



HAL
open science

Contrôle de l'homéostasie redox et détection des oxydants. Régulation du facteur de transcription Yap1 chez *S. cerevisiae*

Agnès Delaunay

► **To cite this version:**

Agnès Delaunay. Contrôle de l'homéostasie redox et détection des oxydants. Régulation du facteur de transcription Yap1 chez *S. cerevisiae*. Autre [q-bio.OT]. INAPG (AgroParisTech), 2002. Français. NNT: . tel-00005660

HAL Id: tel-00005660

<https://pastel.hal.science/tel-00005660>

Submitted on 5 Apr 2004

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.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Présentée et soutenue publiquement

Par

Agnès DELAUNAY

Le 13 Décembre 2002

**Contrôle de l'homéostasie redox et détection des oxydants.
Régulation du facteur de transcription Yap1 chez *S. cerevisiae*.**

Directeur de Thèse :
Dr Michel TOLEDANO

JURY

Pr Claude GAILLARDIN
Pr André-Patrick ARRIGO
Dr Myroslava MIGINIAC-MASLOW
Dr Olivier BENSUAUDE
Dr Michel TOLEDANO

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

« *Grâce à l'oxygène je respire, et sa rouille me détruit* »
Michel Serres, Hominiscence.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire du CEA à Saclay, grâce à la collaboration et au soutien de si nombreuses personnes que c'est un tâche délicate que de les remercier tous... Je tiens tout d'abord à remercier André Sentenac, de m'avoir accueillie dès mon DEA au sein de son service et de m'avoir soutenue tout au long de ma thèse. Je dois également avouer que quelques remarques de sa part m'ont permis de lutter contre ma tendance au rouge écarlate... Mes remerciements vont ensuite à Michel Toledano, qui, en directeur de thèse avisé, a su me guider à travers les méandres de la recherche. Nos discussions (souvent tardives) ont sans aucun doute développé mon esprit critique (et peut être de contradiction...). Elles m'ont également aidé à observer, apprendre et comprendre.

Je remercie sincèrement les membres de mon jury ; André-Patrick Arrigo et Miroslawa Miginiac Maslow d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et Olivier Bensaude d'avoir été mon examinateur. Je remercie tout particulièrement Claude Gaillardin, qui malgré un emploi du temps surchargé (et c'est un euphémisme !) a toujours su m'accorder son attention.

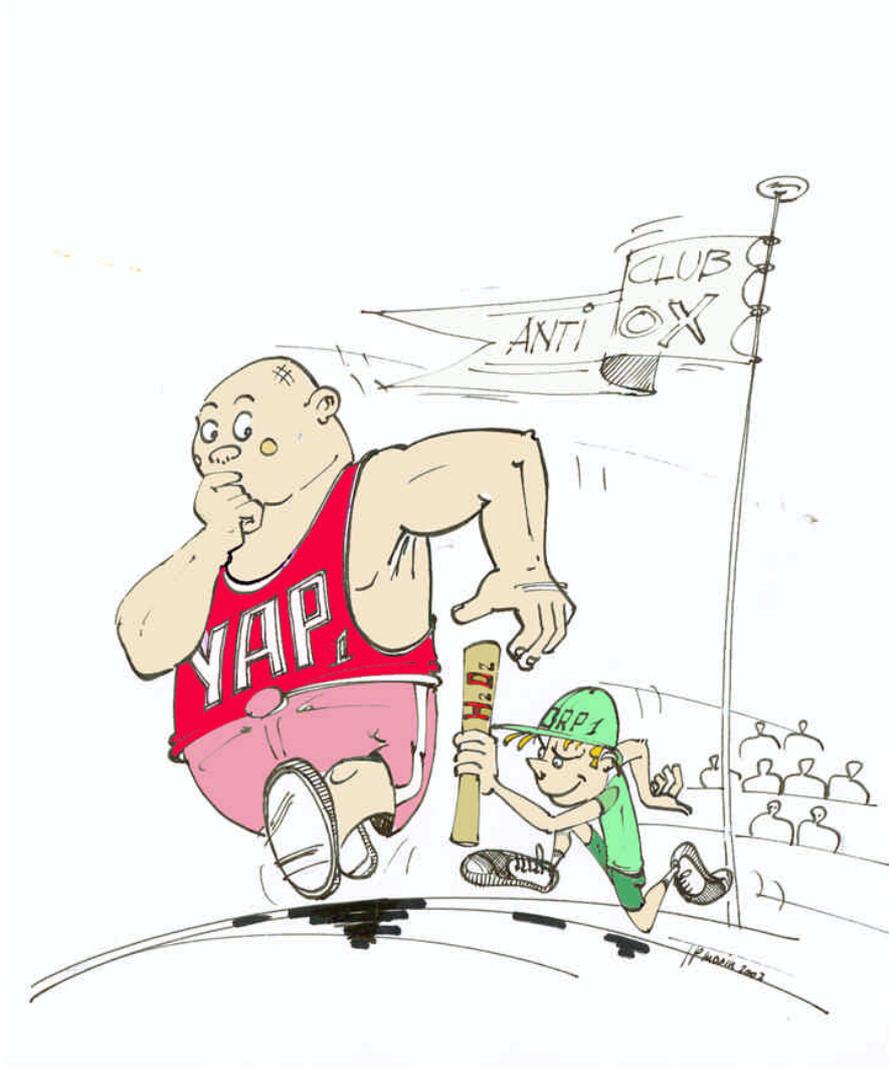
Ces remerciements ne vont pas sans mentionner les différents acteurs de mes deux vies. La première a débuté en 1998 dans l'enceinte du bâtiment 142. La première personne croisée, j'ai cité Manu, est aussi incontournable que le loup blanc des contes. Rien ne se passe sans lui et tout passe par lui. Merci donc, Manu, d'avoir su gérer mon indiscipline des débuts. A quelques mètres de là se trouve Lucette, figure emblématique du bâtiment 142, toujours là pour remonter le moral des troupes (et pour râler un peu quand même), le balais vengeur ! Mes trois premières années de thèse m'ont également permis de rencontrer un personnage aussi sympathique que singulier, j'ai nommé Dan (100 ;200 ;150, you know !). Dan, à qui je dois une désinhibition certaine à parler l'anglais. Il le fallait d'ailleurs pour participer à ses discussions tentaculaires. Ces remerciements me donnent maintenant une chance de lui faire lire le français ! Je ne peux pas parler de ma première vie sans avoir également une pensée pour Anne-Dominique, ma grande-soeur d'alors, et pour nos folles expériences de l'aube. Au grand jeu des chaises tournantes, elle a bientôt été remplacée à la paillasse par Benoît, dont j'apprécie encore aujourd'hui la bonne humeur, le bon humour et surtout la valeur scientifique. Je ne peux clore les remerciements des acteurs du bâtiment 142 sans citer Valérie Fénelon, qui a subi mon joug pendant un an et qui ne m'en tient pas rigueur mais également l'ensemble des membres du SBGM d'alors avec qui ce fut un plaisir de collaborer. Merci Jojo, Christophe, Jean-Marie, Rosalia, Magalie, Bibine, Hélène, Ivan, Khalil, Véronique, Paco, Jean-François, Antoine et tant d'autres....

Ma deuxième vie a débuté au cours d'un sombre mois de février poussiéreux, au cours duquel je ne cachais pas ma réticence à quitter le 142... Rejoindre le bâtiment 532 a cependant été l'occasion de nouvelles rencontres aussi enrichissantes que réjouissantes. Ainsi s'est formée l'équipe des « L-SOC's ». Alors, nous ont rejoints Bénédicte, collaboratrice dévouée, dont la gentillesse n'a d'égale que son efficacité, Frédérique, fidèle relectrice et « coach » de ma deuxième vie, Germain, premier dictionnaire à ouvrir en cas d'incertitude, Pascale, aux commandes du labo, Sophie, à la sécurité assermentée et aux conseils avisés et Stéphanie, dont la bonne et la mauvaise humeur tempère l'atmosphère surchauffée. Stéphane, dont l'aide me fut également précieuse, nous a rejoint par la suite. Puis ce fut le tour de Ludivine. Merci à tous d'avoir supporté mes plaintes (pas toujours justifiées) et mes interrogations avec une gentillesse constante.

Je tiens à dédier un paragraphe particulier à Dulce, avec qui j'aurais passé 2 ans et demi de ma thèse. Ces deux ans et demi doivent représenter plus de 6000 heures de copinage à la paillasse mais également 600 heures de discussions co-voituresques. C'est ainsi que la vie de laboratoire m'a donné une amie. Merci à toi, Dulce, d'avoir été là et bien plus que ça encore.

Alors que les hasards de la vie de laboratoire ont été l'occasion de nouvelles rencontres, les hasards de la vie ont aussi fait qu'une amie, Delphine, a contribué de façon décisive à l'avancée de mon travail. C'est ainsi qu'une simple soirée dans une crêperie s'est transformée en une collaboration fructueuse. Un grand merci à Delphine, mais aussi à Joëlle et à Valérie, pour toutes ces montées d'adrénaline autour du spectromètre de masse. Ces soirées trépidantes n'auraient pas été possibles sans leur disponibilité et leur gentillesse ; je les doit également à Christophe Créminon, à qui j'adresse un merci tout particulier pour avoir sceller le destin de la purification de Yap1 avec sa résine miraculeuse.

Enfin, je remercie de tout coeur ma famille et mes proches, et surtout mes parents, pour leur soutien, leur intérêt et même leur relecture ! Un énorme merci à Lionel, sans qui, je me serais si souvent laissée submerger, et dont les encouragements et le réconfort quotidien ont été sans pareil.



SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I. LES INTERMÉDIAIRES RÉACTIFS DE L'OXYGÈNE (IRO) 17

I. DÉFINITION DES IRO.....	17
A. <i>Le paradoxe des radicaux libres</i>	17
B. <i>Les productions d'O₂⁻, d'H₂O₂ et d'OH sont liées</i>	19
II. LA TOXICITÉ DES IRO EST FONCTION DE LEUR RÉACTIVITÉ.....	19
A. <i>Réactivité des IRO</i>	19
1) Le radical hydroxyle.....	19
2) Le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde.....	20
B. <i>La concentration des IRO doit être contrôlée</i>	21
1) Pourquoi les IRO sont-ils toxiques ?.....	21
2) Une homéostasie du peroxyde d'hydrogène ?.....	22

.CHAPITRE II. LA RÉPONSE ADAPTATIVE AUX IRO23

I. LE PHÉNOMÈNE D'ADAPTATION AUX IRO.....	23
A. <i>La capacité d'adaptation à un oxydant donné</i>	23
B. <i>Le phénomène d'adaptation croisée</i>	25
II. ETUDE GÉNOMIQUE DE L'ADAPTATION AUX IRO.....	25
A. <i>Les stimulons</i>	25
1) Description générale.....	25
2) Description des activités recrutées ou réprimées en réponse à un stress oxydant.....	26
3) Les anti-oxydants responsables du contrôle de la concentration en peroxydes.....	26
4) Importance relative des anti-oxydants dans le contrôle de la concentration en H ₂ O ₂ chez <i>S. cerevisiae</i> et <i>E. coli</i>	38
B. <i>les régulons</i>	43
1) Caractérisation des régulons peroxyde et superoxyde chez <i>E. coli</i>	43
2) Le régulon peroxyde chez <i>S. cerevisiae</i> (Tableau 3).....	49
C. <i>Contrôle de la concentration en peroxydes endogènes</i>	52

CHAPITRE III. LES DÉTECTEURS DU STRESS OXYDANT : CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE DÉTECTION.....55

I. LES DÉTECTEURS DU STRESS OXYDANT CHEZ LES PROCARYOTES.....	55
A. <i>Les détecteurs du H₂O₂</i>	55
1) Chez <i>E. coli</i>	55
2) Chez <i>B. subtilis</i>	61
B. <i>La réponse au O₂⁻ et aux composés à activité redox cyclique chez E. coli</i>	62
1) La présence d'un centre Fer-Soufre dans SoxR est essentielle à l'activité de SoxR.....	62
2) L'activité de SoxR dépend de l'état redox du centre [2Fe-2S].....	63
3) Le centre Fer-soufre de SoxR est rapidement oxydé <i>in vivo</i>	63
4) Comment la forme oxydée de SoxR active-t-elle la transcription de <i>soxS</i> ?.....	65
5) Quel est le signal détecté par SoxR ? (Fig. 11).....	65
6) Quelle réductase pour SoxR ?.....	66
C. <i>Conclusion</i>	67

II. LES DÉTECTEURS DU STRESS OXYDANT CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i>	67
A. <i>L'activité de Yap1 est contrôlée post-transcriptionnellement</i>	69
1) L'activité de Yap1 est contrôlée au niveau de son export nucléaire	69
2) Recherche du mécanisme moléculaire impliqué dans l'inhibition de l'interaction entre Yap1 et Crm1	71
B. <i>Des réponses distinctes au peroxyde d'hydrogène et au diamide</i>	71
III. CONCLUSION	73

RESULTATS

RESULTATS PREMIÈRE PARTIE : CONTRÔLE REDOX DE L'ACTIVITÉ DE YAP1 PAR LES PEROXYDES77

I. YAP1 EST ACTIVÉ PAR OXYDATION EN RÉPONSE AUX PEROXYDES.....	77
A. <i>Mesure de l'activation de Yap1 en réponse au H₂O₂</i>	77
B. <i>Yap1 est oxydé en réponse au H₂O₂</i>	77
C. <i>L'exposition des cellules au H₂O₂ entraîne la formation d'un pont disulfure entre les cystéines 303 et 598 de Yap1</i>	81
D. <i>L'oxydation de Yap1 est essentielle pour son activation</i>	83
E. <i>L'oxydation de Yap1 contrôle son interaction avec Crm1</i>	85
F. <i>Conclusion/ Discussion</i>	87
1) Validité des techniques d'investigation.....	87
2) L'oxydation de Yap1 repose sur la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 303 et 598.....	88
3) Rôle des autres cystéines de Yap1.....	88
4) Conclusion : Comment Yap1 est-il oxydé en réponse aux peroxydes ?	89
II. L'OXYDATION DE YAP1 EN RÉPONSE AUX PEROXYDES EST RELAYÉE PAR LA PEROXYDASE GPX3	91
A. <i>Yap1 interagit avec une protéine d'environ 20 kD via un pont disulfure inter-moléculaire</i> ..	91
B. <i>Le partenaire de Yap1 est la glutathion-péroxydase Gpx3</i>	91
C. <i>L'association de Yap1 et de Gpx3 par un pont disulfure entre les cystéines 36 de Gpx3 et 598 de Yap1 permet l'oxydation de Yap1.</i>	93
D. <i>Gpx3 est essentiel à l'activation de Yap1 par les peroxydes</i>	97
E. <i>L'activité peroxydase de Gpx3 fait intervenir la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 36 et 82.</i>	99
F. <i>L'activité régulatrice de Gpx3 est plus importante que son activité de peroxydase</i>	100
III. MÉCANISME DE DÉTECTION DU PEROXYDE D'HYDROGÈNE CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i> : MODÈLE ET DISCUSSION.....	100
A. <i>Présentation du modèle</i>	100
B. <i>Discussion du modèle : déterminants de la réactivité des cystéines</i>	101
1) Formation de cys36-SOH et du pont disulfure 36-598	101
2) Attaque nucléophile de la cystéine 303	103
C. <i>Discussion du modèle: modalités d'interaction de Gpx3 et de Yap1</i>	103
1) Compétition des fonctions régulatrice et enzymatique de Gpx3.....	103
2) Relation Structure-Fonction chez les PH-GPx	104
3) Essai de comparaison de la réactivité de Gpx1, Gpx2 et Gpx3 vis-à-vis de Yap1	105
D. <i>Gpx3 est-elle une enzyme bi-fonctionnelle</i>	108

IV. LA RÉDUCTION DE YAP1	109
A. <i>La voie des thiorédoxines et non celle du glutathion est impliquée dans le contrôle de l'activité de Yap1</i>	109
1) Utilisation de mutants spécifiques de la voie des thiorédoxines ou du glutathion	109
2) Le niveau basal d'activation et la désactivation de Yap1 sont dérégulés dans les mutants de la voie des thiorédoxines.	111
B. <i>Gpx3 joue-t-il un rôle dans la réduction de Yap1 ?</i>	111
1) La réduction de Gpx3 dépend des thiorédoxines	113
2) Les thiorédoxines et non Gpx3 réduisent Yap1 <i>in vitro</i>	115
3) Gpx3 est responsable de la dérégulation de Yap1 dans la souche <i>trx1 trx2</i>	115
C. <i>Conclusion/Discussion</i>	117
1) Deux modèles non exclusifs impliquant les thiorédoxines dans le contrôle de Yap1.....	117
2) Contrôle cinétique de la réduction.....	118
3) Gpx3 : une glutathion-péroxydase thiorédoxine-dépendante.....	119

.RESULTATS DEUXIÈME PARTIE : UN DEUXIÈME MODE D'ACTIVATION DE YAP1 EN RÉPONSE AUX ÉLECTROPHILES 121

I. BASES MOLÉCULAIRES DE L'ACTIVATION DE YAP1 EN RÉPONSE À LA MÉNADIONE.....	121
A. <i>qu'est-ce que la ménadione ?</i>	121
B. <i>Le rôle de Yap1 dans la réponse à la ménadione</i>	123
1) La ménadione induit une réponse Yap1-dépendante.....	123
2) L'oxydation de Yap1 n'est pas indispensable à son activation par la ménadione	125
3) Les trois cystéines C-terminales de Yap1 sont indispensables à son activation par la ménadione...	127
4) L'activation de Yap1 par la ménadione implique une modification des cystéines C-terminales	129
II. EXISTE-T-IL UN MÉCANISME GÉNÉRAL D'ACTIVATION DE YAP1 IMPLIQUANT LA RÉACTIVITÉ DES CYSTÉINES C-TERMINALES ?	131
A. <i>L'activation de Yap1 par le 4-hydroxynonénal est indépendante de Gpx3</i>	131
B. <i>Le cas du diamide</i>	133
III. CONCLUSION/DISCUSSION.....	134
A. <i>Activation de Yap1 par la ménadione</i>	134
1) La ménadione active Yap1, indépendamment de la production d'ions superoxyde.	134
2) Coexistence des mécanismes d'activation Gpx3-dépendant et Gpx3-indépendant	135
B. <i>Relation réactivité-toxicité</i>	136

DISCUSSION GENERALE..... 139

I. YAP1/GPX3 EST LE SYSTÈME DÉTECTEUR DES PEROXYDES CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i>	139
A. <i>Récapitulation des deux modes d'activation de Yap1</i>	139
1) Le modèle d'activation de Yap1 par les peroxydes.....	139
2) Comparaison du mode d'activation de Yap1 par le H ₂ O ₂ et par les électrophiles	141
B. <i>Comparaison des systèmes fongique et bactérien de détection du stress oxydant</i>	142
1) Yap1 et OxyR sont des homologues fonctionnels.....	142
2) La réponse au stress « disulfure ».....	143
3) La nature de la modification des cystéines module-t-elle la réponse cellulaire ?	144
C. <i>Il existe d'autres niveaux de contrôle de l'activité de Yap1</i>	144
II. UN SYSTÈME DE DÉTECTION CONSERVÉ CHEZ LES EUCARYOTES ?.....	145
A. <i>Chez les autres levures</i>	145
B. <i>Chez les eucaryotes supérieurs</i>	146
1) Bach1 et Bach2.....	146
2) Nrf2 et la réponse aux électrophiles	146

III. L'ACTIVITÉ D'UNE PROTÉINE PEUT ÊTRE RÉGULÉE PAR SON OXYDATION.....	147
A. <i>Les différents types de modifications redox</i>	147
B. <i>Régulation redox et contrôle de l'homéostasie</i>	148
C. <i>Conclusion</i>	149
MATÉRIELS ET MÉTHODES	153
I. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURES.....	153
II. SOUCHES	153
III. PLASMIDES	155
◆ <i>Construction de myc-Yap1 et des mutants cystéines de YAP1</i>	155
◆ <i>Construction de HA-Gpx3, His-Gpx3 et des mutants cystéines de GPX3</i>	156
◆ <i>Construction des plasmides GFP-CRDYap1 et Gal4-cCRD-Yap1-TAPTag</i>	156
IV. TESTS DE SENSIBILITÉ EN MILIEU SOLIDE	157
V. TRANSFORMATIONS.....	157
◆ <i>Electroporation des levures [237]</i>	157
◆ <i>Transformation par choc thermique</i>	158
◆ <i>Electroporation d' E. coli [238]</i>	158
VI. SÉQUENÇAGE.....	159
VII. EXTRACTION DE PLASMIDES À PARTIR DE LA LEVURE	159
VIII. ANALYSE DE CELLULES EXPRIMANT LES FUSIONS YAP1-GFP PAR MICROSCOPIE À FLUORESCENCE.....	159
IX. EXPÉRIENCES DE DOUBLE HYBRIDE.....	160
X. EXPÉRIENCES DE RT-PCR QUANTITATIVE	161
XI. EXTRAITS PROTÉIQUES, ANALYSES ÉLECTROPHORÉTIQUES ET PURIFICATION DES PROTÉINES	162
◆ <i>Protocole d'extraction TCA permettant de visualiser l'état redox de myc-Yap1 et de Gal4- cCRDYap1-TAPtag</i>	162
◆ <i>Analyse de l'état redox de HA-Gpx3 par lyse TCA</i>	163
◆ <i>Purification de Yap1 pour analyse par spectrométrie de masse et tests fonctionnels.</i>	164
◆ <i>Expression et Purification de Gpx3 dans E. coli</i>	165
XII. TESTS PEROXYDASE.....	165
XIII. ANALYSES DE SPECTROMÉTRIE DE MASSE (CPL-MS/MS ET ANALYSES MS/MS).....	166
BIBLIOGRAPHIE.....	173
ANNEXES.....	193
Annexe 1. Alignement multiple d'une sélection représentative de différentes séquence homologues à Gpx3 dans différents règnes de vivant.	193
Annexe 2. Article 1 ; Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB. EMBO J 2000 Oct 2; 19 (19):5157-66.	197
Annexe 3. Article 2 ; Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. Cell 2002 Nov 15;111(4):471-81.	209

SOMMAIRE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES	pages
Figure 1. Les IRO représentent différents états de réduction de l'oxygène.	18
Figure 2. L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène participent à la formation de radical hydroxyle par les réactions d'Haber-Weiss et de Fenton.	18
Figure 3. Mise en évidence du phénomène d'adaptation au H ₂ O ₂ chez <i>S. cerevisiae</i> .	24
Figure 4. Réduction des ponts disulfures par les thiorédoxine.	31
Figure 5. Les voies de réduction impliquant des enzymes à thiol réactif. Modèle décrit chez les microorganismes.	33
Figure 6. Modèle de réduction catalytique des peroxydes par les 2-Cys-peroxyredoxines: l'exemple de Tsa1	36
Figure 7. Modèle de réduction catalytique des peroxydes par les GPx (glutathion peroxydase).	36
Figure 8. Contrôle de l'activité d'OxyR.	56
Figure 9. Structures simplifiées du centre redox d'OxyR.	59
Figure 10. Modèle d'activation du régulon SoxRS.	64
Figure 11. Activation de SoxR par oxydation de son centre Fer-Soufre.	64
Figure 12. L'accumulation nucléaire de Yap1 en réponse à un stress oxydant dépend de son interaction avec l'exportine Crm1.	68
Figure 13. Description schématique des domaines de Yap1.	70
Figure 14. Mesure de l'activation de Yap1 en réponse au H ₂ O ₂ .	76
Figure 15. Yap1 est oxydé <i>in vivo</i> en réponse au H ₂ O ₂ .	78
Figure 16. Identification des cystéines redox de Yap1.	80
Figure 17. Activité des mutants de substitution des cystéines de Yap1	82
Figure 18. Les cystéines 303 et 598 sont essentielles à l'accumulation nucléaire de Yap1 en réponse au H ₂ O ₂ .	84
Figure 19. Les cystéines 303 et 598 ont un rôle essentiel dans la régulation de l'interaction entre Yap1 et Crm1.	84
Figure 20. Un anticorps polyclonal dirigé contre la partie C-terminale de Yap1 ne reconnaît plus la forme oxydée.	86
Figure 21. En réponse au H ₂ O ₂ , Yap1 interagit de façon transitoire avec une petite protéine d'environ 20 kD	90
Figure 22. La glutathion-peroxydase Gpx3 est la protéine de 20 kD interagissant avec Yap1.	92
Figure 23. La formation d'un pont disulfure entre les cystéines 598 de Yap1 et 36 de Gpx3 permet l'oxydation de Yap1.	94
Figure 24. Gpx3 est essentielle à l'activation de Yap1 par le H ₂ O ₂	96
Figure 25. L'activité peroxydase de Gpx3 requiert la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 36 et 82.	98

Figure 26. Modèle décrivant la double fonction de détecteur des peroxydes et de peroxydase de Gpx3.	102
Figure 27. Modélisation structurale de Gpx3 et comparaison avec la GPX bovine	106
Figure 28. Analyse comparée des surfaces des modèles de Gpx3 et Gpx2.	107
Figure 29. L'activité de Yap1 est dérégulée dans les mutants de la voie des thiorédoxines.	109
Figure 30. Gpx3 est réduite par la voie des thiorédoxines.	112
Figure 31. Les thiorédoxines réduisent Yap1 <i>in vitro</i> . A. Réduction de Yap1 _{ox} dans un extrait brut en présence de thiorédoxine recombinante.	114
Figure 32. Gpx3 est responsable de la dérégulation de Yap1 dans la souche <i>trx1 trx2</i>	114
Figure 33. Modélisation du rôle de Gpx3 et des thiorédoxines dans le contrôle de l'activité de Yap1.	116
Figure 34. Production d'ions superoxyde par la ménadione.	120
Figure 35. Mesure de l'activité de Yap1 en réponse à la ménadione.	122
Figure 36. Yap1 est oxydé en réponse à la ménadione.	124
Figure 37. L'oxydation de Yap1 n'est pas essentielle à son activation par la ménadione (Md)	126
Figure 38. Les cystéines C-terminales de Yap1 sont nécessaires et suffisantes à son activation par la ménadione.	128
Figure 39. L'activation de Yap1 par la ménadione implique une modification de ses cystéines C-terminales.	130
Figure 40. Yap1 est activé par diverses molécules ayant une réactivité vis à vis des thiols.	132
Figure 41. Modèle d'activation de Yap1 par le peroxyde d'hydrogène.	138
Figure 42. Deux modes d'activation de Yap1, l'un Gpx3-dépendant, l'autre Gpx3-indépendant.	140
Figure 43. Introduction d'une mutation ou d'une étiquette par PCR en deux étapes.	154
Figure 44. Introduction du fragment de PCR mutagénisé par recombinaison homologue.	154

TABLEAUX

Tableau 1. Liste des principaux gènes contrôlés par OxyR	44
Tableau 2. Liste des principaux gènes contrôlés par SoxR	46
Tableau 3. Liste des principaux gènes contrôlés par Yap1, Skn7 et Msn2/4	50
Tableau 4. Description sommaire des peptides tryptiques observés à partir des échantillons Yap1 _{red} et Yap1 _{ox} .	80
Tableau 5. Liste des souches..	167
Tableau 6. Liste des plasmides	168

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS

L'oxygène moléculaire, ou O_2 , est essentiel à la respiration cellulaire : l'utilisation de l'oxygène comme accepteur final de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale permet la production efficace d'énergie sous forme d'ATP. L'utilisation du pouvoir oxydant de l'oxygène dans de nombreuses réactions enzymatiques permet également la mise en place de nouvelles transformations métaboliques (oxydase, oxygénase, hydroxylase (CytP450)). A l'opposé, l'oxygène peut être toxique. Ainsi, certains organismes anaérobies sont incapables de survivre en présence d'oxygène. Cette toxicité est aussi visible chez les organismes aérobies : l'exposition d'*E. coli* à des pressions élevées en oxygène cause une inhibition de croissance immédiate. Chez l'homme, l'augmentation de la pression partielle en oxygène induit une hyper-excitabilité neuronale, et entraîne des dommages pulmonaires progressifs pouvant être à l'origine d'une fibrose [1].

Pourquoi l'oxygène est-il toxique ?

