Eisner, R., Chaudhuri, G., Aeberhard, E., and Fukuto, J. M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6144–6151
- Pacelli, R., Wink, D. A., Cook, J. A., Krishna, M. C., DeGraf, W., Friedman, N., Tsokos, M., Samuni, A., and Mitchell, J. B. (1995) *J. Exp. Med.* **182**, 1469–1479
- Nappi, A. J., and Vass, E. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1380**, 55–63
- Wink, D. A., Cook, J. A., Pacelli, R., Liebmann, J., Krishna, M. C., and Mitchell, J. B. (1995) *Toxicol. Lett. (Amst.)* **82–83**, 221–226
- Goss, S. P., Hogg, N., and Kalyanaraman, B. (1995) *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 800–806
- Murphy, M. E., and Sies, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10860–10864

3.2 Effets synergiques de l'anion nitroxyde et du peroxyde d'hydrogène pour induire l'apoptose et former de la 8-oxo-dG chez des cellules MCF-7.

3.2.1 Problématique et objectifs du travail

Dans notre publication précédente, nous avons montré que la présence simultanée d'anion nitroxyde et de peroxyde d'hydrogène augmentait de façon synergique la cytotoxicité de chacune de ces espèces. Nous avons également observé une action synergique du monoxyde d'azote et du peroxyde d'hydrogène pour exercer une action cytotoxique sur les cellules MCF-7. Cette effet cytotoxique était néanmoins moins important que celui provoqué par l'anion nitroxyde en par l'anion nitroxyde. Dans cette étude, nous avons tout d'abord voulu déterminer la nature de la mort cellulaire (apoptose ou nécrose) induite par ces 2 mélanges.

Nous avons également montré précédemment que la co-incubation de peroxyde d'hydrogène et d'anion nitroxyde, en présence de métaux de transition, formait le très réactif radical hydroxyle, *in vitro*. En outre, nous avons montré que le monoxyde d'azote ne provoque pas la formation de ce composé dans ces conditions. L'autre but de cette présente étude est de rechercher si le radical hydroxyle peut se former chez des cellules traitées par les mélanges $\text{NO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ et $\text{NO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$.

3.2.2 Résultats

3.2.2.1 Induction de l'apoptose chez les cellules traitées par $\text{NO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ et $\text{NO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$

- *Détermination sur gel d'agarose*

Des cellules MCF-7 ont été incubées pendant 4h30, 6h ou 8h en présence de H_2O_2 , AS, DEA-NO, AS/ H_2O_2 ou DEA-NO/ H_2O_2 . Comme il avait déjà été montré

précédemment, H_2O_2 , DEA-NO et AS incubés séparément n'induisent pas de mort cellulaire pour les concentrations utilisées (et même pour des temps d'incubation de 16h pour AS et DEA-NO et de 8h pour H_2O_2).

En revanche, pour NO^-/H_2O_2 et NO^{\cdot}/H_2O_2 , on observe une migration électrophorétique typique d'une fragmentation internucléosomique (DNA ladder) où toutes les bandes de faibles poids moléculaires sont bien différenciées. Ce profil de DNA ladder, dû à l'action des endonucléases, est caractéristique de l'apoptose. Nous constatons que l'AS, tout comme le DEA-NO, induit l'apoptose en présence de H_2O_2 . On peut remarquer que le maximum de cytotoxicité est observé après 6h d'incubation en présence de NO^-/H_2O_2 alors qu'il faut attendre 8h d'incubation pour NO^{\cdot}/H_2O_2 , ce qui suggère que NO^-/H_2O_2 exerce un effet plus rapide et plus fort que le NO^{\cdot}/H_2O_2 . Ceci est confirmé par observation en microscopie en contraste de phase.

Après 8h d'incubation, la cytotoxicité provoquée par AS/ H_2O_2 est tellement importante qu'une partie de l'ADN est détruite.

Après avoir déterminé que le temps d'incubation optimal est de 6h, nous avons testé différentes concentrations de donneur de NO (250 μ M, 500 μ M et 1mM). Nous avons observé que toutes ces concentrations induisaient l'apoptose.

- *Détermination par microscopie en fluorescence après coloration par Hoechst*

Les cellules non traitées présentent une coloration homogène. En revanche, les cellules traitées par AS/ H_2O_2 et par DEA-NO/ H_2O_2 possèdent une coloration irrégulière avec des points beaucoup plus intenses, ce qui est caractéristique de la condensation chromatidienne et de la fragmentation nucléaire ce qui confirme ainsi l'apoptose.

- *La présence d'un chélateur de fer protège les cellules.*

Nous observons un changement morphologique très net par microscopie en contraste de phase entre les cellules contrôles et les cellules traitées par AS/ H_2O_2 et DEA-NO/ H_2O_2 . L'ajout de 1,5mM de déferoxamine mesylate 2h avant

le traitement, protège les cellules de l'apoptose induite par $\text{NO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ et par $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$.

3.2.2.2 Formation de 8-oxo-dG dans l'ADN de cellules traitées par $\text{NO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ et par $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$.

Nous avons mesuré la quantité de 8-oxo-dG, marqueur de stress oxydatif, produite dans l'ADN des cellules traitées.

Les cellules MCF-7 ont subi les traitements suivants: DEA-NO, H_2O_2 , DEA-NO/ H_2O_2 , AS, AS/ H_2O_2 , où les concentrations sont fixées à $500\mu\text{M}$ et le temps d'incubation à 6h.

L'ADN des cellules est extrait après le traitement, puis hydrolysé de façon enzymatique avec de la nucléase P1 et de la phosphatase acide pendant 1h à 37°C . La réaction enzymatique est ensuite arrêtée en ajoutant du chloroforme. La quantité de 8-oxo-dG est ensuite mesurée par HPLC au moyen d'un détecteur électrochimique.

Alors que l'incubation en présence d'AS ou de H_2O_2 seuls induit la formation de 13,5 et de $18\mu\text{mol}$ 8-oxo-dG/mmol dG, respectivement, la production est de $74,4\mu\text{mol}$ 8-oxo-dG/mmol dG lorsque les 2 composés sont incubés simultanément. Ces résultats montrent que ces deux composés réagissent l'un avec l'autre pour former le radical hydroxyle, confirmant ainsi ce que l'on avait obtenu précédemment *in vitro*.

Nous avons observé que le DEA-NO incubé seul produit par lui-même une quantité non négligeable de 8-oxo-dG ($34\mu\text{mol}$ 8-oxo-dG/mmol dG) [cette expérience avec le DEA-NO seul devra néanmoins être répétée pour confirmer ce résultat]. Lorsqu'il est incubé en présence de H_2O_2 , la quantité de 8-oxo-dG est augmentée, mais pas de façon synergique comme il a pu être observé dans le cas de l'AS.

3.3. Discussion

Nous avons montré que le NO^\cdot forme de la 8-oxo-dG, marqueur de la présence de HO^\cdot , sur l'ADN de cellules en culture, de façon synergique avec H_2O_2 , confirmant ainsi nos données obtenues *in vitro* sur de l'ADN plasmidique. Nous avons également détecté des quantités importantes de 8-oxo-dG dans l'ADN de cellules traitées par $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$ qui résulterait plutôt d'un effet additionnel des 2 composés. Ces données diffèrent de celles obtenues *in vitro* où le DEA-NO n'induisait pas de cassure sur l'ADN ni la formation de 8-oxo-dG. Ceci suggère que dans les cellules des réactions chimiques différentes de celles *in vitro* peuvent se produire.

L'association de $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$ provoque une apoptose plus rapide et plus importante que $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$, ce qui est corrélé avec nos résultats précédents qui montraient une cytotoxicité plus forte pour $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$ que pour $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$. Cette même différence d'effet entre les 2 composés se retrouve vis à vis de la formation de radical hydroxyle, ce qui suggère que cette espèce est impliquée dans l'induction de l'apoptose. De plus, la déferoxamine inhibe l'apoptose induite par $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$ et $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$. Ce résultat confirme d'une part, l'implication de métaux de transition dans la formation de radical hydroxyle par $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$ et d'autre part, suggère fortement que le radical hydroxyle est l'agent responsable de l'apoptose, probablement via les lésions sur l'ADN qu'il provoque.

En ce qui concerne le $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$, ces nouveaux résultats nous laissent penser qu'il induit également la formation de radical hydroxyle (probablement selon les réactions décrites par Farias-Esiner en 1996), mais dans une proportion plus faible que pour le $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$.

Synergistic effects of nitroxyl anion and hydrogen peroxide on induction of apoptosis and oxidative DNA damage in cultured human breast cancer cells

Nitric Oxide.

Laurence Chazotte-Aubert¹, Isabelle Gilibert¹ and Hiroshi Ohshima^{1,2}

1 Unit of Endogenous Cancer Risk Factors, International Agency for Research on Cancer,

150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon cedex 08, France

2 To whom correspondence should be addressed.

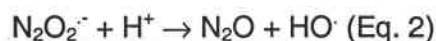
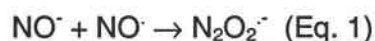
Running title: Apoptosis and DNA oxidative damage by H₂O₂ and NO⁻

ABSTRACT

We have reported that nitroxyl anion (NO^-), the one-electron reduction product of nitric oxide (NO), can act as a reducing agent to generate the highly toxic hydroxyl radical (HO^\cdot) in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) and transition metallic ions. NO^- and H_2O_2 also exerted synergistically cytotoxic effects to MCF-7 human breast cancer cells. The objective of the present study was to investigate whether cell death induced by NO^- plus H_2O_2 is mediated via necrosis or apoptosis. MCF-7 cells incubated for 6 h in the presence of Angeli's salt (NO^- -generating compound) and H_2O_2 exhibited specific features of apoptotic cell death, including formation of DNA ladder as well as morphological changes such as chromatin condensation and nuclear fragmentation. NO^- generated from DEA-NONOate in the presence of H_2O_2 similarly induced apoptosis in MCF-7 cells, but required higher concentrations than Angeli's salt. The levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a marker of DNA oxidative damage, increased synergistically in DNA of the cells incubated in the presence of 500 μM each of Angeli's salt and H_2O_2 , compared to those in non-treated cells (12.6-fold), or those incubated with either Angeli's salt or H_2O_2 alone (5.6- and 4.1-fold, respectively). The cells incubated with DEA-NONOate and H_2O_2 also contained increased levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, but this increase was less pronounced than with Angeli's salt and H_2O_2 . NO^- , which can be formed under a variety of conditions, may play an important role in the etiology of pathophysiological conditions such as inflammation and neurodegenerative diseases, especially when H_2O_2 and metallic ions co-exist.

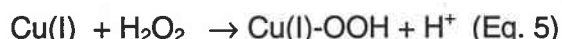
INTRODUCTION

Reactive nitrogen species such as NO_x and peroxyxynitrite (ONOO[•]), which are formed by the reaction of nitric oxide (NO[•]) with oxygen and superoxide (O₂^{•-}), respectively, have been implicated as a cause of diverse pathophysiological conditions such as inflammation, neurodegenerative diseases, cardiovascular disorders and cancer. We have recently proposed that NO[•], which is one electron reduction product of NO₂[•], may also contribute to pathophysiological conditions (1;2). NO[•] generated from Angeli's salt (AS, sodium trioxodinitrate, Na₂N₂O₃) or Piloty's acid (*N*-hydroxybenzenesulfonamide) induces strand breakage in plasmid DNA and also oxidizes 2'-deoxyguanosine to form 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) (a marker of oxidative DNA damage) *in vitro* in isolated calf-thymus DNA (1). A highly toxic hydroxyl radical (HO[•]) generated from the reaction between NO[•] and NO₂[•] could be responsible for the oxidation reactions (Equations 1 and 2).



More recently we have demonstrated that NO[•] in the presence of H₂O₂ and Fe(III)-EDTA or Cu(II) generates a strong oxidant(s), using four different assays (DNA strand breakage, 8-oxo-dG formation in calf-thymus DNA, malondialdehyde formation from deoxyribose and analysis of site-specific DNA damage using ³²P-5'-end-labeled DNA fragments of the human *p53* tumor suppressor gene and the *c-Ha-ras-1* protooncogene), whereas NO[•] generated from DEA-NONOate (DEA-NO) did not exert such effects (2). On the basis of distinct effects of HO[•] scavengers and pattern of site-specific DNA cleavage caused by AS alone or by AS, H₂O₂ plus metal ions, we have

concluded that NO^\cdot acts as a reductant to catalyse the formation of the HO^\cdot from H_2O_2 and Fe(III)-EDTA and the formation of Cu(I)-peroxide complexes with a reactivity similar to HO^\cdot from H_2O_2 and Cu(II) (2) (equations 3 - 5).



Recent publications suggested that NO^\cdot synthase forms NO^\cdot , which can be then converted to NO by superoxide dismutase (SOD) and other electron acceptors (3-6). NO^\cdot can be also produced from S-nitrosothiols in the presence of thiols (7-9). In the absence of oxygen nitrosylhemoglobin liberates NO^\cdot in a reaction producing methemoglobin (10). Ferrocycytochrome *c* also reacts with NO^\cdot to form ferricytochrome *c* and NO^\cdot , which may have implications for inhibition of mitochondrial oxygen consumption by NO^\cdot (11). In our previous studies, NO^\cdot was proposed as one of the possible agents responsible for DNA strand breakage induced by NO^\cdot and catechol-type compounds such as catecholamines, catechol-estrogens, and certain flavonoids (12-14). These studies have suggested that NO^\cdot can be formed by one electron reduction of NO by the quinone/hydroquinone redox system in a manner similar to that of the formation of O_2^\cdot from oxygen (14).

NO^\cdot , generated from AS, has been reported to exert cytotoxic effects in Chinese hamster V79 lung fibroblast cells, reducing intracellular glutathione levels and causing DNA strand breakage (15). We have reported that NO^\cdot generated from AS and H_2O_2 cooperatively exerted cytotoxic effects toward human breast cancer cells. NO^\cdot generated from DEA-NO in the presence of H_2O_2 also exerted cytotoxicity, but this cytotoxic effect

was, in general, weaker than that with AS and H₂O₂ (2). The objective of the present study was to investigate whether cell death induced by NO⁻ plus H₂O₂ is mediated via necrosis or an apoptotic process. We have also investigated effects of NO⁻ in the presence or absence of H₂O₂ on oxidative DNA damage *in vivo* in cultured human breast cancer cells.

Materials and methods

Chemicals

AS and DEA-NO were obtained from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI). Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), L-glutamine and penicillin/streptomycin were from Gibco BRL-Life Technology (Grand Island, USA). H₂O₂, fetal bovine serum, deferoxamine mesylate, acid phosphatase, 8-oxo-dG, 2'-deoxyguanosine (dG) and Hoechst were provided by Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Nuclease P1 was obtained from Boehringer Mannheim (Meylan, France).

Cell culture and treatment

MCF-7 human breast cancer cells were cultured in DMEM cell culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 5% glutamine and 0.5% penicillin-streptomycin at 37°C in humidified atmosphere containing 10% of CO₂. When cells were at 80% of confluence, they were treated either with DEA-NO or AS in the presence or absence of 500 μM H₂O₂. Stock solution of 100mM DEA-NO or 100mM AS were prepared in 0.01N NaOH freshly and an appropriate amount of 0.0.1N HCl was added to the culture medium to neutralise the NaOH present in AS and DEA-NO solution. Stock solution of H₂O₂ was diluted in water just before adding to cell culture medium.

Extraction of DNA and analysis of 8-oxo-dG

In order to avoid auto-oxidation of guanine, 0.1mM deferoxamine mesylate was added as a chelating agent to all buffers used and all manipulations were carried out at +4°C, as described previously (16). DNA was extracted by a high salt protein precipitation method. Cells were lysed with sodium dodecyl sulphate and digested with Qiagen protease (Qiagen, Courtaboeuf, France) at 37°C for 1 h. Proteins were precipitated by adding a saturated solution of NaCl to 1.5 M. After a centrifugation at 2500 rpm for 5 min, the supernatant containing the DNA was collected. The DNA was precipitated by addition of 2 vol of cold ethanol. The DNA pellet was resuspended in a buffer containing 10mM Tris and 1mM EDTA, incubated with RNase A and T1 at 37°C for 1 h and precipitated again by ethanol. Enzymatic digestion of 200 µg DNA of each sample was then performed using 4 units nuclease P1 and 5 units acid phosphatase (Sigma) at 37°C for 1 h (17). Enzymatic reaction was stopped by addition of CHCl₃ and the aqueous layer stored at -80°C under argon for subsequent analysis. Levels of 8-oxo-dG and dG in DNA hydrolysates were determined by HPLC with an electrochemical detector and with a UV detector at 260 nm, respectively, as reported previously (17).

DNA laddering assay

This assay was performed using the DNA laddering kit from Boehringer Mannheim, according to the manufacturer's instructions. Briefly, treated cells were lysed and DNA was precipitated by isopropanol and then trapped on a minicolumn. After washing with ethanol, DNA was collected with 200 µl of heated elution buffer. DNA was treated by 0.1 mg/ml RNase A for 10 min at room temperature. DNA laddering was analysed after migration on 1 % agarose gel stained by ethidium bromide.

Morphological observation

Hoechst staining was performed as follows. Cells were collected and, after centrifugation at 1000 g for 5 min, were resuspended in staining solution containing 0.6% Nonidet P-40, 3.7% formaldehyde and 0.01 mg/ml Hoechst-33258 (Sigma) diluted in PBS. After the appropriate dilution, cells were photographed under fluorescence microscopy using Zeiss-Axioplan 2. Cell morphology was observed using Olympus phase contrast microscope.

Results

As a source of NO^- , we have used AS, which exists predominantly in the form of the monoanion HN_2O_3^- , decomposing to NO^- and nitrite (NO_2^-) at physiological pH (18). As HNO is a weak acid ($\text{pK}_a = 4.7$), NO^- is the predominant form in aqueous solution at neutral pH (18). In order to compare NO^- generated from AS with NO^- , we have used DEA-NO as a source of NO^- . It should be noted that AS and DEA-NO have similar half-lives (~2.5 min) under physiological conditions.

Induction of apoptosis in MCF-7 cells treated with AS plus H_2O_2 or DEA-NO plus H_2O_2

As shown in Fig. 1, formation of DNA ladder was clearly observed in MCF-7 cells exposed for 6 h to AS and H_2O_2 as well as to DEA-NO and H_2O_2 , indicating that both treatments induced apoptosis. On the other hand, DNA remained intact when cells were treated either with AS, DEA-NO or H_2O_2 alone, even for a longer exposure time (16 h for AS and DEA-NO and 8 h for H_2O_2). As shown in Fig. 1A, DNA ladder was not detected clearly after 4 h 30 min of incubation in the presence of AS and H_2O_2 or DEA-NO and H_2O_2 , but was detected after 6 h of incubation. Formation of DNA ladder was the most distinct after 8 h of incubation in the presence of DEA-NO and H_2O_2 , whereas for AS and H_2O_2 , the intensity of DNA staining was weak, possibly because the damage was important.

On the basis of these results, we fixed the incubation time at 6 h and we tested various concentrations of AS and DEA-NO (250 μM , 500 μM and 1 mM) on DNA ladder formation. As shown in Fig 1B, DNA ladder was observed in the cells incubated with AS and H_2O_2 as well as with DEA-NO and H_2O_2 at all the concentrations tested. However, it should be noted that bands with low molecular weights were more intensively stained for the cells exposed to AS and H_2O_2 than those exposed to DEA-NO and H_2O_2 . These

results suggest that AS and H₂O₂ induced apoptosis more strongly than DEA-NO and H₂O₂.

These results were well correlated with cell morphology observed by a phase contrast microscopy (Fig. 3). The relative number of apoptotic cells after incubation with DEA-NO and H₂O₂ was much less than those with AS and H₂O₂, in particular, at a concentration of 250 μM NO⁻- or NO⁻-releasing compound (Fig. 3 B vs. Fig. 3 F). On the other hand, 250 μM AS and H₂O₂ clearly induced morphological change of cells, whereas a concentration of 500 μM of DEA-NO and H₂O₂ was needed to induce a similar morphological change (Fig. 3 B vs. Fig. 3 G).

Fluorescence microscopy was also used as an alternative test to assess apoptosis in MCF-7 cells. After 6 h of incubation with 500 μM H₂O₂ in the presence of 500 μM AS or DEA-NO, cells were stained with Hoechst, followed by fluorescence microscopy analysis. As shown in Fig. 2, non-treated cells demonstrated a homogenous staining of their nuclei. In contrast, cells incubated with either DEA-NO plus H₂O₂ or AS plus H₂O₂ exhibited irregular staining of their nuclei as a result of chromatin condensation and nuclear fragmentation, demonstrating that these cells were undergoing apoptosis.

Previously, we demonstrated that the presence of metallic ions such as Fe(III)-EDTA and Cu(II) enhanced production of an oxidant(s) from AS and H₂O₂. In order to examine effects of an iron chelating agent on cytotoxicity mediated by AS or DEA-NO in the presence of H₂O₂, we incubated MCF-7 cells in the presence of 1.5 mM deferoxamine. As shown in Fig. 3D and H, a pre-treatment of cells for 2 h in the presence of 1.5 mM deferoxamine afforded a dramatic protection of cells against toxicity

mediated by either 500 μM each of AS plus H_2O_2 or DEA-NO plus H_2O_2 , respectively. These results strongly suggest that the presence of ferric ion was required to induced apoptosis in MCF-7 cells mediated by H_2O_2 with NO^\cdot or NO^- .

Formation of 8-oxo-dG in DNA of cells treated with AS plus H_2O_2 or DEA-NO plus H_2O_2

MCF-7 cells were incubated with 500 μM AS or DEA-NO in the presence or absence of 500 μM H_2O_2 . DNA was extracted after 6 h of incubation in the presence of the different compounds. After enzymatic hydrolysis of the DNA, the level of 8-oxo-dG was determined by HPLC with an electrochemical detector as a marker for oxidative DNA damage. As shown in Fig. 4, low levels of 8-oxo-dG were present in non-treated cells (5.9 ± 1.12 μmol 8-oxo-dG/mol dG). Cells treated with AS or H_2O_2 alone contained 13.4 ± 3.0 and 18.0 ± 0.3 μmol 8-oxo-dG/mol dG, respectively. When both AS and H_2O_2 were incubated together, the level of 8-oxo-dG increased dramatically and reached 74.4 ± 16.1 μmol 8-oxo-dG/mol dG, which represented an increase of 12.6-fold compared to the level in non-treated cells. These results suggest that NO^- and H_2O_2 reacted together to form an oxidant(s) which caused oxidative DNA damage within MCF-7 cells. On the other hand, cells incubated with DEA-NO contained 34.0 ± 1.8 μmol 8-oxo-dG/mol dG and those incubated with DEA-NO in combination with H_2O_2 contained 46.0 ± 7 μmol 8-oxo-dG/mol dG.

Discussion

We have previously demonstrated that AS acted synergistically with H_2O_2 to exhibit cytotoxicity toward MCF-7 cells (2). The cytotoxicity was also induced by NO^\cdot generated from DEA-NO in the presence of H_2O_2 , but, in general, was weaker than that

with AS plus H₂O₂ (2). In the present study, we examined whether the cytotoxicity induced by either AS and H₂O₂ or DEA-NO and H₂O₂ was due to apoptotic or necrotic cell death. As shown in Fig. 1, 2 and 3, MCF-7 cells incubated in the presence of AS and H₂O₂ exhibited specific features of apoptotic cell death, including formation of DNA ladder as well as morphological changes such as chromatin condensation and nuclear fragmentation. Thus the cytotoxicity induced by AS and H₂O₂ is, at least in part, mediated via induction of apoptosis. NO⁻ generated from DEA-NONOate in the presence of H₂O₂ similarly induced apoptosis in MCF-7 cells. However, higher concentrations of NO⁻ than those of NO⁺ were required to exert cytotoxicity in the presence of H₂O₂. Filep et al (19) recently reported that NO⁻ co-operates with H₂O₂ in inducing cytotoxicity towards murine lymphoma cells, which is, in part, via induction of apoptosis. NO⁻ and H₂O₂ also co-operatively enhance the cytotoxic activity toward hepatoma cells (20), endothelial cells (21), ovarian cancer cells (22) and gastric mucosal cells (23), although it was not studied whether the cytotoxicity was due to apoptosis or necrosis. NO⁻ also potentiates H₂O₂-induced cytotoxicity against *Escherichia coli* (24). On the other hand, Wink et al (25) reported that NO⁻ protected against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species including H₂O₂ in Chinese hamster V79 cells lung fibroblasts and mesencephalic neurons. Further studies are needed to identify the factors that determine whether NO enhances or protects the H₂O₂-induced cytotoxicity.

It has been shown that NO⁻ can either induce necrosis or apoptosis or protect cells from death (26). There are several important factors, which determine the sensitivity of cells to NO⁻ toxicity, including cell type, concentrations of NO⁻, the presence of other oxygen species such as superoxide and H₂O₂ and metals such as non-heme iron content. Some cells such as macrophages, neuronal cells, pancreatic islets, thymocytes and several tumour cells undergo apoptosis upon exposure to low levels of

NO \cdot , whereas some other cell types such as hepatocytes, human B lymphocytes, endothelial cells, cardiac myocytes, splenocytes, eosinophils and ovarian follicles are resistant to NO \cdot (27). Kim *et al.* (27) recently reported that cellular non-heme iron content is an important determinant for NO \cdot -mediated apoptosis, necrosis and caspase inhibition. Transition metals such as iron and copper react easily with NO \cdot to form NO $^+$, which can S-nitrosylate thiol groups of important enzymes such as caspases (28), inhibiting apoptosis through altering their functions.

On the other hand, the role of NO \cdot in apoptosis and necrosis has not been studied extensively. However, its cytotoxic activity appears to be related to its ability to generate an oxidant(s), possibly HO \cdot produced through the Fenton reaction, which could occur in our cell culture system because Fe(NO $_3$) $_3$ was present in the medium (Equations 3 - 4). In addition, the presence of deferoxamine, an iron chelating agent, afforded a dramatic protection of cells against toxicity mediated by AS and H $_2$ O $_2$ (Fig. 3D). These results strongly suggest that the presence of ferric ion was required to induced apoptosis in MCF-7 cells mediated by H $_2$ O $_2$ with NO \cdot . In fact, the level of 8-oxo-dG, a marker of oxidative DNA damage, increased synergistically (12.6-fold) in DNA of the cells incubated in the presence of 500 μ M each of AS and H $_2$ O $_2$, compared to that in non-treated cells. The levels of 8-oxo-dG in cells incubated with either 500 μ M AS alone or 500 μ M H $_2$ O $_2$ were 2.2- and 3.0-fold higher than the level of non-treated cells, respectively. These results are in good agreement with our previous *in vitro* work, which demonstrated that NO \cdot increased 8-oxo-dG level in calf-thymus DNA in the presence of H $_2$ O $_2$ and Fe(III)-EDTA or Cu(II) (2).

The cells incubated with DEA-NONOate and H_2O_2 also contained increased levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, although this increase was less pronounced than with AS and H_2O_2 . These results are, however, not in agreement with our previous *in vitro* study, which showed that DEA-NO did not generate oxidants even in the presence of H_2O_2 and metallic ions (2). In the present study, synergistic effects of DEA-NO and H_2O_2 on induction of apoptosis were also observed against MCF-7 cells, although the effects were, in general, weaker than AS plus H_2O_2 . Similar synergistic effects of NO^\cdot and H_2O_2 on cytotoxicity were reported for other types of cells (see above). There are several possible explanations for this discrepancy between *in vitro* and *in vivo* works. The one possibility is that DEA-NO plus H_2O_2 induced cytotoxicity by a mechanism independent of HO^\cdot formation. For example, the enhanced cytotoxicity induced by simultaneous exposure to NO^\cdot and H_2O_2 should result from inhibition of mitochondrial respiratory chain by NO^\cdot via inhibition of aconitase (30) and inhibition of DNA synthesis via inhibition of ribonucleotide reductase (31), and H_2O_2 further enhances the toxicity. Alternatively, HO^\cdot generated by the Fenton type reaction could be responsible for the cytotoxicity mediated by NO^\cdot and H_2O_2 as deferoxamine protected cells against toxicity mediated by DEA-NO and H_2O_2 (Fig. 3H). NO^\cdot has been reported to be converted to NO^- by ferrocyanochrome *c* (11). Thus, NO^\cdot could be converted in cells to NO^- , which catalyse the production of HO^\cdot in the presence of H_2O_2 and metallic ions.

In the present study, we have demonstrated that NO^\cdot plus H_2O_2 co-operatively induced apoptosis and oxidative DNA damage in human breast cancer cells. NO^\cdot plus H_2O_2 also co-operatively exerted cytotoxic effects, but the effects were less pronounced than NO^\cdot plus H_2O_2 . These cytotoxic effects required iron, thus confirming our previous findings that NO^\cdot acts as a reductant to generate HO^\cdot in the presence of H_2O_2 and iron (2). Recent studies have demonstrated that NO^\cdot may be formed *in vivo* under a variety of

physiological conditions (see introduction). As stimulated immune cells including neutrophils and macrophages can produce H_2O_2 , one can expect that, during inflammatory process, the formation of both NO^- and H_2O_2 could enhance dramatically the anti-microbial and anti-tumoricidal activity. NO^- may also play an important role as a cause of diverse pathophysiological conditions such as inflammation and neurodegenerative diseases, especially when H_2O_2 and transition metallic ions co-exist.

Acknowledgements – The authors thank Dr. J. Cheney for editing the manuscript, Mr. G Mollon for photographic works and Mrs. P. collard for secretarial assistance.

Fig.1A

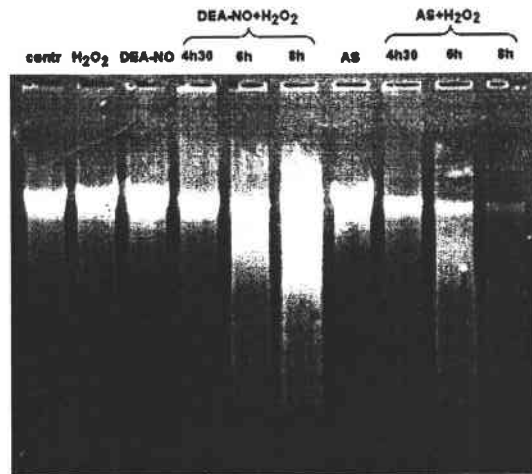
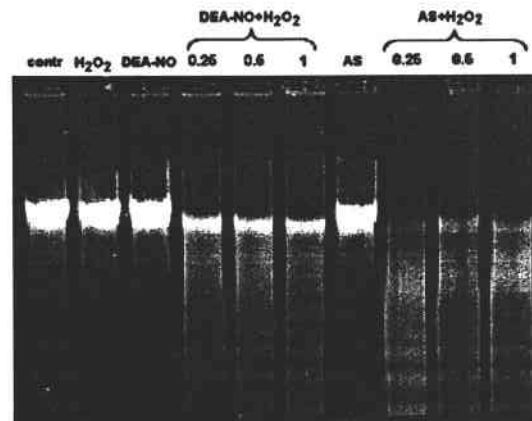
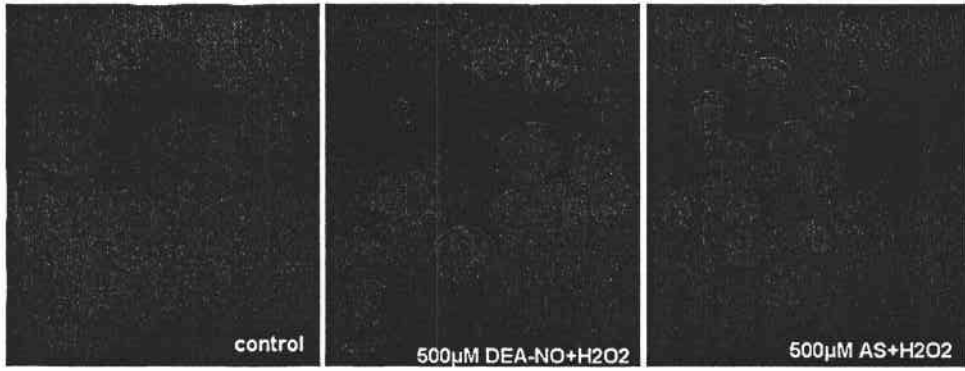


Fig.1B



2



3

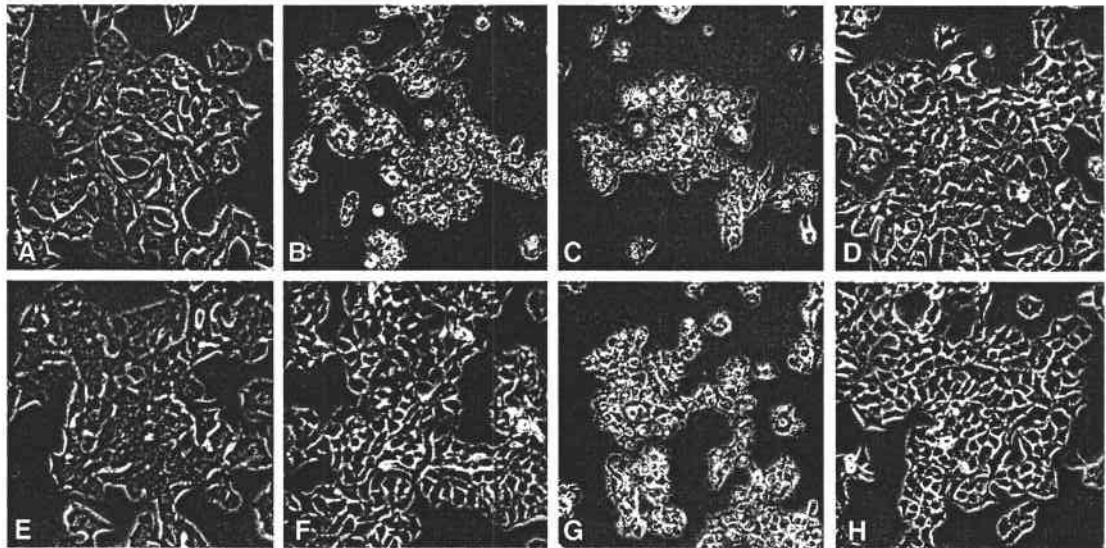
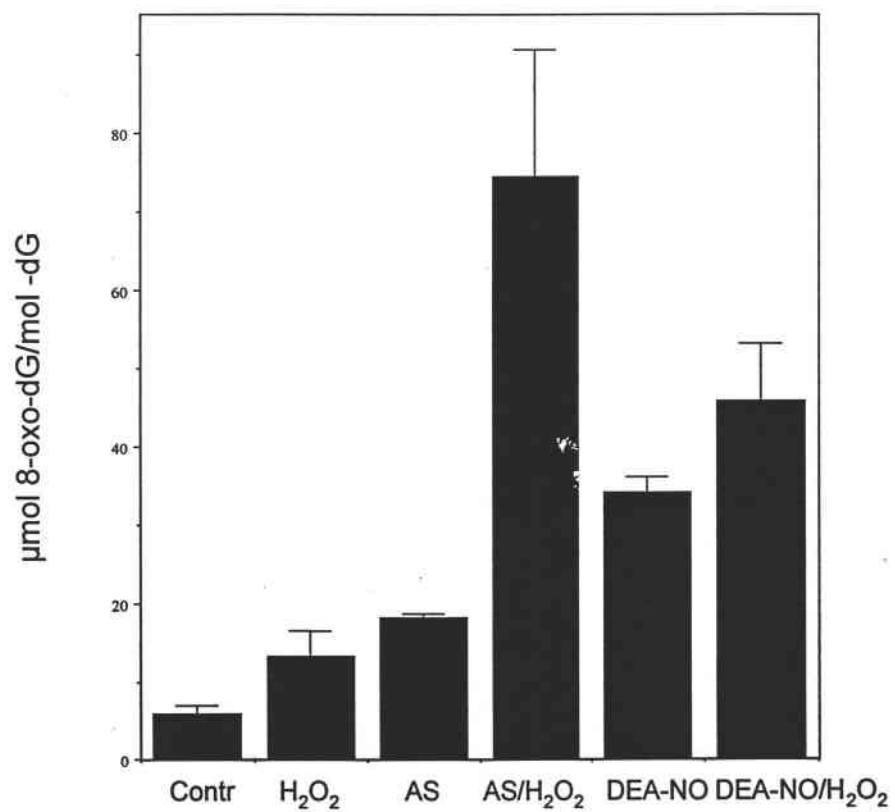


Fig 4



Legends to figures

Figure 1: DNA laddering detected in MCF-7 cells incubated in the presence of AS or DEA-NO with or without H₂O₂. (A) effects of concentrations of AS or DEA-NO on DNA laddering formation. The cells were incubated for 6 h in the presence of AS or DEA-NO at concentrations of 0.25, 0.5 and 1 mM with 0.5 mM H₂O₂. (B) effects of incubation time on DNA laddering formation induced by AS or DEA-NO with H₂O₂. The cells were incubated for 4.5, 6 and 8 h in the presence of 0.5 mM each of AS or DEA-NO with 0.5 mM H₂O₂. When the cells were incubated in the presence of AS alone, DEA-NO alone or H₂O₂ alone, their concentrations were 1, 1 and 0.5 mM and the incubation times were for 16, 16 and for 8 h, respectively (A, B)

Figure 2: Fluorescence microscopy of Hoechst staining cells. The cells were incubated for 6 h in the presence of 0.5 mM each of AS and H₂O₂ or DEA-NO and H₂O₂. The cells were harvested and stained with Hoechst 33258 (Sigma) and photographed under fluorescence microscopy.