L'oxygène est un oxydant capable d'inactiver certaines enzymes par oxydation [1]. Cependant, la réactivité d' O_2 est trop limitée pour rendre compte de la toxicité observée. La majorité de cette toxicité est en fait associée aux intermédiaires réactifs de l'oxygène (IRO), dont les plus connus sont l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. La respiration constitue une source permanente d'IRO et les variations du métabolisme cellulaire induisent une fluctuation de leur production. La cellule peut également être exposée à une production exogène d'IRO, en particulier au cours des réactions inflammatoires ou immunitaires. La majorité des organismes possèdent des systèmes anti-oxydants capables de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène et de l'ion superoxyde. L'étude de ces systèmes a permis de montrer que l'expression de ces enzymes est induite spécifiquement lorsque la concentration de l'un ou l'autre de ces oxydants augmente. L'existence d'un tel système de défense dénote de la toxicité de ces oxydants, qui peut être liée à la réactivité de ces molécules vis-à-vis de l'ensemble des composants cellulaires. Cependant, la nature inductible de la réponse anti-oxydante pourrait également refléter la nécessité pour la cellule de réguler la concentration de ces oxydants et non de simplement les éliminer. Ainsi, notre

hypothèse est que cette réponse inductible s'inscrit dans le cadre d'un contrôle homéostatique du potentiel redox intracellulaire et que la production endogène d'oxydants participe à l'établissement de ce potentiel. L'étude de ces systèmes chez *E. coli* a permis d'étayer l'existence d'une homéostasie redox et plus précisément d'une homéostasie du peroxyde d'hydrogène. Le maintien de cette homéostasie repose sur l'activation de voies de régulation, capables d'induire une réponse globale adaptée. Ainsi, la cellule est capable de détecter la présence de peroxyde d'hydrogène ou d'ion superoxyde grâce à des mécanismes moléculaires spécifiques. Notre étude a porté sur la caractérisation d'un détecteur des peroxydes chez la levure *S. cerevisiae* et a permis de montrer que la notion d'homéostasie redox peut vraisemblablement être généralisée aux eucaryotes.

Chapitre I. Les Intermédiaires Réactifs de l'Oxygène (IRO)

I. Définition des IRO

A. Le paradoxe des radicaux libres

La notion d'intermédiaires réactifs de l'oxygène est souvent associée à la notion de radical libre. Cependant, cette appellation entretient une confusion concernant les notions de réactivité et de radical. En effet, les IRO sont des molécules réactives comprenant des espèces radicalaires et non radicalaires ¹. [1]. Réciproquement, la notion de réactivité n'est pas toujours associée à celle de radical, même si l'organisation électronique d'un radical rend souvent ce composé instable. En effet, l'O₂ dans son état stable, dit triplet, est lui-même un radical, car il possède deux électrons non appariés à spin parallèle. Cependant, sa réactivité est limitée aux molécules capables d'apporter un ou deux électrons non appariés dont le spin est anti-parallèle par rapport à ceux de la molécule d'O₂. Cette restriction de spin est en partie responsable de l'absence de réactivité d'O₂ vis-à-vis d'une grande quantité de molécules. Un apport d'énergie entraîne la réorganisation des électrons et transforme l'oxygène triplet en oxygène singulet, beaucoup plus réactif, car dans ce cas, la restriction de spin est abolie. D'autres IROs peuvent également être formés par réductions mono ou bi-électroniques de l'oxygène. Ils représentent ainsi divers états d'oxydation de l'oxygène, comprenant par ordre de réduction, l'ion superoxyde (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle (OH[•]) (Fig 1). Il existe aussi d'autres types d'IRO, comme l'ozone (O₃), l'acide hypochlorique (HOCl), ou les dérivés azotés (NO, peroxydinitrite...), qui ne seront pas abordés ici.

¹ Un radical est un atome ou une molécule possédant un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) sur une orbitale atomique ou moléculaire.

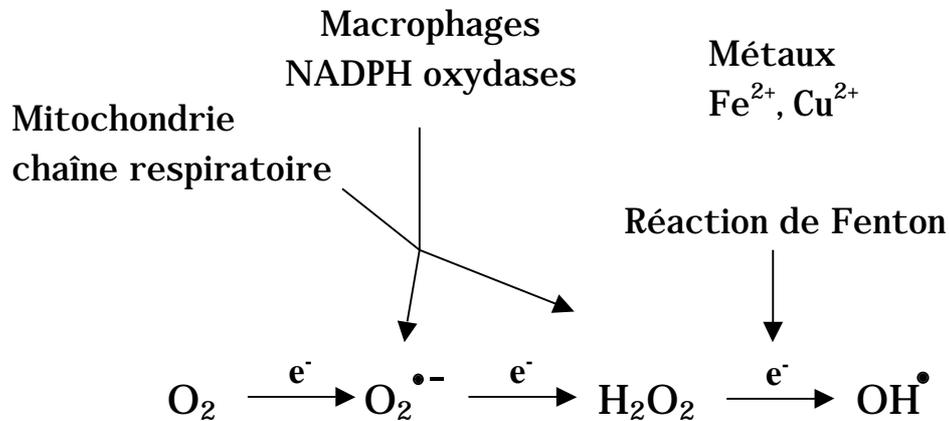
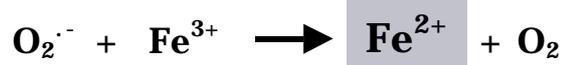


Figure 1. Les IRO représentent différents états de réduction de l'oxygène. L'ion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) issu de la réduction à un électron de l'oxygène peut être produit au cours de la respiration, ou lors de l'activation des macrophages au cours de la réponse immunitaire. Sa dismutation conduit à la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La réaction du H_2O_2 avec des métaux de transition au cours de la réaction de Fenton entraîne la production de radical hydroxyle (OH^{\bullet}).

Réaction d'Haber- Weiss



Réaction de Fenton



Figure 2. L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène participent à la formation de radical hydroxyle par les réactions d'Haber-Weiss et de Fenton. Le fer peut être remplacé par le cuivre.

B. Les productions d' $O_2^{\cdot-}$, d' H_2O_2 et d' OH^{\cdot} sont liées

L'une des plus importantes sources de $O_2^{\cdot-}$ *in vivo* est probablement la chaîne de transport d'électrons présente chez les cellules aérobies [2]. Ainsi, la réduction incomplète de l'oxygène au cours de la respiration entraîne la production d'IRO. Dans les conditions physiologiques, l'ion superoxyde est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène par dismutation. Cette réaction peut être spontanée, mais elle est le plus souvent catalysée par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD) [2]. Parallèlement, l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène participent à la production de radical hydroxyle, via les réactions d'Haber-Weiss et de Fenton (Fig. 1 et 2).

II. La toxicité des IRO est fonction de leur réactivité

A. Réactivité des IRO

1) Le radical hydroxyle

Parmi les IRO décrits ci-dessus, le radical hydroxyle est sans conteste le composé le plus réactif. Cette réactivité est telle qu'elle limite sa diffusion et circonscrit donc le lieu de réaction d' OH^{\cdot} à son lieu de formation. Elle rend également impossible l'existence de mécanismes enzymatiques de détoxification². La formation du radical hydroxyle doit donc être prévenue grâce à l'élimination de l'ion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène par des systèmes enzymatiques spécifiques (voir chapitre II). OH^{\cdot} réagit avec l'ensemble des composants cellulaires grâce à trois types de réactivité. i) OH^{\cdot} est capable de réaction d'addition, entraînant par exemple l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques ainsi que de certains acides aminés aromatiques. ii) OH^{\cdot} peut arracher un hydrogène ou iii) transférer son électron non apparié à de nombreuses molécules, entraînant ainsi la formation de nouvelles espèces radicalaires, tel que le radical peroxyde (ROO^{\cdot}). Ce phénomène est impliqué dans l'initiation des réactions en chaîne responsables de la peroxydation lipidique [3, 4]. Les produits terminaux de la peroxydation lipidique, incluant la malonedialdéhyde et le

² En revanche, la toxicité du radical hydroxyle et de ses dérivés est prévenue grâce à de petites molécules de type α -tocophérol, capables de stopper les réactions radicalaires.

4-hydroxy-nonéanal, sont également toxiques car ils peuvent rapidement modifier l'ADN et les protéines en formant des adduits [5].

2) Le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde

Contrairement au radical hydroxyle, la réactivité d' $O_2^{\cdot-}$ et d' H_2O_2 est beaucoup plus restreinte, ce qui permet à ces molécules de diffuser. Ces deux composés réagissent avec des composants cellulaires spécifiques distincts.

L'une des caractéristiques essentielles d' H_2O_2 est sa réactivité spécifique avec certains résidus cystéine et méthionine des protéines [6]. L'oxydation d'une cystéine par le H_2O_2 entraîne la formation d'un acide sulfénique (SOH). Cette espèce peut ensuite s'oxyder en acide sulfonique (SO_2H) ou sulfinique (SO_3H) ou réagir avec une autre cystéine pour former un pont disulfure. Seules les oxydations en acide sulfénique ou en pont disulfure sont réversibles, car ces formes peuvent être réduites par différentes thiol-réductases spécifiques. L'oxydation d'une cystéine en acide sulfénique est décrite comme une réaction d'addition nucléophile de la cystéine, sous forme thiolate ($Cys-S^-$) sur la molécule de H_2O_2 [7]. Cette réactivité, à la base du mécanisme catalytique de certains anti-oxydants, est plus amplement décrite dans le chapitre II (paragraphe IIB.3). L'oxydation d'un résidu méthionine par le H_2O_2 conduit à la formation de méthionine-sulfoxyde, dont la réduction est catalysée par une enzyme spécifique, la méthionine-sulfoxyde réductase.

L'anion superoxyde, $O_2^{\cdot-}$ présente quant à lui une réactivité spécifique vis-à-vis du Fer. Il peut agir soit en tant que réducteur, en catalysant par exemple la réduction du Fe(III) en Fe(II) au cours de la réaction d'Haber-Weiss (Fig. 2), soit en tant qu'oxydant en entraînant en particulier la destruction des centres Fer-Soufre, présents dans les protéines à [4Fe-4S] après oxydation du Fe(II) en Fe(III) (revue par [8]). L'action de l'ion superoxyde sur les centres Fer-Soufre est en grande partie responsable de la toxicité de ce radical. En effet, l'oxydation du Fer entraîne non seulement l'inactivation des enzymes à centre Fer-Soufre, parmi lesquelles se trouvent des activités essentielles au métabolisme cellulaire, mais déclenche aussi la libération massive de Fer libre dans la cellule.

B. La concentration des IRO doit être contrôlée

1) Pourquoi les IRO sont-ils toxiques ?

In vivo, l'exposition des cellules aux IRO, et en particulier au peroxyde d'hydrogène, peut, à de faibles doses, induire une inhibition de la croissance et à des doses plus fortes, entraîner la mort. Les bases moléculaires de tels phénomènes sont encore étonnamment mal connues. L'une des hypothèses avancées est que la présence de ces IRO endommage de façon non spécifique l'ensemble des composants cellulaires, en particulier via la production de radical hydroxyle. La moindre réactivité des peroxydes et de l'ion superoxyde suggère par ailleurs que cette toxicité peut être associée à l'inactivation de cibles plus spécifiques [9, 10]. Une autre hypothèse, non exclusive, peut cependant être proposée : la concentration des IRO doit être régulée car elle participe au maintien d'une homéostasie redox. Le maintien d'un état redox intracellulaire déterminé (défini par la somme des états dans lesquels se trouvent chaque couples redox présents), est une condition essentielle au bon fonctionnement des activités cellulaires [11, 12], définissant ainsi la notion d'homéostasie redox. L'ensemble des composants de la cellule participe à l'établissement de cette homéostasie. Cependant, certains sont plus importants que d'autres. Ainsi, le contrôle de l'état redox des métaux et des thiols constitue un paramètre essentiel de la régulation homéostatique. En quoi les IRO participent-ils à cette homéostasie ? Le peroxyde d'hydrogène et l'ion superoxyde sont des molécules redox, dont la présence modifie vraisemblablement l'équilibre homéostatique, en particulier grâce à leur réactivité respective vis-à-vis des thiols et des métaux. Il est donc probable que ces molécules contribuent à l'établissement de ce potentiel redox intracellulaire. Lorsque leur concentration n'est pas ou est insuffisamment régulée, le potentiel redox intracellulaire varie et peut devenir incompatible avec le fonctionnement de certaines activités, créant alors un stress oxydant. Une telle hypothèse pose la question suivante : la concentration en IRO, et en particulier la concentration en H_2O_2 est-elle elle-même sujette à une régulation homéostatique ? En d'autres termes, la production de peroxyde d'hydrogène par la respiration est-elle « utile » ?

2) Une homéostasie du peroxyde d'hydrogène ?

Ces questions ont été posées expérimentalement en particulier grâce au système bactérien. En phase exponentielle de croissance, la production d'ions superoxyde par le métabolisme respiratoire est estimée à environ $4 \cdot 10^{-6}$ M/s chez *E. coli* [13]. Une partie de $O_2^{\cdot -}$ est ensuite métabolisé, conduisant à la production de 1 à $14 \cdot 10^{-6}$ M/s de H_2O_2 [14]. Cependant, la concentration intracellulaire, en $O_2^{\cdot -}$ et en H_2O_2 est mesurée aux environs de 10^{-10} M et 10^{-7} M respectivement. De plus, malgré une variabilité importante de la quantité de H_2O_2 produit en fonction de la phase de croissance (augmentation de plus de 10 fois de la production de H_2O_2 au cours de la phase exponentielle), les variations relatives de la concentration intracellulaire en H_2O_2 sont inférieures à un facteur 2 (entre 0,13 et 0,25 μ M) [15]. Ce paramètre est donc finement régulé. La concentration mesurée en peroxyde d'hydrogène n'est pas nulle, suggérant que ce composé peut contribuer à l'établissement d'un potentiel redox intracellulaire.

Les deux chapitres suivant seront consacrés à l'analyse des mécanismes moléculaires permettant à la cellule de réguler la concentration de peroxyde d'hydrogène et nous verrons en quoi l'étude de ces systèmes permet de mettre en évidence l'existence d'une éventuelle homéostasie des peroxydes.

• Chapitre II. La réponse adaptative aux IRO

Les organismes uni et pluricellulaires sont soumis à des variations constantes de leur environnement et de leur métabolisme, d'ordre chimique, thermique ou osmotique. Ces variations peuvent être incompatibles avec le bon fonctionnement de la cellule si elles ne sont pas compensées. La survie de la cellule dépend donc de sa capacité à s'adapter à ces nouvelles conditions de croissance, en mettant en place une réponse de stress. Cette stratégie suppose l'existence d'un système de détection, permettant à la cellule de « sentir » la variation d'un paramètre donné, et de transmettre ensuite l'information à un système effecteur, en charge de corriger spécifiquement cette variation. Elle définit ainsi les bases nécessaires à l'existence d'une régulation homéostatique. Une telle régulation est-elle mise en place en réponse à la variation de la concentration en oxydant ? Deux systèmes expérimentaux ont permis d'étudier cette question. Le premier repose sur l'étude du phénomène d'adaptation et s'appuie sur une étude de viabilité cellulaire. Le deuxième repose sur l'étude des effecteurs et des régulateurs de la réponse et s'appuie sur les nouveaux outils d'analyse globale des génomes.

I. Le phénomène d'adaptation aux IRO

A. La capacité d'adaptation à un oxydant donné

Le phénomène d'adaptation est mis en évidence par la capacité de la cellule à accroître sa résistance face à un stress donné lorsque cette cellule a été auparavant exposée au même stress, mais d'une amplitude plus faible. Une réponse adaptative au stress oxydant a été initialement décrite chez les bactéries [16, 17] puis chez les levures [18-20]. Une réponse adaptative au peroxyde d'hydrogène et aux composés générateurs d'ions superoxyde comme la ménadione ou le paraquat a ainsi été mise en évidence chez *E. coli*, *S. typhimurium* [16, 17, 21] et *S. cerevisiae* [18-20] (Fig. 3). L'existence d'une adaptation physiologique de la cellule à des doses croissantes d'un oxydant donné implique que la cellule possède des systèmes effecteur et détecteur spécifiques.

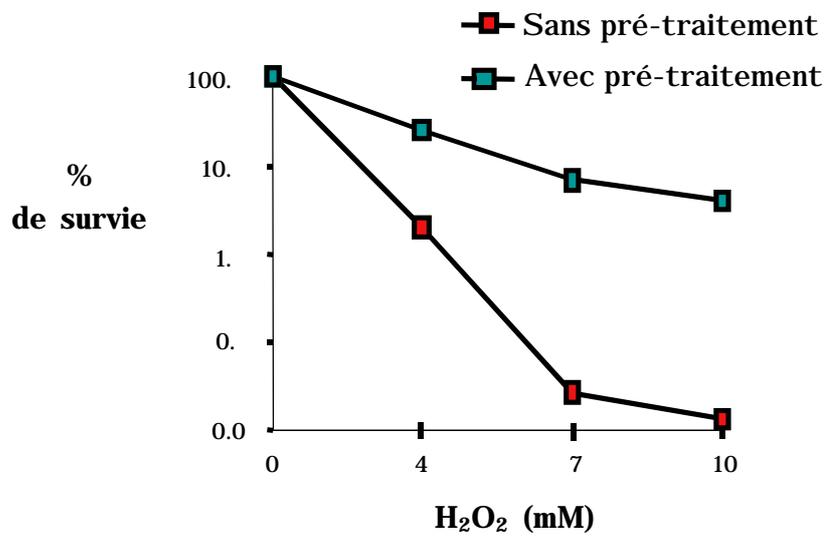


Figure 3. Mise en évidence du phénomène d'adaptation au H₂O₂ chez *S. cerevisiae*. Les cellules sont pré-traitées ou non pendant 15 minutes avec 0,2 mM de H₂O₂, puis exposées pendant une heure aux doses de H₂O₂ indiquées. Le pourcentage de survie est ensuite mesuré grâce au dénombrement des colonies croissant sur un milieu dépourvu d'oxydant après l'exposition.

B. Le phénomène d'adaptation croisée

La nature du stress imposé peut déterminer en partie la nature des défenses induites. Dans quelle mesure cette induction est-elle spécifique d'un oxydant donné? Cette question peut être posée expérimentalement grâce à l'étude des phénomènes d'adaptation croisée. Ainsi, l'exposition d'*E. coli* à de faibles doses de H_2O_2 induit non seulement une résistance accrue à cet oxydant mais aussi à la ménadione [17], suggérant l'induction de défenses communes en réponse à ces deux oxydants. Cette adaptation croisée est en revanche imparfaite chez *S. cerevisiae* [19, 20]. L'étude expérimentale des réponses croisées ne permet pas d'obtenir des renseignements précis sur la nature des défenses induites, ni sur l'existence d'un mécanisme de détection commun aux deux réponses. Il permet d'évaluer d'une façon globale la spécificité des réponses cellulaires par rapport à un oxydant donné, et de postuler l'existence de mécanismes de détection et de régulation, à la fois distincts et communs pour différentes classes d'oxydants.

II. Etude génomique de l'adaptation aux IRO

La réponse adaptative et plus généralement le contrôle de l'homéostasie redox nécessite la synthèse de protéines *de novo*, tant chez les bactéries [16, 17] que chez la levure [18, 20]. L'analyse de gels d'électrophorèse à deux dimensions, et plus récemment, l'utilisation de puces à ADN, a permis de caractériser de façon relativement exhaustive l'ensemble des activités induites ou réprimées par les stress oxydants, en particulier les stress induits par H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$. L'analyse de ces réponses génomiques a permis d'apprécier leur complexité, et le large spectre des activités recrutées pour adapter la cellule à ce type de stress.

A. Les stimulons

1) Description générale

La réponse au stress oxydant se caractérise, chez *E. coli* comme chez *S. cerevisiae*, par la modulation de l'expression d'un nombre important de gènes, pouvant représenter jusqu'à 14 % des gènes putatifs chez *S. cerevisiae*. [22]. En réponse à une dose unique d'oxydant, cette

réponse est à la fois rapide et transitoire : chez la bactérie comme chez la levure, elle est observée dès 5 à 10 minutes de traitement au H_2O_2 avec un retour au niveau de base après une heure d'exposition [17, 22]. L'observation expérimentale d'une telle réponse transitoire montre d'une part que la cellule détecte rapidement la présence de H_2O_2 , et d'autre part qu'il existe des mécanismes de rétrocontrôle permettant l'arrêt de la réponse. Ces deux aspects reposent sur l'existence de régulateurs spécifiquement activés ou désactivés en fonction de la concentration en oxydant. Les mécanismes moléculaires responsables de ces réponses chez *E. coli*, sont exposés dans le chapitre III

2) Description des activités recrutées ou réprimées en réponse à un stress oxydant

Les activités régulées par le stress H_2O_2 ou $O_2^{\cdot-}$ ont été identifiées par analyse globale (gels d'électrophorèse bi-dimensionnelle des protéines et puces à ADN) chez *E. coli*, et chez *S. cerevisiae*, [22-25]. Ces analyses ont permis de dégager un certain nombre de traits caractéristiques de ces réponses de stress. Tout d'abord, la cellule met en place des mécanismes de défense impliquant l'induction de protéines à activité anti-oxydante, des protéines de choc thermique et de réparation de l'ADN et des pompes à efflux, permettant l'élimination des toxiques. Les activités anti-oxydantes comprennent les catalases, les superoxydes dismutases et les peroxydases, ainsi que les enzymes de la voie des thiorédoxines et du glutathion ; leur rôle dans le contrôle de la concentration en H_2O_2 est analysé dans le paragraphe suivant. En outre, la cellule induit une répression générale de l'anabolisme au profit du catabolisme. Ainsi, chez *S. cerevisiae*, les gènes impliqués dans les phénomènes de croissance cellulaire, le métabolisme des ARNs, la synthèse protéique et la sécrétion sont réprimés en réponse au H_2O_2 [22, 24, 25]. Parallèlement, la répression des enzymes de la glycolyse au profit en particulier des enzymes de la voie des pentoses phosphate [23] pourrait permettre l'augmentation de la production de NADPH, coenzyme essentiel des voies de réduction thiol-dépendantes.

3) Les anti-oxydants responsables du contrôle de la concentration en peroxydes

Les anti-oxydants sont essentiels au maintien de l'homéostasie redox car ils catalysent l'élimination des IRO par réduction. La concentration en peroxyde d'hydrogène est contrôlée grâce à deux types d'activités reposant sur deux modes de catalyse différents. i) Les superoxyde dismutases et les catalases catalysent respectivement la dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau grâce aux propriétés redox des métaux. L'activité réductrice de ces deux enzymes ne dépend pas du pouvoir réducteur du NADH ou du NADPH. ii) Les peroxydases catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et des peroxydes organiques en leur alcool correspondant grâce au pouvoir réducteur du NADPH (ou du NADH). L'activité de ces enzymes repose sur la présence de thiols ou de sélénothiols réactifs. Leur description sera détaillée car la découverte relativement récente de ces enzymes a permis de leur attribuer un rôle essentiel dans la réduction des peroxydes. De plus, elles constituent un modèle pour l'étude de la réactivité du peroxyde d'hydrogène vis-à-vis des cystéines.

(a) Les superoxyde-dismutases et leur double rôle dans la protection contre le stress superoxyde

(1) Trois types de Superoxyde-dismutases

L'activité superoxyde-dismutase (SOD) est retrouvée chez la plupart des organismes aérobies. Elle catalyse la conversion de deux molécules d' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 par un mécanisme de dismutation métal-dépendant. Le métal de transition, présent au sein du site actif, est tout d'abord réduit par une première molécule d' $O_2^{\cdot-}$, libérant O_2 . Sa ré-oxydation par une deuxième molécule d' $O_2^{\cdot-}$ permet la régénération du métal catalytique et la libération d'une molécule de H_2O_2 . Il existe trois types de SOD, en fonction de la nature du métal de transition impliqué : les superoxyde-dismutases Fer-dépendantes, (Fe-SOD), les superoxyde-dismutases Manganèse-dépendantes, (Mn-SOD) et les superoxyde-dismutases Cuivre-dépendantes, (Cu/Zn-SOD), le zinc jouant dans ce cas un rôle structural.

(2) L'analyse phénotypique de mutants déficients en activité SOD définit la toxicité d' $O_2^{\cdot-}$

Chez *E. coli*, comme chez *S. cerevisiae*, l'absence d'activité SOD entraîne un défaut de croissance en conditions aérobies, diverses auxotrophies en milieu minimum, une

hypersensibilité à l'oxygène et aux agents générateurs d'ions superoxyde, ainsi qu'une augmentation du taux de mutations spontanées [26-29]. Une partie de ces phénotypes est imputée à l'inactivation par l'ion superoxyde des protéines à centres Fer-Soufre, dont certaines participent aux voies de biosynthèse des acides aminés [30]. Parallèlement, la destruction des centres Fer-Soufre entraîne une libération de Fer et donc une augmentation de la concentration en Fer libre dans la cellule [31, 32]. Pourquoi cette libération de Fer est-elle toxique ? La première hypothèse est que la participation de ce métal de transition aux réactions de Fenton et d'Haber-Weiss permet la production de radical hydroxyle. Cette hypothèse est compatible avec l'observation d'une augmentation du taux de mutations spontanées. Cependant, chez la levure, l'import de Fer est accru dans les mutants SOD et l'ajout de Fer dans le milieu supprime certains des phénotypes associés à l'absence de SOD [33, 34]. Cette observation a conduit ces auteurs à proposer une deuxième hypothèse non exclusive : l'exposition à l'ion superoxyde entraîne une carence relative en Fer et cette carence est responsable d'une partie des phénotypes observés en absence de SOD. En effet, le Fer libéré par la destruction des centres Fer-Soufre n'apparaît pas disponible pour leur reconstruction, mais au contraire séquestré dans la vacuole [35].

Les superoxyde-dismutases permettent donc de prévenir la toxicité associée à la présence d'ions superoxyde. Ce-faisant, elles participent à la production d'un autre composé potentiellement toxique, le peroxyde d'hydrogène. D'autres activités, les catalases et les peroxydases sont alors mises en jeu.

(b) Les catalases et les peroxydases à thiol sont les principales activités responsables de la réduction des peroxydes

(1) les catalases

Les catalases sont des protéines homotétramériques, dont l'activité catalytique repose sur la présence d'un hème. Les catalases réduisent par dismutation deux molécules d' H_2O_2 en eau et O_2 en utilisant le pouvoir catalytique du Fer. La catalase a été l'une des premières enzymes décrites chez la bactérie *E. coli*, qui possède deux types de catalases codées par les gènes KatE [36] et KatG [37]. *S. cerevisiae* possède également deux catalases, une catalase cytoplasmique, Cta1, et une catalase peroxisomale, Ctt1 [38, 39].

(2) Les peroxydases à thiol (ou thiol-peroxydases)

(i) Une activité catalytique reposant sur un thiol réactif

Les thiol-peroxydases sont de petites protéines catalysant la réduction à un électron des peroxydes (ROOH) en leur alcool correspondant (ROH). Ainsi, le peroxyde d'hydrogène est réduit en eau. L'étude de leur activité catalytique est un modèle pour l'analyse de la réactivité des peroxydes vis-à-vis des cystéines. Le site catalytique des thiol-peroxydases est constitué d'une cystéine réactive, capable de réaliser une attaque nucléophile de la fonction peroxyde. Cette réaction entraîne de façon concomitante la libération d'une molécule d'eau ou d'alcool et la formation d'un acide sulfénique (Cys-OH) au niveau du site catalytique [40]. La réactivité de la cystéine catalytique nécessite sa présence sous forme thiolate (Cys-S⁻), plus nucléophile que la forme protonée. L'abondance du thiolate est directement dépendante du pH du milieu et du pKa de la cystéine. Or, à pH physiologique, la plupart des cystéines sont protonées car leur pKa est d'environ 8,5. La forme thiolate peut être stabilisée par le micro-environnement de la cystéine catalytique. En particulier, la présence de groupements électro-attracteurs à proximité du site actif permet la stabilisation de la forme thiolate de la cystéine, chargée négativement. Cette stabilisation se traduit par une diminution du pKa mesuré pour la cystéine réactive. Ce facteur est important tant que le pKa n'est pas significativement inférieur au pH physiologique. En effet, la diminution du caractère basique du thiolate diminue également sa nucléophilie, et par là même sa réactivité. La réactivité est ainsi théoriquement maximale lorsque le pKa de la cystéine est égal au pH intracellulaire [6]. L'abaissement du pKa n'est pas le seul paramètre nécessaire au fonctionnement du site catalytique des thiol-peroxydases. Un autre paramètre important est la capacité du site actif à protoner et ainsi à stabiliser l'espèce RO⁻, produite suite à la réduction de la fonction peroxyde [40].