Figure 3: Morphology of MCF-7 cells after incubation with AS and H₂O₂ or DEA-NO and H₂O₂ observed by phase-contrast microscope. (A) non-treated cells; (B) after incubation for 6 h in the presence of 250 μ M AS and 500 μ M H₂O₂; (C) after incubation for 6 h in the presence of 500 μ M each of AS and H₂O₂; (D) after incubation for 8 h in the presence of 500 μ M each of AS and H₂O₂ with 1.5 mM deferoxamine; (E) after incubation of 6 h in the presence of 500 μ M H₂O₂ alone; (F) after incubation for 6 h in the presence of 250 μ M DEA-NO and 500 μ M H₂O₂; (G) after incubation for 6 h in the presence of 500 μ M each of DEA-NO and H₂O₂; (H) after incubation for 8 h in the presence of 500 μ M each of DEA-NO and H₂O₂ with 1.5 mM deferoxamine.

Figure 4: Levels of 8-oxo-dG (μmol 8-oxo-dG/mol dG) in MCF-7 cells incubated in the presence of AS or DEA-NO with or without H_2O_2 . DNA was extracted from MCF-7 cells incubated for 6 h in the presence of 500 μM of AS or DEA-NO with or without 500 μM H_2O_2 . After enzymatic digestion, levels of 8-oxo-dG and dG were analysed by HPLC using an electrochemical detector and a UV detector, respectively, as described in materials and methods.

References

1. Ohshima, H., Gilibert, I., and Bianchini, F. (1999) Induction of DNA strand breakage and base oxidation by nitroxyl anion (NO⁻) through hydroxyl radical production. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1305-1313.
2. Chazotte-Aubert, L., Oikawa, S., Gilibert, I., Bianchini, F., Kawanishi, S., and Ohshima, H. (1999) Cytotoxicity and site-specific DNA damage induced by nitroxyl anion (NO⁻) in the presence of hydrogen peroxide. Implications for various pathophysiological conditions. *J Biol Chem* **274**, 20909-20915.
3. Hobbs, A. J., Fukuto, J. M., and Ignarro, L. J. (1994) Formation of free nitric oxide from l-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **91**, 10992-10996.
4. Schmidt, H. H., Hofmann, H., Schindler, U., Shutenko, Z. S., Cunningham, D. D., and Feelisch, M. (1996) NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **93**, 14492-14497.
5. Rusche, K. M., Spiering, M. M., and Marletta, M. A. (1998) Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry* **37**, 15503-15512.
6. Adak, S., Wang, Q., and Stuehr, D. J. (2000) Arginine conversion to nitroxide by tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric-oxide synthase: Implications for mechanism. *J Biol Chem Record*.
7. Arnette, D. R. and Stamler, J. S. (1995) NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys.* **318**, 279-285.
8. Hogg, N., Singh, R. J., and Kalyanaraman, B. (1996) The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett* **382**, 223-228.
9. Wong, P. S. Y., Hyun, J., Fukuto, J. M., Shirota, F. N., DeMaster, E. G., Shoeman, D. W., and Nagasawa, H. T. (1998) Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry. *Biochemistry* **37**, 5362-5371.
10. Gow, A. J. and Stamler, J. S. (1998) Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* **391**, 169-173.
11. Sharpe, M. A. and Cooper, C. E. (1998) Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem J* **332**, 9-19.
12. Yoshie, Y. and Ohshima, H. (1997) Synergistic induction of DNA strand breakage caused by nitric oxide together with catecholamine: implications for neurodegenerative disease. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1015-1022.

13. Yoshie, Y. and Ohshima, H. (1998) Synergistic induction of DNA strand breakage by catechol-estrogen and nitric oxide: implications for hormonal carcinogenesis. *Free Radic.Biol.Med.* **24**, 341-348.
14. Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., and Gilibert, I. (1998) Anti-oxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxyxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radic.Biol.Med.* **25**, 1057-1065.
15. Wink, D. A., Feelisch, M., Fukuto, J., Chistodoulou, D., Jour'd'heuil, D., Grisham, M. B., Vodovotz, Y., Cook, J. A., Krishna, M., DeGraff, W. G., Kim, S., Gamson, J., and Mitchell, J. B. (1998) The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch Biochem Biophys.* **351**, 66-74.
16. Bianchini, F., Elmstahl, S., Martinez-Garcia, C., van Kappel, A. L., Douki, T., Cadet, J., Ohshima, H., Riboli, E., and Kaaks, R. (2000) Oxidative DNA damage in human lymphocytes: correlations with plasma levels of alpha-tocopherol and carotenoids. *Carcinogenesis* **21**, 321-324.
17. Yamaguchi, R., Hirano, T., Asami, S., Chung, M. H., Sugita, A., and Kasai, H. (1996) Increased 8-hydroxyguanine levels in DNA and its repair activity in rat kidney after administration of a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Carcinogenesis* **17**, 2419-2422.
18. Bazylinski, D. A. and Hollocher, T. C. Evidence from the reaction between trioxodinitrate(II) and ¹⁵NO that trioxodinitrate(II) decomposes into nitrosyl hydride and nitrite in neutral aqueous solution. *Inorg.Chem.* **24**, 4285-4288. 1985. Ref Type: Journal (Full)
19. Filep, J. G., Lapierre, C., Lachance, S., and Chan, J. S. (1997) Nitric oxide co-operates with hydrogen peroxide in inducing DNA fragmentation and cell lysis in murine lymphoma cells. *Biochem J* **321**, 897-901.
20. Ioannidis, I. and de Groot, H. (1993) Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: evidence for co-operative action with hydrogen peroxide. *Biochem.J.* **296**, 341-345.
21. Volk, T., Ioannidis, I., Hensel, M., deGroot, H., and Kox, W. J. (1995) Endothelial damage induced by nitric oxide: synergism with reactive oxygen species. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **213**, 196-203.
22. Farias Eisner, R., Chaudhuri, G., Aeberhard, E., and Fukuto, J. M. (1996) The chemistry and tumoricidal activity of nitric oxide/hydrogen peroxide and the implications to cell resistance/susceptibility. *J.Biol.Chem.* **271**, 6144-6151.
23. Hata, Y., Ota, S., Hiraishi, H., Terano, A., and Ivey, K. J. (1996) Nitric oxide enhances cytotoxicity of cultured rabbit gastric mucosal cells induced by hydrogen peroxide. *Biochim.Biophys Acta* **1290**, 257-260.
24. Pacelli, R., Wink, D. A., Cook, J. A., Krishna, M. C., DeGraff, W., Friedman, N., Tsokos, M., Samuni, A., and Mitchell, J. B. (1995) Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of Escherichia coli. *J.Exp.Med.* **182**, 1469-1479.

25. Wink, D. A., Hanbauer, I., Krishna, M. C., DeGraff, W., Gamson, J., and Mitchell, J. B. (1993) Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 9813-9817.
26. Murphy, M. P. (1999) Nitric oxide and cell death. *Biochim.Biophys Acta* **1411**, 401-414.
27. Kim, Y. M., Chung, H. T., Simmons, R. L., and Billiar, T. R. (2000) Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J Biol Chem* **275**, 10954-10961.
28. Kim, Y. M., Talanian, R. V., and Billiar, T. R. (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* **272**, 31138-31148.
29. Calmels, S., Hainaut, P., and Ohshima, H. (1997) Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* **57**, 3365-3369.
30. Drapier, J. C. and Hibbs, J. B., Jr. (1996) Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods Enzymol.* **269**, 26-36.
31. Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L., and Fontecave, M. (1991) Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **179**, 442-448.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le NO est un composé à facettes multiples qui exerce des effets cellulaires variés que nous avons tenté d'étudier dans leur globalité. Le NO peut réagir avec d'autres composés azotés et oxygénés pour former des espèces plus toxiques qui peuvent induire une peroxydation lipidique ou réagir avec les protéines. Celles-ci sont capables d'oxyder les groupements thiols pour former des nitrosothiols, des ponts disulfures ou réagir avec leurs métaux de transition tels que le fer, le cuivre et le zinc. Le NO et ses dérivés peuvent aussi réagir avec les résidus tyrosine de certaines protéines pour former des résidus nitrotyrosine et ainsi inhiber leur activité. Le NO et ses dérivés produisent également des lésions sur l'ADN de natures variées dont certaines sont pro-mutagéniques.

Le NO produit par la iNOS, exprimée fortement lors du processus inflammatoire, apparaît être impliquée dans la cancérogenèse. Cependant, de part les multiples effets qu'il exerce, il joue un rôle complexe.

Afin de mieux comprendre l'implication du NO dans le développement d'un cancer, nous avons étudié ses effets sur une protéine clé pour le maintien de l'intégrité génétique: la protéine onco-suppressive p53. Il est acquis que la protéine p53 s'accumule dans le noyau des cellules traitées par un donneur de NO, probablement par l'intermédiaire des lésions sur l'ADN qu'il provoque (Forrester, 1996).

Nous avons fait l'hypothèse que, dans des tissus enflammés de façon chronique, le NO pourrait favoriser l'apparition d'un cancer en inhibant l'activité de p53. Nous nous fondons sur les résultats d'une étude précédente menée au laboratoire montrant que le NO induit un changement de la conformation de p53 *in vitro* et que la protéine perd son activité de liaison spécifique à l'ADN pour des concentrations de NO relativement élevées. Dans un premier temps, nous avons examiné l'éventualité que le NO puisse réagir directement avec la protéine p53. Nous avons choisi d'étudier la possibilité que le NO forme des résidus nitrotyrosine sur la protéine p53, comme il a été observé pour d'autres protéines. Nous avons démontré, par une technique d'immunoprécipitation,

qu'un traitement par un donneur de NO (le GSNO) induit la formation de résidus nitrotyrosine sur la protéine p53 des cellules traitées. Ces résultats mettent en évidence que le NO peut réagir chimiquement avec cette protéine, ce qui suggère que les relations NO/p53 sont encore plus complexes que ce qui avait été montré précédemment. La formation de résidus nitrotyrosine peut être considérée comme une nouvelle modification post-traductionnelle de p53. Il est maintenant bien établi que les modifications post-traductionnelles de p53 jouent un rôle majeur pour son activation, sa dégradation et sa fonctionnalité (Ashcroft and Vousden, 1999; Gu and Roeder, 1997a).

Il serait très intéressant, dans l'avenir, de caractériser la (les) tyrosine(s) concernée (s) par cette réaction de nitration. Pour cela, il faudrait pouvoir obtenir une quantité de protéine p53 recombinante humaine importante (de l'ordre du mg). La protéine recombinante serait ensuite incubée *in vitro* en présence d'un donneur de NO, digérée enzymatiquement et les fragments peptidiques seraient analysés par HPLC pour déterminer quels sont les peptides nitrés. Après avoir été purifiés, ils seraient séquencés ce qui permettrait d'identifier quelles sont les tyrosines nitrées. Une analyse en spectrométrie de masse permettrait de connaître combien de résidus nitrotyrosine sont présents par molécule de p53 car un groupement nitro rajoute une masse de 45 Da. Une telle investigation permettrait d'appréhender plus précisément les effets de cette nitration. En effet, les conséquences ne sont pas les mêmes si la tyrosine concernée se trouve dans la partie N ou C terminale ou encore dans la région de liaison à l'ADN car chacun de ces domaines possède des fonctions bien particulières (cf analyse bibliographique). Par la suite, il serait également intéressant de muter cette ou ces tyrosines de p53 et d'étudier la fonctionnalité de la p53 ainsi modifiée afin de déterminer s'il s'agit d'un résidu important pour sa fonctionnalité. Si tel était le cas, on peut imaginer que l'ajout d'un groupement nitro rende ce résidu tyrosine inapte à subir une modification post-traductionnelle (par exemple, la phosphorylation).

Nous pouvons supposer également que la présence de résidus nitrotyrosine pourrait induire un changement de conformation de la protéine. Crow et coll ont montré que les tyrosines se trouvant à proximité d'un résidu glutamate avaient plus de chances d'être nitrées (Crow et al., 1997). Sur la p53 humaine, 3 tyrosines correspondent à ce critère. Deux sont situées dans la région centrale de la protéine (Y 205 et Y 220) et l'autre (Y 327) est localisée dans partie C terminale, siège de diverses modifications post-traductionnelles. Celle-ci est proche de la lysine 320 (qui est acétylée lors de l'activation de p53) et elle appartient au domaine de tétramérisation.

Une étude plus large a permis de dégager d'autres critères importants qui déterminent la sensibilité à la nitration des tyrosines (Souza et al., 1999a). Ainsi, les résidus tyrosine qui sont situés à la surface de la molécule, sur une boucle et proches d'un acide aminé acide sont particulièrement sensibles à la nitration.

L'idéal serait bien évidemment d'être en mesure de détecter des NTYR sur la p53 de tissus humains tumoraux afin de vérifier que cette modification est réellement physiologique. Pour réaliser ce projet, il faudrait analyser des biopsies de tissus tumoraux en utilisant une technique d'immunoprécipitation, comme nous avons procédé pour les cellules en culture. La présence de NTYR a été mise en évidence sur des tissus humains de patients atteints par diverses maladies liées à une inflammation chronique mais les protéines concernées n'ont pas été identifiées (Ischiropoulos, 1998).

Nous ne pouvons cependant exclure qu'il puisse exister d'autres modifications sur p53 induites par le NO car cette protéine possède certaines caractéristiques qui en font une cible privilégiée pour le NO. En effet, c'est une protéine dont la structure tertiaire du domaine de liaison à l'ADN contient un atome de zinc coordonné de façon tétraédrique avec 3 cystéines et une histidine. L'atome de zinc est nécessaire pour que p53 se trouve dans sa forme sauvage et si celui-ci est substitué par un métal tel que le cadmium, la protéine

adopte un phénotype immunologique mutant et elle est inactive (Meplan et al., 1999b).

L'état réduit des cystéines est indispensable pour qu'elles puissent se lier au zinc et donc pour lier spécifiquement l'ADN. Le NO peut réagir avec les thiols de p53 pour former des nitrosothiols ou des ponts disulfures. Or, la fonctionnalité de p53 est régulée de façon redox (Meplan et al., 2000; Parks et al., 1997). Par exemple, la thioredoxine augmente l'activité transactivatrice de p53. Il a été montré, dans notre laboratoire, que le NO pouvait induire la formation de ponts disulfures sur p53 et altérer sa conformation *in vitro* (Calmels et al., 1997).

Nous proposons que le NO, en réagissant directement avec p53, pourrait inhiber, du moins partiellement, sa fonctionnalité bien que le niveau de la protéine soit augmenté. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les effets du NO sur une des fonctions biologiques de p53: la réponse des radiations ionisantes. La protéine p53 est, en effet, un point de contrôle essentiel pour stopper la prolifération cellulaire après exposition à des radiations γ (Kuerbitz et al., 1992).

Alors que les cellules exposées à une irradiation seule s'arrêtent dans leur cycle en phases G1 et G2, les cellules qui ont été pré-incubées en présence de GSNO ont perdu leur capacité à s'arrêter dans leur cycle. Cette perte de fonction cellulaire est corrélée avec la perte d'activité de liaison spécifique à l'ADN de p53 et au fait que la protéine p21^{Waf-1} ne s'accumule pas. Ceci signifie que la protéine p53 a perdu sa capacité à transactiver des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'arrêt cellulaire, en particulier p21^{Waf-1}. Elle n'est ainsi plus capable d'exercer sa fonction de suppresseur de tumeur. De plus, la prolifération des cellules pré-exposées à du GSNO est plus importante que celles des cellules contrôles. Ainsi, les cellules continuent à se diviser en présence de lésions sur l'ADN induites à la fois par le NO et par l'irradiation. Ainsi, les cellules qui sont exposées à certaines doses de NO sont incapables

de réagir à un second stress car leur protéine p53 est inactive, ce qui peut conduire au développement d'anomalies génétiques.

Nos résultats montrent que la concentration en NO est critique. D'une part, une concentration de 0.25mM n'est pas suffisante pour exercer un effet sur p53, alors que 0.5 et 0.75mM GSNO empêchent p53 d'exercer sa fonction transactivatrice. D'autre part, les cellules exposées pendant 16h en présence de 1mM GSNO deviennent apoptotiques, ce qui permet l'élimination des cellules endommagées par le NO.

Quels sont les facteurs décisifs qui déterminent le choix entre l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose? D'une façon simpliste, on pense que l'arrêt du cycle cellulaire permet de réparer les lésions sur l'ADN et que lorsque les dommages sont trop importants, la cellule "choisit l'apoptose". Conceptuellement, cette théorie se conçoit très bien mais elle est difficile à expliquer sur le plan moléculaire. Par exemple, p53 transactive à la fois des gènes cibles impliqués soit dans l'arrêt du cycle soit dans l'apoptose. Il a été rapporté qu'une expression accrue de p21^{Waf-1} prévenait l'apoptose (Bouvard et al., 2000; Gorospe et al., 1997) et que le clivage de cette même protéine précède l'apoptose (Gervais et al., 1998; Zhang et al., 1999).

Il est possible que lorsque p53 est impliquée, ce soit la nature même du stress qui détermine quelle (s) kinase (s) est activée (exemple l'ATM, après les radiations ionisantes) et par là même la décision entre l'arrêt du cycle et l'apoptose. Une publication du mois de septembre de cette année a montré l'existence d'un nouveau gène cible pro-apoptotique de p53, p53AIP1 (Oda et al, 2000). De plus, l'induction de l'apoptose par cette protéine est directement corrélée avec la phosphorylation de la Ser 46. Ces auteurs proposent qu'à un stade précoce de l'activation de p53 après des lésions génotoxiques, les ser 15 et 20 soient phosphorylées, ce qui conduit à la transactivation de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, tel que p21^{Waf-1}. En revanche, lorsque les lésions sont sévères et que la réparation de l'ADN est impossible, la Ser 46

serait activée, ce qui conduirait à un changement de la conformation de p53 pour que celle-ci ait une meilleure affinité pour les promoteurs de gènes pro-apoptotiques, tel que *p53AIP1*.

Nous avons ensuite tenté de déterminer si l'apoptose était dépendante ou non de p53 dans notre modèle. Messmer et Brune ont montré précédemment que l'apoptose induite par le NO pouvait se passer par voie dépendante ou indépendante de p53 chez des macrophages Raw 264.7 (Messmer and Brune, 1996). Etant donné qu'il existe de grandes variabilités entre les types cellulaires à propos de l'apoptose provoquée ou non par le NO, nous avons choisi d'utiliser les cellules MN1/MDD2 qui sont dérivées des cellules MCF-7. Les cellules MDD2 ont été transfectées de façon stable par un plasmide *Neo* qui exprime une séquence DD2 qui code pour un peptide correspondant au domaine de tétramérisation de p53. L'expression de DD2 inactive p53 (Bacus et al., 1996; Shaulian et al., 1992). Les cellules MN1, qui ont été transfectées par le plasmide *Neo* vide, expriment une p53 active.

Nous avons été très surpris de constater que ces deux types cellulaires étaient insensibles au GSNO, bien que les MN1/MDD2 soient dérivées des MCF-7. Ceci soulève un point très important qui est la différence de sensibilité des lignées cellulaires vis à vis du NO. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence entre les MCF-7 et les MN1/MDD2.