Certaines peroxydases possèdent une sélénocystéine à la place de la cystéine catalytique. C'est en particulier le cas des glutathion-peroxydases chez les eucaryotes supérieurs. La sélénocystéine présente une réactivité comparable à la cystéine catalytique des thiol-peroxydases, et s'oxyde, en présence de peroxyde, en acide séléninique. Les propriétés

nucléophiles du sélénium améliore sa réactivité et donc l'efficacité peroxydatique de ce type d'enzyme [41].

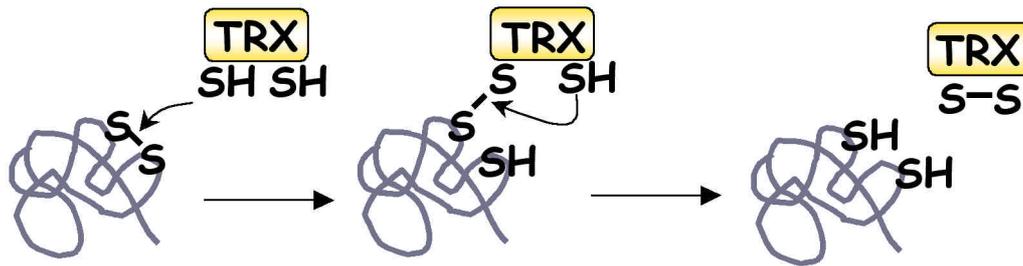
Une seule cystéine est responsable de la réduction des peroxydes. Cependant, l'acide sulfénique (ou séléninique) formé est ensuite conjugué à une autre cystéine pour former un pont disulfure, protégeant ainsi l'enzyme d'une inactivation éventuelle associée à l'oxydation irréversible de la cystéine catalytique en acide sulfinique. L'activité des thiol-peroxydases est ensuite régénérée par réduction du pont disulfure, grâce au pouvoir réducteur du NADPH (ou du NADH), relayé par des enzymes à activités thiol-transférase appartenant à la voie des thiorédoxines ou du glutathion.

(ii) Les voies des thiorédoxines et du glutathion régénèrent les thiol-peroxydases grâce au pouvoir réducteur de NADPH

Il existe deux voies majeures capables de transférer le pouvoir réducteur du NADPH aux thiol-peroxydases, la voie des thiorédoxines et la voie du glutathion.

La voie des thiorédoxines. Les thiorédoxines catalysent la réduction de ponts disulfures grâce à une activité thiol-transférase conférée par la présence dans son site actif de deux cystéines vicinales au sein du motif conservé, Trp-Cys-Gly-Pro-Cys. Les thiorédoxines peuvent réduire un pont disulfure grâce à un processus catalytique en deux étapes (Fig. 4A). La première cystéine du site actif réalise une attaque nucléophile du pont disulfure du substrat, entraînant la réduction d'une des deux cystéines de ce pont et la formation d'un pont intermoléculaire entre la thiorédoxine et son substrat. Ce pont disulfure inter-moléculaire est ensuite attaqué par la deuxième cystéine du site actif, permettant la libération du substrat réduit et de la thiorédoxine oxydée [42]. Une fois oxydées, les thiorédoxines peuvent être réduites par une enzyme à FAD NADPH-dépendante, la thiorédoxine réductase [43]. L'abondance et le potentiel redox très bas (-270 mV pour Trx1 chez *E. coli*) des thiorédoxines [43] en font des thiol-réductases majeures. Les thiorédoxines sont incapables de réduire directement les IRO [44]. En revanche, leur implication dans le cycle catalytique de nombreuses peroxydases leur confère un rôle majeur dans la réduction des peroxydes (Fig. 4B).

A



B

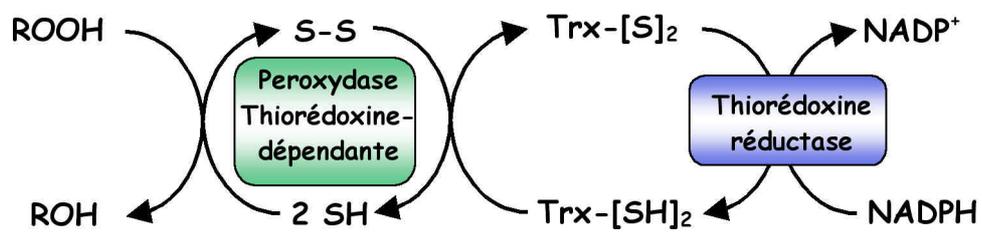


Figure 4. Réduction des ponts disulfures par les thioredoxines A. Modèle illustrant l'activité thiol-transférase des thioredoxines. B. Réduction des thiol-peroxydases thioredoxine-dépendantes grâce au pouvoir réducteur du NADPH.

La voie du glutathion. Le glutathion (GSH) est un tripeptide glutamate-cystéine-glycine présent dans la cellule à des concentrations de l'ordre du millimolaire (revues [45, 46]). Le glutathion est un composé redox qui peut être présent soit sous forme réduite (GSH) soit sous forme oxydée (GSSG). L'oxydation du GSH en GSSG fait intervenir la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre les résidus cystéines de deux molécules. Le couple GSH/GSSG possède un potentiel redox de -240 mV. L'abondance du glutathion associé à son pouvoir réducteur élevé lui ont valu d'être défini dans de nombreuses études, comme un tampon redox, capable d'absorber les équivalents oxydants. Cependant, la capacité du GSH à réduire directement les IRO *in vivo* est discutable. En revanche, il participe activement à la réduction des peroxydes par le biais de glutathion peroxydases qui utilisent le GSH comme donneur d'électrons. La forme oxydée dimérique GSSG peut être réduite en deux molécules de GSH par l'action d'une enzyme à FAD NADPH-dépendante, la glutathion réductase.

Les glutarédoxines. sont de petites protéines capables, à l'instar des thiorédoxines, d'activité thiol-transférase (revue par [47]). A la différence des thiorédoxines, elles utilisent le pouvoir réducteur du NADPH via le glutathion et la glutathion réductase pour catalyser la réduction de ponts disulfures ou de disulfures mixtes protéine-glutathion .

Deux types de glutarédoxines ont été décrites en fonction de leur activité catalytique et de leur séquence : les glutarédoxines à dithiol (consensus CPYC), généralement associées à la réduction de ponts disulfures et des disulfures mixtes, et les glutarédoxines à monothiol (consensus PXCG/AFS/P) (bien qu'elles puissent contenir plus d'une cystéine) dont l'activité est généralement restreinte à la réduction des disulfures mixtes. Le rôle physiologique de ces enzymes dans la réponse au stress oxydant est encore très mal connu. En particulier, il n'existe pas d'exemple de thiol-peroxydase dont la réduction dépende des glutarédoxines. Cependant, une étude récente a montré que les glutarédoxines à dithiol de *S. cerevisiae* seraient elles-mêmes capables d'activité peroxydase *in vitro* [48].

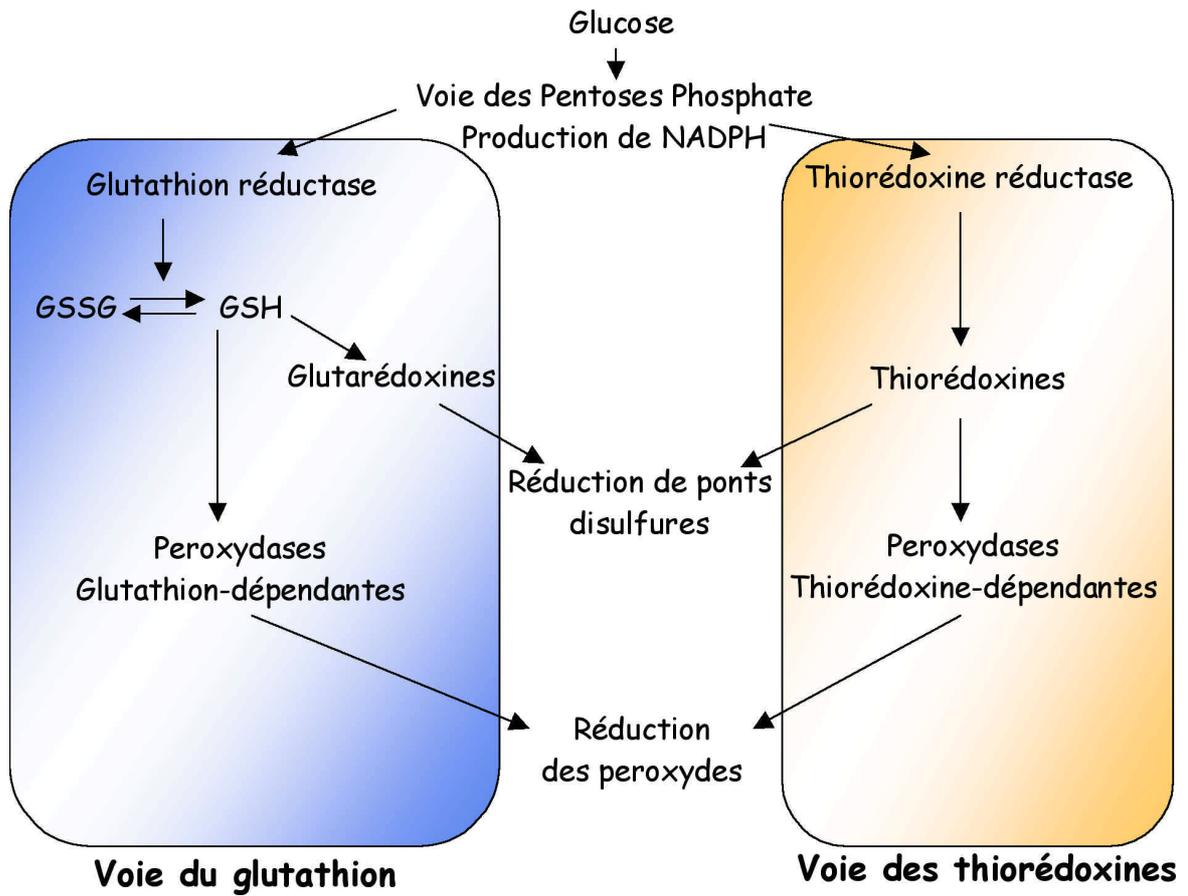


Figure 5. Les voies de réduction impliquant des enzymes à thiol réactif. Modèle décrit chez les microorganismes. Le pouvoir réducteur du NADPH, provenant de l'oxydation du glucose, est utilisé pour la réduction de ponts disulfures (illégitimes, régulateurs ou présents dans le cycle catalytique de certaines enzymes, comme la ribonucléotide réductase ou la PAPS réductase) et pour la réduction des peroxydes.

Deux chaînes de transfert d'électrons dépendent du pouvoir réducteur du NADPH.

L'ensemble des systèmes de réduction impliquant des enzymes à thiol réactif utilise le NADPH comme donneur final d'électrons. La voie des pentoses phosphate permet le couplage entre l'oxydation du glucose et le recyclage de NADPH, grâce à l'action de deux enzymes, la glucose 6-phosphate deshydrogénase (G6PDH) et la gluconate-6-phosphate deshydrogénase. Le potentiel redox très bas (-315 mV) du couple NADPH/NADP⁺ permet un transfert d'électrons suivant un gradient de potentiel (Fig. 5). Le pouvoir réducteur du NADPH est transféré aux premières réductases grâce à la présence d'un groupement FAD. La réduction du FAD en FADH₂ permet, au sein de ces mêmes enzymes, la réduction d'un premier pont disulfure. La régénération de ce dithiol, doté d'une activité thiol-transférase, permet ensuite la réduction d'autres ponts disulfure, selon un gradient de potentiel. Ainsi, la thiorédoxine réductase et la glutathion réductase réduisent respectivement la thiorédoxine et le glutathion. Le glutathion peut ensuite donner ses électrons aux différentes glutarédoxines (dont le potentiel varie entre -198 et -233 mV chez *E. coli*) [49]. La description de ces systèmes définit deux voies de réduction à priori distinctes, la voie des thiorédoxines, constituée de la thiorédoxine réductase et de la thiorédoxine et la voie du glutathion, constituée de la glutathion-réductase, du glutathion et des glutarédoxines (Fig. 5). La séparation de ces deux voies est compatible avec l'ensemble des données expérimentales obtenues à ce jour. Cependant, les potentiels redox calculés pour chaque réductase n'excluent pas qu'une équilibration du flux d'électrons d'une voie à l'autre puisse se faire (Par exemple, la glutathion réductase peut théoriquement réduire la thiorédoxine). Ces données suggèrent que les réactions permettant le transfert d'électrons entre les différents acteurs d'une voie sont soumises à un contrôle cinétique et ne résultent pas d'une équilibration des potentiels.

Conclusion

Ainsi, les thiorédoxines et le glutathion permettent, par l'intermédiaire d'enzymes à FAD, la régénération de la forme active réduite des peroxydases par un échange dithiol/disulfure. Le pouvoir réducteur du NADPH est donc utilisé pour protéger la cellule contre les variations de la concentration en peroxydes. Outre leur implication dans la réduction des peroxydes, la

capacité des enzymes de la voie du glutathion et des thiorédoxines à réduire des ponts disulfures est essentielle au maintien de l'équilibre « thiol-redox » cytoplasmique. Celui-ci implique non seulement la réduction de ponts disulfures illégitimes s'ils existent, mais également la réduction spécifique d'enzymes, telles que la ribonucléotide réductase, dont le cycle catalytique comporte une étape de réduction. Le rôle des thiol-transférases est encore très mal connu. En particulier, le rôle essentiel du glutathion chez *S. cerevisiae* [50] n'est pas connu.

(iii) Les différentes familles de thiol-peroxydases

Deux classes majeures de peroxydases ont été décrites : les peroxyrédoxines (Prx) et les glutathion-peroxydase (Gpx).

- Les peroxyrédoxines ou la famille AhpC/Tsa

L'activité des peroxyrédoxines dépend de la présence d'un résidu cystéine absolument conservé au sein du motif VCP. En fonction de la présence d'une deuxième cystéine conservée, les peroxyrédoxines sont classées en 1-Cys ou 2-Cys Prx [51]. Les 2-Cys-Prx ont été les plus étudiées, grâce à deux enzymes modèles, Tsa1 chez *S. cerevisiae* et AhpC chez *E. coli*. Le cycle catalytique de ces enzymes inclut la formation de deux ponts disulfures intermoléculaires entre deux sous-unités d'un homodimère (Fig. 6). Ainsi, la cystéine réactive d'une sous-unité est oxydée par le H₂O₂ en acide sulfénique puis forme un pont disulfure avec la deuxième cystéine conservée de l'autre sous-unité [40, 44, 52-54]. La réduction de Tsa1 est dépendante des thiorédoxines *in vitro* et *in vivo* ([44, 55], données du laboratoire). A la différence de Tsa1, la réduction d'AhpC ne dépend pas de la voie des thiorédoxines, mais d'une enzyme spécifique AhpF, dont le gène est exprimé en opéron avec *ahpC* [56]. AhpF catalyse la réduction d'AhpC en utilisant le pouvoir réducteur du NADH (et dans une moindre mesure du NADPH) [57], grâce à la présence au sein de la même enzyme d'un groupement FAD et de deux dithiols réactifs [52]. AhpF est donc fonctionnellement apparenté au système thiorédoxine/thiorédoxine réductase, dont il présente également les caractéristiques structurales [58-60]. Un changement de conformation de l'enzyme au cours des différents transferts d'électrons permet à l'enzyme de passer de l'activité thiorédoxine réductase à l'activité thiorédoxine.

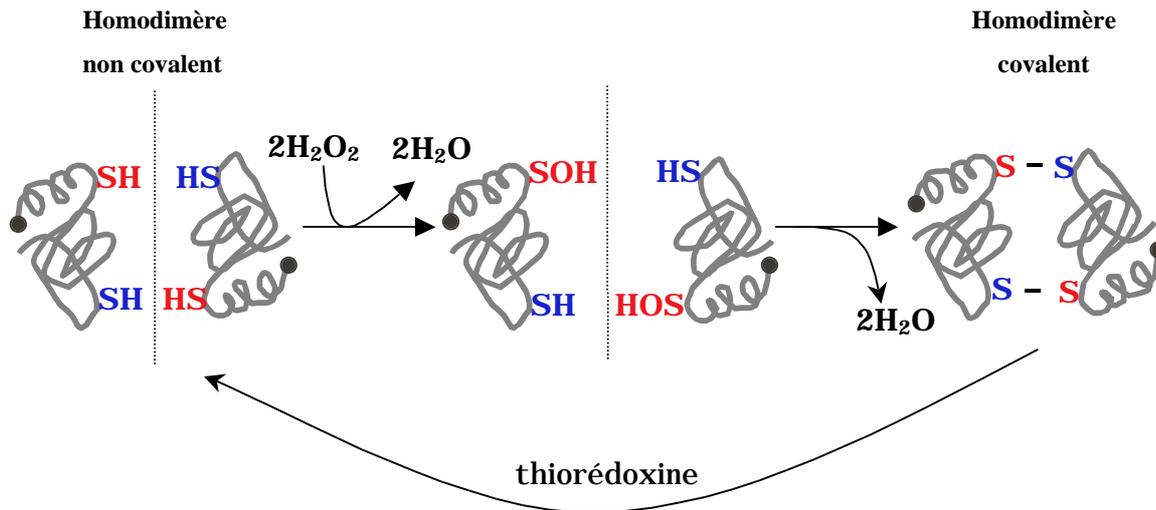


Figure 6. Modèle de réduction catalytique des peroxydes par les 2-Cys-peroxyrédoxines: l'exemple de Tsa1. La cystéine catalytique (en rouge) de chaque monomère réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former un acide sulfénique. Cette espèce réagit ensuite avec la deuxième cystéine conservée (en bleu) de l'autre monomère et forme un pont disulfure intermoléculaire, réductible par les thiorédoxines.

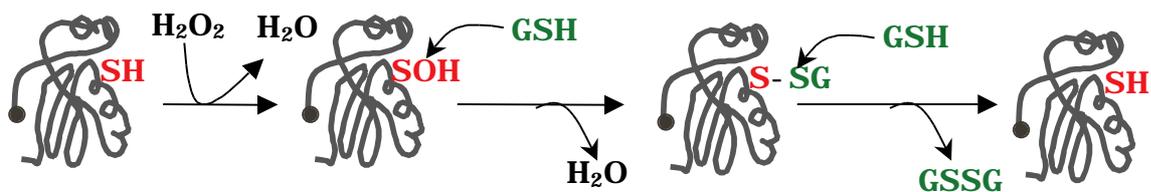


Figure 7. Modèle de réduction catalytique des peroxydes par les GPx (glutathion peroxydase). La cystéine (ou la sélénocystéine) catalytique réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former un acide sulfénique (séléninique). Cette espèce réagit ensuite avec une molécule de glutathion pour former un pont disulfure mixte, qui est ensuite réduit par une deuxième molécule de glutathion.

S. cerevisiae contient cinq peroxyrédoxines [61]. Pourquoi la cellule maintient-elle une telle diversité ? L'étude des peroxyrédoxines de *S. cerevisiae* suggère que ces enzymes ont à la fois des fonctions redondantes et spécifiques. Trois de ces enzymes sont cytoplasmiques, une est mitochondriale et la dernière nucléaire [61]. D'autre part, les trois enzymes cytoplasmiques, Tsa1, Ahp1 et Tsa2, présentent des spécificités de substrat différentes : Tsa1 réduit préférentiellement H₂O₂ alors que l'affinité d'Ahp1 est plus grande pour les peroxydes organiques [44, 61-63]. Enfin, Tsa2 serait capable de réduire les peroxy-nitrites [64].

E. coli contient également une autre protéine de la famille AhpC/Tsa, appelée BCP pour « Bacterioferritin Comigratory Protein », dont l'activité dépend, au moins *in vitro*, de la voie des thiorédoxines [65].

- Les glutathion-peroxydases

Les glutathion-peroxydases (GPx) ont été les premières thiol-peroxydases découvertes, initialement décrites chez les Eucaryotes supérieurs, comme des sélénio-enzymes, capables de catalyser la réduction des peroxydes. Leur activité catalytique repose sur l'oxydation d'une sélénocystéine catalytique en acide séléninique et sur sa réduction par le glutathion (Fig. 7). L'acide séléninique réagit avec une molécule de GSH, formant un pont disulfure mixte entre la protéine et le glutathion (Protéine-Cys-S-SG). Ce pont est ensuite attaqué par une deuxième molécule de glutathion qui permet la réduction de la cystéine catalytique de la peroxydase et la libération d'une molécule de GSSG [41]. Il existe deux types majeurs de GPx selon leur spécificité de substrat : les glutathion-peroxydases classiques (GPx), catalysant la réduction des hydroperoxydes solubles et les « phospholipide-hydroperoxyde glutathion-peroxydases » (PH-GPx), capable de réduire les hydroperoxydes de lipides estérifiés. Les GPx sont homotétramériques alors que les PH-GPx sont monomériques. La présence de GPx et de PH-GPx a récemment été décrite chez les levures. La découverte et le clonage chez *Hanseluna mrakii* [66] d'une activité GPx a permis d'identifier par homologie de séquence trois GPx chez *S. cerevisiae*, Gpx1, Gpx2 et Gpx3 [67]. Une comparaison de séquence avec les protéines mammifères a permis d'assimiler ces trois enzymes à des PH-GPx [68]. A la différence de la majorité des GPx eucaryotes, l'activité de ces enzymes ne dépend pas d'une

sélenocystéine mais d'un thiol réactif. La définition de leur activité catalytique en tant que GPx et PH-GPx a été établie grâce à des tests peroxydase *in vitro* en présence de glutathion et de glutathion réductase et de NADPH [67, 68].

La définition des Prx comme thiorédoxine-dépendantes et des GPx comme glutathion-dépendantes n'est pas absolue

D'après l'étude de protéines modèles, les protéines de la famille AhpC/Tsa sont généralement assimilées à des peroxydases thiorédoxine-dépendantes (TPx) et les protéines de la famille GPx, à des peroxydases glutathion-dépendantes. Or, cette attribution peut être abusive. En effet, des études *in vitro* ont montré que des protéines de la famille GPx sont en fait thiorédoxine-dépendantes ([69, 70]; voir résultats). L'analyse fonctionnelle de chaque peroxydase doit donc être rigoureuse et de nouvelles techniques permettant cette analyse *in vivo* doivent être mises au point.

4) Importance relative des anti-oxydants dans le contrôle de la concentration en H₂O₂ chez *S. cerevisiae* et *E. coli*

Le rôle physiologique des différents anti-oxydants décrits précédemment peut être évalué grâce à l'étude phénotypique de mutants présentant un défaut dans ces activités. Deux systèmes expérimentaux sont utilisés afin de déterminer le rôle d'une activité dans la tolérance de la cellule aux oxydants. Le premier mesure la survie de la cellule après une exposition brève mais intense à un oxydant ; il est réalisé en milieu liquide et est appelé test de survie. Le deuxième mesure la capacité de la cellule à croître et à survivre en présence de cet oxydant ; il est réalisé en milieu solide et est appelé test en gouttes. Alors que le test de survie mesure une toxicité aiguë, le test en gouttes mesure la capacité de la cellule à croître en présence de l'oxydant au cours d'une exposition prolongée.

(a) La réponse anti-oxydante aux peroxydes chez *S. cerevisiae*.

(1) Deux peroxyrédoxines, Tsa1 et Ahp1 et une GPx , Gpx3 sont essentielles pour la résistance aux peroxydes.

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe trois types d'enzymes capable de réduire les peroxydes : les peroxyrédoxines, les glutathion-péroxydases et les catalases. L'importance physiologique de chacune de ces activités a été testée: des souches invalidées pour chacun des gènes correspondants ont été créés et leur sensibilité aux peroxydes a été mesurée par test en gouttes. Il en résulte que trois enzymes contribuent de façon prédominante à la résistance aux peroxydes. Les souches invalidées pour *TSA1* et *AHP1* sont hypersensibles au H₂O₂ et au t-butyl-hydroperoxyde respectivement [63, 71]. De plus, l'invalidation simultanée de ces deux gènes altère très sévèrement la capacité de la souche mutante à croître en conditions aérobies (Biteau et Toledano, données non publiées). Ces deux peroxyrédoxines jouent donc un rôle majeur dans le contrôle de la concentration en peroxydes. Parallèlement, l'invalidation simultanée des trois glutathion-péroxydases [67, 68] entraîne une hypersensibilité au H₂O₂ et aux hydroperoxydes de lipides. Ce phénotype est essentiellement associé à l'invalidation de *GPX3* [67, 68].

L'analyse du rôle des catalases chez la levure repose sur un nombre très restreint d'études. En particulier, aucune étude phénotypique de type test en gouttes n'a été réalisée chez des mutants acatalasémiques. En revanche, la survie d'un mutant acatalasémique est compromise après exposition à de fortes doses de H₂O₂, et dans ce cas, sa capacité à mettre en place une réponse d'adaptation est altérée [72]. Une autre étude montre que l'activité catalase ne semble requise chez *S. cerevisiae*, que lorsque les autres activités anti-oxydantes, en particulier le glutathion, font défaut [73].

L'ensemble de ces études suggère que les catalases n'ont pas un rôle de premier plan dans la réduction des peroxydes chez *S. cerevisiae* et que les thiol-péroxydases apparaissent donc comme les activités essentielles au contrôle de la concentration en peroxydes chez cet organisme.

(2) Le rôle des thiorédoxines dans la réduction des peroxydes

L'invalidation de la thiorédoxine réductase (*TRR1*) (données du laboratoire ; [74]) et l'invalidation simultanée des deux thiorédoxines cytoplasmiques (*TRX1* et *TRX2*) (données du laboratoire ; [55]) entraînent une hypersensibilité très marquée des mutants au H₂O₂. La voie des thiorédoxines joue donc un rôle central en réponse aux peroxydes. Quel est ce rôle ? La surexpression d'Ahp1 permet d'augmenter la résistance de la cellule aux peroxydes organiques, sauf en l'absence de *TRX1* et *TRX2* [63] et Tsa1 et Ahp1 sont décrites comme des enzymes thiorédoxine-dépendantes *in vitro* et *in vivo* [44, 62, 63]. Ces données suggèrent donc que le rôle essentiel joué par les thiorédoxines dans la tolérance aux peroxydes est au moins en partie relayé par ces deux thiol-péroxydases.

(3) Le glutathion est essentiel en cas de stress aigu

Le caractère essentiel du glutathion chez *S. cerevisiae* a rendu son étude difficile et a souvent engendré des résultats contradictoires. La construction dans le laboratoire d'une souche contenant une quantité très réduite de glutathion, ySOG [50]; voir résultats) a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de ce dernier en cas de stress aigu. A la différence des mutants de la voie des thiorédoxines, les mutants de la voie du glutathion ne présentent qu'une sensibilité très modérée aux peroxydes en test en gouttes [50]. En revanche, la survie d'une souche ySOG est significativement diminuée après exposition des cellules à de fortes doses de H₂O₂. Le rôle physiologique du glutathion en tant que réducteur des peroxydases glutathion-dépendantes reste mal connu.

(4) Le rôle essentiel du NADPH

Comme nous l'avons vu auparavant, le dénominateur commun des thiol-péroxydases est leur dépendance vis-à-vis du NADPH. La principale voie de réduction du NADP⁺ en NADPH est le cycle des pentoses phosphate. Or, l'inactivation de certaines enzymes de la voie des pentoses, en particulier la G6PDH [75, 76] entraîne une augmentation de la sensibilité des mutants au H₂O₂. Il a été montré par la suite que l'inactivation de chacune des enzymes de la voie des pentoses confère une hyper-sensibilité aux oxydants [77]. Les profils d'expression génique en réponse au H₂O₂, suggèrent une redistribution des activités en faveur de la voie

des pentoses phosphate et donc de la production de NADPH et soulignent d'autant l'importance de ce métabolite au cours des réponses anti-oxydantes. [23].