Il est possible que la sélection des MN1/MDD2 par un antibiotique ait favorisé le développement de cellules plus résistantes en général. Il est envisageable que les MN1/MDD2 possèdent des systèmes de défense anti-oxydants en plus grande quantité que les MCF-7, en particulier le glutathion. En effet, nous avons observé qu'un antioxydant tel que la L-NAC (N-Acétyl Cystéine), protège les cellules MCF-7 de l'apoptose. L'effet protecteur de la L-NAC proviendrait de sa capacité à augmenter le niveau intracellulaire de GSH (Oka et al., 1993) ou éventuellement en augmentant l'expression de Bcl2 (Voehringer, 1999). Il a été proposé précédemment que le NO pouvait faire chuter le niveau de GSH, ce qui entraîne un changement de la perméabilité

mitochondriale qui résulte en la libération du cytochrome c et qui, par conséquent, provoque l'apoptose (Ghibelli et al., 1999). Il a été également montré qu'une sur expression de la thioredoxine protégeait les cellules de l'apoptose induite par le NO (Ferret et al., 2000).

De plus, il existe de nombreux variants de la lignée MCF-7 (Burow et al., 1998), ce qui pourrait expliquer les différences qui existent entre les MCF-7 et les MN1/MDD2. En effet, il est possible que les MN1/MDD2 aient été créées à partir d'une lignée MCF-7 différente de celle employée dans notre laboratoire. Par exemple, il existe des cellules MCF-7 qui sont résistantes au $TNF\alpha$. Cette insensibilité au $TNF\alpha$ est due à l'expression d'une p53 mutante et la ré-introduction du gène sauvage TP53 rend les cellules réceptives à cette cytokine (Cai et al., 1997; Shatrov et al., 2000). De plus, les variants de MCF-7 résistant à l'apoptose induite par le $TNF\alpha$ possèdent des niveaux d'expression plus élevés de Bcl2 et plus faibles de Bax (Burow et al., 1998).

Il serait très intéressant de poursuivre ces travaux sur l'apoptose induite par le NO et de comparer la sensibilité de nombreux types cellulaires afin de déterminer pourquoi certaines cellules sont sensibles au GSNO alors que d'autres ne le sont pas. Il a été également montré que les MCF-7 n'expriment pas une caspase 3 active, bien qu'elles conservent leur potentiel apoptotique (Kirsch et al., 1999; Kurokawa et al., 1999). Comment les cellules MCF-7 gèrent-elles leur manque de caspase 3 ? Scaffidi et coll ont proposé l'existence de 2 types cellulaires, déterminés par la voie apoptotique empruntée, et ils ont suggéré que la caspase 8 pourrait remplacer la caspase 3 pour cliver les substrats apoptotiques (Scaffidi et al., 1999).

De plus, le NO a été rapporté comme étant un agent pro ou anti-apoptotique, selon différents auteurs. Ainsi, il a été montré que le NO pouvait bloquer l'apoptose en inhibant l'activité de la caspase 3 (Haendeler et al., 1997; Kim et al., 1997; Rossig et al., 1999). Cependant, de nombreuses autres études ont mis en évidence que le NO induisait l'apoptose chez différents types cellulaires

(Albina and Reichner, 1998; Brune et al., 1998; Hortelano et al., 1997; Murphy, 1999). Il doit certainement exister des facteurs déterminant la susceptibilité au NO que certains types cellulaires possèdent et d'autres pas, mais ceux-ci n'ont pas encore été déterminés.

Il a été montré qu'une sur-expression de Bcl-2 favorisait la résistance à l'apoptose induite par le NO, ce qui suggère que l'apoptose induite par le NO dépend de la voie mitochondriale où le couple Bax/Bcl2 occupe une place prépondérante (el-Deiry et al., 1993). De plus, il a été montré que le NO provoquait un changement de la perméabilité mitochondriale (Hortelano et al., 1997) et que ce processus pouvait résulter de la formation de résidus NTYR sur le cytochrome c (Hortelano et al., 1999). Très récemment, une étude a montré que le NO provoquait la libération du cytochrome c dans le cytoplasme des cellules MCF-7 et que l'apoptose était indépendante de la voie du récepteur CD95 (Umansky et al., 2000).

Une accumulation de publications suggère que l'un des événements décisifs pour l'apoptose consiste en la perméabilisation des membranes mitochondriales. De multiples voies de transduction du signal convergent en direction de la mitochondrie. La perméabilité de la membrane mitochondriale déterminée par un rapport Bax/bcl2 élevé représenterait un point déterminant la décision entre la vie et la mort (Jacotot et al., 2000). En effet, la perméabilisation des membranes permet la libération de facteurs solubles tels que le cytochrome c, qui en se liant à Apaf-1 active la caspase 9, et l'AIF, une flavoprotéine qui est une nucléase (Jacotot et al., 2000).

Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé la transactivation du gène pro-apoptotique Bax. Nous avons ainsi confirmé les résultats publiés par Messmer et Brune qui montraient qu'un traitement par un donneur de NO induisait l'accumulation de p53, suivie de celle de Bax puis de l'apoptose (Sandau et al., 1997). Néanmoins, cette transactivation de Bax pour des

concentrations de 0.5mM et 1mM de GSNO semblait infirmer nos résultats montrant la perte d'activité de liaison à l'ADN de p53 pour une concentration de 1mM GSNO. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé une lignée humaine de carcinome de côlon: les HCT116 qui existent en 2 génotypes : p53^{-/-} et p53^{+/+}. Nous avons observé que Bax s'accumule chez les cellules traitées par 0.5mM et 1mM de GSNO et ce, aussi bien chez les cellules possédant p53 que chez les cellules nulles pour p53. Ce résultat original montre que Bax peut s'accumuler de façon indépendante de p53. Ceci est en accord avec les toutes nouvelles observations de Oda et coll (2000).

Il serait intéressant de poursuivre nos travaux en étudiant la libération du cytochrome c dans le cytoplasme afin d'être sûrs que le NO induise l'apoptose par voie mitochondriale dans nos conditions expérimentales. Il est, en effet, important de ne pas oublier que Bax n'est qu'un des points de départ du processus apoptotique. Examiner l'effet d'une sur-expression de Bcl2 sur l'apoptose induite par le NO pourrait également compléter ce travail.

Nous expliquons donc la succession des événements observés après un traitement par un donneur de NO de manière différente de ce qui avait été montré précédemment (Messmer and Brune, 1997; Sandau et al., 1997). Nous pensons que ces phénomènes concomitants ne sont pas liés de façon causale. En effet, pour une concentration de 1mM GSNO, p53 perd sa capacité à transactiver ses gènes cibles et Bax peut être transactivé de manière indépendante de p53. Nos résultats suggèrent que, dans notre modèle, l'apoptose se produirait par voie mitochondriale bien qu'il ne soit pas connu précisément comment les MCF-7 gèrent leur manque de caspase 3.

Il existerait donc une relation complexe entre le NO et p53 où le NO induirait d'une part, l'accumulation de la protéine p53 (probablement par les lésions sur l'ADN qu'il provoque en réagissant avec d'autres espèces réactives) et où, d'autre part, il inhiberait partiellement l'activité de p53 par réaction chimique. Les

conséquences biologiques des effets du NO sur p53 sont de deux ordres. 1) L'inhibition de la fonction de p53 par le NO laisse se diviser les cellules qui ont été endommagées, ce qui permet la propagation des lésions oncogéniques sur les cellules filles. 2). L'inhibition de l'arrêt du cycle cellulaire permet une autre réponse cellulaire : l'apoptose. Dans le premier cas, l'exposition au NO est susceptible de provoquer l'acquisition et la propagation de lésions oncogéniques. Ceci se passerait plutôt à des concentrations intermédiaires de NO, lorsque p53 est inactivée mais que la quantité de NO n'est pas suffisante pour induire l'apoptose. Dans le second cas, lorsque la quantité de NO est plus importante, les cellules subissent le

processus apoptotique qui permet d'éliminer les cellules endommagées.

Il a été montré que p53 régule la production de NO en inhibant la transcription de la iNOS. Cependant, en cas d'exposition à de fortes quantités de NO, il est tout à fait possible qu'elle en soit devenue incapable. Le fait que des marqueurs de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote tels que la 8-oxo-dG et les NTYR puissent être détectés dans des tissus enflammés suggère qu'effectivement, à un moment donné, la régulation négative de p53 sur la iNOS n'agit plus ou n'est pas suffisante pour maintenir un niveau faible de NO dans les cellules.

Il serait intéressant de vérifier expérimentalement que de fortes quantités de NO peuvent inactiver la capacité de p53 à réprimer la transcription de la iNOS par p53. Des résultats préliminaires, obtenus par Western blot (non présentés), semblent confirmer cette hypothèse mais il serait nécessaire d'étudier également l'expression de l'ARN messager de la iNOS.

Afin de mieux appréhender les interactions complexes qui existent entre le NO et p53, notre laboratoire a lancé le développement de souris déficientes à la fois pour le gène TP53 et pour celui de la iNOS. Ces souris seront obtenues par croisement entre souris iNOS^{-/-} et souris p53^{-/-}. Le développement de cette

nouvelle lignée a débuté il y a environ un an et demi et ces souris seront établies définitivement d'ici quelques mois. Ce modèle permettra, par comparaison avec les souris iNOS^{-/-} et les souris p53^{-/-} de déterminer, *in vivo*, la régulation de la iNOS en présence et en l'absence de p53. Il sera également possible de comparer le développement tumoral de ces souris soumises à des agents infectieux.

Il est connu depuis longtemps qu'une inflammation chronique favorise le développement d'un cancer, ce qui est illustré par l'association entre les infections schistosomiales et le cancer de la vessie, l'infection par *Helicobacter Pylori* et les cancers gastriques, le virus de l'hépatite et le carcinome hépatocellulaire. Notre hypothèse permettrait d'expliquer comment des tissus enflammés, qui atteignent de fortes concentrations de NO (voir plus loin), peuvent devenir tumoraux. Une fois p53 inactivée, les lésions sur l'ADN induites par le NO et ses dérivés peuvent passer à travers les mailles du filet de protection assuré par p53. De plus, les cellules ainsi sensibilisées ne sont plus capables de faire face à un second stress. Bien que p53 soit rapidement renouvelée, comme l'exposition au NO est constante, d'autres lésions peuvent se produire sans que p53 puisse exercer ses fonctions onco-suppressives. Ainsi, bien qu'aucune mutation ne soit détectée sur le gène TP53, la protéine peut être présente sous forme inactive et favoriser un processus cancérogène. Dans certaines tumeurs, notamment dans le cas du cancer du sein, le gène est intact mais la protéine est inactivée par séquestration dans le cytoplasme (Moll et al., 1992; Moll et al., 1995). Ainsi, des événements épigénétiques de nature variée peuvent se produire et inactiver la protéine. Il est tout à fait probable que seule une partie de la p53 soit concernée par cette inactivation induite par le NO, mais que cela suffise pour la réponse cellulaire ne soit pas adaptée.

Deux équipes ont récemment identifié la protéine MIF (Macrophage migration Inhibitory Factor), produite par les macrophages et les lymphocytes T,

qui inhibe l'activité de transactivation transcriptionnelle de p53 (Cordon-Cardo and Prives, 1999; Hudson et al., 1999). L'effet de cette cytokine a permis de rapprocher inflammation et cancer bien que la voie par laquelle MIF inactive p53 ne soit pas encore connue.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons adopté une approche plus chimique afin de mieux comprendre les différentes réactions dues au NO et à ses dérivés. Nous nous sommes intéressés aux types de lésions sur l'ADN et à la cytotoxicité provoqués par les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Nous avons comparé les effets du NO[•] et du NO⁻ en présence ou en l'absence de H₂O₂ et d'ions métalliques de transition. Nous avons montré que le NO[•] et le H₂O₂ agissent de façon synergique, en présence d'ions métalliques de transition, pour induire des cassures simple et double brins et pour former de la 8-oxo-dG sur de l'ADN plasmidique, *in vitro*. De plus, le mélange NO[•]/H₂O₂/CuCl₂ produit des lésions préférentiellement sur les résidus thymines situés sur les séquences suivantes: 5'-CTG-3', 5'-GTG-3' et 5'-GTA-3'. La formation de lésions spécifiquement sur les résidus thymines est caractéristique du complexe Cu¹⁺-OOH qui est créé par l'incubation d'ascorbate, de GSH ou de NADH en présence de H₂O₂ et de CuCl₂ (Oikawa and Kawanishi, 1996).

En fait, le NO[•] agit comme un agent réducteur (au même titre que le GSH, le NADH, l'ascorbate...) pour former du radical hydroxyle en présence de Fe³⁺ et un complexe Cu¹⁺-OOH en présence de Cu²⁺ qui possède les mêmes propriétés oxydantes que le radical hydroxyle.

In vitro, le NO[•] (délivré par du DEA-NO) en présence de H₂O₂ n'exerce pas les mêmes dommages sur l'ADN que le NO[•]. Cependant, le NO⁻, tout comme le NO[•], agit de façon synergique avec le H₂O₂ pour exercer des effets cytotoxiques sur les cellules MCF-7 en culture.

La formation de 8-oxo-dG a été confirmée sur l'ADN de cellules MCF-7 traitées simultanément par du NO[•] ou du NO⁻ en présence de H₂O₂. En ce qui concerne l'incubation en présence de NO[•]/H₂O₂, la formation de 8-oxo-dG est

synergique alors que pour $\text{NO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ la formation de cette base oxydée résulte de l'addition de la production provoquée par les 2 composés séparés.

Nous avons ensuite montré que ces 2 mélanges conduisaient à une mort cellulaire par apoptose (caractérisée par DNA ladder et coloration par Hoechst). La modification morphologique, observée par microscopie, est perceptible plus rapidement dans le cas de $\text{NO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ que dans celui de $\text{NO}^\bullet/\text{H}_2\text{O}_2$. De plus, nous avons montré que la présence d'un chélateur du fer (la déféroxamine) prévient l'apoptose provoquée par les deux mélanges, démontrant ainsi l'implication des métaux de transition. L'ensemble de nos résultats suggèrent que le radical hydroxyle serait l'espèce réactive responsable de l'apoptose induite par ces deux mélanges.

Des expériences étudiant la formation de 8-oxo-dG dans des cellules en culture exposées aux mélanges $\text{NO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ et $\text{NO}^\bullet/\text{H}_2\text{O}_2$ en présence de déféroxamine viendront compléter ces résultats. Nous espérons que ceux-ci permettront de montrer que le chélateur de fer inhibe la formation de 8-oxo-dG, tout comme l'apoptose, ce qui permettrait de lier définitivement la production de radical hydroxyle avec l'induction de l'apoptose que nous observons.

Il serait intéressant, par la suite, de quantifier les lésions induites sur l'ADN et d'étudier le type de lésions qu'induisent les mélanges $\text{NO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ et $\text{NO}^\bullet/\text{H}_2\text{O}_2$. Pour se faire, l'utilisation du test comète serait pertinente et nous permettrait de quantifier les cassures simple et double brins.

Pour comparer la toxicité du NO^- par rapport à celle du NO^\bullet , en présence de H_2O_2 , nous avons utilisé un donneur de NO^\bullet qui possède la même demi-vie que celle du donneur de NO^- (2.5 min). Nous avons donc utilisé le DEA-NO, et non pas le GSNO comme dans les études précédentes, car le GSNO a une demi-vie de l'ordre de quelques heures. On aurait pu observer des effets différents entre le NO^- et le NO^\bullet qui auraient été dus non pas à la nature du composé mais à la différence de demi vie entre les 2 donneurs de NO.

Le facteur limitant de toutes les études portant sur le NO est l'utilisation de donneurs de NO. Il existe plusieurs types de donneurs qui délivrent du NO avec des cinétiques différentes et qui ne libèrent pas toujours exactement le même composé. Comme nous l'avons vu, la nature du composé chimique est très importante vis à vis des réactions qu'il induit. Ceci a été illustré dans la publication 3, où nous avons montré que les différents donneur de NO ne possèdent pas le même pouvoir de nitration. De plus, nous avons remarqué, en utilisant la méthode de Griess pour mesurer l'accumulation des nitrites et des nitrates, que le GSNO libère beaucoup plus de NO dans le milieu de culture cellulaire que dans du PBS ou tout autre tampon utilisé pour les expériences *in vitro*. En effet, la présence de certains composés tels que l'acide ascorbique, le Cu^+ , et le GSH facilitent la dissociation du GSNO (Singh et al., 1996a; Singh et al., 1996b; Smith and Dasgupta, 2000b).

Nous avons choisi, pour nos expériences avec des cellules, d'utiliser le GSNO car il se décompose lentement et reflète le mieux les conditions inflammatoires. En effet, il est naturellement présent dans des conditions physiologiques et joue, en quelque sorte, un rôle de réservoir à NO. Il a été montré que 1mM GSNO génère 1 à 4 $\mu\text{M}/\text{min}$ de NO dans un milieu de culture cellulaire contenant 10% de serum (Wink et al., 1996), ce qui correspond à ce que nous avons mesuré dans nos conditions expérimentales. Il a été mesuré que la iNOS produit de l'ordre de 0.55 à 10 nmol/min/g tissue, soit 0.55 à 10 $\mu\text{M}/\text{min}$, dans la muqueuse enflammée de patients atteints de colite ulcéreuse, (Boughton-Smith et al., 1993; Rachmilewitz et al., 1995). Ces données indiquent que 1mM GSNO permet d'obtenir une concentration de NO voisine de celle atteinte dans des tissus enflammés de façon chronique.

En fait, le NO n'agit pas seul, mais réagit avec d'autres composés (en étant aussi bien sous forme de monoxyde d'azote que sous forme d'anion nitroxy) pour former des composés plus toxiques. Nous avons montré que le NO et ses dérivés induisent des lésions sur l'ADN et réagissent avec la protéine p53, qui a

justement pour rôle de reconnaître les dommages sur l'ADN et de diriger la cellule soit vers l'arrêt du cycle, soit vers l'apoptose pour éliminer les cellules trop endommagées. On peut imaginer que la cellule utilise l'ADN comme intégrateur de différents stress et que la cellule a à sa disposition de nombreux outils pour réparer ou éliminer les cellules endommagées. Lorsque ces «verrous» sont altérés, les lésions génomiques s'installent et un cancer peut se développer.

Doit-on utiliser des inhibiteurs de la production de NO comme agents chimioprotecteurs?

Répondre à cette question n'est pas simple car, comme nous l'avons évoqué précédemment, le NO joue un rôle ambivalent dans le processus de cancérogenèse. En fait, le NO exerce une action non spécifique et ses effets dépendent de sa quantité, de la nature des cellules exposées et du micro environnement radicalaire. Il est plus correct de parler d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote dans leur ensemble plutôt que du NO par lui-même car comme nous l'avons vu, le NO peut être réduit en anion nitroxyle et il réagit avec d'autres espèces pour en former d'autres plus toxiques. Lors de l'inflammation, du peroxyde d'hydrogène est également formé et potentialise l'effet cytotoxique du NO.