(5) Conclusion

Les études phénotypiques ont permis de montrer que les thiol-péroxydases et la voie des thiorédoxines ont un rôle prédominant dans le contrôle de la concentration en peroxydes chez la levure. La tolérance de la levure vis-à-vis des peroxydes dépend donc ultimement du pouvoir réducteur du NADPH.

(6) Le phénomène de compensation

Les données phénotypiques suggèrent que la tolérance de la cellule aux peroxydes implique au moins trois peroxydases différentes. Or, l'absence d'une de ces enzymes peut être compensée par la stimulation de l'expression des autres anti-oxydants. Ainsi, l'invalidation d'*AHP1* entraîne une stimulation de l'expression de *TSA1* [61]. L'induction de cette autre peroxydase minore sans doute le phénotype observé pour le simple mutant *ahp1*. Ce phénomène montre donc qu'il est difficile de quantifier pratiquement le rôle physiologique d'une activité en étudiant le phénotype du mutant correspondant même si l'existence de cette compensation est une preuve indirecte de l'importance d'une activité donnée.

Plus spécifiquement, ce phénomène de compensation confirme l'importance du contrôle de la concentration en peroxydes car il met en avant l'existence de rétrocontrôles permettant à la cellule de détecter un défaut de réduction des peroxydes.

(b) La réponse anti-oxydante aux peroxydes chez E.coli.

(1) Deux enzymes essentielles au contrôle de la concentration en peroxydes : le système peroxydatique AhpCF et la catalase KatG

Le contrôle de la concentration en peroxydes fait intervenir deux systèmes enzymatiques majeurs chez *E. coli*: les catalases, en particulier katG et le système AhpCF, aussi appelé AhpR pour « alkyl-hydroperoxyde-reductase » [78, 79]. Les activités de KatG et d'AhpR présentent deux niveaux de complémentarité : i) KatG réduit spécifiquement l' H_2O_2 , alors qu'AhpR peut réduire l' H_2O_2 et les peroxydes organiques ii) AhpR n'est efficace qu'aux

faibles doses de H₂O₂ alors que KatG peut réduire des doses plus importantes. Ainsi, AhpR est responsable de la réduction des faibles doses de peroxyde d'hydrogène produites par le métabolisme cellulaire [80]. A de plus fortes doses, le défaut d'activité d'AhpR est compensé par KatG, dont l'activité est stimulée lorsque les doses de peroxyde d'hydrogène augmentent [80]. Ainsi, l'inactivation de katG (combinée ou non avec l'inactivation de katE, la deuxième catalase existant chez *E. coli*) entraîne une hypersensibilité marquée au H₂O₂ [36, 37, 81]. Parallèlement, l'inactivation d'AhpR ne présente qu'un faible défaut de tolérance au H₂O₂. Ce phénotype peu marqué observé pour la souche *ahpR*⁻ est lié à l'utilisation de doses d'H₂O₂ trop fortes, l'induction de katG compensant alors l'absence d'AhpR [80]. L'expression de KatG [82] et d'AhpR [17] est induite en réponse au H₂O₂ et le rôle complémentaire essentiel d'AhpR et de KatG dans le contrôle de la concentration en H₂O₂ est souligné par l'observation d'un important défaut de croissance en aérobiose lorsque ces deux activités sont absentes simultanément [80]. Parallèlement, AhpR est impliqué dans la résistance aux alkyl-hydroperoxydes [57, 79], La réduction des alkyl-hydroperoxydes par AhpR et non KatG est compatible avec le mode d'action de ces enzymes (en particulier, le site actif des catalases ne permet pas la réduction des peroxydes complexes).

(2) Quel rôle pour la voie des thiorédoxines ?

Chez *S. cerevisiae*, la voie des thiorédoxines joue un rôle majeur dans le contrôle de la concentration intracellulaire en peroxydes, par l'intermédiaire de peroxydases thiorédoxine-dépendantes. Or, chez *E. coli*, AhpR et KatG sont indépendants des voies thiol-rédox classiques. Dans ce cadre, les thiorédoxines sont-elles impliquées dans le contrôle de la concentration en peroxydes chez *E. coli* ? Seules deux activités peroxydase thiorédoxine-dépendantes ont été décrites chez *E. coli*, une protéine de 20 kD, tpx aussi appelée p20 [83], et une protéine de la famille Tsa/AhpC, BCP [65]. Les données *in vitro* suggèrent que Bcp et tpx se comportent préférentiellement comme des alkyl-hydroperoxydases. Tpx est une protéine périplasmique [83] et son absence, comme celle de Bcp entraîne une hypersensibilité des souches aux peroxydes [65, 84]. L'activité de ces deux enzymes pourrait rendre compte d'un rôle éventuel des thiorédoxines dans la réponse aux peroxydes chez *E. coli*. L'étude phénotypique de mutants affectés dans la voie des thiorédoxines n'a pas permis de conclure

quant au rôle physiologique de cette voie chez *E. coli*. A la différence de *S. cerevisiae*, la double délétion des deux thiorédoxines cytoplasmiques, *trxA* et *trxC* n'entraîne pas d'hyper-sensibilité au H_2O_2 ; le double mutant est paradoxalement hyper-résistant au H_2O_2 [85, 86]. Ce phénotype peut être expliqué par un phénomène de compensation. En effet, l'hyper-résistance observée chez un mutant *trxB*⁻ (invalidé pour la thiorédoxine reductase) est entre-autres liée à l'induction des catalases [85].

(3) Quel rôle pour le glutathion ?

A la différence de la levure, le glutathion n'est pas essentiel chez *E. coli* : l'invalidation du gène *gshA*, codant la première enzyme de biosynthèse du GSH n'entraîne aucun défaut de croissance. De plus, contrairement à ce qui est observé chez *S. cerevisiae*, aucune sensibilité des mutants *gshA* n'est constatée en test de survie [87]. Le glutathion ne semble jouer aucun rôle dans la tolérance aux peroxydes chez *E. coli*.

B. les régulons

Comme nous l'avons vu précédemment, la cellule répond aux oxydants par la mise en place d'une résistance cellulaire acquise. Cette réponse physiologique est globale et implique l'activation et la répression transcriptionnelle d'un nombre important de gènes. D'autres niveaux d'activation existent, mais leur rôle dans la réponse au stress oxydant sont moins connus (contrôle de la stabilité des ARNs, modifications post-traductionnelles...). Des régulateurs, capables de détecter un signal de stress spécifique convertissent ce signal en réponse transcriptionnelle. Ces régulateurs contrôlent l'expression d'un ensemble de gènes appelé régulon.

1) Caractérisation des régulons peroxyde et superoxyde chez *E. coli*.

Chez *E. coli*, les réponses aux peroxydes et au superoxyde impliquent deux régulons bien distincts : le régulon OxyR contrôle la majorité des anti-oxydants en réponse aux peroxydes et le régulon SoxR répond spécifiquement au stress superoxyde induit par la présence de composés à activité redox cyclique.

		Induction ^a		
Gène	Fonction	ARN / essais- -galactosidase	Gels 2D ^b	Puces à ADN ^c
Voie du glutathion				
<i>gorA</i>	Glutathione réductase		H, OxyR ^C	H
<i>grxA</i>	Glutarédoxine 1	H, [94]	H	H
Voie des thioredoxines				
<i>trxC</i>	Thioredoxin 2		H	H
Autres antioxydants				
<i>ahpC</i>	Alkyl Hydroperoxyde peroxydase		H, OxyR ^C	H
<i>ahpF</i>	Réductase d'AhpC		H, OxyR ^C	H
<i>sufE</i>	oxydoréductase			H
<i>katG</i>	Catalase		H, OxyR ^C	H
<i>hemH</i>	Ferrochelatase synthèse de l'hème			H
<i>hemF</i>	Coproporphyrinogène III oxydase. synthèse de l'hème	H, [95]		
<i>sodA</i>	Mn-SOD		OxyR ^C	
Protéines du métabolisme du soufre				
<i>sufA</i>	Synthèse des centres Fer-Soufre		H	H
<i>sufS</i>	Homologue à NifS sélénocystéine lyase		H	H
Pompes à efflux				
<i>sufB</i>	Transporteur ABC			H
<i>sufC</i>	Transporteur ABC			H
<i>sufD</i>	Transporteur ABC			H
Régulateurs				
<i>fur</i>	Répresseur de l'import de fer	H [96]		H
<i>OxyR</i>	Régulateur de la réponse aux peroxydes	H,[93, 97]		
<i>OxyS</i>	ARN régulateur de la réponse aux peroxydes	[97]		
<i>rcsC</i>	Régulateur de la synthèse des polysaccharides de la paroi	H, [95]		
Métabolisme				
<i>zwf</i>	G-6-P deshydrogénase		OxyR ^C	
<i>gldA</i>	Glycérol deshydrogénase	H, [95]		
Autres				
<i>dps</i>	Protéine de liaison à l'ADN (non spécifique)		OxyR ^C	H
<i>flu</i>	Antigène 43			H
<i>fhuF</i>	Réductase de fer ferrique			H
<i>uvrD</i>	ATPase ADN-dépendante, ADN hélicase	[95]		

^a H = Peroxyde d'hydrogène, OxyR^C = mutant constitutif d'OxyR

^b Gels bidimensionnels des protéines [17] [92]

^c Zheng et col., 2001 [25]

Tableau 1. Principaux gènes contrôlés par OxyR. Les gènes dont l'expression est réprimée par OxyR sont notés en gris.

Ainsi, l'invalidation d'OxyR entraîne une hypersensibilité aux peroxydes [88], alors que celle de SoxR diminue la tolérance de la cellule aux composés générateurs d'ions superoxyde, tels que le paraquat ou la ménadione [89]

(a) Le régulon OxyR (Tableau 1)

Le locus OxyR a été identifié dans un crible génétique recherchant des mutants hyper-résistants au H₂O₂ [17] et code un régulateur majeur de la réponse aux peroxydes chez *E. coli* [88, 90]. OxyR est un activateur de transcription de la famille LysR, en particulier capable d'activer l'expression de KatG et d'AhpC en réponse au H₂O₂ [17, 91, 92]. Il peut en outre fonctionner comme un répresseur de sa propre expression [88, 93]. Une analyse globale du régulon OxyR a permis d'identifier une vingtaine de gènes dont l'expression est stimulée par le peroxyde d'hydrogène de façon OxyR dépendante (tableau 1) [17, 25, 91, 92]. Parmi ces gènes se trouvent, outre *katG* et *ahpC*, *ahpF*, des gènes codant la voie des thiorédoxines et du glutathion (*grxA*, codant la glutarédoxine 1, *gorA*, codant la glutathion réductase et *trxC*, codant la thiorédoxine 2) [25].

(b) Le régulon SoxRS (Tableau 2)

Le locus SOX a été identifié par deux cribles indépendants, l'un recherchant des mutants hyper-résistants à la ménadione, un composé à activité redox cyclique générateur d'ions superoxyde [98], l'autre permettant l'expression constitutive de gènes normalement induits par ces composés [89]. L'identification du locus SOX a révélé l'existence de deux gènes *soxS* et *soxR* [99, 100]. *soxR* et *soxS* codent tous deux des facteurs de transcription appartenant respectivement à la famille MerR et AraC. L'activation de SoxR par des composés à activité redox cyclique, stimule l'expression de SoxS [101, 102]. SoxS active ensuite le régulon SoxRS en se liant spécifiquement aux promoteurs de ses gènes cibles [99, 103] (voir aussi Fig. 10). Le régulon SoxS est constitué de 37 gènes induits et de 58 gènes réprimés [24]. Les gènes induits par SoxS comprennent en particulier *sodA* et *zwf*, codant respectivement la Mn-SOD et la G6PDH [89]. SoxS induit également la synthèse d'isoenzymes redox-résistantes en remplacement de certaines enzymes redox-sensibles [104]. Ainsi l'induction de *fumC* codant pour une fumarase redox-résistante permet le maintien de cette fonction dans le cycle de Krebs [105].

		Induction ^a		
Gène	Fonction	ARN / essais- -galactosidase	Gels 2D ^b	Puces à ADN ^c
Réductases				
<i>fldA</i>	flavodoxine			+
<i>fpr</i>	Ferredoxine réductase NADPH dépendante	P [106] H [107]		+
<i>nfnB</i>	nitroréductase			+
Antioxydants				
<i>sodA</i>	Mn-SOD	P [89, 98] H (Manchado et col., 2000) <i>sod⁻</i> [102]	SoxR ^C	+
Protéines du métabolisme du soufre				
<i>cysK</i>	Cystéine synthase A			+
<i>map</i>	Méthionine aminopeptidase			+
Régulateurs				
<i>fur</i>	Répresseur de l'import de fer	P [96]		+
<i>micF</i>	ARN régulateur de la réponse superoxydes	P [108] H [107]		
<i>soxS</i>	Régulateur de la réponse au superoxyde	P, Répression de <i>soxS</i> par lui même [109]		
Métabolisme				
<i>zwf</i>	G-6-P deshydrogénase	P [89, 98]	SoxR ^C	+
<i>fumC</i>	Fumarase C	P [105] <i>sod⁻</i> [104, 110]		
Autres				
<i>nfo</i>	Endonucléase IV	P [89, 98]	SoxR ^C	+
<i>acrA</i>	Composant de la pompe à efflux AcrAB	Surexpression de SoxS [111]		
<i>tolC</i>	Pompe à efflux	Surexpression de SoxS [111]		
<i>ompF</i>	Porine (régulation indirecte par <i>micF</i>)			+
<i>lpxC</i>	Enveloppe et division cellulaire			+

^a P = Paraquat, H = Peroxyde d'hydrogène; SoxR^C = mutant constitutif de SoxR, *sod⁻* : mutants déficients en superoxyde-dismutase

^b Greenberg et col., 1990 [98]

^c Pomposiello et col., 2001 [24] (gène dont l'expression est modulée à la fois par le paraquat et la surexpression de SoxS)

Tableau 2. Principaux gènes contrôlés par SoxRS. Les gènes dont l'expression est réprimée par SoxR sont notés en gris.

De même, l'induction Sox-dépendante d'une NADPH ferredoxine réductase (*fpr*) permet une compensation de l'inactivation de la pyruvate ferredoxine réductase [106]. La définition du régulon SoxRS par puce à ADN a été réalisée dans des conditions de surexpression de SoxS [24]. Ainsi, ce protocole expérimental mime l'activation de SoxRS par l'ion superoxyde mais ne la reproduit probablement pas fidèlement. De fait, parmi les gènes induits par la surexpression de SoxS, seuls 14 sont induits en réponse par le paraquat. La définition du régulon SoxRS donnée par Pomposiello et col.[24] dépasse donc la simple activation de SoxS par le stress superoxyde .

(c) Spécificité des réponses peroxyde et superoxyde

Les régulons OxyR et SoxR sont décrits comme deux régulons indépendants répondant spécifiquement l'un à une augmentation de la concentration en peroxydes et l'autre à la production d'ions superoxyde par les composés à activité redox cyclique. Cette spécificité est le résultat de leur capacité à détecter chacun des signaux redox différents (voir chapitre III). Cependant, un certain nombre de gènes du stimulon peroxyde sont également induits par l'exposition des cellules à l'ion superoxyde [21, 24]. Ceci peut être expliqué par la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène, permettant l'activation secondaire d'OxyR [112]. En revanche, il est plus difficile de comprendre l'activation du régulon SoxRS en réponse au peroxyde d'hydrogène [25, 107]. Cette activation intervient à des doses plus importantes de H₂O₂ et suggère que SoxR peut être activé même indirectement par le H₂O₂. Les bases moléculaires responsables de cette activation sont inconnues.

(d) Existence d'autres régulateurs

Qu'il s'agisse de la réponse peroxyde ou superoxyde, le nombre de gènes induits ou réprimés dépasse largement le nombre des gènes régulés par SoxRS ou OxyR, suggérant l'existence d'autres régulateurs capables de ressentir les stress imposés. Le recrutement de ces autres régulateurs peut être indirect.

- L'exemple du represser Fur (pour « ferric iron uptake »)

L'expression du régulateur Fur est par exemple stimulée de façon OxyR ou SoxR-dépendante en réponse au peroxyde d'hydrogène ou à l'ion superoxyde respectivement [96]. Fur est un represser qui régule l'expression de protéines impliquées dans le transport du fer en inhibant leur transcription lorsque le fer est abondant [113]. Le rôle physiologique de cette induction pourrait être lié à la nécessité de réprimer l'import de fer en présence d'ions superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène, conditions dans lesquelles la production de radical hydroxyle par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss est favorisée. Cette hypothèse est étayée par l'observation d'une hypersensibilité au H₂O₂ et d'une augmentation du taux de mutations spontanées dans une souche invalidée pour *fur* [114].

- La double réponse à la ménadione, un composé générateur d'ions superoxyde

Deux composés à activité redox cyclique, la ménadione et le paraquat, sont couramment utilisés pour créer expérimentalement un stress superoxyde. Or l'étude des régulons répondant à ces deux composés dévoile un autre niveau de complexité de cette réponse. Le principal régulateur activé par le paraquat est SoxR alors que la ménadione active SoxRS mais également un autre régulateur, MarA [24, 115]. MarA est un facteur de transcription de la même famille que SoxS, impliqué dans la résistance pléiotropique aux antibiotiques. La ménadione est donc capable d'activer à la fois SoxRS et MarA par des signaux différents. Les moyens utilisés pour produire expérimentalement l'ion superoxyde font que cette réponse, contrairement à la réponse peroxyde, n'est jamais pure. Premièrement, les composés à activité redox cyclique présentent une réactivité chimique qui leur est propre. Ainsi, la réactivité chimique de la ménadione est vraisemblablement responsable de l'activation de MarA. Deuxièmement, l'exposition de la cellule à ces composés entraîne à une oxydation du pool de NADPH [116]. Les moyens techniques limitent donc l'étude du stress superoxyde au sens strict. La majorité des études portant sur SoxR ont ainsi été réalisées avec le paraquat, une molécule dont les effets parallèles semblent les plus limités.

2) Le régulon peroxyde chez *S. cerevisiae* (Tableau 3)

Chez *S. cerevisiae*, la réponse au peroxyde d'hydrogène est essentiellement contrôlée par le facteur de transcription Yap1, qui régule, en association avec un autre facteur de transcription, Skn7, la majorité des anti-oxydants induits par le H₂O₂ (voir Tableau). L'inactivation de *YAP1* [117, 121, 136] ou de *SKN7* [76] entraîne une hyper-sensibilité au H₂O₂, et une perte de la capacité d'adaptation.

(a) Yap1, le régulateur majeur de la réponse anti-oxydante aux peroxydes

Yap1 est un activateur de la transcription, identifié comme une protéine capable de se fixer spécifiquement au site de liaison à l'ADN du facteur de transcription mammifère AP-1 (ARE pour AP-1 recognition element) [137]. *YAP1* code une protéine de 650 acides aminés de la famille des « leucine-zipper » à domaine basique (b-ZIP), homologue à Gcn4 et c-jun [138]. A la différence des autres facteurs de la famille AP-1, le b-ZIP de Yap1 est situé en N-terminal de la protéine et permet une liaison spécifique de Yap1 à des sites A(T/G)ACTAA appelés YRE pour « Yap1 Response Element » [121, 139, 140]. Ce site est différent du site AP1 canonique. L'étude du régulon Yap1 par gel d'électrophorèse bi-dimensionnelle a montré que Yap1 contrôle l'expression de 32 protéines en réponse au H₂O₂ [123]. Yap1 induit en particulier l'expression de la majorité des activités anti-oxydantes, incluant les enzymes des voies des thiorédoxines et du glutathion, les peroxyrédoxines et les superoxyde-dismutases. Le régulon Yap1 comprend également des enzymes de la voie des pentoses phosphates. L'analyse du régulon Yap1 par puce à ADN a permis d'étendre le nombre de gènes dont l'expression est stimulée de façon Yap1-dépendante en réponse au H₂O₂ à environ 70 ([22]; Biteau et Toledano données du laboratoire). Yap1 apparaît donc comme un activateur majeur de la réponse peroxyde.

Gène	Fonction	Induction ^a			Régulation		
		Northern blot / essais- -galactosidase	Gels 2D ^b	Puces à ADN ^c	Northern blot / essais- -galactosidase	Gels 2D ^d	Puces à ADN ^c
Voie du glutathion							
GSH1	Glutamate-cystéine ligase	H, M [117]		H,D,M	Yap1 [117]		Yap1
GSH2	Glutathione synthétase	H, TB [118]		H,D,M	Yap1 [118]		Yap1
GLR1	Glutathione réductase	H, D [119]	H	H,D,M	Yap1 [119]	Yap1	Yap1
GPX1	Glutathione peroxydase	M [67]		H,D,M			
GPX2	Glutathione peroxydase	H, TB, CH, P, M, D [67]		H,D,M	Yap1 [67]		Yap1
GRX1	Glutarédoxine 1	H, M, D [120]	H	H,D,M			Msn2/4
GRX2	Glutarédoxine 2	H, M, D [120]		H,D,M			
Voie des thioredoxines							
TRX2	Thioredoxin 2	H, TB, M, D [121]	H	H,D,M	Yap1/Skn7 [121]	Yap1/skn7	Yap1
TRR1	Thioredoxin reductase 1	H, D [122]	H	H,D,M	Yap1/Skn7 [122]	Yap1/skn7	Yap1
TSA1	Thiol peroxydase	H, D [123, 124]	H	H,D,M	Yap1/Skn7 [123, 124]	Yap1/skn7	Yap1
AHP1	Thiol peroxydase	H, TB, D [63, 123]	H	H,D,M	Yap1/Skn7 [63]	Yap1/skn7	
mTPx	Thiol peroxydase	H, D [61]		H,D,M			
TSA2	Thiol peroxydase	H, D [61]	H	H,D,M		Yap1/skn7	Yap1
Autres antioxydants							
CCP1	Cytochrome-c peroxydase	H [123]	H	H,D,M	Yap1/Skn7 [123]	Yap1/skn7	Yap1
CTA1	Catalase A, peroxysomale			H			Yap1
CTT1	Catalase T, cytosolique	H [125, 126]	H	H,D,M	Msn2 [127]	Yap1/skn7	Msn2/4
SOD1	Superoxyde dismutase	H, P [128]	H	H,D,M		Yap1/skn7	Yap1
SOD2	Superoxyde dismutase	P [128]	H	H,D,M		Yap1/skn7	
CUP1	Métallothionéine	M [129]					
Protéines de choc thermique							
SSA1	famille H SP70	H [117, 130]	H	D	Yap1/Skn7 [123]; Skn7 [131]	Yap1/skn7	
SSA3	famille H SP70		H	D			
SSA4	famille H SP70			H,D			
HSP12	HSP	H [124]	H	H,D,M	Skn7 [131]; Msn2 [124]		Msn2/4
HSP26	HSP	H [127, 131]	H	H,D	Skn7 [131]; Msn2 [127]		
HSP42	HSP		H	H,D,M			
HSP82	HSP	H [123]	H	H,D	Yap1/Skn7 [123]	Yap1/skn7	
HSP104	HSP	H [131]	H	H,D,M	Skn7 [131]		
Pompes à efflux							
FLR1	Pompe à efflux ATP-dépendante	H, TB, D [132]		H,D,M	Yap1 [132]		Yap1
ATR1	Pompe à efflux ATP-dépendante			H,D,M			Yap1
Métabolisme des sucres							
ZWF1	G-6-P dehydrogenase	H [133]	H	H,D		Yap1	Yap1
TSL1	Trehalose-6-P synthase			H,D,M			Msn2/4
TPS1	Trehalose-6-P synthase		H	H,D		Yap1	
TPS2	Trehalose-6-P synthase			H,D,M			
ALD3	Aldéhyde dehydrogénase	M [134]		H,D			Msn2/4
Autres							
UBI4	Ubiquitine		H	H,D,M			
GRE1				H,D			
GRE2	Homologue à une dihydrofavonol réductase	H [135]	H	H,D,M		Yap1	Yap1
GRE3	Aldose réductase	H [135])		H,D,M			Msn2/4
PDI1	Protéine disulfide isomerase		H	D		Yap1	

^a H = Peroxyde d'hydrogène, TB = ter-butyl hydroperoxyde, D = Diamide, M = Ménadione, P = Paraquat, CH = Cumène Hydroperoxyde,

^b Godon et al., 1998 [23]

^c Gasch et al., 2000 [22]

^d Lee et al., 1999b [123]

Tableau 3. Liste des principaux gènes régulés par Yap1, Skn7 et Msn2/4.

(b) Skn7 participe au contrôle d'une partie du régulon Yap1

Skn7 a été identifié au cours d'un crible recherchant des mutants hyper-sensibles au peroxyde d'hydrogène [76, 141]. Skn7 est un facteur de transcription, dont la partie C-terminale présente des similitudes avec le domaine receveur des systèmes à deux composants procaryotes. D'autre part, la partie N-terminale de Skn7 est homologue au domaine de liaison à l'ADN, en hélice-tour-hélice, présent chez le facteur de transcription Hsf1 [141, 142]. Skn7 est nécessaire à l'induction d'environ la moitié des gènes du régulon Yap1, tel qu'il a été défini par gel d'électrophorèse à deux dimensions [123]. Cette étude a permis d'identifier deux sous-groupes séparant parmi les gènes Yap1-dépendants, les peroxyrédoxines et les enzymes de la voie des thiorédoxines, co-réglées par Yap1 et Skn7 et les enzymes de la voie du glutathion et des pentoses phosphates, dont l'induction est indépendante de Skn7. En réponse au H₂O₂, Skn7 ne contrôle aucun gène indépendamment de Yap1. La faculté de Skn7 à co-réguler l'expression de *TRX2*, *TRR1*, ou *TSA1* est associée à sa capacité à lier les promoteurs de ces gènes indépendamment de Yap1 [122, 123]. L'ensemble de ces données suggère que Yap1 et Skn7 coopèrent pour activer un certain nombre de gènes en réponse aux peroxydes.

(c) D'autres régulateurs sont impliqués dans la réponse peroxyde chez *S. cerevisiae*

Les régulons Yap1 et Skn7 ne représentent qu'une partie des gènes dont l'expression est modulée en réponse au peroxyde d'hydrogène. D'autres facteurs de transcription ont en effet été impliqués dans la mise en place de cette réponse.

- Les régulateurs Msn2 et Msn4

Les facteurs de transcription Msn2 et Msn4 se lient et activent l'expression de gènes contenant un Stress Response Element (STRE : CCCCT), en réponse à divers stress environnementaux, incluant le stress peroxyde mais aussi la transition diauxique et les stress osmotique, thermique et acide [143, 144]. Ainsi, en réponse au H₂O₂, l'induction d'environ 180 gènes est affectée par l'inactivation simultanée des régulateurs Msn2 et Msn4 [22] parmi lesquels, la catalase *CTT1*, plusieurs *HSP* et diverses enzymes du métabolisme des sucres [22,

145]. L'invalidation simultanée de *MSN2* et *MSN4* entraîne une hyper-sensibilité au H_2O_2 en test en gouttes. Cependant, ce mutant est toujours capable d'adaptation [145]. Cette étude phénotypique ainsi que l'étude protéomique des cibles de ces régulateurs indiquent que *Msn2/4* ne seraient pas impliqués dans le contrôle de l'homéostasie redox à proprement parlé mais permettraient la réparation ou la dégradation des composants endommagés et la réorganisation des voies métaboliques une fois cette homéostasie rétablie.

- Hsf1, Met4 et Rpn4

Le stimulon H_2O_2 compte un certain nombre de protéines de choc thermique (HSP) [23, 127, 131]. L'induction de ces gènes en réponse aux peroxydes est relayée par le facteur de transcription Hsf1, en association avec Skn7 [131] ou *Msn2/4* [127]. D'autre part, l'implication de deux autres régulateurs, Rpn4 et Met4, dans le contrôle du stimulon H_2O_2 a été mise en évidence grâce à une analyse par puce à ADN réalisée au laboratoire (Biteau et col., données non publiées). Met4 contrôle indépendamment de Yap1 les gènes du métabolisme du Soufre et Rpn4, les gènes du protéasome.