L'augmentation des facteurs de risque sur les tissus enflammés et l'effet pro-mutagène du NO et de ses dérivés suggèrent une action pro-cancérogène du NO. Certaines tumeurs expriment de la NOS (inductible ou constitutive, selon le type cellulaire) et le NO exerce des effets immunosuppresseurs (Lejeune et al., 1994; Salvucci et al., 1998). Ainsi, les cellules tumorales, en produisant du NO, se protégeraient contre les actions immunologiques de l'hôte. D'autre part, le NO et ses dérivés exercent une action cytotoxique. L'extrapolation de l'ensemble de ces données peut conduire à l'hypothèse que la réponse de l'organisme contre les cellules tumorales soit essentiellement cytotoxique car

les actions immunologiques des cellules NK et des lymphocytes T sont inhibées par la présence de NO.

Les conséquences de l'action cytotoxique du NO sont complexes à analyser car il s'agit d'une action non spécifique, contrairement à la réponse immunologique qui est très ciblée. Lorsque l'action cytotoxique se limite à lutter contre les invasions des bactéries ou contre les cellules tumorales, l'action peut être considérée comme bénéfique. Néanmoins, lorsque cet effet cytotoxique s'exerce sur des cellules saines, le NO agit au détriment de l'organisme.

Lors d'une inflammation chronique, il serait très intéressant de limiter la production massive de NO par la iNOS, tout en gardant la production contrôlée et nécessaire du NO par la eNOS et la nNOS. La iNOS et la eNOS présentent de grandes homologies pour les interactions entre protéine/cofacteur et la protéine/substrat, d'où la difficulté de développer des inhibiteurs très spécifiques d'une isoforme. Cependant, la détermination des structures cristallographiques ont mis en évidence des petites différences qui pourraient permettre de créer des inhibiteurs spécifiques de la iNOS (Fischmann et al., 1999).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Abdel-Mageed,A.B. and Agrawal,K.C. (1998). Activation of nuclear factor kappaB: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res* 58, 2335-2338.
- 2 Agami,R., Blandino,G., Oren,M., and Shaul,Y. (1999). Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis [see comments]. *Nature* 399, 809-813.
3. Agarwal,M.L., Agarwal,A., Taylor,W.R., Wang,Z.Q., Wagner,E.F., and Stark,G.R. (1997). Defective induction but normal activation and function of p53 in mouse cells lacking poly-ADP-ribose polymerase. *Oncogene* 15, 1035-1041.
- 4 Agoff,S.N., Hou,J., Linzer,D.I., and Wu,B. (1993). Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* 259, 84-87.
- 5 Albina,J.E. and Reichner,J.S. (1998). Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev* 17, 39-53.
- 6 Ambs,S., Bennett,W.P., Merriam,W.G., Ogunfusika,M.O., Oser,S.M., Harrington,A.M., Shields,P.G., Felley-Bosco,E., Hussain,S.P., and Harris,C.C. (1999). Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 91 , 86-88.
- 7 Ambs,S., Merriam,W.G., Bennett,W.P., Felley-Bosco,E., Ogunfusika,M.O., Oser,S.M., Klein,S., Shields,P.G., Billiar,T.R., and Harris,C.C. (1998a). Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res* 58, 334-341.
- 8 Ambs,S; Ogunfusika,M.O., Merriam,W.G., Benett,W.P., Billiar,T.R., Harris,C.C. (1998 b). Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 233-239.
- 9 An,W.G., Kanekal,M., Simon,M.C., Maltepe,E., Blagosklonny,M.V., and Neckers,L.M. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* 392, 405-408.
- 10 Ara,J., Przedborski,S., Naini,A.B., Jackson-Lewis,V., Trifiletti,R.R., Horwitz,J., and Ischiropoulos,H. (1998a). Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7659-7663.

- 11 Ara, J., Przedborski, S., Naini, A.B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R.R., Horwitz, J., and Ischiropoulos, H. (1998b). Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 7659-7663.
- 12 Arnelo, D.R. and Stamler, J.S. (1995). NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys* *318*, 279-285.
- 13 Arrigo, A.P. (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol Med* *27*, 936-944.
- 14 Ashcroft, M. and Vousden, K.H. (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene* *18*, 7637-7643.
- 15 Bacus, S.S., Yarden, Y., Oren, M., Chin, D.M., Lyass, L., Zelnick, C.R., Kazarov, A., Toyofuku, W., Gray-Bablin, J., Beerli, R.R., Hynes, N.E., Nikiforov, M., Haffner, R., Gudkov, A., and Keyomarsi, K. (1996). Neu differentiation factor (Heregulin) activates a p53-dependent pathway in cancer cells. *Oncogene* *12*, 2535-2547.
- 16 Bae, I., Fan, S., Bhatia, K., Kohn, K.W., Fornace, A.J., Jr., and O'Connor, P.M. (1995). Relationships between G1 arrest and stability of the p53 and p21Cip1/Waf1 proteins following gamma-irradiation of human lymphoma cells. *Cancer Res* *55*, 2387-2393.
- 17 Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K.G. (1994). p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 413-417.
- 18 Balabanli, B., Kamisaki, Y., Martin, E., and Murad, F. (1999). Requirements for heme and thiols for the nonenzymatic modification of nitrotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* *96*, 13136-13141.
- 19 Balint, E., Bates, S., and Vousden, K.H. (1999). Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene* *18*, 3923-3929.
- 20 Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* *281*, 1674-1677.
- 21 Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* *12*, 461-468.

- 22 Bargonetti, J., Manfredi, J.J., Chen, X., Marshak, D.R., and Prives, C. (1993). A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev.* 7, 2565-2574.
- 23 Bates, S. and Vousden, K.H. (1999). Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55, 28-37.
- 24 Beckman, J.S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 836-844.
- 25 Beckman, J.S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der, W.M., Smith, C., Chen, J., Harrison, J., Martin, J.C., and Tsai, M. (1992). Kinetics of superoxide dismu. *Arch Biochem Biophys* 298, 438-445.
- 26 Beckman, J.S. and Koppenol, W.H. (1996a). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271, C1424-C1437.
- 27 Beckman, J.S. and Koppenol, W.H. (1996b). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271, C1424-C1437.
- 28 Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R., and Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis [see comments]. *Science* 282, 290-293.
- 29 Berlett, B.S., Levine, R.L., and Stadtman, E.R. (1998). Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2784-2789.
- 30 Blaydes, J.P. and Hupp, T.R. (1998). DNA damage triggers DRB-resistant phosphorylation of human p53 at the CK2 site. *Oncogene* 17, 1045-1052.
- 31 Boughton-Smith, N.K., Evans, S.M., Hawkey, C.J., Cole, A.T., Balsitis, M., Whittle, B.J., and Moncada, S. (1993). Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 342, 338-340.
- 32 Boulos, C., Jiang, H., and Balazy, M. (2000). Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues [In Process Citation]. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 222-229.
- 33 Bourdon, J.C., Deguin-Chambon, V., Lelong, J.C., Dessen, P., May, P., Debuire, B., and May, E. (1997). Further characterisation of the p53 responsive

element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53.
Oncogene 14, 85-94.

- 34 Bouvard,V., Zaitchouk,T., Vacher,M., Duthu,A., Canivet,M., Choisy-Rossi,C., Nieruchalski,M., and May,E. (2000). Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* 19, 649-660.
- 35 Brain,R. and Jenkins,J.R. (1994). Human p53 directs DNA strand reassociation and is photolabelled by 8-azido ATP. *Oncogene* 9 , 1775-1780.
- 36 Brockhaus,F. and Brune, B. (1999). P53 accumulation in apoptotic macrophages is an energy demanding process that precedes cytochrome c release in response to nitric oxide. *Oncogene* 18, 6403-6410.
- 37 Brodsky,M.H., Nordstrom,W., Tsang,G., Kwan,E., Rubin,G.M., and Abrams,J.M. (2000). Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* 101, 103-113.
- 38 Brown,G.C. and Cooper,C.E. (1994). Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356, 295-298.
- 39 Brugarolas,J., Chandrasekaran,C., Gordon,J.I., Beach,D., Jacks,T., and Hannon,G.J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552-557.
- 40 Brune,B., von Knethen,A., and Sandau,K.B. (1998). Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 351, 261-272.
- 41 Buckbinder,L., Talbott,R., Velasco-Miguel,S., Takenaka,I., Faha,B., Seizinger,B.R., and Kley,N. (1995). Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 377, 646-649.
- 42 Bulavin,D.V., Saito,S., Hollander,M.C., Sakaguchi,K., Anderson,C.W., Appella,E., and Fornace,A.J., Jr. (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* 18, 6845-6854.
- 43 Burow,M.E., Weldon,C.B., Tang,Y., Navar,G.L., Krajewski,S., Reed,J.C., Hammond,T.G., Clejan,S., and Beckman,B.S. (1998). Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer Res* 58, 4940-4946.
- 44 Cai,Z., Capoulade,C., Moyret-Lalle,C., Amor-Gueret,M., Feunteun,J., Larsen,A.K., Paillerets,B.B., and Chouaib,S. (1997). Resistance of MCF7

- human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene* 15, 2817-2826.
- 45 Calmels,S., Hainaut,P., and Ohshima,H. (1997). Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 57, 3365-3369.
- 46 Canman,C.E., Lim,D.S., Cimprich,K.A., Taya,Y., Tamai,K., Sakaguchi,K., Appella,E., Kastan,M.B., and Siliciano,J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-1679.
- 47 Carmeliet,P., Dor,Y., Herbert,J.M., Fukumura,D., Brusselmans,K., Dewerchin,M., Neeman,M., Bono,F., Abramovitch,R., Maxwell,P., Koch,C.J., Ratcliffe,P., Moons,L., Jain,R.K., Collen,D., Keshert,E., and Keshet,E. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis [published erratum appears in *Nature* 1998 Oct 1;395(6701):525]. *Nature* 394, 485-490.
- 48 Cassina,A. and Radi,R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328, 309-316.
- 49 Castro,L.A., Robalinho,R.L., Cayota,A., Meneghini,R., and Radi,R. (1998). Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 359, 215-224.
- 50 Cayrol,C., Knibiehler,M., and Ducommun,B. (1998). p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16, 311-320.
- 51 Chehab,N.H., Malikzay,A., Appel,M., and Halazonetis,T.D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* 14, 278-288.
- 52 Chen,J., Marechal,V., and Levine,A.J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* 13, 4107-4114.
- 53 Chen,J., Peters,R., Saha,P., Lee,P., Theodoras,A., Pagano,M., Wagner,G., and Dutta,A. (1996). A 39 amino acid fragment of the cell cycle regulator p21 is sufficient to bind PCNA and partially inhibit DNA replication in vivo. *Nucleic Acids Res* 24, 1727-1733.
- 54 Chin,K.V., Ueda,K., Pastan,I., and Gottesman,M.M. (1992). Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 255, 459-462.

- 55 Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346-355.
- 56 Chouaib, S., Asselin-Paturel, C., Mami-Chouaib, F., Caignard, A., Blay, J.Y. (1997). The host-tumor immune conflict :from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunology Today* 18, 493-497.
- 57 Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley-Usmar, V.M., Moncada, S., and Schapira, A.H. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 345, 50-54.
- 58 Clore, G.M., Omichinski, J.G., Sakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E., and Gronenborn, A.M. (1994). High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR [published erratum appears in *Science* 1995 Mar 10;267(5203):1515]. *Science* 265, 386-391.
- 59 Cobbs, C.S., Brenman, J.E., Aldape, K.D., Bredt, D.S., and Israel, M.A. (1995). Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 55, 727-730.
- 60 Cordon-Cardo, C. and Prives, C. (1999). At the crossroads of inflammation and tumorigenesis [comment]. *J Exp Med* 190, 1367-1370.
- 61 Cortes, U., Moyret-Lalle, C., Falette, N., Duriez, C., Ghissassi, F.E., Barnas, C., Morel, A.P., Hainaut, P., Magaud, J.P., and Puisieux, A. (2000). BTG gene expression in the p53-dependent and -independent cellular response to DNA damage. *Mol Carcinog* 27, 57-64.
- 62 Craig, A.L., Burch, L., Vojtesek, B., Mikutowska, J., Thompson, A., and Hupp, T.R. (1999). Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers. *Biochem J* 342 (Pt 1), 133-141.
- 63 Crow, J.P., Beckman, J.S., and McCord, J.M. (1995). Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxynitrite. *Biochemistry* 34, 3544-3552.
- 64 Crow, J.P., Ye, Y.Z., Strong, M., Kirk, M., Barnes, S., and Beckman, J.S. (1997). Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L. *J Neurochem.* 69, 1945-1953.
- 65 de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., Walztinger, C., Chambon, P., and de Murcia, G. (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in

recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7303-7307.

- 66 Dehmer, T., Lindenau, J., Haid, S., Dichgans, J., and Schulz, J.B. (2000). Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo [In Process Citation]. *J Neurochem.* 74, 2213-2216.
- 67 Delphin, C. and Baudier, J. (1994). The protein kinase C activator, phorbol ester, cooperates with the wild-type p53 species of Ras-transformed embryo fibroblasts growth arrest. *J Biol Chem* 269, 29579-29587.
- 68 Derojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. (1995). Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 8, 473-477.
- 69 Dijkstra, G., Moshage, H., van Dullemen, H.M., Jager-Krikken, A., Tiebosch, A.T., Kleibeuker, J.H., Jansen, P.L., and van Goor, H. (1998). Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 186, 416-421.
- 70 Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.
- 71 Ducrocq, C., Blanchard, B., Pignatelli, B., and Ohshima, H. (1999). Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol Life Sci* 55, 1068-1077.
- 72 Eiserich, J.P., Hristova, M., Cross, C.E., Jones, A.D., Freeman, B.A., Halliwell, B., and van, d., V (1998). Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391, 393-397.
- 73 el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- 74 el Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1, 45-49.
- 75 Elbendary, A., Berchuck, A., Davis, P., Havrilesky, L., Bast, R.C., Jr., Iglehart, J.D., and Marks, J.R. (1994). Transforming growth factor beta 1 can induce CIP1/WAF1 expression independent of the p53 pathway in ovarian cancer cells. *Cell Growth Differ.* 5, 1301-1307.

- 76 Endicott, J.A. and Noble, M.E. (1998). Structural principles in cell-cycle control: beyond the CDKs. *Structure*. 6, 535-541.
- 77 Evans, T.J., Buttery, L.D., Carpenter, A., Springall, D.R., Polak, J.M., and Cohen, J. (1996). Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9553-9558.
- 78 Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., and Weissman, A.M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 275, 8945-8951.
- 79 Farias-Eisner, R., Chaudhuri, G., Aeberhard, E., Fukuto, J.M. (1996). The chemistry and tumoricidal activity of nitric oxide/hydrogen peroxide and the implication to cell resistance/susceptibility. *J Bio Chem* 271, 6144-6151.
- 80 Felley-Bosco, E. (1998). Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 17, 25-37.
- 81 Ferret, P.J., Soum, E., Negre, O., Wollman, E.E., and Fradelizi, D. (2000). Protective effect of thioredoxin upon NO-mediated cell injury in THP1 monocytic human cells. *Biochem J* 346 Pt 3, 759-765.
- 82 Fischmann, T.O., Hruza, A., Niu, X.D., Fossetta, J.D., Lunn, C.A., Dolphin, E., Prongay, A.J., Reichert, P., Lundell, D.J., Narula, S.K., and Weber, P.C. (1999). Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat Struct. Biol* 6, 233-242.
- 83 Forman, D. (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *Aliment. Pharmacol Ther* 9 Suppl 2, 71-76.
- 84 Freedman, D.A. and Levine, A.J. (1999). Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein--thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 59, 1-7.
- 85 Freermerman, A.J., Gallegos, A., and Powis, G. (1999). Nuclear factor kappaB transactivation is increased but is not involved in the proliferative effects of thioredoxin overexpression in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 59, 4090-4094.
- 86 Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J., and Prives, C. (1993). The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jun 15;90(12):5878]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3319-3323.
- 87 Friesen, C., Herr, I., Krammer, P.H., and Debatin, K.M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 2, 574-577.

- 88 Fuchs,E.J., McKenna,K.A., and Bedi,A. (1997). p53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires Fas/APO-1-independent activation of CPP32beta. *Cancer Res* 57, 2550-2554.
- 89 Fuchs,S.Y., Adler,V., Buschmann,T., Yin,Z., Wu,X., Jones,S.N., and Ronai,Z. (1998). JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.* 12, 2658-2663.
- 90 Fukasawa,K., Wiener,F., Vande Woude,G.F., and Mai,S. (1997). Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene* 15, 1295-1302.
- 91 Fukumura,D. and Jain,R.K. (1998). Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev* 17, 77-89.
- 92 Fukumura,D., Yuan,F., Endo,M., and Jain,R.K. (1997). Role of nitric oxide in tumor microcirculation. Blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions. *Am J Pathol* 150, 713-725.
- 93 Gaiddon,C., Moorthy,N.C., and Prives,C. (1999). Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO J* 18, 5609-5621.
- 94 Garcia-Monzon,C., Majano,P.L., Zubia,I., Sanz,P., Apolinario,A., and Moreno-Otero,R. (2000). Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol* 32, 331-338.
- 95 Gergel,D. and Cederbaum,A.I. (1996). Inhibition of the catalytic activity of alcohol dehydrogenase by nitric oxide is associated with S nitrosylation and the release of zinc. *Biochemistry* 35, 16186-16194.
- 96 Gervais,J.L., Seth,P., and Zhang,H. (1998). Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273, 19207-19212.
- 97 Ghibelli,L., Coppola,S., Fanelli,C., Rotilio,G., Civitareale,P., Scovassi,A.I., and Ciriolo,M.R. (1999). Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *FASEB J* 13, 2031-2036.
- 98 Ghosh,D.K., Crane,B.R., Ghosh,S., Wolan,D., Gachhui,R., Crooks,C., Presta,A., Tainer,J.A., Getzoff,E.D., and Stuehr,D.J. (1999). Inducible nitric oxide synthase: role of the N-terminal beta-hairpin hook and pterin-binding segment in dimerization and tetrahydrobiopterin interaction. *EMBO J* 18, 6260-6270.

- 99 Ginsberg,D., Mechta,F., Yaniv,M., and Oren,M. (1991). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9979-9983.
- 100 Gong,J.G., Costanzo,A., Yang,H.Q., Melino,G., Kaelin,W.G., Jr., Levrero,M., and Wang,J.Y. (1999). The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage [see comments]. *Nature* 399, 806-809.
- 101 Good,P.F., Werner,P., Hsu,A., Olanow,C.W., and Perl,D.P. (1996). Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 149, 21-28.
- 102 Gorospe,M., Cirielli,C., Wang,X., Seth,P., Capogrossi,M.C., and Holbrook,N.J. (1997). p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 14, 929-935.
- 103 Gorren,A.C., de Boer,E., and Wever,R. (1987). The reaction of nitric oxide with copper proteins and the photodissociation of copper-NO complexes. *Biochim. Biophys Acta* 916, 38-47.
- 104 Goss,S.P., Hogg,N., and Kalyanaraman,B. (1995). The antioxidant effect of spermine NONOate in human low-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol* 8, 800-806.
- 105 Gostissa,M., Hengstermann,A., Fogal,V., Sandy,P., Schwarz,S.E., Scheffner,M., and Del Sal,G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 18, 6462-6471.
- 106 Goto,T., Haruma,K., Kitadai,Y., Ito,M., Yoshihara,M., Sumii,K., Hayakawa,N., and Kajiyama,G. (1999). Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* 5, 1411-1415.
- 107 Gow,A.J., Duran,D., Malcolm,S., and Ischiropoulos,H. (1996). Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 385, 63-66.
- 108 Gow,A.J. and Stamler,J.S. (1998). Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 391, 169-173.
- 109 Grandati,M., Verrecchia,C., Revaud,M.L., Allix,M., Boulu,R.G., and Plotkine,M. (1997). Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol* 122, 625-630.

- 110 Graziewicz, M., Wink, D.A., and Laval, F. (1996). Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: potential mechanisms for NO-mediated DNA damage. *Carcinogenesis* 17, 2501-2505.
- 111 Greis, K.D., Zhu, S., and Matalon, S. (1996). Identification of nitration sites on surfactant protein A by tandem electrospray mass spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys* 335, 396-402.
- 112 Gu, J., Chen, D., Rosenblum, J., Rubin, R.M., and Yuan, Z.M. (2000). Identification of a sequence element from p53 that signals for Mdm2-targeted degradation. *Mol Cell Biol* 20, 1243-1253.
- 113 Gu, W. and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
- 114 Gu, W., Shi, X.L., and Roeder, R.G. (1997). Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* 387, 819-823.
- 115 Guillouf, C., Rosselli, F., Sjin, R.T., Moustacchi, E., Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (1998). Role of a mutant p53 protein in apoptosis: characterization of a function independent of transcriptional trans-activation. *Int J Oncol* 13, 107-114.
- 116 Guittet, O., Decottignies, P., Serani, L., Henry, Y., Le Marechal, P., Laprevote, O., and Lepoivre, M. (2000). Peroxynitrite-mediated nitration of the stable free radical tyrosine residue of the ribonucleotide reductase small subunit. *Biochemistry* 39, 4640-4648.
- 117 Guittet, O., Ducastel, B., Salem, J.S., Henry, Y., Rubin, H., Lemaire, G., and Lepoivre, M. (1998). Differential sensitivity of the tyrosyl radical of mouse ribonucleotide reductase to nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem* 273, 22136-22144.
- 118 Gunther, M.R., Hsi, L.C., Curtis, J.F., Gierse, J.K., Marnett, L.J., Eling, T.E., and Mason, R.P. (1997). Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J Biol Chem* 272, 17086-17090.
- 119 Haendeler, J., Weiland, U., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (1997). Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide* 1, 282-293.
- 120 Hainaut, P. and Hollstein, M. (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77, 81-137.
- 121 Hainaut, P. and Milner, J. (1993). Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. *Cancer Res* 53, 4469-4473.

- 122 Hainaut, P., Rolley, N., Davies, M., and Milner, J. (1995). Modulation by copper of p53 conformation and sequence-specific DNA binding: role for Cu(II)/Cu(I) redox mechanism. *Oncogene* 10, 27-32.
- 123 Halazonetis, T.D. and Kandil, A.N. (1993). Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J* 12, 5057-5064.
- 124 Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S., and Croce, C.M. (1994). Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 54, 2095-2097.
- 125 Halliwell, B. (1997). What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett* 411, 157-160.
- 126 Harris, L.C., Remack, J.S., Houghton, P.J., and Brent, T.P. (1996). Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* 56, 2029-2032.
- 127 Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- 128 Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K.H., and Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* 9, 2170-2183.
- 129 Hausmann, G., O'Reilly, L.A., van Driel, R., Beaumont, J.G., Strasser, A., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2000). Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol* 149, 623-634.
- 130 Hellberg, C.B., Boggs, S.E., and Lapetina, E.G. (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase is a target for protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 252, 313-317.
- 131 Henry, Y., Ducrocq, C., Drapier, J.C., Servent, D., Pellat, C., and Guissani, A. (1991). Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur Biophys J* 20, 1-15.
- 132 Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1, 3-11.
- 133 Hinder, F., Booke, M., Traber, L.D., and Traber, D.L. (1997). Nitric oxide and endothelial permeability. *J Appl Physiol* 83, 1941-1946.

- 134 Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3633-3638.
- 135 Hirsch, E.C. and Hunot, S. (2000). Nitric oxide, glial cells and neuronal degeneration in parkinsonism. *Trends Pharmacol Sci* 21, 163-165.
- 136 Ho, Y.S., Liu, H.L., Duh, J.S., Chen, R.J., Ho, W.L., Jeng, J.H., Wang, Y.J., and Lin, J.K. (1999). Induction of apoptosis by S-nitrosoglutathione and Cu²⁺ or Ni²⁺ ion through modulation of bax, bad, and bcl-2 proteins in human colon adenocarcinoma cells. *Mol Carcinog.* 26, 201-211.
- 137 Hobbs, A.J., Fukuto, J.M., and Ignarro, L.J. (1994). Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10992-10996.
- 138 Hoffman, R.A., Langrehr, J.M., Billiar, T.R., Curran, R.D., and Simmons, R.L. (1990). Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine. *J Immunol* 145, 2220-2226.
- 139 Hogg, N., Singh, R.J., and Kalyanaraman, B. (1996). The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett* 382, 223-228.
- 140 Honda, R. and Yasuda, H. (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 19, 1473-1476.
- 141 Hortelano, S., Alvarez, A.M., and Bosca, L. (1999). Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages [In Process Citation]. *FASEB J* 13, 2311-2317.
- 142 Hortelano, S., Dallaporta, B., Zamzami, N., Hirsch, T., Susin, S.A., Marzo, I., Bosca, L., and Kroemer, G. (1997). Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 410, 373-377.
- 143 Hsieh, T.C., Juan, G., Darzynkiewicz, Z., and Wu, J.M. (1999). Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2 [In Process Citation]. *Cancer Res* 59, 2596-2601.
- 144 Huang, L.C., Clarkin, K.C., and Wahl, G.M. (1996). p53-dependent cell cycle arrests are preserved in DNA-activated protein kinase-deficient mouse fibroblasts. *Cancer Res* 56, 2940-2944.

- 145 Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J., and Beach, D.H. (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190, 1375-1382.
- 146 Hueber, A.O., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., and Evan, G.I. (1997). Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* 278, 1305-1309.
- 147 Hupp, T.R. and Lane, D.P. (1994). Regulation of the cryptic sequence-specific DNA-binding function of p53 by protein kinases. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 59, 195-206.
- 148 Hupp, T.R. and Lane, D.P. (1995). Two distinct signaling pathways activate the latent DNA binding function of p53 in a casein kinase II-independent manner. *J Biol Chem* 270, 18165-18174.
- 149 Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., and Lane, D.P. (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71, 875-886.
- 150 Hupp, T.R., Sparks, A., and Lane, D.P. (1995). Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* 83, 237-245.
- 151 Iadecola, C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 20, 132-139.
- 152 Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9265-9269.
- 153 Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Wood, K.S., and Chaudhuri, G. (1988). Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 244, 181-189.
- 154 Ikawa, S., Nakagawara, A., and Ikawa, Y. (1999). p53 family genes: structural comparison, expression and mutation [see comments]. *Cell Death Differ.* 6, 1154-1161.
- 155 Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys* 356, 1-11.
- 156 Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J.C., Smith, C.D., and Beckman, J.S. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298, 431-437.

- 157 Jacks,T., Remington,L., Williams,B.O., Schmitt,E.M., Halachmi,S., Bronson,R.T., and Weinberg,R.A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4, 1-7.
- 158 Jacotot,E., Ferri,K.F., and Kroemer,G. (2000). Apoptosis and cell cycle: distinct checkpoints with overlapping upstream control. *Pathol Biol (Paris)* 48, 271-279.
- 159 Jayaraman,L., Murthy,K.G., Zhu,C., Curran,T., Xanthoudakis,S., and Prives,C. (1997). Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev.* 11, 558-570.
- 160 Jeffrey,P.D., Gorina,S., and Pavletich,N.P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267, 1498-1502.
- 161 Jimenez,G.S., Bryntesson,F., Torres-Arzayus,M.I., Priestley,A., Beeche,M., Saito,S., Sakaguchi,K., Appella,E., Jeggo,P.A., Taccioli,G.E., Wahl,G.M., and Hubank,M. (1999). DNA-dependent protein kinase is not required for the p53-dependent response to DNA damage. *Nature* 400, 81-83.
- 162 Jones,S.N., Roe,A.E., Donehower,L.A., and Bradley,A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206-208.
- 163 Jost,C.A., Marin,M.C., and Kaelin,W.G., Jr. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis [published erratum appears in *Nature* 1999 Jun 24;399(6738):817]. *Nature* 389, 191-194.
- 164 Juang,S.H., Xie,K., Xu,L., Shi,Q., Wang,Y., Yoneda,J., and Fidler,I.J. (1998). Suppression of tumorigenicity and metastasis of human renal carcinoma cells by infection with retroviral vectors harboring the murine inducible nitric oxide synthase gene. *Hum Gene Ther* 9, 845-854.
- 165 Kachnic,L.A., Wu,B., Wunsch,H., Mekeel,K.L., DeFrank,J.S., Tang,W., and Powell,S.N. (1999). The ability of p53 to activate downstream genes p21(WAF1/cip1) and MDM2, and cell cycle arrest following DNA damage is delayed and attenuated in scid cells deficient in the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 274, 13111-13117.
- 166 Kaelin,W.G., Jr. (1999). The p53 gene family. *Oncogene* 18, 7701-7705.
- 167 Kaghad,M., Bonnet,H., Yang,A., Creancier,L., Biscan,J.C., Valent,A., Minty,A., Chalon,P., Lelias,J.M., Dumont,X., Ferrara,P., McKeon,F., and Caput,D. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809-819.

- 168 Kamisaki, Y., Wada, K., Bian, K., Balabanli, B., Davis, K., Martin, E., Behbod, F., Lee, Y.C., and Murad, F. (1998). An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 11584-11589.
- 169 Kapoor, M. and Lozano, G. (1998). Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2834-2837.
- 170 Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., and Fornace, A.J.J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* *71*, 587-597.
- 171 Khan, A.U., Kovacic, D., Kolbanovskiy, A., Desai, M., Frenkel, K., and Geacintov, N.E. (2000). The decomposition of peroxyxynitrite to nitroxyl anion (NO-) and singlet oxygen in aqueous solution [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 2984-2989.
- 172 Kim, Y.M., Talanian, R.V., and Billiar, T.R. (1997). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* *272*, 31138-31148.
- 173 Kimura, H., Hokari, R., Miura, S., Shigematsu, T., Hirokawa, M., Akiba, Y., Kurose, I., Higuchi, H., Fujimori, H., Tsuzuki, Y., Serizawa, H., and Ishii, H. (1998). Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxyxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* *42*, 180-187.
- 174 Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* *87*, 159-170.
- 175 Kirsch, D.G., Doseff, A., Chau, B.N., Lim, D.S., Souza-Pinto, N.C., Hansford, R., Kastan, M.B., Lazebnik, Y.A., and Hardwick, J.M. (1999). Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem* *274*, 21155-21161.
- 176 Knowles, R.G. and Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* *298 (Pt 2)*, 249-258.
- 177 Ko, L.J. and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* *10*, 1054-1072.
- 178 Ko, L.J., Shieh, S.Y., Chen, X., Jayaraman, L., Tamai, K., Taya, Y., Prives, C., and Pan, Z.Q. (1997). p53 is phosphorylated by CDK7-cyclin H in a p36MAT1-dependent manner. *Mol Cell Biol* *17*, 7220-7229.

- 179 Kong, S.K., Yim, M.B., Stadtman, E.R., and Chock, P.B. (1996). Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3377-3382.
- 180 Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J.S. (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5, 834-842.
- 181 Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- 182 Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., and Kastan, M.B. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7491-7495.
- 183 Kurokawa, H., Nishio, K., Fukumoto, H., Tomonari, A., Suzuki, T., and Saijo, N. (1999). Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. *Oncol Rep* 6, 33-37.
- 184 Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., and Pavletich, N.P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain [comment]. *Science* 274, 948-953.
- 185 Lancaster, J.R., Jr., Langrehr, J.M., Bergonia, H.A., Murase, N., Simmons, R.L., and Hoffman, R.A. (1992). EPR detection of heme and nonheme iron-containing protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat heart allograft. *J Biol Chem* 267, 10994-10998.
- 186 Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- 187 Langrehr, J.M., Dull, K.E., Ochoa, J.B., Billiar, T.R., Ildstad, S.T., Schraut, W.H., Simmons, R.L., and Hoffman, R.A. (1992). Evidence that nitric oxide production by in vivo allosensitized cells inhibits the development of allospecific CTL. *Transplantation* 53, 632-640.
- 188 Lees-Miller, S.P., Sakaguchi, K., Ullrich, S.J., Appella, E., and Anderson, C.W. (1992). Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol* 12, 5041-5049.
- 189 Lejeune, P., Lagadec, P., Onier, N., Pinard, D., Ohshima, H., Jeannin, J.F. (1994). Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. *J. Immunol* 152, 5077-5083.
- 190 Lepoivre, M., Flaman, J.M., Bobe, P., Lemaire, G., and Henry, Y. (1994). Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric

- oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. *J Biol Chem* 269, 21891-21897.
- 191 Lepoivre, M., Flaman, J.M., and Henry, Y. (1992). Early loss of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase of adenocarcinoma cells producing nitric oxide. *J Biol Chem* 267, 22994-23000.
- 192 Levrero, M., De, L., V, Costanzo, A., Gong, J., Melino, G., and Wang, J.Y. (1999). Structure, function and regulation of p63 and p73 [see comments]. *Cell Death Differ.* 6, 1146-1153.
- 193 Li, H., Raman, C.S., Glaser, C.B., Blasko, E., Young, T.A., Parkinson, J.F., Whitlow, M., and Poulos, T.L. (1999). Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 274, 21276-21284.
- 194 Li, J., Billiar, T.R., Talanian, R.V., and Kim, Y.M. (1997). Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 240, 419-424.
- 195 Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease [see comments]. *Nat Med* 5, 1403-1409.
- 196 Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202-1209.
- 197 Lohrum, M.A., Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., and Vousden, K.H. (2000). Contribution of two independent MDM2-binding domains in p14(ARF) to p53 stabilization [In Process Citation]. *Curr Biol* 10, 539-542.
- 198 Lohrum, M.A. and Vousden, K.H. (1999). Regulation and activation of p53 and its family members [see comments]. *Cell Death Differ.* 6, 1162-1168.
- 199 Lu, H. and Levine, A.J. (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5154-5158.
- 200 Lymar, S.V., Jiang, Q., and Hurst, J.K. (1996). Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxyxynitrite. *Biochemistry* 35, 7855-7861.
- 201 Maki, C.G. (1999). Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *J Biol Chem* 274, 16531-16535.

- 202 Maki,C.G., Huibregtse,J.M., and Howley,P.M. (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res* 56, 2649-2654.
- 203 Malanga,M., Pleschke,J.M., Kleczkowska,H.E., and Althaus,F.R. (1998). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J Biol Chem* 273, 11839-11843.
- 204 Marquez,L.A. and Dunford,H.B. (1995). Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies. *J Biol Chem* 270, 30434-30440.
- 205 Marshall,H.E., Merchant,K., Stamler,J.S. (2000). Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J.* 14, 1889-1900.
- 206 Martin,D.W., Munoz,R.M., Subler,M.A., and Deb,S. (1993). p53 binds to the TATA-binding protein-TATA complex. *J Biol Chem* 268, 13062-13067.
- 207 Martinez,J.D., Craven,M.T., and Pennington,M.E. (1998). Selective binding of different p53 response elements by p53 containing complexes. *Oncogene* 16, 453-458.
- 208 May,P. and May,E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18, 7621-7636.
- 209 Mayer,B. and Hemmens,B. (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells [published erratum appears in *Trends Biochem Sci* 1998 Feb;23(2):87]. *Trends Biochem Sci* 22, 477-481.
- 210 Medot-Pirenne,M., Heilman,M.J., Saxena,M., McDermott,P.E., and Mills,C.D. (1999). Augmentation of an antitumor CTL response In vivo by inhibition of suppressor macrophage nitric oxide. *J Immunol* 163, 5877-5882.
- 211 Meek,D.W. (1998). Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal.* 10, 159-166.
- 212 Meplan,C., Mann,K., and Hainaut,P. (1999b). Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem* 274, 31663-31670.
- 213 Meplan,C., Richard,M.J., and Hainaut,P. (2000). Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem Pharmacol* 59, 25-33.
- 214 Meplan,C., Verhaegh,G., Richard,M.J., and Hainaut,P. (1999a). Metal ions as regulators of the conformation and function of the tumour suppressor protein p53: implications for carcinogenesis. *Proc Nutr Soc* 58, 565-571.

- 215 Merenyi,G., Lind,J., Goldstein,S., and Czapski,G. (1998). Peroxynitrous acid homolyzes into *OH and *NO₂ radicals. *Chem Res Toxicol* *11*, 712-713.
- 216 Messmer,U.K., Reimer,D.M., Reed,J.C, Brune,B. (1996a). Nitric oxide induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophages apoptosis is blocked by Bcl2. (1996a). *FEBS Lett* *15*, 162-166.
- 217 Messmer,U.K. and Brune,B. (1996b). Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem. J.* *319*, 299-305.
- 218 Messmer,U.K. and Brune,B. (1997). Attenuation of p53 expression and Bax down-regulation during phorbol ester mediated inhibition of apoptosis. *Br. J Pharmacol* *121*, 625-634.
- 219 Midgley,C.A., Desterro,J.M., Saville,M.K., Howard,S., Sparks,A., Hay,R.T., and Lane,D.P. (2000). An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene* *19*, 2312-2323.
- 220 Midgley,C.A. and Lane,D.P. (1997). p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene* *15*, 1179-1189.
- 221 Mills,A.A., Zheng,B., Wang,X.J., Vogel,H., Roop,D.R., and Bradley,A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* *398*, 708-713.
- 222 Milne,D.M., Campbell,L.E., Campbell,D.G., and Meek,D.W. (1995). p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by an ultraviolet radiation-induced protein kinase characteristic of the c-Jun kinase, JNK1. *J Biol Chem* *270*, 5511-5518.
- 223 Miyashita,T., Harigai,M., Hanada,M., and Reed,J.C. (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* *54*, 3131-3135.
- 224 Miranda,K.M., Espey,M.G., Ludwick,N., Kim,S., Jourd'heuil,D., Grishman,B., Feelisch,M., Fukuto,J.M., Wink,D.A. (2000). Unique oxidative mechanisms for the reactive nitrogen species, nitroxyl anion. *J.Biol Chem IN PRESS*.
- 225 Molinari,M., Okorokov,A.L., and Milner,J. (1996). Interaction with damaged DNA induces selective proteolytic cleavage of p53 to yield 40 kDa and 35 kDa fragments competent for sequence-specific DNA binding. *Oncogene* *13*, 2077-2086.
- 226 Moll,U.M., LaQuaglia,M., Benard,J., and Riou,G. (1995). Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated

- neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4407-4411.
- 227 Moll, U.M., Riou, G., and Levine, A.J. (1992). Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7262-7266.
- 228 Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., and Levine, A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245.
- 229 Montes de Oca, L.R., Wagner, D.S., and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203-206.
- 230 Mochhala, S. and Rajnakova, A. (1999). Role of nitric oxide in cancer biology. *Free Radic. Res* 31, 671-679.
- 231 Morel, Y. et Barouki, R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Médecine/science* 14, 713-721.
- 232 Mortensen, K., Skouv, J., Hougaard, D.M., Larsson, L.I. (1999). Endogenous endothelial cell nitric-oxide synthase modulates apoptosis in cultured breast cancer cells and is transcriptionally regulated by p53. *J. Biol. Chem* 274, 37679-37684.
- 233 Muller, C.W., Rey, F.A., Sodeoka, M., Verdine, G.L., and Harrison, S.C. (1995). Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA [see comments]. *Nature* 373, 311-317.
- 234 Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y., and Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification [In Process Citation]. *J Biol Chem* 275, 13321-13329.
- 235 Murata, J., Tada, M., Iggo, R.D., Sawamura, Y., Shinohe, Y., and Abe, H. (1997). Nitric oxide as a carcinogen: analysis by yeast functional assay of inactivating p53 mutations induced by nitric oxide. *Mutat Res* 379, 211-218.
- 236 Murohara, T., Horowitz, J.R., Silver, M., Tsurumi, Y., Chen, D., Sullivan, A., and Isner, J.M. (1998). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97, 99-107.
- 237 Murphy, M., Hinman, A., and Levine, A.J. (1996). Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein. *Genes Dev.* 10, 2971-2980.