(d) S. cerevisiae ne semble pas posséder de régulon superoxyde distinct

Outre son rôle dans la réponse peroxyde, Yap1 semble important dans la réponse superoxyde. En effet, l'invalidation de ce régulateur entraîne une hyper-sensibilité à la ménadione [136]. A la différence d'*E. coli*, le même régulateur semble donc impliqué dans les deux réponses chez *S. cerevisiae*. Aucun régulateur permettant une réponse spécifique à l'ion superoxyde n'est connu chez *S. cerevisiae* et l'activation du régulon Yap1/Skn7 pourrait être relayée par la production de peroxyde d'hydrogène après dismutation de l'ion superoxyde.

C. Contrôle de la concentration en peroxydes endogènes

Comme nous l'avons vu précédemment, la concentration en H_2O_2 est finement régulée au cours des différentes phases de croissance chez *E. coli*. En réponse à un stress H_2O_2 exogène, la cellule induit l'expression des stimulons présentés ci-dessus et cette induction est

essentielle à la survie cellulaire. La cellule utilise-t-elle les mêmes systèmes inductibles pour contrôler la concentration des peroxydes produits par le métabolisme ? Chez *E. coli*, l'absence de KatG et d'AhpCF mais surtout celle du régulateur OxyR entraîne une augmentation sensible de la concentration en H₂O₂ intracellulaire [15, 80]. De plus, l'expression du régulon OxyR est modulée au cours des différentes phases de croissance, parallèlement à la production de H₂O₂ [146, 147]. L'expression de *katG* est en particulier induite au cours du passage en phase exponentielle de croissance [146]. Ainsi, la production métabolique de H₂O₂ est au moins en partie contrecarrée par l'induction des enzymes du régulon OxyR. La cellule utilise donc des systèmes inductibles afin de réguler la production de H₂O₂ endogène. La nécessité d'adapter en permanence la concentration d'antioxydants au niveau de production de H₂O₂ suggère i) que la production constitutive d'antioxydants peut être délétère, et/ou ii) que la cellule doit tolérer une concentration intracellulaire de H₂O₂ minimale. La mesure de la concentration intracellulaire en H₂O₂ chez *E. coli*, montre d'ailleurs que celle-ci n'est pas nulle. Ces données indiquent donc que le H₂O₂ peut ne pas être simplement toxique mais qu'il pourrait participer à l'établissement de l'homéostasie redox cellulaire.

Chapitre III. Les détecteurs du stress oxydant : caractérisation des mécanismes moléculaires de détection

La cellule perçoit les variations de la concentration en peroxydes ou en ions superoxyde grâce à des détecteurs spécifiques. Chez *E. coli*, la spécificité des réponses peroxyde et superoxyde repose sur l'existence de deux régulons distincts, le régulon OxyR et le régulon SoxR. La caractérisation des mécanismes moléculaires responsables de l'activation de ces deux régulateurs a permis d'établir les bases de la spécificité du processus de détection. Dans un cas comme dans l'autre, le régulateur est aussi le détecteur. Chez *S. cerevisiae*, les mécanismes moléculaires responsables de l'activation de la voie Yap1/Skn7, contrôlant le régulon peroxyde, sont encore mal connus et l'étude du facteur de transcription Yap1 constitue l'objet de mon travail de thèse.

I. Les détecteurs du stress oxydant chez les Procaryotes

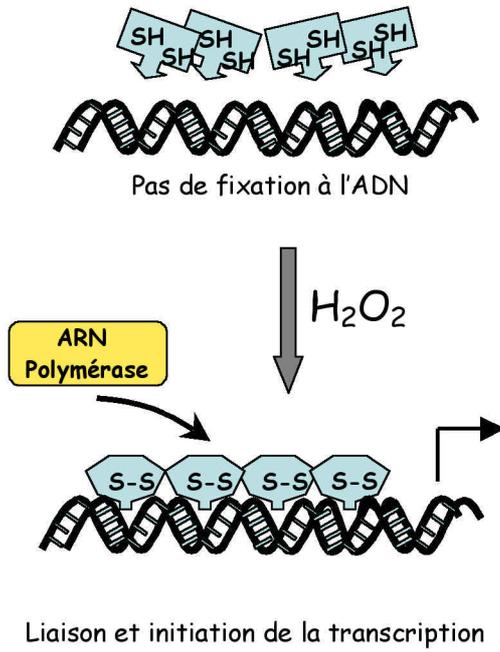
A. Les détecteurs du H₂O₂

1) Chez *E. coli*

(a) OxyR est activé par oxydation

La forme active d'OxyR, capable de stimuler la transcription, est une forme oxydée [148]. En effet, dans un système de reconstitution *in vitro*, OxyR active la transcription de *katG* lorsqu'il est oxydé et la présence d'un agent réducteur, comme le dithiothréitol (DTT) inhibe la réaction. Cette inhibition est réversible. Pourquoi OxyR est-il inactif en conditions réductrices ? L'étude de l'interaction d'OxyR avec l'ADN a montré que seule la forme oxydée d'OxyR est capable de se lier aux promoteurs des gènes induits de façon OxyR-dépendante, suggérant que l'oxydation de ce régulateur permet son recrutement aux promoteurs de ses gènes cibles [97] (Fig.8A). L'existence d'une liaison coopérative d'OxyR et de l'ARN Polymérase [149] indique que la forme oxydée d'OxyR serait en outre capable de recruter l'ARN Polymérase afin d'initier la transcription.

A Cas d'un gène induit par OxyR



B Cas du promoteur d'OxyR

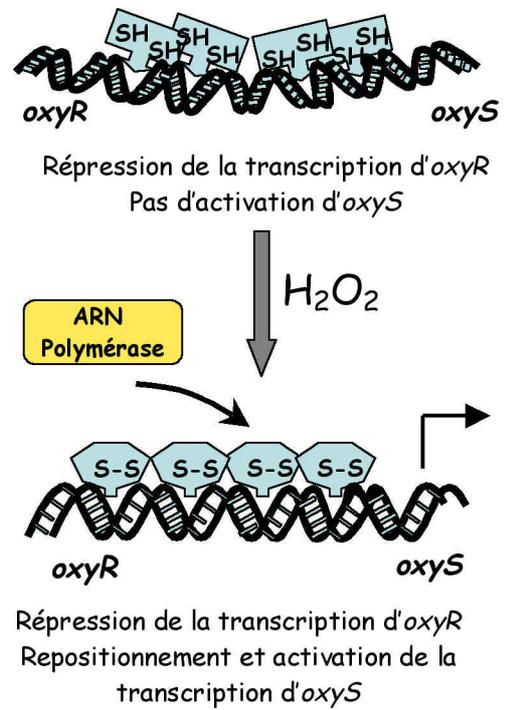


Figure 8. Contrôle de l'activité d'OxyR. Modèle représentant l'induction de l'expression d'un gène cible d'OxyR (par exemple AhpC ou KatG) (A) et le rôle de répresseur joué par OxyR au niveau de son propre promoteur (B).

OxyR est également capable de se lier à son propre promoteur et d'en réprimer la transcription [88, 93]. Dans ce cas, la capacité d'OxyR à lier l'ADN est indépendante de son état d'oxydation [97](Fig. 8B). En revanche, la transcription d'*oxyS*, un gène cible d'OxyR localisé tête-bêche avec *oxyR*, est spécifiquement induite en conditions oxydantes. L'activation d'*oxyS* ne dépend pas de la capacité d'OxyR à lier l'ADN mais d'un repositionnement d'OxyR au niveau du promoteur. La forme réduite d'OxyR se lie à deux fois deux sillons adjacents séparés par un tour d'hélice et réprime *oxyR* sans activer *oxyS*. L'oxydation d'OxyR entraîne un déplacement de son site de liaison, permettant son contact avec quatre sillons majeurs consécutifs et stimulant ainsi l'expression d'*oxyS*, tout en maintenant la répression d'*oxyR*. Ce déplacement est dû à un changement de conformation majeur d'OxyR lors de la transition entre les formes réduite et oxydée.

(b) L'oxydation d'OxyR dépend de la formation d'un pont disulfure intramoléculaire

Le centre redox d'OxyR est constitué de deux cystéines, les cystéines 199 et 208 dont l'oxydation en un pont disulfure intramoléculaire conduit au changement de conformation responsable de l'activation d'OxyR en réponse aux peroxydes [150]. La mutagenèse de la cystéine 199 (C199S) et dans une moindre mesure de la cystéine 208 (C208S) induit une hypersensibilité aux peroxydes [149]. Ces deux mutants sont transcriptionnellement inactifs *in vitro* comme *in vivo* [149, 150]. La mutagenèse des quatre autres cystéines d'OxyR n'entraîne au contraire aucune altération fonctionnelle ou phénotypique pour l'ensemble des tests effectués [149]. En particulier, un mutant ne possédant plus que les cystéines 199 et 208 (OxyR_{4C-A}) est sauvage. L'étude par spectrométrie de masse de la protéine mutante OxyR_{4C-A}, purifiée et oxydée à l'air, a démontré l'existence d'un pont disulfure entre les cystéines 199 et 208 [150]. *In vivo*, l'état redox d'une protéine peut être visualisé grâce à des techniques spécifiques (voir Résultats) [151, 152]. L'analyse par ces techniques des mutants des cystéines d'OxyR a permis de confirmer la formation de ce pont disulfure en réponse au H₂O₂ [152].

Le potentiel redox du couple $\text{OxyR}_{\text{red}}/\text{OxyR}_{\text{ox}}$ est de -185 mV [150]. Cette valeur, inférieure d'environ 100 mV à celle du potentiel redox intracellulaire (-280 mV), est compatible avec la présence d'OxyR sous forme réduite dans des conditions de croissance standard [151, 152]. OxyR est oxydé *in vivo* dès 30 secondes d'exposition au H_2O_2 [151]. En réponse à une dose unique de H_2O_2 , cette oxydation est transitoire avec un retour à l'état réduit après 5 minutes d'exposition. Le profil d'oxydation d'OxyR est corrélé avec la cinétique d'activation de ses gènes cibles. Les doses requises *in vivo* pour l'oxydation d'OxyR sont faibles (à partir de 5 μM de H_2O_2 ajouté dans le milieu). Ces données montrent qu'OxyR est activé par un changement de conformation de la protéine, induit par la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 199 et 208.

(c) OxyR est réduit par la glutarédoxine 1

OxyR est désactivé par réduction. Afin de caractériser le système enzymatique responsable de sa réduction, les profils cinétiques d'activation et de désactivation d'OxyR ont été déterminés dans différents mutants de la voie des thiorédoxines et du glutathion. La désactivation d'OxyR est retardée dans des mutants *grxA*, *gorA* ou *gshA*, mais pas dans des mutants *trxA* ou *trxB*, suggérant qu'OxyR pourrait être réduit par la glutarédoxine 1, via la voie du glutathion [150]. La réduction d'OxyR *in vitro* en présence de glutarédoxine 1, de glutathion et de glutathion réductase étaye cette hypothèse. L'expression de *grxA* et de *gorA* étant stimulée par OxyR en réponse au H_2O_2 , le système apparaît auto-régulé [17, 94]. La persistance d'une réduction même retardée, dans le mutant *grxA*, suggère cependant qu'en l'absence de glutarédoxine 1, OxyR peut être réduit par un autre système, moins efficace (par exemple les thiorédoxines).

(d) Bases structurales de la réactivité d'OxyR vis à vis des peroxydes

L'oxydation d'OxyR par le H_2O_2 est directe [151]. En effet, en présence du système de réduction décrit ci-dessus, OxyR se conduit comme une thiol-peroxydase, réduisant H_2O_2 par consommation de NADPH.

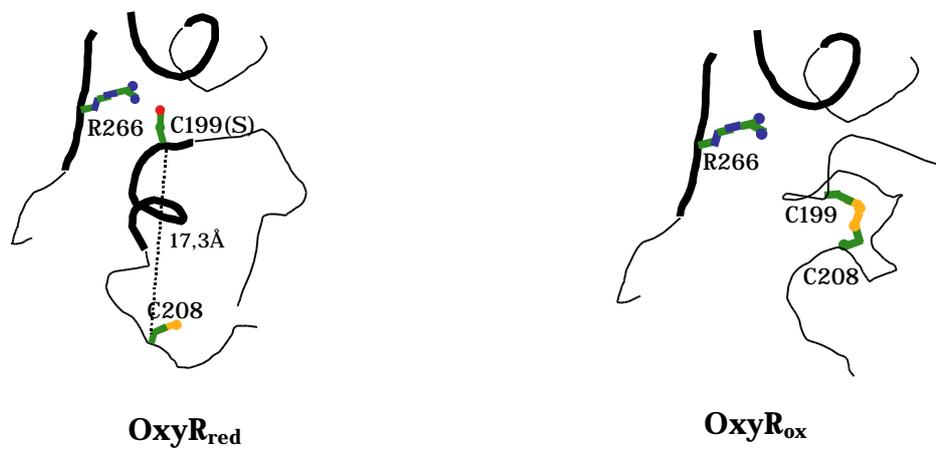


Figure 9 Structures simplifiées du centre redox d'OxyR. Comparaison des formes réduite (contenant la cystéine 199 mutée en sérine) et oxydée. Le résidu arginine 266 et l'hélice contenant la cystéine 199 stabilisent vraisemblablement la forme thiolate de ce résidu.

La reconstitution *in vitro* du système d'oxydation/réduction d'OxyR a montré que cette protéine peut être oxydée par 2 μM de H_2O_2 en présence de 25 mM de GSH [151]. La réactivité d'OxyR vis à vis des peroxydes est donc bien supérieure à celle du glutathion. Les déterminants de cette réactivité ne sont pas clairement établis. Cependant, une étude structurale d'OxyR a permis de caractériser l'environnement électronique de chacune des cystéines du pont disulfure régulateur [153] (Fig. 9) et de proposer un modèle mécanistique de la transition entre les formes réduite et oxydée.

Le cristal de la forme réduite d'OxyR montre que les deux cystéines 199 et 208 sont espacées de 17,3 Å et que la cystéine 199 est localisée dans une étroite poche hydrophobe. Ce résidu est en contact étroit avec une arginine, chargée positivement, dont la présence est susceptible d'augmenter la réactivité de la cystéine 199. L'observation d'un phénotype d'hyper-sensibilité au H_2O_2 ainsi que d'un défaut d'activation d'OxyR chez un mutant dépourvu de ce résidu arginine étaye cette hypothèse [149]. La présence de trois petites hélices α , formant des petits dipôles électro-attracteurs, à proximité de la cystéine 199 peut également augmenter la réactivité de la cystéine 199. Les données de mutagénèse, confortées par les données structurales, suggèrent donc que le H_2O_2 induit la formation d'un acide sulfénique au niveau de la cystéine 199 [150, 153]. Sa présence au sein d'un environnement hydrophobe pourrait rendre cette forme instable et la cystéine oxydée serait alors soustraite à cet environnement par la formation du pont disulfure avec la cystéine 208.

(e) Un mécanisme controversé

Une étude récente, réalisée par le groupe de Stamler, a remis en cause le modèle d'activation par formation d'un pont disulfure, décrit ci-dessus. Il propose que l'activation d'OxyR par les peroxydes repose sur la formation d'un acide sulfénique au niveau de la cystéine 199 et que cette espèce suffit à induire une conformation active de la protéine [154]. Des études d'oxydation *in vitro* ont permis de montrer que la cystéine 199 est la seule cystéine redox réactive et que la forme Cys199-SOH est stable et active transcriptionnellement. La stabilité de cet acide sulfénique suggère qu'aucun thiol vicinal, permettant sa condensation en pont disulfure, n'est présent. Cette donnée est compatible avec l'éloignement structural des cystéines 199 et 208 décrit par Choi et col [153]. OxyR peut donc être oxydé *in vitro*, sans

qu'il n'y ait formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Les auteurs expliquent ces nouveaux résultats par le fait que les techniques d'analyse réalisées pour l'identification formelle du pont Cys199-Cys208 sont discutables (protéine tronquée et/ou mutée pour les quatre autres cystéines (OxyR_{4C-A})). L'utilisation de ces mutants aurait ainsi occulté l'oxydation de la cystéine 199 en acide sulfénique, en permettant la formation illégitime du pont 199-208. *In vivo*, l'hypothèse de Stamler est étayée par l'observation, en réponse au H₂O₂, d'une oxydation de la cystéine 199 et par la purification d'une forme d'OxyR conjuguée au glutathion (OxyR-S-SG), vraisemblablement issu de la conjugaison du dérivé sulfénique avec une molécule de GSH [154]. Cependant, aucune preuve formelle de l'existence de la forme Cys199-SOH n'a pu être apportée *in vivo*.

2) Chez *B. subtilis*

Des homologues d'OxyR ont été décrits dans de nombreuses bactéries [155-157]. Cependant, aucun homologue d'OxyR n'a été trouvé chez *B. subtilis*. La réponse aux peroxydes chez cet organisme semble contrôlée, au moins en partie, par deux répresseurs récemment découverts, PerR et OhrR, dont l'inactivation permet l'induction des anti-oxydants. D'une manière générale, l'étude de ces systèmes reste très préliminaire.

(a) *PerR*

PerR est une petite métalloprotéine de la famille des « ferric uptake repressor » (Fur), contrôlant, en réponse aux peroxydes, l'expression d'une catalase (KatA), d'un opéron responsable de la biosynthèse de l'hème et d'une alkyl-hydroperoxyde-réductase homologue au système AhpR d'*E. coli* [158]. L'exposition des cellules au H₂O₂ inactive PerR et permet la levée de la répression. Ainsi, l'inactivation de *perR* entraîne une hyper-résistance au H₂O₂. Le mécanisme moléculaire responsable de cette inactivation n'est pas connu. Il est possible qu'il fasse intervenir la formation d'un pont disulfure car PerR peut être réactivé en présence d'un dithiol réducteur [159]. A l'instar des autres membres de la famille Fur, PerR contient deux centres métalliques par monomère [159]. Le premier site contient un atome de Zinc, dont la fonction semble structurale. L'autre site contient un métal qui peut être soit un atome de Fer soit un atome de Manganèse. La capacité du H₂O₂ à inactiver PerR semble dépendre de la nature du métal présent dans ce site [159, 160]. Cependant, les bases moléculaires de cette

inactivation sont inconnues. Des homologues de PerR sont présents chez de nombreuses bactéries Gram+ et Gram-. La caractérisation du mécanisme moléculaire de détection des peroxydes par cette protéine constituera donc un nouveau modèle d'étude des détecteurs du stress oxydant chez les procaryotes.

(b) *OhrR*

OhrR régule l'expression du gène *ohrA*, responsable avec *ohrB* de la majorité de l'activité alkyl-hydroperoxyde réductase chez *B. subtilis* [161]. OhrR réprime l'expression d'*ohrA* et est spécifiquement inactivé par les alkyl-hydroperoxydes *in vivo*. *In vitro*, la liaison d'OhrR au promoteur d'*ohrA* est inhibée en présence de divers peroxydes et le traitement ultérieur par le DTT permet de restaurer cette liaison [162]. L'unique résidu cystéine d'OhrR est nécessaire à la dérepression d'*ohrA*, et donc à l'inactivation d'OhrR. L'utilisation de méthodes spectrophotométriques associées à une analyse par spectrométrie de masse a permis de montrer que la cystéine d'OhrR est oxydée *in vitro* en acide sulfénique. Ces données suggèrent que la réactivité unique de la cystéine d'OhrR contrôle l'activité de ce régulateur. Cependant, la formation de cet acide sulfénique *in vivo* reste à démontrer.

B. La réponse au $O_2^{\cdot-}$ et aux composés à activité redox cyclique chez *E. coli*

L'utilisation de diverses techniques de biophysique a permis de montrer que l'activité de SoxR est régulée par son état redox. Cependant la nature du signal responsable de cette modification redox est encore un sujet de controverse.

1) La présence d'un centre Fer-Soufre dans SoxR est essentielle à l'activité de SoxR

SoxR est une métalloprotéine contenant un centre [2Fe-2S] par monomère [163, 164]. La présence de ce centre est essentielle à son activité. Deux formes de SoxR peuvent être produites : la forme Fe-SoxR, contenant le centre [2Fe-2S], et la forme Apo-SoxR, dépourvue de centre métallique [163]. L'analyse de l'activité transcriptionnelle de SoxR *in vitro* montre que seul Fe-SoxR est capable de stimuler l'expression de SoxS [163, 164]. De plus la

mutagénèse individuelle des quatre cystéines, nécessaires à la formation du centre métallique, rend SoxR transcriptionnellement inactif [165].

2) L'activité de SoxR dépend de l'état redox du centre [2Fe-2S]

La présence de métal n'est pas une condition suffisante à l'activation de SoxR. L'analyse spectroscopique et par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) a permis de montrer que le centre Fer-Soufre de SoxR peut être soit oxydé ($[\text{Fe}^{3+}\text{-Fe}^{3+}]$) soit réduit ($[\text{Fe}^{3+}\text{-Fe}^{2+}]$) [163, 164]. La forme réduite de Fe-SoxR ne présente pas d'activité transcriptionnelle mais peut être réactivée par simple incubation à l'air [166, 167]. *In vitro*, l'activité transcriptionnelle de SoxR dépend du potentiel redox [167]. L'état redox du centre Fer-soufre de SoxR constitue donc un niveau de contrôle de l'activité de ce régulateur *in vitro*. Le couple SoxR_{red}/SoxR_{ox} a un potentiel redox de -285 mV, une valeur proche du potentiel redox intracellulaire mesuré.

3) Le centre Fer-soufre de SoxR est rapidement oxydé *in vivo*

La mise au point d'une technique de RPE, permettant la visualisation de l'état d'oxydation de SoxR *in vivo* [168, 169] a permis de conclure que l'activité de SoxR dépend essentiellement de l'état d'oxydation du centre [2Fe-2S]. En absence d'inducteur, 90 % de la protéine est détectée sous forme Fe-SoxR réduite. Le traitement des cellules au paraquat entraîne la disparition rapide (< 2 minutes) du signal RPE, disparition correspondant à une oxydation et non à une destabilisation du centre [2Fe-2S] de SoxR puisque le signal RPE peut être de nouveau détecté après perméabilisation et traitement des cellules avec un agent réducteur puissant, la dithionite. L'élimination du paraquat par lavage des cellules permet également de restaurer ce signal, indiquant que le centre Fer-Soufre de SoxR est rapidement réduit après élimination de l'inducteur [168, 169]. La stimulation de l'expression de SoxS est corrélée *in vivo* avec l'oxydation de SoxR [168]. Le centre Fer-Soufre de SoxR est donc oxydé *in vivo* et son oxydation contrôle l'activité de SoxR.

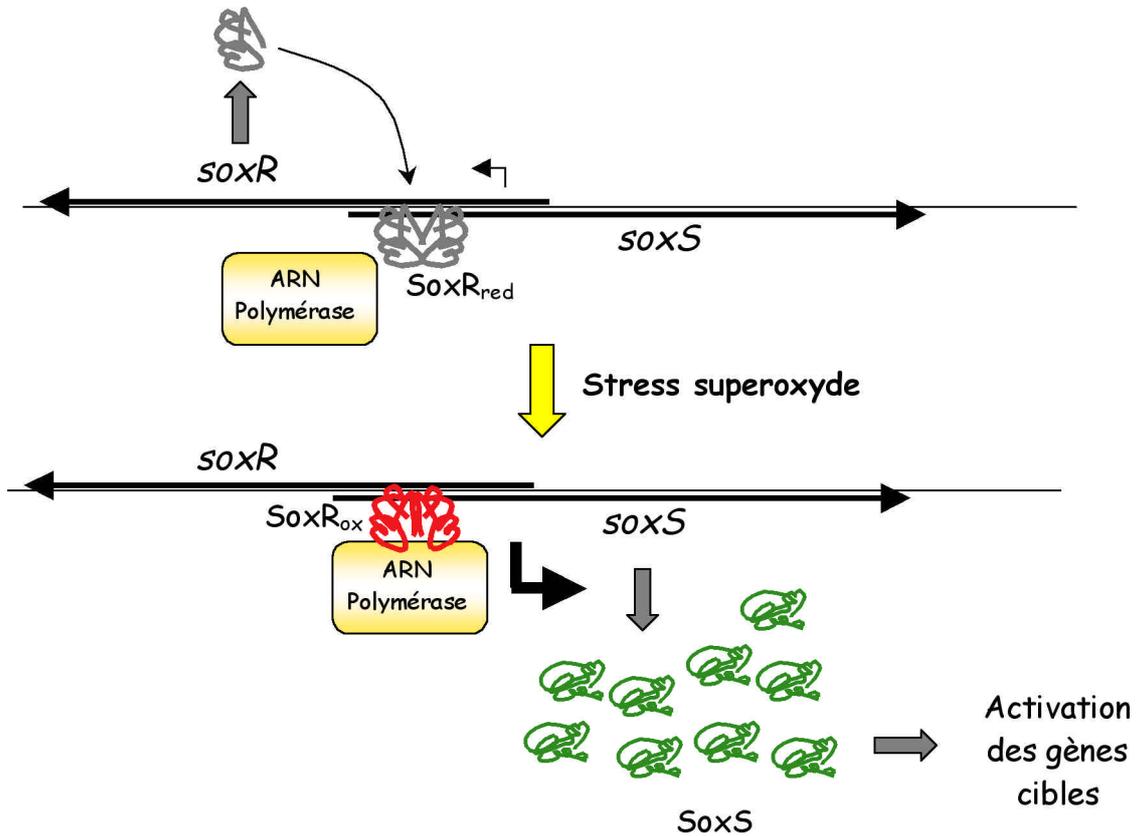


Figure 10. Modèle d'activation du régulon SoxRS. Le signal induit par le stress superoxyde est détecté par SoxR, qui forme alors un complexe ouvert avec l'ARN Polymérase et initie la transcription de SoxS. L'augmentation de la concentration en SoxS permet l'induction des gènes du régulon.

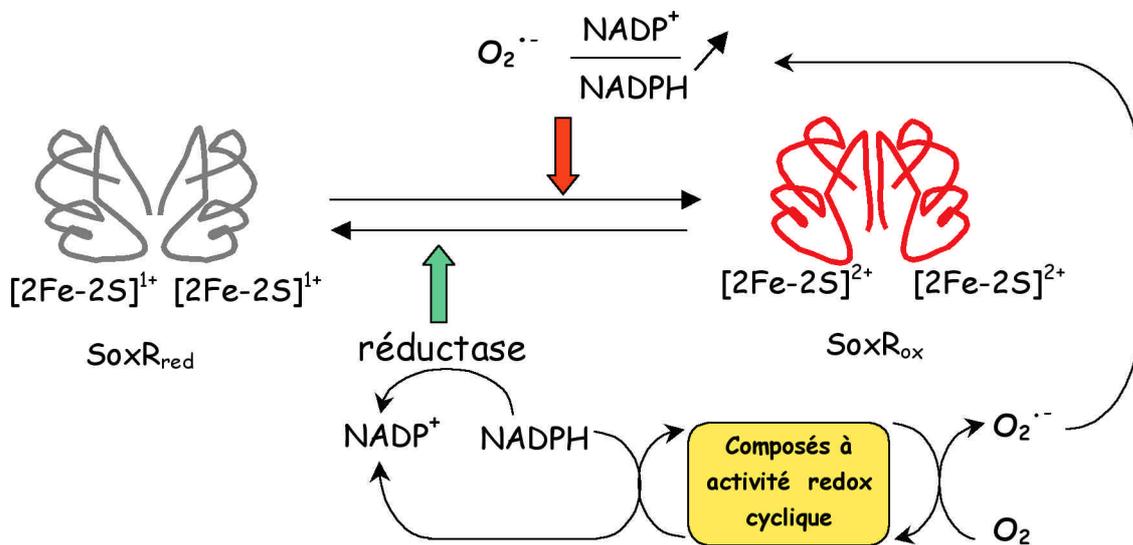


Figure 11. Activation de SoxR par oxydation de son centre Fer-Soufre. Représentation des différents signaux susceptibles d'oxyder SoxR. La présence d'ions superoxyde ou l'augmentation du rapport NADP⁺/NADPH sont vraisemblablement deux signaux de nature différente capables d'activer SoxR. L'oxydation du NADPH en NADP⁺ par les composés à activité redox cyclique pourrait limiter la capacité d'une réductase spécifique à réduire SoxR et donc conduire à son activation.