- 238 Murphy, M.P. (1999). Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys Acta* 1411, 401-414.
- 239 Nathan, C. and Xie, Q.W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269, 13725-13728.
- 240 Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C.L., Penman, B.W., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3030-3034.
- 241 Niculescu, A.B., III, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S.I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1998 Mar;18(3):1763]. *Mol Cell Biol* 18, 629-643.
- 242 North, S. and Hainaut, P. (2000). p53 and cell-cycle control: a finger in every pie. *Pathol Biol (Paris)* 48, 255-270.
- 243 Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schlitz, R.L., Howard, T., Yang, X.J., Howard, B.H., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex [see comments]. *Cell* 94, 35-44.
- 244 Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- 245 Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I., and Bartsch, H. (1990). Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem. Toxicol* 28, 647-652.
- 246 Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., and Gilibert, I. (1998). Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radic. Biol Med* 25, 1057-1065.
- 247 Ohshima, H., Gilibert, I., Bianchini, F. (1999). Induction of DNA strand breakage and base oxidation by nitroxyl anion through hydroxyl radical production. *Free Radic. Biol Med* 26, 1305-1313.
- 248 Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. and Taya, Y. (2000). P53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser 46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-862.
- 249 Oikawa, S. and Kawanishi, S. (1996). Site-specific DNA damage induced by NADH in the presence of copper(II): role of active oxygen species. *Biochemistry* 35, 4584-4590.

- 250 Oka,A., Belliveau,M.J., Rosenberg,P.A., and Volpe,J.J. (1993). Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *J Neurosci.* *13*, 1441-1453.
- 251 Okorokov,A.L., Ponchel,F., and Milner,J. (1997). Induced N- and C-terminal cleavage of p53: a core fragment of p53, generated by interaction with damaged DNA, promotes cleavage of the N- terminus of full-length p53, whereas ssDNA induces C-terminal cleavage of p53. *EMBO J* *16*, 6008-6017.
- 252 Ollmann,M., Young,L.M., Di Como,C.J., Karim,F., Belvin,M., Robertson,S., Whittaker,K., Demsky,M., Fisher,W.W., Buchman,A., Duyk,G., Friedman,L., Prives,C., and Kopczynski,C. (2000). Drosophila p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell* *101*, 91-101.
- 253 Oren,M. (1992). p53: the ultimate tumor suppressor gene? *FASEB J* *6*, 3169-3176.
- 254 Oren,M. (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* *274*, 36031-36034.
- 255 Osada,M., Ohba,M., Kawahara,C., Ishioka,C., Kanamaru,R., Katoh,I., Ikawa,Y., Nimura,Y., Nakagawara,A., Obinata,M., and Ikawa,S. (1998). Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53 [see comments] [published erratum appears in *Nat Med* 1998 Sep;4(9):982]. *Nat Med* *4*, 839-843.
- 256 Owen-Schaub,L.B., Zhang,W., Cusack,J.C., Angelo,L.S., Santee,S.M., Fujiwara,T., Roth,J.A., Deisseroth,A.B., Zhang,W.W., and Kruzel,E. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* *15*, 3032-3040.
- 257 Parks,D., Bolinger,R., and Mann,K. (1997). Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucleic Acids Res* *25*, 1289-1295.
- 258 Pfeiffer,S. and Mayer,B. (1998). Lack of tyrosine nitration by peroxynitrite generated at physiological pH. *J Biol Chem* *273*, 27280-27285.
- 259 Pfeiffer,S., Schmidt,K., and Mayer,B. (2000). Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite. Implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide in vivo. *J Biol Chem* *275*, 6346-6352.
- 260 Pisani,P., Parkin,D.M., Munoz,N., and Ferlay,J. (1997). Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *6*, 387-400.

- 261 Polyak,K., Xia,Y., Zweier,J.L., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1997). A model for p53-induced apoptosis [see comments]. *Nature* 389, 300-305.
- 262 Prisco,M., Hongo,A., Rizzo,M.G., Sacchi,A., and Baserga,R. (1997). The insulin-like growth factor I receptor as a physiologically relevant target of p53 in apoptosis caused by interleukin-3 withdrawal. *Mol Cell Biol* 17, 1084-1092.
- 263 Pryor,W.A. and Squadrito,G.L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide [see comments]. *Am J Physiol* 268, L699-L722.
- 264 Rachmilewitz,D., Stampler,J.S., Bachwich,D., Karmeli,F., Ackerman,Z., and Podolsky,D.K. (1995). Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 36, 718-723.
- 265 Radi,R. (1996). Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem Res Toxicol* 9, 828-835.
- 266 Radi,R., Beckman,J.S., Bush,K.M., and Freeman,B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266, 4244-4250.
- 267 Rainwater,R., Parks,D., Anderson,M.E., Tegtmeyer,P., and Mann,K. (1995). Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol Cell Biol* 15, 3892-3903.
- 268 Rajah,R., Valentinis,B., and Cohen,P. (1997). Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 272, 12181-12188.
- 269 Raman,C.S., Li,H., Martasek,P., Kral,V., Masters,B.S., and Poulos,T.L. (1998). Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 95, 939-950.
- 270 Rathmell,W.K., Kaufmann,W.K., Hurt,J.C., Byrd,L.L., and Chu,G. (1997). DNA-dependent protein kinase is not required for accumulation of p53 or cell cycle arrest after DNA damage. *Cancer Res* 57, 68-74.
- 271 Reed,J.C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236.
- 272 Reed,M., Woelker,B., Wang,P., Wang,Y., Anderson,M.E., and Tegtmeyer,P. (1995). The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9455-9459.
- 273 Reif,D.W. and Simmons,R.D. (1990). Nitric oxide mediates iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys* 283, 537-541.

- 274 Riethmuller,C., Gorren,A.C, Pitters,E., Hemmens,B., Habisch,H.J., Heales,S., Schmidt,K., Werner,R., Mayer,B. (1999). Activation of neuronal nitric-oxide synthase by the 5-methyl analog of tetrahydrobiopterin, functional evidence against reductive oxygen activation by the pterin cofactor. *J. Biol Chem* 274, 16047-16051.
- 275 Roberts,E.S., Lin,H., Crowley,J.R., Vuletich,J.L., Osawa,Y., and Hollenberg,P.F. (1998). Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine and inactivation of the catalytic activity of cytochrome P450 2B1. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1067-1074.
- 276 Rodriguez,M.S., Desterro,J.M., Lain,S., Midgley,C.A., Lane,D.P., and Hay,R.T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* 18, 6455-6461.
- 277 Rossig,L., Fichtlscherer,B., Breitschopf,K., Haendeler,J., Zeiher,A.M., Mulsch,A., and Dimmeler,S. (1999). Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol. Chem.* 274, 6823-6826.
- 278 Rouault,J.P., Falette,N., Guehenneux,F., Guillot,C., Rimokh,R., Wang,Q., Berthet,C., Moyret-Lalle,C., Savatier,P., Pain,B., Shaw,P., Berger,R., Samarut,J., Magaud,J.P., Ozturk,M., Samarut,C., and Puisieux,A. (1996). Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat Genet* 14, 482-486.
- 279 Routledge,M.N., Wink,D.A., Keefer,L.K., and Dipple,A. (1994). DNA sequence changes induced by two nitric oxide donor drugs in the supF assay. *Chem Res Toxicol* 7, 628-632.
- 280 Rubbo,H., Radi,R., Trujillo,M., Telleri,R., Kalyanaraman,B., Barnes,S., Kirk,M., and Freeman,B.A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 269, 26066-26075.
- 281 Sakaguchi,A.A., Miura,S., Takeuchi,T., Hokari,R., Mizumori,M., Yoshida,H., Higuchi,H., Mori,M., Kimura,H., Suzuki,H., and Ishii,H. (1999). Increased expression of inducible nitric oxide synthase and peroxynitrite in *Helicobacter pylori* gastric ulcer. *Free Radic. Biol Med* 27, 781-789.
- 282 Sakaguchi,K., Herrera,J.E., Saito,S., Miki,T., Bustin,M., Vassilev,A., Anderson,C.W., and Appella,E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev.* 12, 2831-2841.
- 283 Sakaguchi,K., Saito,S., Higashimoto,Y., Roy,S., Anderson,C.W., and Appella,E. (2000). Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem* 275, 9278-9283.

- 284 Sakaguchi,K., Sakamoto,H., Lewis,M.S., Anderson,C.W., Erickson,J.W., Appella,E., and Xie,D. (1997). Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* 36, 10117-10124.
- 285 Sakurai,A., Hara,S., Okano,N., Kondo,Y., Inoue,J., and Imura,N. (1999). Regulatory role of metallothionein in NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 455, 55-58.
- 286 Salvucci,O., Kolb,J.P.,Dugas,B., Dugas,N., Chouaib,S. (1998). The induction of nitric oxide by interleukin-12 and tumor necrosis factor- α in human natural killer cells :relationship with the regulation of lytic activity 92, 2093-2102.
- 287 Sampson,J.B., Ye,Y., Rosen,H., and Beckman,J.S. (1998). Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 356, 207-213.
- 288 Sandau,K., Pfeilschifter,J., and Brune,B. (1997). Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int* 52, 378-386.
- 289 Sandri,M.I., Isaacs,R.J., Ongkeko,W.M., Harris,A.L., Hickson,I.D., Broggin,M., and Vikhanskaya,F. (1996). p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase IIalpha gene. *Nucleic Acids Res* 24, 4464-4470.
- 290 Scaffidi,C., Schmitz,I., Zha,J., Korsmeyer,S.J., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem.* 274, 22532-22538.
- 291 Schmale,H. and Bamberger,C. (1997). A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* 15, 1363-1367.
- 292 Schmidt,H.H., Hofmann,H., Schindler,U., Shutenko,Z.S., Cunningham,D.D., and Feelisch,M. (1996). No .NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14492-14497.
- 293 Schwartz,K.A., Lanciloti,N.J., Moore,M.K., Campione,A.L., and Chandar,N. (1999). p53 transactivity during in vitro osteoblast differentiation in a rat osteosarcoma cell line. *Mol Carcinog.* 25, 132-138.
- 294 Scolnick,D.M., Chehab,N.H., Stavridi,E.S., Lien,M.C., Caruso,L., Moran,E., Berger,S.L., and Halazonetis,T.D. (1997). CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 57, 3693-3696.
- 295 Senoo,M., Seki,N., Ohira,M., Sugano,S., Watanabe,M., Inuzuka,S., Okamoto,T., Tachibana,M., Tanaka,T., Shinkai,Y., and Kato,H. (1998). A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73 [published

erratum appears in *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Sep 18;250(2):536].
Biochem Biophys Res Commun 248, 603-607.

- 296 Sharpe, M.A. and Cooper, C.E. (1998). Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem J* 332 (Pt 1), 9-19.
- 297 Shatrov, V.A., Ameyar, M., Bouquet, C., Cai, Z., Stancou, R., Haddada, H., and Chouaib, S. (2000). Adenovirus-mediated wild-type-p53-gene expression sensitizes TNF-resistant tumor cells to TNF-induced cytotoxicity by altering the cellular redox state. *Int J Cancer* 85, 93-97.
- 298 Shaulian, E., Zauberman, A., Ginsberg, D., and Oren, M. (1992). Identification of a minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* 12, 5581-5592.
- 299 Shaulian, E., Zauberman, A., Milner, J., Davies, E.A., and Oren, M. (1993). Tight DNA binding and oligomerization are dispensable for the ability of p53 to transactivate target genes and suppress transformation. *EMBO J* 12, 2789-2797.
- 300 Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 10, 6565-6577.
- 301 Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., and Iggo, R. (1996). Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 12, 921-930.
- 302 Sheikh, M.S. and Fornace, A.J., Jr. (2000). Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 182, 171-181.
- 303 Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites [published erratum appears in *Genes Dev* 2000 Mar 15;14(6):750]. *Genes Dev.* 14, 289-300.
- 304 Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.
- 305 Shieh, S.Y., Taya, Y., and Prives, C. (1999). DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J* 18, 1815-1823.

- 306 Shivakumar,C.V., Brown,D.R., Deb,S., and Deb,S.P. (1995). Wild-type human p53 transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *Mol Cell Biol* 15, 6785-6793.
- 307 Siliciano,J.D., Canman,C.E., Taya,Y., Sakaguchi,K., Appella,E., and Kastan,M.B. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev.* 11, 3471-3481.
- 308 Singer,I.I., Kawka,D.W., Scott,S., Weidner,J.R., Mumford,R.A., Riehl,T.E., and Stenson,W.F. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111, 871-885.
- 309 Singh,R.J., Hogg,N., Joseph,J., and Kalyanaraman,B. (1996a). Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 271, 18596-18603.
- 310 Singh,S.P., Wishnok,J.S., Keshive,M., Deen,W.M., and Tannenbaum,S.R. (1996b). The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14428-14433.
- 311 Sionov,R.V. and Haupt,Y. (1999). The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18, 6145-6157.
- 312 Smith,J.N. and Dasgupta,T.P. (2000a). Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by l-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide [In Process Citation]. *Nitric. Oxide.* 4, 57-66.
- 313 Smith,J.N. and Dasgupta,T.P. (2000b). Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by l-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide [In Process Citation]. *Nitric. Oxide.* 4, 57-66.
- 314 Smith,M.L., Chen,I.T., Zhan,Q., Bae,I., Chen,C.Y., Gilmer,T.M., Kastan,M.B., O'Connor,P.M., and Fornace,A.J., Jr. (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266, 1376-1380.
- 315 Souici,A.C., Mirkovitch,J., Hausel,P., Keefer,K., and Felley-Bosco,E. (2000). Transition mutation in codon 248 of the p53 tumor suppressor gene induced by reactive oxygen species and a nitric oxide-releasing compound. *Carcinogenesis* 21, 281-287.
- 316 Soussi,T. and May,P. (1996). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol* 260, 623-637.

- 317 Souza, J.M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C.S., and Ischiropoulos, H. (1999a). Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* 371, 169-178.
- 318 Souza, J.M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C.S., and Ischiropoulos, H. (1999b). Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* 371, 169-178.
- 319 Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1, 949-957.
- 320 Stamler, J.S., Singel, D.J., and Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms [see comments]. *Science* 258, 1898-1902.
- 321 Steinman, R.A., Hoffman, B., Iro, A., Guillouf, C., Liebermann, D.A., and el Houseini, M.E. (1994). Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 9, 3389-3396.
- 322 Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* 18, 1660-1672.
- 323 Stuehr, D.J. and Nathan, C.F. (1989). Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169, 1543-1555.
- 324 Subbaramaiah, K., Altorki, N., Chung, W.J., Mestre, J.R., Sampat, A., and Dannenberg, A.J. (1999). Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 274, 10911-10915.
- 325 Subler, M.A., Martin, D.W., and Deb, S. (1992). Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J Virol* 66, 4757-4762.
- 326 Subler, M.A., Martin, D.W., and Deb, S. (1994). Overlapping domains on the p53 protein regulate its transcriptional activation and repression functions. *Oncogene* 9, 1351-1359.
- 327 Szabo, C. and Ohshima, H. (1997). DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric. Oxide.* 1, 373-385.
- 328 Szabo, C., Zingarelli, B., O'Connor, M., and Salzman, A.L. (1996). DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1753-1758.

- 329 Takenaka,I., Morin,F., Seizinger,B.R., and Kley,N. (1995). Regulation of the sequence-specific DNA binding function of p53 by protein kinase C and protein phosphatases. *J Biol Chem* 270, 5405-5411.
- 330 Tamir,S., Burney,S., and Tannenbaum,S.R. (1996). DNA damage by nitric oxide. *Chem Res Toxicol* 9, 821-827.
- 331 Tan,M., Li,S., Swaroop,M., Guan,K., Oberley,L.W., and Sun,Y. (1999). Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J Biol Chem* 274, 12061-12066.
- 332 Tanaka,H., Arakawa,H., Yamaguchi,T., Shiraishi,K., Fukuda,S., Matsui,K., Takei,Y., and Nakamura,Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage [see comments]. *Nature* 404, 42-49.
- 333 ter Steege,J., Buurman,W., Arends,J.W., and Forget,P. (1997). Presence of inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, CD68, and CD14 in the small intestine in celiac disease. *Lab Invest* 77, 29-36.
- 334 Thomsen,L.L. and Miles,D.W. (1998). Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev* 17, 107-118.
- 335 Thut,C.J., Chen,J.L., Klemm,R., and Tjian,R. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267, 100-104.
- 336 Tibbetts,R.S., Brumbaugh,K.M., Williams,J.M., Sarkaria,J.N., Cliby,W.A., Shieh,S.Y., Taya,Y., Prives,C., and Abraham,R.T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 13, 152-157.
- 337 Tschugguel,W., Schneeberger,C., Unfried,G., Czerwenka,K., Weninger,W., Mildner,M., Gruber,D.M., Sator,M.O., Waldhor,T., and Huber,J.C. (1999). Expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer depends on tumor grade. *Breast Cancer Res Treat* 56, 145-151.
- 338 Ueno,M., Masutani,H., Arai,R.J., Yamauchi,A., Hirota,K., Sakai,T., Inamoto,T., Yamaoka,Y., Yodoi,J., and Nikaido,T. (1999). Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 274, 35809-35815.
- 339 Uiterkamp,A.J. and Mason,H.S. (1973). Magnetic dipole-dipole coupled Cu(II) pairs in nitric oxide-treated tyrosinase: a structural relationship between the active sites of tyrosinase and hemocyanin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 993-996.

- 340 Umansky, V., Ushmorov, A., Ratter, F., Chlichlia, K., Bucur, M., Lichtenauer, A., and Rocha, M. (2000). Nitric oxide-mediated apoptosis in human breast cancer cells requires changes in mitochondrial functions and is independent of CD95 (APO-1/Fas). *Int J Oncol* 16, 109-117.
- 341 Unger, T., Nau, M.M., Segal, S., and Minna, J.D. (1992). p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *EMBO J* 11, 1383-1390.
- 342 Uppu, R.M., Squadrito, G.L., and Pryor, W.A. (1996). Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys* 327, 335-343.
- 343 Van der Veen, R.C., Dietlen, T.A., Pen, L., Gray, J.D. (1999). Nitric oxide inhibits the proliferation of T helper 1 and 2 lymphocytes without reduction in cytokine secretion. *Cell Immunol* 193, 194-201.
- 344 Van der Veen, R.C., Dietlen, T.A., Gray, J.D., Gilmore, W. (2000). Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. *Cell Immunol* 199, 43-49.
- 345 Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., O'Neill, C.A., Halliwell, B., and Cross, C.E. (1995). Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch Biochem Biophys* 319, 341-349.
- 346 Van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Halliwell, B., Cross, C.E., and Kaur, H. (1994). Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. Evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite. *FEBS Lett* 339, 89-92.
- 347 Van Etten, R.A. (1999). Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* 9, 179-186.
- 348 Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L., and Debussche, L. (1998). The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J* 17, 4668-4679.
- 349 Verhaegh, G.W., Richard, M.J., and Hainaut, P. (1997). Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper. *Mol Cell Biol* 17, 5699-5706.
- 350 Voehringer, D.W. (1999). BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic. Biol Med* 27, 945-950.

- 351 Waga,S., Hannon,G.J., Beach,D., and Stillman,B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-578.
- 352 Walker,K.K. and Levine,A.J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15335-15340.
- 353 Walker,L.J., Robson,C.N., Black,E., Gillespie,D., and Hickson,I.D. (1993). Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. *Mol Cell Biol* 13, 5370-5376.
- 354 Wang,Q., Zambetti,G.P., and Suttle,D.P. (1997). Inhibition of DNA topoisomerase II alpha gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 17, 389-397.
- 355 Wang,X.W., Zhan,Q., Coursen,J.D., Khan,M.A., Kontny,H.U., Yu,L., Hollander,M.C., O'Connor,P.M., Fornace,A.J., Jr., and Harris,C.C. (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3706-3711.
- 356 Wang,Y., Reed,M., Wang,P., Stenger,J.E., Mayr,G., Anderson,M.E., Schwedes,J.F., and Tegtmeyer,P. (1993). p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev.* 7, 2575-2586.
- 357 Waterman,J.L., Shenk,J.L., and Halazonetis,T.D. (1995). The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *EMBO J* 14, 512-519.
- 358 Waterman,M.J., Stavridi,E.S., Waterman,J.L., and Halazonetis,T.D. (1998). ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* 19, 175-178.
- 359 Weinberg,R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- 360 Wever,R., Leeuwen,F.v., and Gelder,B.v. (1973). The reaction of nitric oxide with ceruloplasmin. *Biochim. Biophys Acta* 302, 236-239.
- 361 White,E. and Prives,C. (1999). DNA damage enables p73 [news; comment]. *Nature* 399, 734-5, 737.
- 362 Wink. Formation and detection of nitroxyl and nitrous oxide. Feelisch, M. *Methods in Nitric Oxide Research.* 403-412. 1996.

- 363 Wink,D.A., Cook,J.A., Kim,S.Y., Vodovotz,Y., Pacelli,R., Krishna,M.C., Russo,A., Mitchell,J.B., Jourd'heuil,D., Miles,A.M., and Grisham,M.B. (1997). Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* 272, 11147-11151.
- 364 Wink,D.A., Cook,J.A., Pacelli,R., DeGraff,W., Gamson,J., Liebmann,J., Krishna,M.C., and Mitchell,J.B. (1996). The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys* 331, 241-248.
- 365 Wink,D.A., Kasprzak,K.S., Maragos,C.M., Elespuru,R.K., Misra,M., Dunams,T.M., Cebula,T.A., Koch,W.H., Andrews,A.W., and Allen,J.S. (1991). DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254, 1001-1003.
- 366 Wink,D.A. and Laval,J. (1994). The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 15, 2125-2129.
- 367 Wink,D.A., Vodovotz,Y., Laval,J., Laval,F., Dewhirst,M.W., and Mitchell,J.B. (1998). The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 19, 711-721.
- 368 Wizemann,T.M., Gardner,C.R., Laskin,J.D., Quinones,S., Durham,S.K., Goller,N.L., Ohnishi,S.T., and Laskin,D.L. (1994). Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. *J Leukoc. Biol* 56, 759-768.
- 369 Wong,P.S., Hyun,J., Fukuto,J.M., Shirota,F.N., DeMaster,E.G., Shoeman,D.W., and Nagasawa,H.T. (1998). Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry. *Biochemistry* 37, 5362-5371.
- 370 Woo,R.A., McLure,K.G., Lees-Miller,S.P., Rancourt,D.E., and Lee,P.W. (1998). DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* 394, 700-704.
- 371 Wu,G.S., Burns,T.F., McDonald,E.R., III, Meng,R.D., Kao,G., Muschel,R., Yen,T., and el Deiry,W.S. (1999). Induction of the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis but not growth arrest [In Process Citation]. *Oncogene* 18, 6411-6418.
- 372 Wu,H.M., Huang,Q., Yuan,Y., and Granger,H.J. (1996). VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am J Physiol* 271, H2735-H2739.

- 373 Wu,X., Bayle,J.H., Olson,D., and Levine,A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7, 1126-1132.
- 374 Wu,X. and Levine,A.J. (1994). p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3602-3606.
- 375 Xanthoudakis,S., Miao,G.G., and Curran,T. (1994). The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 23-27.
- 376 Xie,K., Huang,S., Dong,Z., Gutman,M., and Fidler,I.J. (1995). Direct correlation between expression of endogenous inducible nitric oxide synthase and regression of M5076 reticulum cell sarcoma hepatic metastases in mice treated with liposomes containing lipopeptide CGP 31362. *Cancer Res* 55, 3123-3131.
- 377 Xie,Q.W., Kashiwabara,Y., and Nathan,C. (1994). Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269, 4705-4708.
- 378 Xiong,Y., Hannon,G.J., Zhang,H., Casso,D., Kobayashi,R., and Beach,D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [see comments]. *Nature* 366, 701-704.
- 378 Yamakura,F., Taka,H., Fujimura,T., and Murayama,K. (1998). Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J. Biol. Chem.* 273, 14085-14089.
- 379 Yang,A., Schweitzer,R., Sun,D., Kaghad,M., Walker,N., Bronson,R.T., Tabin,C., Sharpe,A., Caput,D., Crum,C., and McKeon,F. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398, 714-718.
- 380 Ye,Y.Z., Strong,M., Huang,Z.Q., and Beckman,J.S. (1996). Antibodies that recognize nitrotyrosine. *Methods Enzymol.* 269, 201-209.
- 381 Yermilov,V., Rubio,J., Becchi,M., Friesen,M.D., Pignatelli,B., and Ohshima,H. (1995a). Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis* 16, 2045-2050.
- 382 Yermilov,V., Rubio,J., and Ohshima,H. (1995b). Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett* 376, 207-210.
- 383 Yoshie,Y. and Ohshima,H. (1997b). Nitric oxide synergistically enhances DNA strand breakage induced by polyhydroxyaromatic compounds, but

- inhibits that induced by the Fenton reaction. *Arch Biochem Biophys* 342, 13-21.
- 384 Yoshie, Y. and Ohshima, H. (1997a). Synergistic induction of DNA strand breakage caused by nitric oxide together with catecholamine: implications for neurodegenerative disease. *Chem Res Toxicol* 10, 1015-1022.
- 385 Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W., and Schreiber, S.L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 76, 933-945.
- 386 Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Rago, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1999). Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 96, 14517-14522.
- 387 Yuan, Z.M., Huang, Y., Fan, M.M., Sawyers, C., Kharbanda, S., and Kufe, D. (1996a). Genotoxic drugs induce interaction of the c-Abl tyrosine kinase and the tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem* 271, 26457-26460.
- 388 Yuan, Z.M., Huang, Y., Whang, Y., Sawyers, C., Weichselbaum, R., Kharbanda, S., and Kufe, D. (1996b). Role for c-Abl tyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage. *Nature* 382, 272-274.
- 389 Yuan, Z.M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y.Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1999). p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage [published erratum appears in *Nature* 1999 Aug 19;400(6746):792]. *Nature* 399, 814-817.
- 390 Yun, J., Chae, H.D., Choy, H.E., Chung, J., Yoo, H.S., Han, M.H., and Shin, D.Y. (1999). p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor. *J Biol Chem* 274, 29677-29682.
- 391 Zeng, X., Chen, L., Jost, C.A., Maya, R., Keller, D., Wang, X., Kaelin, W.G., Jr., Oren, M., Chen, J., and Lu, H. (1999). MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol* 19, 3257-3266.
- 392 Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C., and Fornace, A.J., Jr. (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18, 2892-2900.
- 393 Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Zhang, H., Bi, D., Weber, B.L., and el Deiry, W.S. (1998). BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* 16, 1713-1721.

- 394 Zhang, Y., Fujita, N., and Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 18, 1131-1138.
- 395 Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W.H., Tom, E., Mack, D.H., and Levine, A.J. (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* 14, 981-993.
- 396 Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H.T., Donnini, S., Granger, H.J., and Bicknell, R. (1997). Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99, 2625-2634.
- 397 Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997b). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 [see comments]. *Cell* 90, 405-413.
- 398 Zou, M., Martin, C., and Ullrich, V. (1997a). Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol. Chem.* 378, 707-713.

Modifications of p53 protein and induction of apoptosis by NO and its derivatives: mechanisms of reactions and implication in carcinogenesis.

ABSTRACT

The aim of this study is to better understand the role of nitric oxide (NO \cdot) and its derivatives in carcinogenesis. In the first part of this work, we have shown that a treatment by a NO donor, S-nitrosoglutathione (GSNO), induced an accumulation of the tumor suppressor p53 protein but inhibited its DNA binding activity and its anti-proliferative function. We have hypothesized that this alteration of p53 could be due to modification(s) of p53 protein by NO \cdot and its derivatives. We found that NO \cdot (and/or its derivatives) reacted with p53 protein to form nitrotyrosine residues. We have also observed that 1mM GSNO induced apoptosis that was well correlated with the accumulation of the pro-apoptotic protein Bax, one of the target genes of p53. Nevertheless, we have also demonstrated that Bax could accumulate by a p53 independent pathway. Thus, partial inactivation of p53 through overproduction of NO \cdot could occur in inflamed tissues, playing an important role in cell death control and tumor development.

In the second part of this work, our purpose was to determine chemical reactions that could occur between some reactive species produced during the inflammatory process. We have found that, *in vitro*, the reaction between nitroxyl anion (NO \cdot^-) and H $_2$ O $_2$, in the presence of metal transition ions, induced the formation of 8-oxo-deoxyguanosine and of malondialdehyde from deoxyribose that was inhibited by radical hydroxyl chelators. We proposed that NO \cdot^- behaved as a reductor agent to form hydroxyl radical in the presence of H $_2$ O $_2$ and ions metallic transition ions. Formation of 8-oxo-deoxyguanosine was also found in MCF-7 cells exposed to NO \cdot^- /H $_2$ O $_2$ and NO \cdot^- /H $_2$ O $_2$. Furthermore, these compounds induced rapidly apoptosis, which could be inhibited by the iron chelator deferoxamine, demonstrating the importance of transition metallic ions for the toxicity of NO \cdot^- /H $_2$ O $_2$ and NO \cdot^- /H $_2$ O $_2$.

KEY WORDS

Carcinogenesis, p53, apoptosis, inflammation, nitric oxide, nitroxyl anion.

Modifications de la protéine p53 et induction de l'apoptose par le NO et ses dérivés: mécanismes réactionnels et implication dans la cancérogenèse.

RESUME

Le but de cette étude est de mieux comprendre le rôle du monoxyde d'azote (NO[•]) et de ses dérivés dans la cancérogenèse. Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence qu'un traitement par un donneur de NO[•], le S-nitrosoglutathion (GSNO) induit l'accumulation de la protéine p53 mais inhibe son activité de liaison spécifique à l'ADN et sa fonction anti-proliférative. Nous avons fait l'hypothèse que cette altération de p53 pourrait être due à des modifications de la protéine provoquées par le NO[•] et ses dérivés. Nous avons montré que le NO réagit avec la protéine p53 pour former des résidus nitrotyrosines. Nous avons également observé la mort par apoptose de cellules humaines mammaires tumorales (MCF-7) traitées par 1mM de GSNO, ce qui est corrélé avec l'accumulation de la protéine pro-apoptotique Bax, un des gènes cibles de p53. Nous avons cependant montré que Bax peut s'accumuler de façon indépendante de p53 après exposition à du NO[•]. Une sur-production de NO[•] dans les tissus inflammés, pourrait donc provoquer une inactivation partielle de p53, ce qui jouerait un rôle important dans le développement d'un cancer et le contrôle de la mort cellulaire.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié les réactions chimiques qu'il peut se produire entre différentes espèces produites lors de l'inflammation. Nous avons montré, *in vitro*, que la réaction entre l'anion nitroxyle (NO⁻) et H₂O₂, en présence d'ions métalliques de transition, forme de la 8-oxo-déoxyguanosine et produit du malondialdéhyde à partir de déoxyribose, ce qui est inhibé par des chélateurs du radical hydroxyle. Nous proposons donc que le NO⁻ se comporte comme un agent réducteur pour former le radical hydroxyle en présence de H₂O₂ et d'ions métalliques de transition. La formation de 8-oxo-déoxyguanosine a été mise en évidence sur l'ADN de cellules MCF-7 exposées aux mélanges NO⁻/H₂O₂ et NO[•]/H₂O₂. De plus, ces deux mélanges induisent rapidement une apoptose qui peut être inhibée par un chélateur du Fer, la déféroxamine, ce qui montre l'importance d'ions métalliques de transition pour la toxicité exercée par NO⁻/H₂O₂ et NO[•]/H₂O₂.

MOTS CLES

Cancérogenèse, p53, apoptose, inflammation, monoxyde d'azote, anion nitroxyle.

Discipline: biologie

Unité des facteurs de risques endogènes de cancer
Centre International de Recherche sur le Cancer, Lyon.

Modifications of p53 protein and induction of apoptosis by NO and its derivatives: mechanisms of reactions and implication in carcinogenesis.

ABSTRACT

The aim of this study is to better understand the role of nitric oxide (NO \cdot) and its derivatives in carcinogenesis. In the first part of this work, we have shown that a treatment by a NO donor, S-nitrosoglutathione (GSNO), induced an accumulation of the tumor suppressor p53 protein but inhibited its DNA binding activity and its anti-proliferative function. We have hypothesized that this alteration of p53 could be due to modification(s) of p53 protein by NO \cdot and its derivatives. We found that NO \cdot (and/or its derivatives) reacted with p53 protein to form nitrotyrosine residues. We have also observed that 1mM GSNO induced apoptosis that was well correlated with the accumulation of the pro-apoptotic protein Bax, one of the target genes of p53. Nevertheless, we have also demonstrated that Bax could accumulate by a p53 independent pathway. Thus, partial inactivation of p53 through overproduction of NO \cdot could occur in inflamed tissues, playing an important role in cell death control and tumor development.

In the second part of this work, our purpose was to determine chemical reactions that could occur between some reactive species produced during the inflammatory process. We have found that, *in vitro*, the reaction between nitroxyl anion (NO \cdot^-) and H $_2$ O $_2$, in the presence of metal transition ions, induced the formation of 8-oxo-deoxyguanosine and of malondialdehyde from deoxyribose that was inhibited by radical hydroxyl chelators. We proposed that NO \cdot^- behaved as a reductor agent to form hydroxyl radical in the presence of H $_2$ O $_2$ and ions metallic transition ions. Formation of 8-oxo-deoxyguanosine was also found in MCF-7 cells exposed to NO \cdot^- /H $_2$ O $_2$ and NO \cdot^- /H $_2$ O $_2$. Furthermore, these compounds induced rapidly apoptosis, which could be inhibited by the iron chelator deferoxamine, demonstrating the importance of transition metallic ions for the toxicity of NO \cdot^- /H $_2$ O $_2$ and NO \cdot^- /H $_2$ O $_2$.

KEY WORDS

Carcinogenesis, p53, apoptosis, inflammation, nitric oxide, nitroxyl anion.

Modifications de la protéine p53 et induction de l'apoptose par le NO et ses dérivés: mécanismes réactionnels et implication dans la cancérogenèse.

RESUME

Le but de cette étude est de mieux comprendre le rôle du monoxyde d'azote (NO^\cdot) et de ses dérivés dans la cancérogenèse. Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence qu'un traitement par un donneur de NO^\cdot , le S-nitrosoglutathion (GSNO) induit l'accumulation de la protéine p53 mais inhibe son activité de liaison spécifique à l'ADN et sa fonction anti-proliférative. Nous avons fait l'hypothèse que cette altération de p53 pourrait être due à des modifications de la protéine provoquées par le NO^\cdot et ses dérivés. Nous avons montré que le NO^\cdot réagit avec la protéine p53 pour former des résidus nitrotyrosines. Nous avons également observé la mort par apoptose de cellules humaines mammaires tumorales (MCF-7) traitées par 1mM de GSNO, ce qui est corrélé avec l'accumulation de la protéine pro-apoptotique Bax, un des gènes cibles de p53. Nous avons cependant montré que Bax peut s'accumuler de façon indépendante de p53 après exposition à du NO^\cdot . Une sur-production de NO^\cdot dans les tissus inflammés, pourrait donc provoquer une inactivation partielle de p53, ce qui jouerait un rôle important dans le développement d'un cancer et le contrôle de la mort cellulaire.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié les réactions chimiques qu'il peut se produire entre différentes espèces produites lors de l'inflammation. Nous avons montré, *in vitro*, que la réaction entre l'anion nitroxyle (NO^\cdot) et H_2O_2 , en présence d'ions métalliques de transition, forme de la 8-oxo-déoxyguanosine et produit du malondialdéhyde à partir de déoxyribose, ce qui est inhibé par des chélateurs du radical hydroxyle. Nous proposons donc que le NO^\cdot se comporte comme un agent réducteur pour former le radical hydroxyle en présence de H_2O_2 et d'ions métalliques de transition. La formation de 8-oxo-déoxyguanosine a été mise en évidence sur l'ADN de cellules MCF-7 exposées aux mélanges $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$ et $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$. De plus, ces deux mélanges induisent rapidement une apoptose qui peut être inhibée par un chélateur du Fer, la déféroxamine, ce qui montre l'importance d'ions métalliques de transition pour la toxicité exercée par $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$ et $\text{NO}^\cdot/\text{H}_2\text{O}_2$.

MOTS CLES

Cancérogenèse, p53, apoptose, inflammation, monoxyde d'azote, anion nitroxyle.

Discipline: biologie

Unité des facteurs de risques endogènes de cancer
Centre International de Recherche sur le Cancer, Lyon.