Un autre modèle d'activation de SoxR par assemblage-désassemblage du centre Fer-Soufre a également été proposé [170, 171]. Cependant, les données *in vivo* obtenues par RPE suggèrent que ce mode d'activation n'est pas prépondérant.

4) Comment la forme oxydée de SoxR active-t-elle la transcription de *soxS* ?

La présence du centre Fer-Soufre de SoxR ne contrôle ni sa liaison au promoteur de *soxS*, ni le recrutement de l'ARN polymérase [163]. Comment l'état d'oxydation du centre Fer-Soufre régule-t-il la transcription de *soxS* ? La liaison de SoxR au promoteur de *soxS* présente des caractéristiques inhabituelles. Les boîtes -10 et -35 du promoteur de *soxS* sont anormalement espacées et SoxR se lie entre ces deux séquences, un site généralement lié par les répresseurs. L'activation de SoxR provoquerait un remodelage structural des régions -10 et -35 du promoteur, permettant alors l'induction de SoxS [172].

Ainsi, la liaison, au promoteur de SoxS, de Fe-SoxR (oxydé au cours de la purification) et de l'ARN polymérase promeut la formation d'un complexe de transcription ouvert, indétectable en présence d'Apo-SoxR [164] (Fig. 10). L'oxydation du centre Fer-Soufre de SoxR serait donc indispensable à l'initiation de la transcription.

5) Quel est le signal détecté par SoxR ? (Fig. 11)

SoxR est activé par l'exposition des cellules à des composés à activité redox cyclique. Ces molécules sont réduites par le biais de réductases NADPH-dépendantes et leur ré-oxydation se fait par réduction de l'oxygène moléculaire. Leur cycle d'oxydo-réduction entraîne donc simultanément une production importante d'ions superoxyde et une oxydation du pool de NADPH. SoxR est-il activé par la production d'ions superoxyde ? La réactivité spécifique de l'ion superoxyde avec les centres Fer-Soufre, rend cette hypothèse attractive. Afin de tester ce mécanisme, la concentration intracellulaire en ion superoxyde a été artificiellement modulée soit par la surexpression soit par l'inactivation des superoxyde-dismutases et l'effet sur l'état d'activation de SoxR a été analysé. L'activité basale de SoxR est augmentée dans des mutants dépourvus de superoxyde-dismutase [104, 173] et cette activation est dépendante de la

présence d'oxygène [110]. L'absence de SOD accroît également l'intensité de la réponse transcriptionnelle après induction par le paraquat [110]. Ces résultats suggèrent que $O_2^{\cdot-}$ est effectivement un inducteur de SoxR.

$O_2^{\cdot-}$ ne semble cependant pas être le seul signal détecté par SoxR. En effet, la surexpression de l'activité SOD ne diminue pas l'induction du régulon SoxR par le paraquat. [105, 174], suggérant que dans ce cas, l'activation de SoxR est indépendante de la concentration en ion superoxyde. SoxR est-il activé en réponse à l'oxydation du NADPH? La déplétion artificielle du NADPH dans un mutant de la G6PDH (*zwf*), permet une stimulation accrue des gènes SoxRS-dépendants en réponse au paraquat [105], conduisant les auteurs à postuler que l'augmentation du rapport $NADP^+/NADPH$ agit comme un signal d'activation pour SoxR. Ce rapport pourrait en particulier influencer sur la capacité de SoxR à être réduit par une réductase spécifique.

6) Quelle réductase pour SoxR ?

Le potentiel redox du couple $SoxR_{red}/SoxR_{ox}$ étant proche du potentiel redox intracellulaire, le maintien d'une forme majoritairement réduite, observée en RPE *in vivo*, impliquerait la réduction permanente de SoxR par une réductase spécifique. L'inhibition de cette réductase pourrait donc permettre l'oxydation et l'activation de SoxR. Le rôle de différentes réductases dans la réduction de SoxR a été testé, sans succès. L'effet de l'invalidation ou de la surexpression d'une ferredoxine oxidoreductase NADPH dépendante (*fpr*), identifiée comme une cible de SoxRS [106] a tout d'abord été analysé. En effet, cette enzyme aurait pu être le lien manquant entre l'état redox de SoxR et celui du pool de pyridine nucléotide. Cependant, la *fpr* est incapable de réduire SoxR *in vitro* en présence de NADPH [166], et la surexpression de cette enzyme entraîne une stimulation de l'activité de SoxR plutôt qu'une atténuation [175]. La surexpression de la *fpr* entraînant une oxydation accrue du NADPH, cette observation renforce l'idée que le rapport $NADP^+/NADPH$ est important dans le contrôle de l'activité de SoxR. Les tentatives d'identification de la réductase de SoxR ont été jusque-là infructueuses. Cet échec peut s'expliquer si plusieurs voies de réduction de SoxR existent ou si cette réductase est essentielle à la viabilité cellulaire. Une équipe a cependant isolé une

activité capable de réduire SoxR *in vitro* en présence de NADPH [176]. Malheureusement, l'identité de cette activité reste encore inconnue.

C. Conclusion

Ces études montrent qu'OxyR est le détecteur des peroxydes. OxyR permet le maintien d'une concentration en peroxydes stable par le jeu de son activation directe par le H₂O₂ et de son inactivation par la glutarédoxine 1, un gène cible d'OxyR dont l'induction permet la mise en place d'un rétrocontrôle négatif. La concentration en peroxyde d'hydrogène est donc soumise à un contrôle de type homéostatique. L'étude du régulateur SoxR n'a pas permis de décrire un tel système en réponse à l'ion superoxyde. En particulier, la nature du signal détecté par SoxR est encore débattue. L'ion superoxyde étant détoxifié par sa réduction en peroxyde d'hydrogène, le contrôle de la concentration en H₂O₂ est un paramètre dont la régulation est centrale.

II. Les détecteurs du stress oxydant chez *S. cerevisiae*

Les données décrites dans le chapitre II (paragraphe II.B.2) ont mis en évidence le rôle essentiel de la voie Yap1/Skn7 dans la mise en place des défenses anti-oxydantes chez la levure. Le facteur Yap1 apparaît comme un régulateur clé de cette voie. Yap1 est en effet capable d'activer la transcription de certains de ses gènes cibles en l'absence de Skn7 [123], suggérant qu'il est capable de détecter lui-même la présence de peroxydes. D'autre part, Yap1 est activé par un nombre relativement important de composés incluant les peroxydes mais aussi des chimiques comme le diéthylmaléate [121], le bénomyl ou le méthylméthanesulfonate (MMS) [132], un agent thiol-oxydant, le diamide [121], le cadmium [177-180] et le sélénite [181]. La variété des composés induisant l'activation de Yap1 a rendu la recherche du mécanisme moléculaire d'activation de ce facteur encore plus attractive : à quel niveau s'exerce la régulation permettant l'activation de Yap1 dans des conditions aussi diverses ? Quelle est la nature commune de cette régulation et comment les différents signaux engendrés par ces inducteurs sont-ils globalement intégrés par un seul régulateur ?

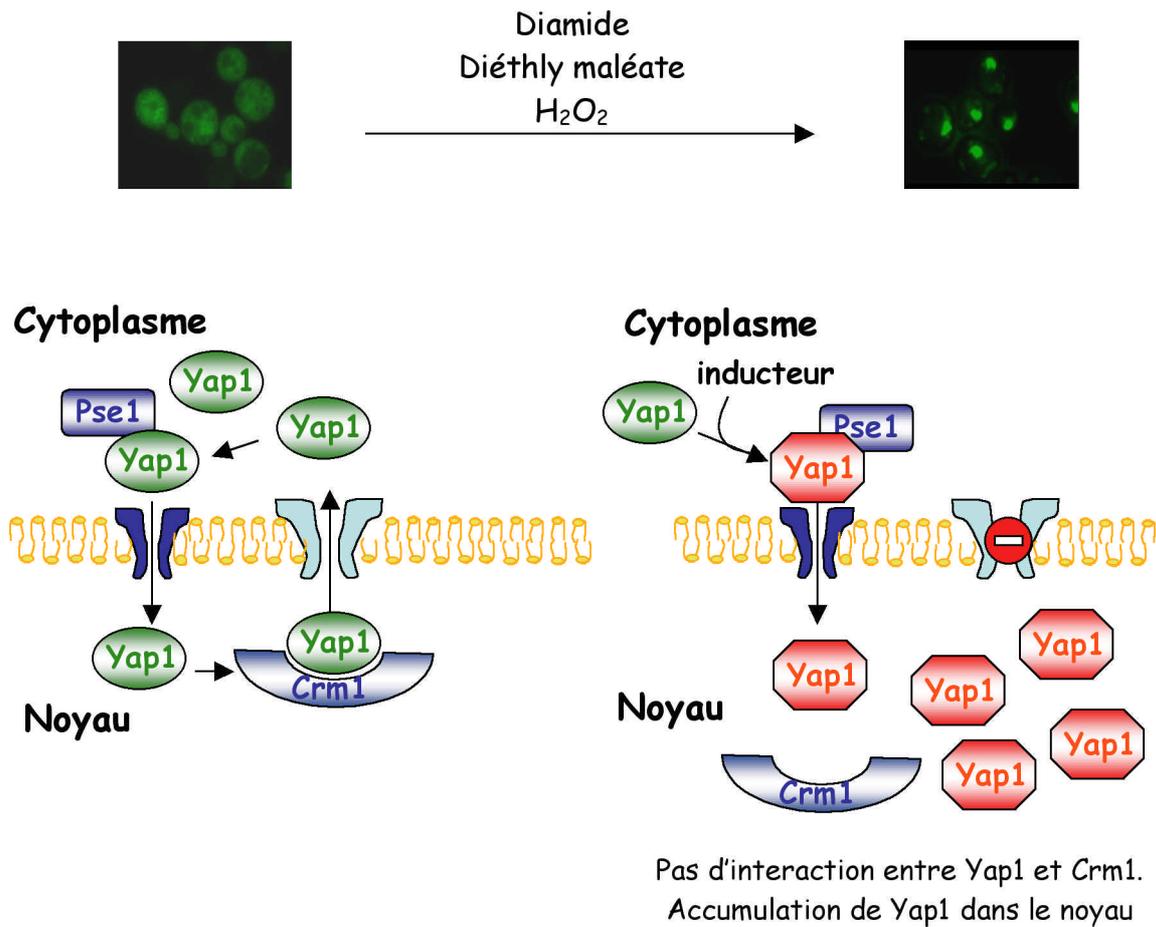


Figure 12. L'accumulation nucléaire de Yap1 en réponse à un stress oxydant dépend de son interaction avec l'exportine Crm1. En absence de stress, Yap1 est continuellement importé dans le noyau par l'importine Pse1 et exporté hors du noyau par l'exportine Crm1. En présence d'un stress oxydant, l'interaction entre Yap1 et Crm1 est interrompue et Yap1 s'accumule dans le noyau.

A. L'activité de Yap1 est contrôlée post-transcriptionnellement.

Aucune stimulation de la synthèse de Yap1 n'a été observée en réponse à un inducteur [121, 182]. De plus, l'addition de cycloheximide au cours de l'induction ne prévient pas la stimulation Yap1-dépendante de *TRX2* [121]. Le contrôle de Yap1 est donc post-transcriptionnel. L'étude de la liaison de Yap1 au promoteur de *TRX2*, l'un de ses gènes cibles, [121] a montré que le traitement des cellules au H₂O₂, mais surtout au diamide ou au diéthylmaléate, permet de stimuler *in vitro* la fixation de Yap1 à l'ADN. Cependant, le niveau modeste de cette stimulation ainsi que l'observation d'une liaison de Yap1 au promoteur de *TRX2* en dehors de toute induction suggèrent que ce mécanisme n'est pas majoritairement responsable de l'activation de Yap1 *in vivo* [183].

1) L'activité de Yap1 est contrôlée au niveau de son export nucléaire

L'activité de Yap1 est en fait régulée par sa localisation subcellulaire [183]. En absence d'inducteur, Yap1 est majoritairement cytoplasmique [183]. Cette localisation est le résultat d'un processus dynamique impliquant l'import de Yap1 dans le noyau grâce à l'importine Pse1 [184] et son export hors du noyau grâce à l'exportine Crm1 [185, 186]. La localisation globalement cytoplasmique de Yap1 implique que l'export est plus rapide que l'import. L'export de Yap1 repose sur la présence dans la partie C-terminale de ce régulateur d'un signal d'export nucléaire (NES) non canonique, riche en résidus hydrophobes (leucine, isoleucine) permettant l'interaction de ce facteur avec Crm1. Un complexe coopératif est ainsi formé composé de Yap1, de son exportine et de la petite GTPase Ran ; l'hydrolyse de GTP au niveau du pore nucléaire permet ensuite le relargage de Yap1 hors du noyau [185]. En absence du NES, par exemple lorsque la partie C-terminale de Yap1 est tronquée ou lorsque les résidus hydrophobes sont mutés, l'interaction entre Yap1 et Crm1 est interrompue et Yap1 s'accumule dans le noyau [183, 185]. L'exposition des cellules au diamide, au diéthylmaléate [183] ou au H₂O₂ [187] entraîne une concentration de Yap1 dans le noyau, indiquant que l'accumulation nucléaire de Yap1 est une étape essentielle du contrôle de son activité (Fig. 12).

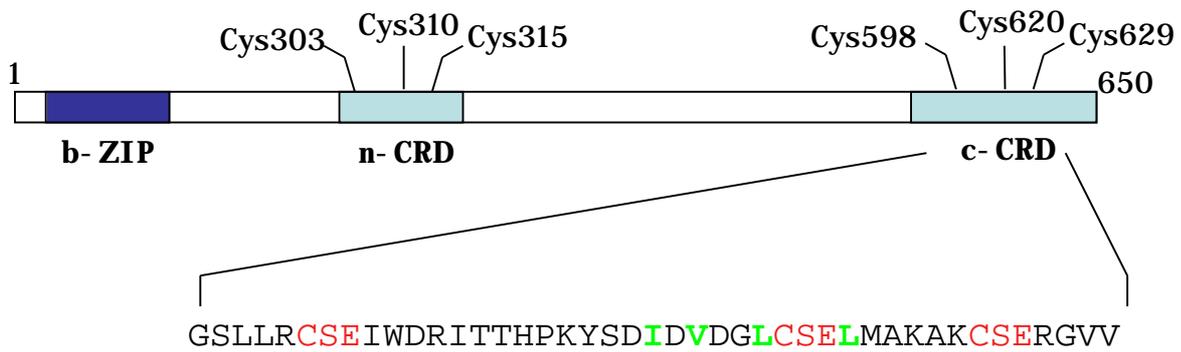


Figure 13. Description schématique des domaines de Yap1. Les domaines riches en cystéines (n-CRD et c-CRD) sont indiqués en bleu ciel et le domaine de liaison à l'ADN en bleu foncé. Le détail du domaine c-CRD indique les résidus constituant le signal d'export en vert et leur localisation par rapport aux motifs CSE (indiqués en rouge).

Des tests d'interaction par double-hybride ont permis de montrer que l'accumulation nucléaire de Yap1 en réponse à ces inducteurs est le résultat d'une inhibition de l'interaction entre Yap1 et Crm1 [185, 186, 188]. L'activité de Yap1 est donc régulée au niveau de son interaction avec l'exportine Crm1. Aucune régulation de l'import de Yap1 n'a été observée [184].

2) Recherche du mécanisme moléculaire impliqué dans l'inhibition de l'interaction entre Yap1 et Crm1

La recherche du mécanisme permettant l'inhibition de l'interaction Yap1-Crm1 s'est rapidement orientée vers l'existence d'une altération de la fonction NES de Yap1. Or, ce signal d'export nucléaire présente une localisation très particulière au sein d'un domaine appelé c-CRD pour « Cysteine Rich Domain ». Les résidus hydrophobes du NES sont en effet intercalés avec trois motifs Cystéine-Sérine-Glutamate (CSE), présents en C-terminal de la protéine (Fig. 13). La mutagenèse simultanée des trois résidus cystéines présents du c-CRD prévient complètement l'accumulation nucléaire et l'activation de Yap1 en réponse aux oxydants [183]. Cette absence de réactivité est associée à une persistance de l'interaction entre Yap1 et Crm1 en présence de diamide [185].

Ces données dévoilent l'importance de ces résidus cystéines dans le contrôle de l'interaction Yap1-Crm1. De plus, la fusion du domaine c-CRD de Yap1 à Gal4 (contenant un domaine d'import nucléaire) confère à cette protéine de fusion la capacité de s'accumuler dans le noyau en réponse au diamide et au diéthyl-maléate [183]. Le c-CRD contient donc les informations nécessaires à la régulation de l'interaction entre Yap1 et Crm1 par ces deux composés. Cette régulation implique probablement la modification des résidus cystéine présents dans ce domaine. L'observation d'une interaction entre Yap1 et Crm1 *in vitro* en présence d'agents réducteurs mais pas d'agents oxydants étaye cette hypothèse [185] et suggère que cette modification est une modification redox.

B. Des réponses distinctes au peroxyde d'hydrogène et au diamide

Deux classes de mutants présentant une hypersensibilité au H₂O₂ ont été obtenus [182, 187, 189]. La première est constituée de mutants de Yap1 présentant une hypersensibilité au H₂O₂,

au diamide et au cadmium. La deuxième classe est constituée de mutants de Yap1 présentant une hypersensibilité au H₂O₂ mais paradoxalement une hyper-résistance au diamide ou au cadmium. L'activation de Yap1 en réponse à ces différents composés nécessitant sa translocation nucléaire, l'obtention de cette deuxième classe de mutants implique deux possibilités : i) la réponse au H₂O₂ nécessite l'interaction de Yap1 avec un autre régulateur, inutile à la réponse au diamide ou au cadmium ii) Yap1 détecte la présence du H₂O₂ et du diamide par des mécanismes moléculaires différents. Ces deux hypothèses ne sont d'ailleurs pas exclusives. Les données de mutagenèse ont également permis d'identifier deux domaines distincts dans Yap1, en fonction de leur implication dans la réponse au diamide ou au peroxyde d'hydrogène. Seule la partie C-terminale de Yap1, contenant le c-CRD est nécessaire à l'induction par le diamide alors que la présence d'un domaine central (résidu 220-335) est indispensable, en plus du c-CRD, à la réponse au H₂O₂ [182, 187]. Il est intéressant de noter que cette partie centrale contient également un domaine riche en cystéine (trois résidus), appelé n-CRD [187] (Fig. 13).

III. Conclusion

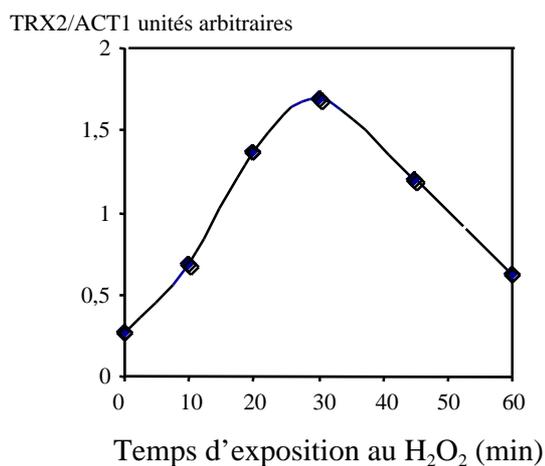
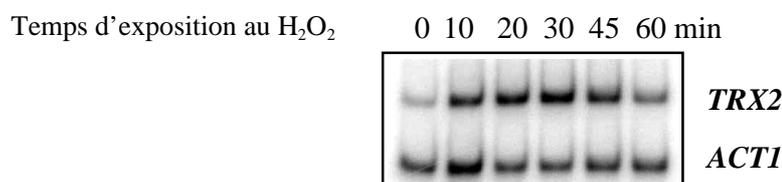
L'ensemble des données présentées ici corrobore l'existence de systèmes inductibles responsables du maintien de l'homéostasie redox intracellulaire et en particulier du contrôle de la concentration en peroxydes. Ces systèmes sont les mieux décrits chez la bactérie, mais sont probablement conservés chez les eucaryotes. Comme nous l'avons vu chez la bactérie, la compréhension des déterminants qui régissent l'homéostasie redox intracellulaire passe par l'étude des régulateurs/détecteurs en charge de corriger une perturbation redox. La caractérisation du régulateur est associée à la définition d'un régulon, dont la fonction physiologique peut être définie par rapport à la nature du signal détecté. Chez les eucaryotes, la recherche des détecteurs et des régulateurs des réponses peroxyde et superoxyde doit permettre de mieux cerner la notion de stress oxydant et donc d'homéostasie redox chez ces organismes.

Afin d'étudier les mécanismes de régulation de l'homéostasie redox intracellulaire chez un eucaryote, nous avons choisi la levure *Saccharomyces cerevisiae*, très largement utilisé comme organisme eucaryote modèle. Cet organisme offre des avantages techniques considérables, incluant la disponibilité de la séquence complète de son génome, la facilité des manipulations génétiques et biochimiques et la rapidité de croissance. C'est un des seuls modèles eucaryotes permettant d'intégrer les approches de biologie moléculaire et cellulaire, les analyses génomiques globales et la physiologie des fonctions cellulaires. C'est aussi un des seuls modèles eucaryotes permettant d'aborder le fonctionnement d'ensemble de l'homéostasie redox intracellulaire. L'identification du facteur de transcription Yap1 comme le régulateur majeur de la réponse peroxyde chez *S. cerevisiae* nous a conduit à étudier les modalités de son activation en réponse au H₂O₂. Depuis sa découverte, les données obtenues sur le contrôle de Yap1 suggéraient que son activité pouvait être régulée de façon redox. Nous avons donc élaboré des expériences nous permettant d'une part de mesurer l'état redox de Yap1 *in vivo* et d'autre part, de caractériser son mode d'activation en réponse à différents inducteurs. De nombreuses études montrent que l'activité d'une protéine peut être modulée par son état redox. En particulier, l'oxydation des résidus cystéine ou méthionine d'une protéine peut aisément conduire à son inactivation. Le problème posé par l'interprétation de

tels résultats est de savoir si cette modification est spécifique et présente un rôle physiologique. Cependant, si la pertinence de l'inactivation d'une protéine par oxydation est souvent difficile à cerner, la caractérisation chez *E. coli* de protéines spécifiquement activées par oxydation est une indication forte que l'oxydation d'une protéine peut effectivement relayer une réponse physiologique. C'est en particulier le cas des régulateurs OxyR et SoxR. La caractérisation des modifications redox capable de promouvoir l'activation de ces deux régulateurs a nécessité la mise au point de protocoles fiables permettant l'identification de ces modifications *in vivo*. Cependant, malgré un nombre important d'études, les mécanismes d'activation d'OxyR et de SoxR présentent encore des zones d'ombre. Ceci dénote l'importance de la mise au point de différentes techniques d'études permettant l'analyse de l'état redox des protéines *in vivo* et l'intérêt de la confrontation des résultats obtenus par ces différentes techniques.

RESULTATS

A



B

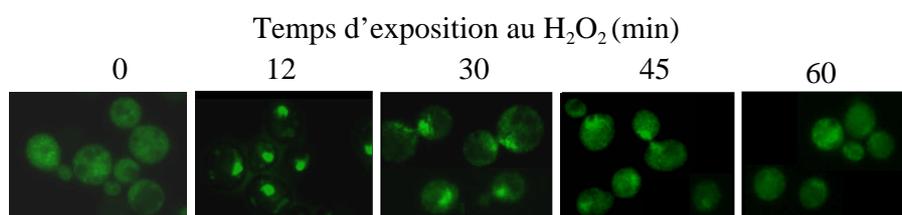


Figure 14. Mesure de l'activation de Yap1 en réponse au H₂O₂. A. Cinétique d'expression de *TRX2*. Les ARNs totaux sont extraits après exposition d'une souche sauvage à 0,4 mM de H₂O₂ durant les temps indiqués. L'expression de *TRX2* et de *ACT1* a été quantifiée par RT-PCR semi-quantitative après séparation sur gel des produits de PCR marqués au P³² et exposition au PhosphorImager (Gel). Les rapports *TRX2/ACT1* ont ensuite été calculés et reportés en fonction du temps (Graphique). B. Accumulation nucléaire de Yap1 en réponse au H₂O₂. Une souche *yap1* exprimant la fusion GFP-Yap1 a été exposée au H₂O₂ (0,3 mM) durant les temps indiqués et le marquage GFP correspondant a été observé au microscope à fluorescence.

RESULTATS Première Partie : Contrôle redox de l'activité de Yap1 par les peroxydes

I. Yap1 est activé par oxydation en réponse aux peroxydes

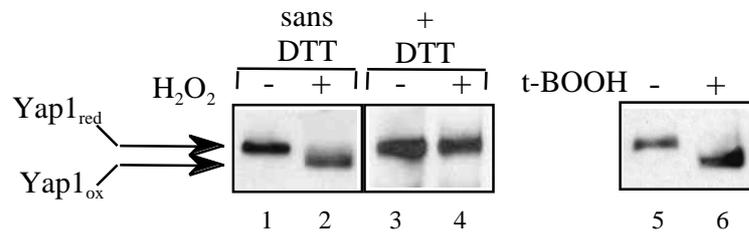
A. Mesure de l'activation de Yap1 en réponse au H₂O₂

L'activation de Yap1 peut aisément être mesurée par la quantification de l'expression de l'un de ses gènes cibles, la thiorédoxine 2 (*TRX2*) [121]. Après traitement des cellules au H₂O₂ (0,4 mM), l'expression de *TRX2* augmente rapidement, atteint un maximum après 30 minutes d'exposition, puis redescend à son niveau de base après 60 minutes (Fig. 14A). Ce profil d'expression est caractéristique de la réponse génomique, observée pour les gènes cibles de Yap1 après induction H₂O₂ (doses moyennes et faibles) ([22]; Biteau et Toledano, données du laboratoire). L'activation de Yap1 peut également être suivie par l'observation de sa localisation sub-cellulaire [183] grâce à l'utilisation d'une fusion GFP-Yap1. En absence de stress, Yap1 est majoritairement cytoplasmique. L'exposition des cellules au H₂O₂ (0,3 mM) entraîne une accumulation nucléaire de Yap1 dès 12 minutes de traitement (Fig. 14B). Cette concentration de Yap1 dans le noyau est transitoire; Yap1 est présent de façon prépondérante dans le noyau pendant la première demi-heure de traitement, puis redevient progressivement cytoplasmique avec un retour à la situation basale après 1 heure.

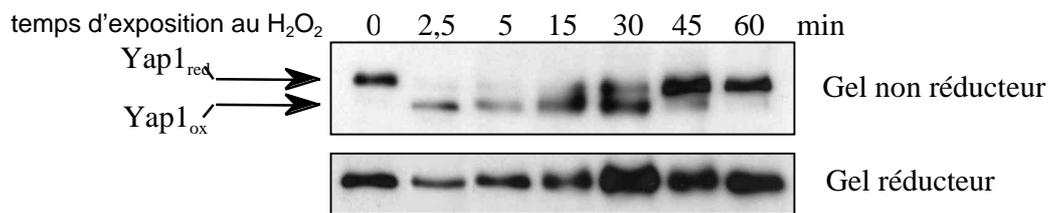
B. Yap1 est oxydé en réponse au H₂O₂

La partie C-terminale de Yap1, aussi appelée c-CRD pour « Cysteine Rich Domain », contient le signal d'export nucléaire (NES) entouré de 3 résidus cystéines, C598, C620 et C629 (Fig. 13). La mutagenèse simultanée de ces trois cystéines empêche l'accumulation nucléaire de la protéine après induction [186].

A



B



C

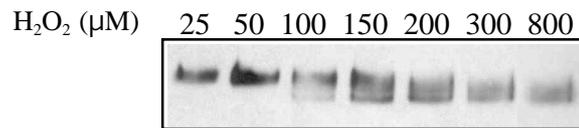


Figure 15. Yap1 est oxydé *in vivo* en réponse au H₂O₂. A. Des cellules exprimant myc-Yap1 ont été exposées ou non pendant 2,5 min à 0,4 mM d'H₂O₂ (lignes 1 à 4) ou à 1 mM de t-butyl-hydroperoxyde (lignes 5 et 6), puis lysées en présence de TCA. Après resuspension du précipitat en présence d'iodoacétamide, les extraits protéiques ont été séparés sur gel dénaturant non réducteur et révélés au moyen de l'anticorps anti-myc 9E10. La seule différence existant entre les lignes 1 et 2, et 3 et 4 réside dans le fait que les précipitats après TCA des lignes 3 et 4 ont été préalablement traités avec 200 mM de DTT avant resuspension en présence d'un excès d'iodoacétamide (3,2 M). B. Cinétique d'oxydation de Yap1. Des cellules exprimant myc-Yap1 ont été exposées à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués. Les extraits ont été réalisés comme décrit en A (lignes 1 et 2), puis traités à la phosphatase alcaline et séparés sur gel dénaturant réducteur ou non réducteur. C. Détermination de la dose minimale de H₂O₂ nécessaire à l'oxydation de Yap1. Des cellules exprimant myc-Yap1 ont été exposées pendant 5 min aux doses de H₂O₂ indiquées et les extraits ont été réalisés comme décrit en A (lignes 1 et 2).

L'absence de réactivité du mutant Yap1^{C598T,C620A,C629T} et la présence de ces résidus cystéines au sein d'un domaine de régulation essentiel, nous ont conduit à rechercher l'existence d'une oxydation *in vivo* de Yap1 en réponse au H₂O₂. La nature labile des modifications redox ainsi que leur propension à survenir par simple exposition à l'air nous ont amenés à utiliser un protocole d'extraction des protéines adapté [152]. Les cellules sont lysées en absence d'agent réducteur et en présence d'acide trichloroacétique (TCA), qui permet en abaissant très fortement le pH de maintenir les cystéines dans leur état redox natif : les ponts disulfures déjà présents dans la cellule sont maintenus, alors que la protonation des thiols prévient l'oxydation non spécifique des cystéines libres. La re-solubilisation des protéines, par re-suspension du culot protéique à pH alcalin, est réalisée en présence d'un agent alkylant des thiols, l'iodoacétamide. Les cystéines libres, qui ont ainsi été bloquées, ne présentent plus de réactivité à l'oxydation lors des étapes ultérieures. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel dénaturant en conditions non réductrices. Si l'oxydation d'une protéine s'est traduite *in vivo*, par la formation d'un pont disulfure intramoléculaire, le changement de conformation induit par la présence de cette modification covalente entraînera une altération de la migration électrophorétique de la protéine oxydée par rapport à la protéine réduite. Nous avons ainsi observé qu'après traitement des cellules au H₂O₂, une forme de Yap1 étiquetée avec 9 épitopes myc (myc-Yap1) adopte une migration électrophorétique plus rapide, visible uniquement en conditions non réductrices (Fig. 15A, lignes 1 et 2). L'ajout de DTT lors de l'électrophorèse abolit la différence de migration visible entre les échantillons non induit et induit au H₂O₂ (Fig. 15A, lignes 3 et 4), indiquant que le changement de migration observé en conditions non réduites est lié à une oxydation de Yap1 par le H₂O₂. L'exposition des cellules au t-butyl-hydroperoxyde (t-BOOH) reproduit également cette altération de migration (Fig. 15A, lignes 5 et 6). Cette oxydation de Yap1 intervient très rapidement (2,5 minutes après traitement au H₂O₂) (Fig. 15B), et reste maximale pendant 15 minutes. Puis, la réduction de Yap1 s'amorce dès 30 minutes d'exposition au H₂O₂ pour être totale après 60 minutes d'induction. L'oxydation de Yap1 est observée pour de faibles doses de H₂O₂ (100 µM) et est maximale dès traitement des cellules avec 200 µM de H₂O₂ (Fig. 15C).

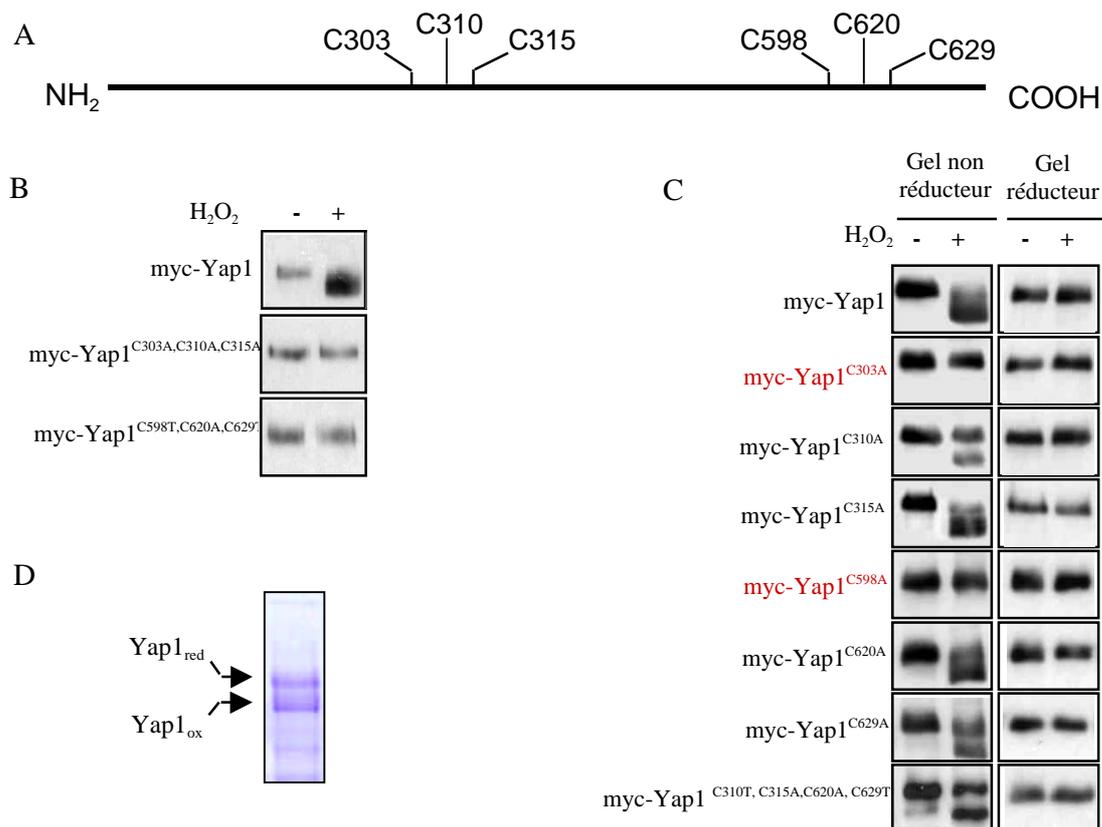


Figure 16. Identification des cystéines redox de Yap1. A. Représentation schématique des cystéines de Yap1. B. Des cellules *yap1* exprimant myc-Yap1^{C303A,C310A,C315A} et myc-Yap1^{C598T,C620A,C629T} ont été exposées ou non pendant 5 minutes à 0,4 mM de H₂O₂. Les extraits ont été réalisés comme décrit dans la figure 15A (lignes 1 et 2) et révélés après migration sur gel dénaturant non réducteur. C. Des cellules *yap1* exprimant les différents mutants de myc-Yap1 ont été exposées ou non pendant 5 minutes à 0,4 mM de H₂O₂. Les extraits ont été réalisés comme décrit dans la figure 15A (lignes 1 et 2), les protéines ont été séparées sur gel dénaturant réducteur ou non réducteur et révélées au moyen de l'anticorps anti-myc. D. Gel préparatif dénaturant non réducteur séparant les formes réduites et oxydées de Yap1. Yap1 a été purifié à partir d'une souche *yap1* exprimant myc-Yap1 exposée à 0,6 mM de H₂O₂ pendant 5 minutes.

Peptides tryptiques contenant les cystéines de Yap1	Yap1 _{red}	Yap1 _{ox}	Yap1 _{ox} réduit et alkylé (DTT puis IAA)
279-305	Non détecté	Non détecté	Non détecté
306-313	Cys ³¹⁰ alkykée NEM	Cys ³¹⁰ alkykée NEM	Cys ³¹⁰ alkykée NEM
314-319	Cys ³¹⁵ alkykée NEM	Cys ³¹⁵ alkykée NEM	Cys ³¹⁵ alkykée NEM
598-604	Cys ⁵⁹⁸ alkykée NEM	Non détecté	Cys ⁵⁹⁸ alkykée IAA
611-626	Cys ⁶²⁰ alkykée NEM	Cys ⁶²⁰ alkykée NEM	Cys ⁶²⁰ alkykée NEM
627-632	Non détecté	Non détecté	Non détecté

Tableau 4. Description sommaire des peptides tryptiques observés à partir des échantillons Yap1_{red} et Yap1_{ox}, avec ou sans réduction/alkylation par l'iodoacétamide. Yap1 a été purifié en présence de NEM à partir de cellules *yap1* exprimant myc-Yap1 sur un plasmide à bas nombre de copies et exposées au H₂O₂ (0,6 mM) pendant 5 minutes. Après migration sur gel dénaturant non réducteur, les formes oxydées et réduites de Yap1 sont séparées et digérées par la trypsine. Une moitié de la bande contenant la forme oxydée a été réduite et alkylée par le DTT et l'iodoacétamide avant digestion.

La cinétique d'apparition de la forme oxydée de Yap1 est comparable à la cinétique d'activation de Yap1, visualisée en termes d'expression génique et de translocation nucléaire, suggérant un lien entre activation et oxydation.

C. L'exposition des cellules au H₂O₂ entraîne la formation d'un pont disulfure entre les cystéines 303 et 598 de Yap1

L'utilisation concertée du système expérimental décrit ci-dessus et de la mutagenèse dirigée nous a permis d'identifier sans ambiguïté deux cystéines, l'une dans le c-CRD (C598) et l'autre dans la partie médiane de Yap1 (n-CRD) (C303) comme étant le centre redox de la protéine. Les protéines issues des allèles mutants myc-Yap1^{C303A,C310A,C315A} et myc-Yap1^{C598T,C620A,C629T} ne sont pas capables de reproduire le changement de mobilité électrophorétique lié à l'oxydation de la protéine sauvage, suggérant qu'une ou plusieurs cystéines de ces deux domaines (c-CRD et n-CRD) sont essentielles à l'oxydation de Yap1 par le H₂O₂ (Fig. 16B). Nous avons donc effectué une analyse systématique de l'effet de la substitution en alanine de chacun des six résidus cystéine de Yap1. Parmi les six résidus cystéine présents dans Yap1, seule la mutagenèse de la cystéine 303 ou de la cystéine 598 entraîne la disparition de la modification de migration électrophorétique visible après induction au H₂O₂ (Fig. 16C). La présence de ces seuls résidus dans la protéine myc-Yap1^{C310A,C315A,C620A,C629T} est de plus suffisante pour reproduire la différence de migration caractéristique de la forme oxydée de Yap1. Ces résultats indiquent que les cystéines 303 et 598 sont non seulement nécessaires mais aussi suffisantes à l'oxydation de Yap1 par le H₂O₂. La disparition totale de la forme oxydée de Yap1 si l'une ou l'autre des cystéines 303 et 598 est absente sous-tend l'existence d'un pont disulfure entre ces deux cystéines. Nous avons cherché à montrer formellement, par spectrométrie de masse, que ce pont disulfure est formé en réponse à un traitement des cellules par le H₂O₂. Pour cela, nous avons purifié sur une résine d'affinité anti-myc (9^F10), la forme oxydée de myc-Yap1. Après exposition au H₂O₂ (0,6 mM), les cellules exprimant myc-Yap1 ont été lavées puis lysées en présence de N-éthyl-maléimide (NEM), un agent alkylant des cystéines permettant en particulier de prévenir la réduction de Yap1 par les réductases cellulaires au cours de la lyse.

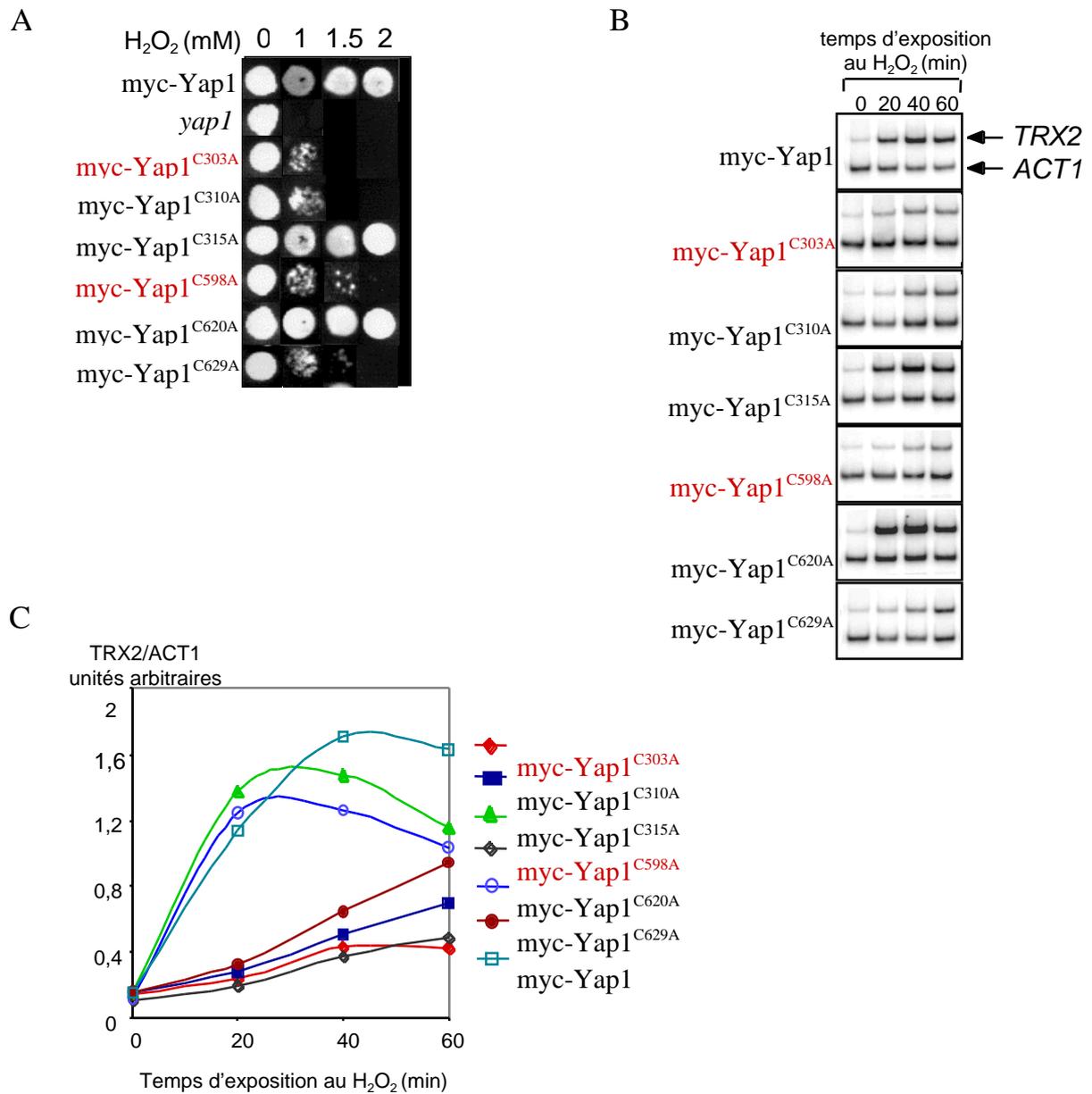


Figure 17. Activité des mutants de substitution des cystéines de Yap1. A. Sensibilité au H₂O₂ des mutants cystéine. Une souche *yap1*, transformée ou non avec les plasmides exprimant Myc-Yap1 ou les différents mutants cystéine est cultivée en phase stationnaire puis sa tolérance au H₂O₂ est mesurée sur milieu solide contenant des concentrations croissantes de cet oxydant. B. Activité transcriptionnelle des mutants cystéine de Yap1. L'expression de *TRX2* et de *ACT1* a été quantifiée par RT-PCR semi-quantitative, à partir de souches identiques à celles décrites en A, exposées ou non à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués. Les ARN totaux ont été extraits et traités comme dans la figure 14A. C. Le rapport *TRX2/ACT1* a été mesuré après quantification de la radioactivité incorporée au PhosphorImager, puis rapporté en fonction du temps.

La migration sur gel non réducteur de la protéine purifiée a permis de dissocier la partie réduite de Yap1 de la partie oxydée (Fig. 16D). Les bandes correspondant aux formes réduites et oxydées de Yap1 ont été digérées par la trypsine et analysées par nanochromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (nanoESI-Q-TOF MS/MS) (Tableau 4). Trois des résidus cystéines (Cys310, Cys315 et Cys620) sont alkylés par le NEM dans la forme réduite comme dans la forme oxydée. Ces cystéines étaient donc libres lors de la lyse des cellules et ne participent pas directement à la forme oxydée de Yap1. Le peptide contenant la cystéine 598 est en revanche présent et alkylé NEM dans la forme réduite mais absent dans la forme oxydée. La réduction/alkylation par le DTT et l'iodoacétamide de l'échantillon correspondant à la forme oxydée de Yap1 permet de nouveau de détecter le peptide contenant la cystéine 598 sous forme carbamidométhylée. Ces résultats indiquent que la cystéine 598 est oxydée en réponse au H₂O₂ et participe à la constitution de la forme oxydée de Yap1. Les peptides contenant les cystéines 303 et 629 n'ont pas pu être observés par les différentes techniques utilisées, très probablement à cause de leur taille. D'autres stratégies de digestion devront être mises en place pour espérer détecter ces peptides. Ces données associées aux données de mutagenèse suggèrent très fortement l'existence d'un pont disulfure entre les cystéines 303 et 598 de Yap1. Il est intéressant de noter que les protéines mutantes myc-Yap1^{C310A}, myc-Yap1^{C629A}, et par voie de conséquence Yap1^{C310A,C315A,C620A,C629T}, ne sont pas complètement oxydables, bien que leur participation directe dans la modification redox observée sur gel soit largement exclue par les données précédentes (voir discussion).

D. L'oxydation de Yap1 est essentielle pour son activation

L'identification des résidus impliqués dans l'oxydation de Yap1 nous a permis de tester l'importance de cette oxydation dans le processus d'activation. Pour cela, nous avons tout d'abord exprimé les différents allèles mutants de Yap1 dans une souche invalidée pour Yap1 (*yap1*) et mesuré la sensibilité au H₂O₂ des souches correspondantes (Fig. 17A). Alors que les allèles *yap1*^{C315A} et *yap1*^{C620A} récupèrent complètement l'hypersensibilité d'une souche *yap1*, tous les autres mutants testés sont hypersensibles au H₂O₂, les mutants exprimant les allèles *yap1*^{C303A} et *yap1*^{C310A} étant les plus sensibles.

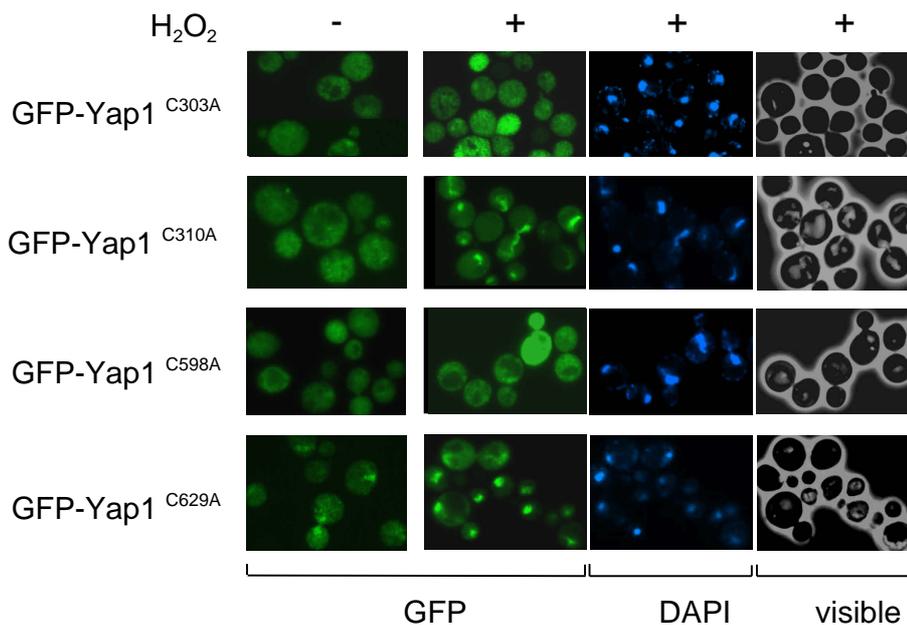


Figure 18. Les cystéines 303 et 598 sont essentielles à l'accumulation nucléaire de Yap1 en réponse au H₂O₂. La souche *yap1*, transformée avec un plasmide exprimant GFP-Yap1 ou les différents mutants cystéine est exposée pendant 12 minutes à 0,3 mM de H₂O₂ puis le marquage GFP est observé au microscope à fluorescence

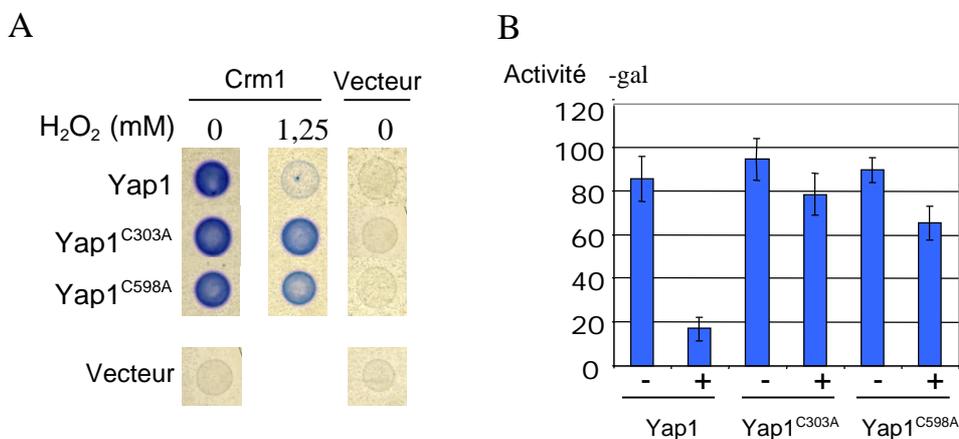


Figure 19. Les cystéines 303 et 598 ont un rôle essentiel dans la régulation de l'interaction entre Yap1 et Crml. A. L'interaction entre Yap1 et Crml est mesurée par double hybride au moyen d'un gène rapporteur LacZ. Yap1 est exprimé en fusion avec le domaine d'activation de LexA (pJG4-5-Yap1) et Crml avec le domaine de liaison à l'ADN (pKW422). Les vecteurs vides pEG202 et pKW422 ont été utilisés comme contrôles. A. Essai -galactosidase en milieu solide, en absence ou en présence de 1,25 mM de H₂O₂. B. Essai -galactosidase en milieu liquide en absence (-) ou en présence (+) de 0,5 mM de H₂O₂. Les histogrammes représentent la moyenne de quatre expériences indépendantes.

Nous avons ensuite mesuré l'activité transcriptionnelle des différents mutants (Fig. 17B et 17C) ainsi que leur capacité à se concentrer dans le noyau en réponse à une exposition au H₂O₂ (Fig. 18). De la même façon, les mutants Yap1^{C315A} et Yap1^{C620A} ont un profil d'activité transcriptionnelle (Fig. 17B et 17C) et une accumulation nucléaire sauvages (données non montrées). En revanche, les mutants Yap1^{C303A} et Yap1^{C598A} présentent non seulement un défaut d'activité transcriptionnelle mais également une absence totale d'accumulation nucléaire. Les mutants Yap1^{C310A} et Yap1^{C629A} ont des phénotypes plus complexes. Ces deux mutants présentent un défaut d'activité transcriptionnelle, malgré une faible induction de *TRX2* après une heure de traitement ainsi qu'une altération de leur capacité à s'accumuler dans le noyau. Le mutant Yap1^{C310A} est capable de se concentrer dans le noyau mais de façon relativement inefficace et retardée, alors que le mutant Yap1^{C629A} est partiellement nucléaire en absence de stress avec une légère augmentation de sa concentration nucléaire après exposition au H₂O₂. Ces phénotypes peuvent être rapprochés du défaut d'oxydation décrit pour ces mutants dans le paragraphe précédent.

E. L'oxydation de Yap1 contrôle son interaction avec Crm1

Les données de relocalisation indiquent que l'oxydation de Yap1 est requise pour son accumulation nucléaire. Nous avons donc mesuré par double-hybride l'impact des mutations C303A et C598A sur l'interaction de Yap1 avec l'exportine Crm1 (Fig. 19). En absence d'agent oxydant, l'interaction entre Yap1 et Crm1 se traduit par la coloration bleue des colonies. En présence de H₂O₂, l'interaction entre Yap1 et Crm1 est interrompue (pas de coloration et baisse de l'activité β -galactosidase), alors qu'elle persiste lorsque les mutants Yap1^{C303A} et Yap1^{C598A} sont exprimés à la place de la protéine sauvage. Ces données indiquent que l'oxydation de Yap1 permet une inhibition de l'interaction entre Yap1 et Crm1. Le changement de conformation induit par la formation du pont disulfure 303-598, masque probablement le NES et entraîne l'accumulation nucléaire de Yap1 en réponse au H₂O₂. L'existence d'un changement de conformation au cours de la transition réduit/oxydé a été mise en évidence grâce à un anti-corps polyclonal conformationnel, dirigé contre un peptide

C-terminal de Yap1 (Fig. 20). En effet, cet anti-corps reconnaît la forme oxydée avec une affinité nettement diminuée.

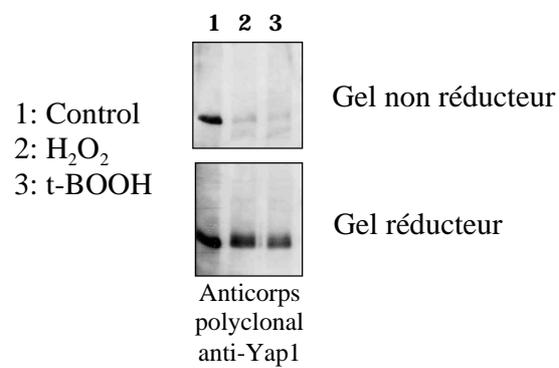


Figure 20. Un anticorps polyclonal dirigé contre la partie C-terminale de Yap1 ne reconnaît plus la forme oxydée. Une souche sauvage a été exposée ou non pendant 5 minutes à 0,4 mM de H₂O₂ ou 1 mM de t-BOOH. Les extraits sont réalisés comme décrit dans la figure 15A.

F. Conclusion/ Discussion

Nous avons montré que l'exposition de cellules au peroxyde d'hydrogène entraîne la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 303 et 598 de Yap1. Cette oxydation est cruciale pour l'activation de Yap1 en réponse au H_2O_2 car elle contrôle l'interaction entre Yap1 et Crm1 et régule ainsi sa localisation subcellulaire. Ces données sont donc compatibles avec les précédents résultats de mutagenèse, montrant que le c-CRD et la partie médiane de Yap1 sont indispensables à l'accumulation nucléaire de Yap1 en réponse au H_2O_2 [187].

1) Validité des techniques d'investigation

Contrairement aux techniques classiques d'extraction des protéines, la méthode que nous avons utilisée pour déterminer l'état redox de Yap1 est adaptée à l'observation des modifications redox *in vivo*. En effet, l'abaissement rapide du pH grâce à l'ajout d'acide trichloroacétique (TCA) diminue de façon drastique la réactivité des cystéines et permet de figer l'état redox des protéines tel qu'il était à l'intérieur de la cellule. Cet état redox est maintenu de façon comparable au cours de la lyse. Lors de leur re-solubilisation à pH alcalin, l'oxydation non spécifique des protéines est prévenue par l'ajout d'un agent alkylant des thiols, l'iodoacétamide. Le blocage définitif des cystéines libres se fait à un pH égal à 8, permettant l'alkylation de la majorité des cystéines. Une fois modifiées de façon covalente, les protéines peuvent être analysées par séparation sur gel dénaturant et les profils de migration en conditions réductrices ou non réductrices peuvent être comparés.

L'utilisation d'une technique de lyse non dénaturante (sans TCA) a été nécessaire, en particulier pour l'analyse du pont disulfure en spectrométrie de masse. Dans ce cas, le blocage des cystéines par l'agent alkylant (NEM) est réalisé *in vivo*. Ce blocage est à priori moins efficace que l'arrêt par le TCA (pH intracellulaire et vitesse de réaction) et pose de plus le problème de l'existence d'une réponse physiologique de la cellule aux agents alkylants des thiols. Cette technique n'a donc pas été utilisée en première intention pour l'analyse de l'état

redox des protéines, mais seulement afin de confirmer par spectrométrie de masse les résultats prédits par la mutagenèse.

2) L'oxydation de Yap1 repose sur la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 303 et 598

La mutagenèse dirigée nous a permis de désigner deux cystéines comme essentielles à l'oxydation et à l'activation de Yap1 : les cystéines 303 et 598. Bien que nous n'ayons pas été capables d'identifier formellement le pont disulfure, un faisceau d'arguments nous permet d'appuyer son existence. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'éliminer formellement l'implication des cystéines 310, 315 et 620 dans la forme oxydée. Bien que le peptide contenant la cystéine 629 n'ait pas pu être détecté, son implication dans le pont disulfure est peu probable aux vues des données génétiques. Par ailleurs, la mutagenèse de l'une ou de l'autre des cystéines 303 et 598 suffit à abolir totalement la différence de migration électrophorétique induite par l'oxydation. L'interprétation la plus simple de ce résultat est la formation d'un pont disulfure entre ces deux cystéines. La présence d'un métal-redox actif ou d'un groupement prosthétique ne peut cependant pas être éliminé. Elle sera recherchée lorsque nous obtiendrons la protéine Yap1 purifiée en quantité suffisante.

3) Rôle des autres cystéines de Yap1

Parmi les 4 autres cystéines de Yap1, C315, C620 et C629 ne semblent pas impliquées dans le processus d'oxydation. Bien que les cystéines 620 et 629, aient été associées, dans des études de mutagenèse précédemment publiées, au contrôle de l'accumulation nucléaire de Yap1, les phénotypes observés sont vraisemblablement liés à une modification de la structure du NES, diminuant l'efficacité de l'export par Crm1, plutôt qu'à une altération de la fonction de détection du H₂O₂. Ceci est bien illustré par le fait que la substitution de la cystéine 620 en thréonine promeut l'accumulation nucléaire de Yap1 [183] alors que sa substitution en alanine n'a pas d'effet (nos données). De même, la substitution de la cystéine 629 en alanine ([187] et nos données) altère la fonction du NES alors que le mutant de substitution en thréonine présente un profil sauvage [183]. La mutagenèse de la cystéine 629 en alanine est également

associée à un défaut d'activation et à une hyper-sensibilité de la souche en réponse au H₂O₂. Ces phénotypes sont partagés par l'ensemble des mutants constitutivement nucléaires ([187] et nos données), sans que la cause de ce phénomène soit comprise (voir discussion générale). Le rôle de la cystéine 310 apparaît plus complexe. Nos données montrent que cette cystéine n'est pas indispensable à l'oxydation de Yap1 ; cependant, cette oxydation est relativement inefficace et corrèle avec un défaut d'activité transcriptionnelle et une hyper-sensibilité du mutant au H₂O₂. Des données obtenues récemment au laboratoire suggèrent que la cystéine 310 jouerait un rôle dans la stabilisation du pont disulfure entre les résidus 303 et 598. Cette observation est compatible avec le défaut d'oxydation et l'accumulation nucléaire retardée observés dans ce mutant. De plus, la localisation des deux cystéines 310 et 629 à proximité des cystéines 303 et 598 n'exclut pas que ces résidus jouent un rôle structural important, en particulier dans l'établissement de la réactivité du centre redox. Par ailleurs, l'existence d'un mécanisme d'oxydation concerté impliquant les cystéines 310 et 629 et reposant sur la mise en place d'une chaîne de transfert de ponts disulfures aboutissant à la forme la plus stable, ne peut pas être exclu. Cependant, la capacité à être oxydé du mutant Yap1^{C310A,C315A,C620A,C629T}, ne possédant plus que les cystéines 303 et 598, suggère qu'un tel mécanisme n'est pas essentiel.

4) Conclusion : Comment Yap1 est-il oxydé en réponse aux peroxydes ?

Chez *E. coli*, OxyR est oxydé directement par les peroxydes [49] : OxyR est en même temps le détecteur et l'activateur de la réponse aux peroxydes. Ce mécanisme est-il conservé chez *S. cerevisiae* : l'oxydation de Yap1 est-elle directe ? Notre incapacité à reproduire l'oxydation de Yap1 *in vitro*, en présence de H₂O₂, suggérait qu'un mécanisme plus complexe était en effet responsable de l'oxydation de Yap1 (données non montrées).

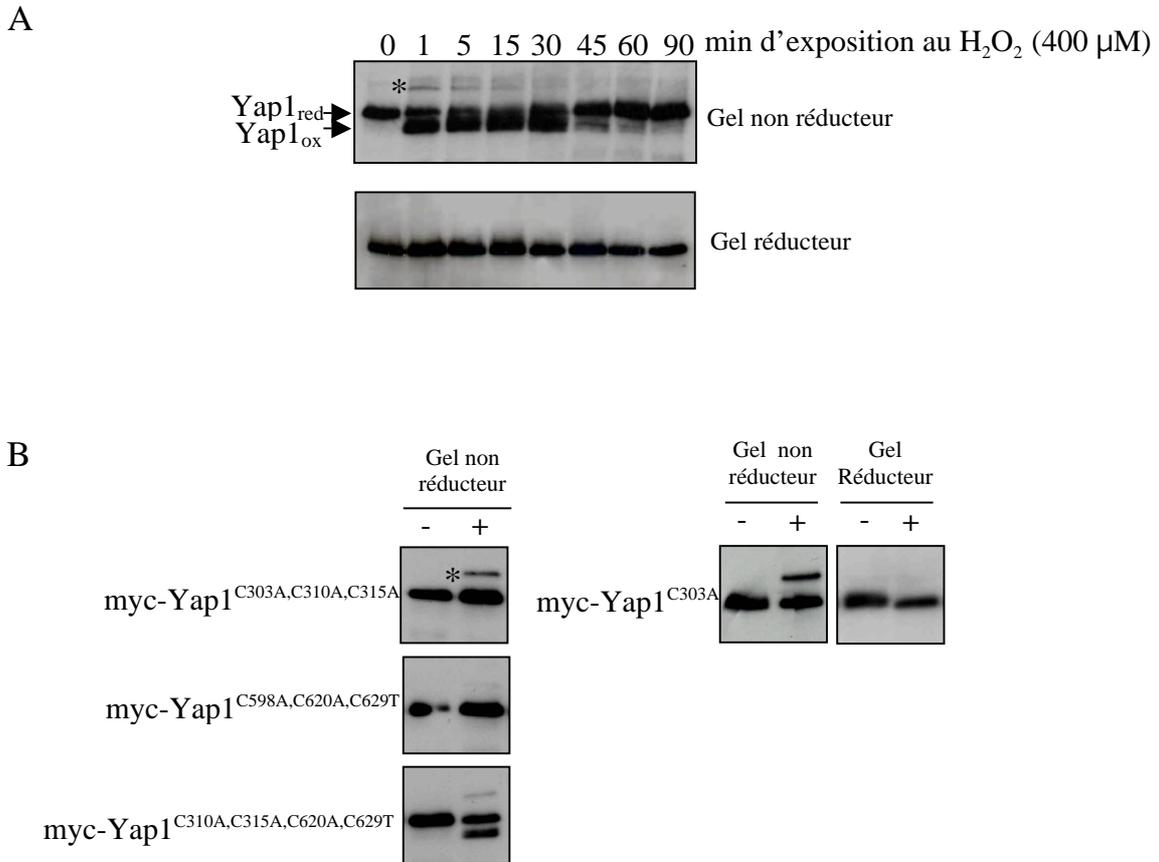


Figure 21. En réponse au H₂O₂, Yap1 interagit de façon transitoire avec une petite protéine d'environ 20 kD. A. Analyse *in vivo* de l'état redox de Yap1. La souche *yap1* exprimant myc-Yap1 est exposée à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués. Les extraits, réalisés comme décrit dans la figure 15A, sont ensuite séparés sur gel dénaturant non réducteur ou réducteur et révélés au moyen de l'anticorps anti-myc 9^F10. La bande de haut poids moléculaire correspondant à Yap1 en interaction avec la petite protéine est signalée par une astérisque. B. Effet des mutations des cystéines de Yap1 sur la formation de la bande de haut poids moléculaire. Les extraits ont été réalisés à partir d'une souche *yap1* exprimant les allèles mutants indiqués, non traitée ou exposée à 0,4 mM de H₂O₂ pendant 2 minutes. Les protéines sont ensuite séparées comme décrit en A.

II. L'oxydation de Yap1 en réponse aux peroxydes est relayée par la peroxydase Gpx3

A. Yap1 interagit avec une protéine d'environ 20 kD via un pont disulfure inter-moléculaire

L'observation d'un auto-radiogramme plus exposé de la cinétique d'oxydation de myc-Yap1 a permis de mettre en évidence l'apparition d'une bande de haut poids moléculaire, inductible et présente durant les 15 premières minutes d'exposition au H₂O₂ (Fig. 21A). La période pendant laquelle cette bande est visible sur le gel correspond à la période pendant laquelle l'oxydation de Yap1 est maximale. Cette bande immunoréactive, d'intensité très modérée, disparaît lorsque les protéines sont séparées en conditions réductrices. D'après ses caractéristiques de migration, cette bande pourrait correspondre à l'association covalente d'une faible proportion de Yap1 (environ 10%) et d'une protéine d'environ 20 kDa via un pont disulfure inter-moléculaire.

L'analyse des mutants des cystéines de Yap1 a montré que cette bande était quasiment indétectable dans la souche exprimant myc-Yap1^{C598A,C620A,C629T} alors que son abondance était accrue dans une souche exprimant myc-Yap1^{C303A,C310A,C315A} (Fig. 21B). La stabilisation de cette bande de haut poids moléculaire est reproduite dans des cellules exprimant le simple mutant myc-Yap1^{C303A}. Dans ce cas, la proportion de Yap1 impliquée dans cette interaction atteint 30 à 50 %. La présence de cette bande après exposition au H₂O₂ de cellules exprimant le mutant myc-Yap1^{C310A,C315A,C620A,C629T}, ne possédant plus que les cystéines 303 et 598, suggère que la cystéine 598 est impliquée dans l'interaction de Yap1 avec son partenaire.

B. Le partenaire de Yap1 est la glutathion-peroxydase Gpx3

Nous avons profité de la stabilisation de cette forme de haut poids moléculaire dans le mutant Yap1^{C303A} pour identifier ce partenaire covalent de Yap1. Après exposition au H₂O₂, les cellules exprimant myc-Yap1^{C303A} ont été lavées et lysées en présence de NEM et Yap1 et son partenaire ont été copurifiés sur une résine d'affinité anti-myc (9^E10) en absence d'agent réducteur.

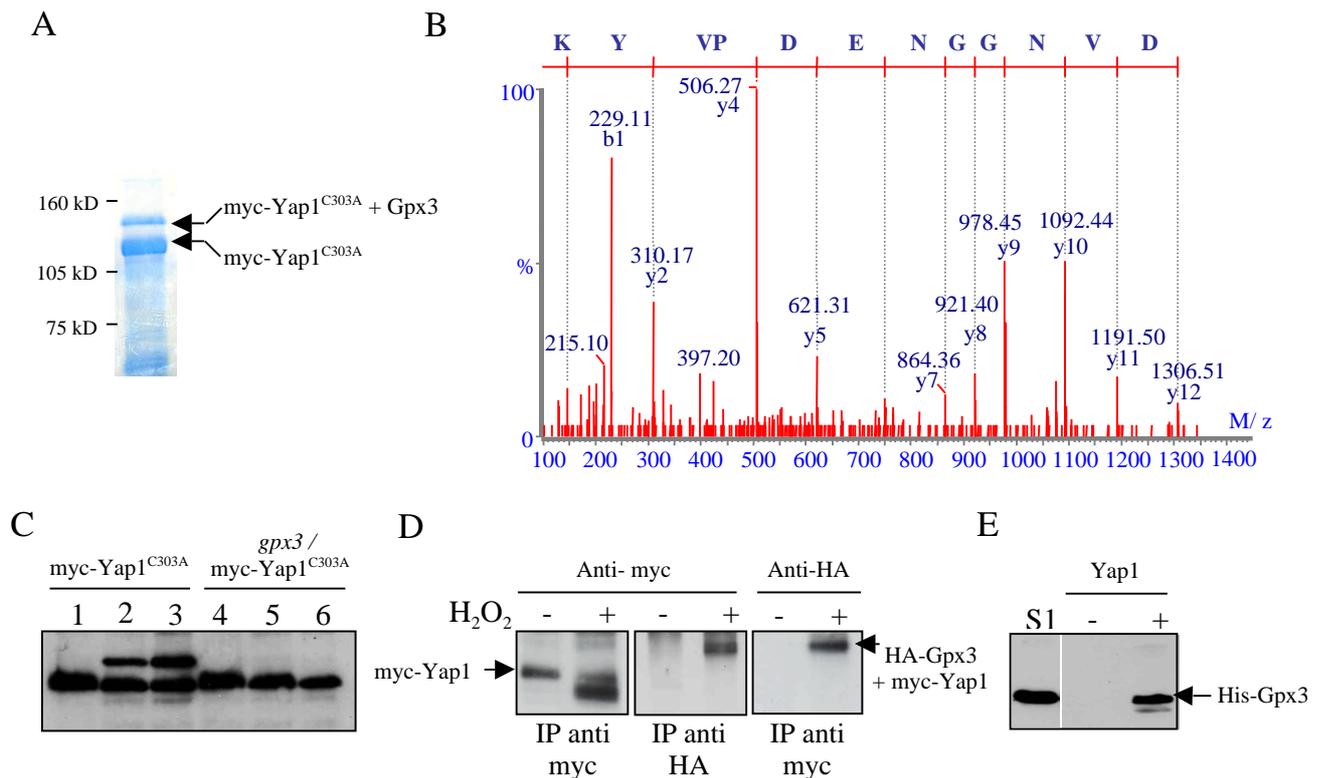


Figure 22. La glutathion-peroxydase Gpx3 est la protéine de 20 kD interagissant avec Yap1. A. Gel préparatif dénaturant non réducteur séparant myc-Yap1^{C303A} libre ou associé à son partenaire. Yap1 a été purifié à partir d'une souche *yap1* exprimant myc-Yap1^{C303A} exposée à 0,6 mM de H₂O₂ pendant 5 minutes. B. Identification du peptide 96-108 de Gpx3 par fragmentation en mode MS/MS. L'identification est réalisée par comparaison des profils de fragmentation expérimentaux et des profils théoriques calculés à partir de la banque de données NCBI. C. La bande de haut poids moléculaire associée à myc-Yap1^{C303A} est absente dans une souche *gpx3* exposée au H₂O₂. Les souches *yap1* et *yap1 gpx3* exprimant myc-Yap1^{C303A} non traitées (lignes 1 et 4), exposées à 0,4 mM de H₂O₂ (lignes 2 et 5) ou à 1 mM de t-BOOH (lignes 3 et 6) pendant 2 minutes, ont été lysées suivant le protocole décrit en Fig. 15A. D. L'interaction entre Yap1 et Gpx3 est également observée avec la protéine Yap1 sauvage. Une souche *yap1* co-exprimant myc-Yap1 et HA-Gpx3 a été exposée ou non à 0,4 mM de H₂O₂ pendant 2 minutes. Les extraits ont été réalisés comme décrit en Fig. 15A, dialysés puis purifiés par immunoprécipitation (IP) soit avec l'anticorps anti-myc 9^E10 soit avec l'anticorps anti-HA 12CA5. Les immunoprécipitats ont ensuite été séparés sur gel dénaturant non réducteur et révélés comme indiqué soit au moyen soit de l'anticorps anti-HA soit de l'anticorps anti-myc. E. Les protéines Yap1 et Gpx3 réduites interagissent de façon non covalente. Des extraits issus d'une souche *yap1* surexprimant ou non myc-Yap1 ont été incubés en conditions réductrices (2 mM de DTT) pendant 3 heures à 4°C avec une résine sépharose couplée à l'anti-myc 9^E10. Un extrait contenant His-Gpx3 recombinant (S1), a été réalisé en anaérobiose et déposé sous argon sur la résine fixant ou non Yap1 réduit. Après lavage de la résine, le matériel fixé spécifiquement à la résine a été élué par compétition avec le peptide myc et les protéines ont été bloquées au NEM. Les éluats ont ensuite été déposés sur gel SDS-PAGE non réducteur et révélés au moyen d'un anticorps monoclonal anti-His.

Les deux formes, libre et associée de Yap1, ont été séparées sur un gel dénaturant non réducteur (Fig. 22A). Une analyse par nano-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (nanoESI-Q-TOF MS/MS) a permis d'identifier, après digestion tryptique de la bande de plus haut poids moléculaire, comme seules protéines présentes dans cette bande, Yap1 (avec 40% de couverture) et Gpx3 (avec 27% de couverture) (Fig. 22B). Nous avons confirmé génétiquement les résultats de spectrométrie de masse en montrant qu'après traitement au H₂O₂, la bande de haut poids moléculaire n'est plus visible dans une souche invalidée pour *GPX3* (*gpx3*), exprimant myc-Yap1^{C303A} (Fig. 22C). Nous avons également montré que Gpx3 interagit covalamment avec la protéine Yap1 sauvage, en co-exprimant myc-Yap1 et une version étiquetée HA de Gpx3 (Fig. 22D). Après immunoprécipitation dénaturante de myc-Yap1, l'association de Gpx3 et de Yap1 est observée spécifiquement dans les immunoprécipitats issus de cellules induites, par la révélation d'une bande unique immunoréactive HA, migrant à la taille de la bande de haut poids moléculaire révélée par l'anti-myc. Réciproquement, l'immunoprécipitation dénaturante de HA-Gpx3 permet de révéler myc-Yap1 en conditions induites. L'induction par le H₂O₂, entraînant la formation d'un pont disulfure inter-moléculaire entre Yap1 et Gpx3, nous avons recherché une éventuelle interaction non covalente entre ces deux protéines en conditions non induites. La protéine recombinante Gpx3, exprimée dans *E. coli*, est retenue spécifiquement par myc-Yap1, immobilisé sur une colonne sépharose anti-myc. Ces résultats ont été obtenus avec des protéines réduites et l'expérience a été réalisée en anaérobiose (Fig. 22E) ou après alkylation des protéines (données non montrées). Yap1 et Gpx3 sont donc probablement associés en un pré-complexe en absence de H₂O₂.

Gpx3 est l'une des trois glutathion-peroxydases présentes chez *S. cerevisiae*. Son poids moléculaire observé est de 21 kDa. Cette valeur correspond au poids prédit du partenaire de Yap1 et indique que Yap1 et Gpx3 interagissent avec une stoechiométrie 1:1.

C. L'association de Yap1 et de Gpx3 par un pont disulfure entre les cystéines 36 de Gpx3 et 598 de Yap1 permet l'oxydation de Yap1.

La cinétique d'interaction de Gpx3 avec Yap1, la stabilisation de cette interaction dans le mutant Yap1^{C303A} ainsi que la fonction peroxydase de cette protéine nous ont conduit à penser que l'oxydation de Yap1 par le peroxyde d'hydrogène pourrait être relayée par Gpx3.

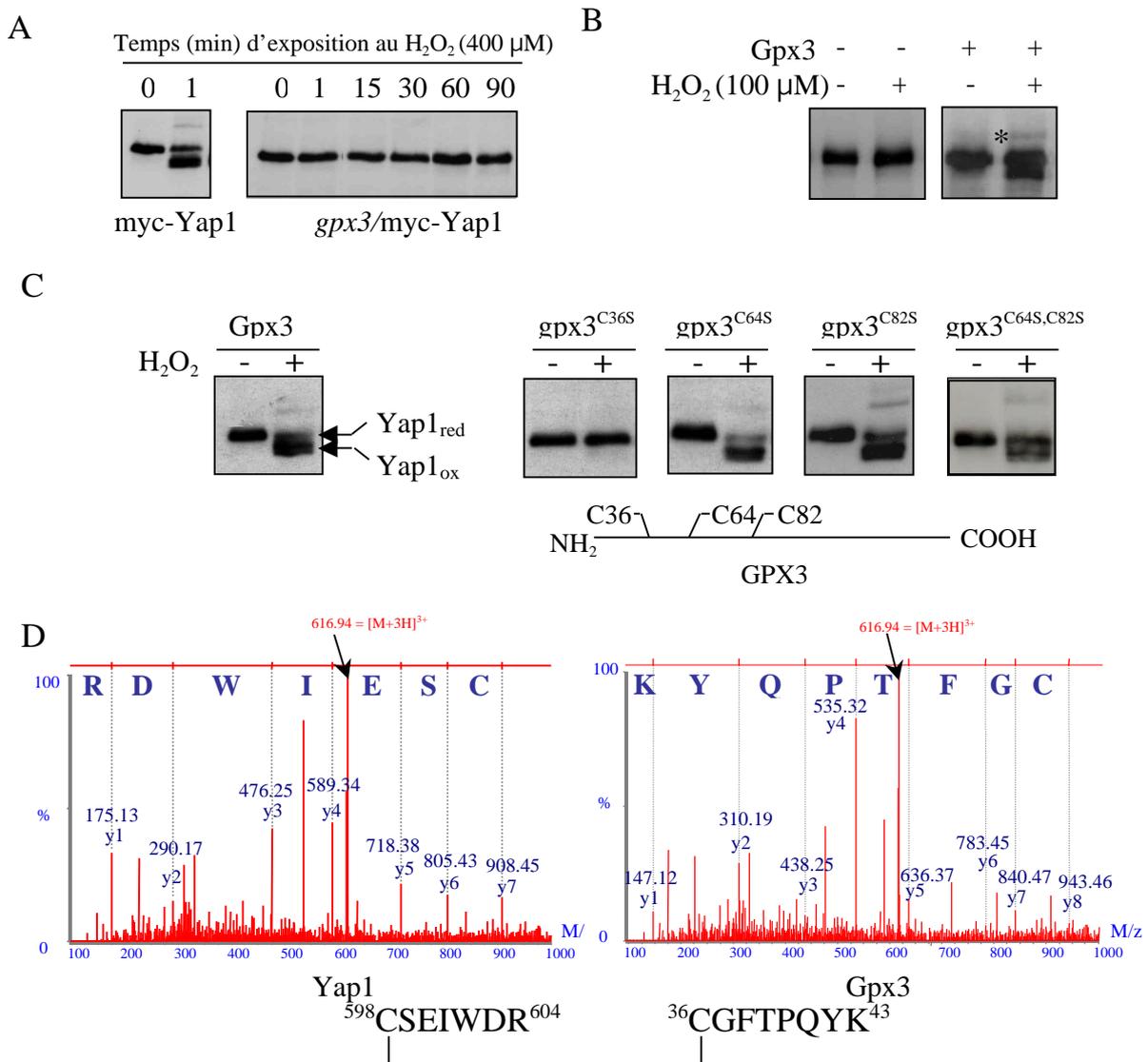


Figure 23. La formation d'un pont disulfure entre les cystéines 598 de Yap1 et 36 de Gpx3 permet l'oxydation de Yap1. A. Gpx3 est essentiel à l'oxydation de Yap1 par le H₂O₂. Les souches *yap1*, *yap1 gpx3* transformées avec myc-Yap1 ont été exposées ou non à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués. Les extraits ont été réalisés et analysés sur gel non réducteur comme décrit en Fig. 15A. B. L'oxydation de Yap1 *in vitro* nécessite la présence de Gpx3. 100 μM de H₂O₂ ont été ajoutés à 1 μM de Yap1 purifié et réduit en présence ou non de Gpx3 purifié réduit (excès molaire de 10 fois). La réaction a été réalisée en anaérobiose pendant 10 minutes à température ambiante et a été arrêtée par ajout de NEM (10 mM). L'état redox de Yap1 est visualisé après migration sur gel dénaturant non réducteur. La forme correspondant au pont disulfure entre Yap1 et Gpx3 est signalée par une astérisque. C. Identification des cystéines de Gpx3 essentielles à l'oxydation de Yap1. La souche *yap1* co-exprimant myc-Yap1 et les différents allèles sauvage et mutants de Gpx3 (Gpx3^{C36S}, Gpx3^{C64S}, Gpx3^{C82S} et HA-Gpx3^{C64S,C82S}) a été traitée ou non avec 0,4 mM de H₂O₂ pendant 2 minutes. Les extraits ont été réalisés comme décrit en Fig. 15A, séparés sur gel dénaturant non réducteur et révélés avec l'anticorps anti-myc. Un schéma décrivant l'emplacement des cystéines de Gpx3 est placé en dessous. D. Identification du pont disulfure reliant Yap1 et Gpx3 par spectrométrie de masse. Le spectre MS/MS correspondant à la fragmentation des peptides liés par pont disulfure est représenté deux fois (Masse moléculaire totale: 1847,82 Da) et est interprété soit par rapport à la séquence de Yap1 soit par rapport à la séquence de Gpx3. Le pic précurseur est triplement chargé (Masse moléculaire: 616,94 Da)

Nous avons donc analysé l'état redox de Yap1 *in vivo*, et nous avons observé qu'en absence de Gpx3, aucune oxydation de Yap1 n'est visible, et ce jusqu'à 90 minutes d'exposition au H₂O₂ (Fig. 23A). Gpx3 est également nécessaire à l'oxydation de Yap1 *in vitro* (Fig. 23B). En anaérobiose, l'ajout de 100 µM d'H₂O₂ aux protéines Yap1 et Gpx3 purifiées et réduites permet la formation du pont disulfure intermoléculaire observé *in vivo* et une oxydation de Yap1 Gpx3-dépendante. Cependant, la relative inefficacité de l'oxydation de Yap1 *in vitro* par rapport à son oxydation *in vivo* suggère qu'un autre composant pourrait être nécessaire à cette oxydation.

Gpx3 possède trois cystéines, aux positions 36, 64 et 82 (Fig. 23C). Afin d'identifier la ou les cystéines impliquée(s) dans l'oxydation de Yap1, nous avons remplacé chacune de ces cystéines par des sérines et nous avons co-exprimé les mutants correspondants avec myc-Yap1 dans une souche *gpx3* (Fig. 23C). L'oxydation de Yap1 en réponse au H₂O₂ est sauvage dans les mutants Gpx3^{C64S}, Gpx3^{C82S}, Gpx3^{C64S,C82S}. En revanche, Yap1 n'est plus oxydé dans le mutant Gpx3^{C36S} et aucune bande, correspondant à l'association covalente de Yap1 et de Gpx3, n'est observée. La cystéine 36 de Gpx3 semble donc être, avec la cystéine 598 de Yap1, impliquée dans l'interaction Yap1/Gpx3. Nous avons cherché à préciser biochimiquement cette interaction en visualisant formellement l'association entre Yap1 et Gpx3 par spectrométrie de masse. Pour cela, nous avons analysé par nanoESI-Q-TOF MS/MS l'échantillon non réduit utilisé précédemment pour l'identification de Gpx3, contenant Yap1^{C303A} associé covalamment à Gpx3 (Fig. 22A). Un ion dont la masse expérimentale correspond à la masse théorique calculée de l'association des peptides 598-604 de Yap1 et 36-43 de Gpx3 par un pont disulfure a été détecté dans la digestion tryptique. La fragmentation de cet ion par MS/MS a permis de déterminer formellement la présence des deux peptides de Yap1 et de Gpx3 sus-cités (Fig. 23D). Dans cet échantillon, ni le peptide 598-604 de Yap1 ni le peptide 36-43 de Gpx3 n'ont été détectés sous leur forme libre. Ces données indiquent que la liaison covalente de ces deux protéines n'implique pas d'autres cystéines que les cystéines 598 et 36, à moins que deux ponts disulfures ne soient nécessaires à l'association covalente des deux protéines. Or, la capacité du mutant Gpx3^{C64S,C82S} à s'associer covalamment avec Yap1 montre qu'un seul pont disulfure est suffisant.

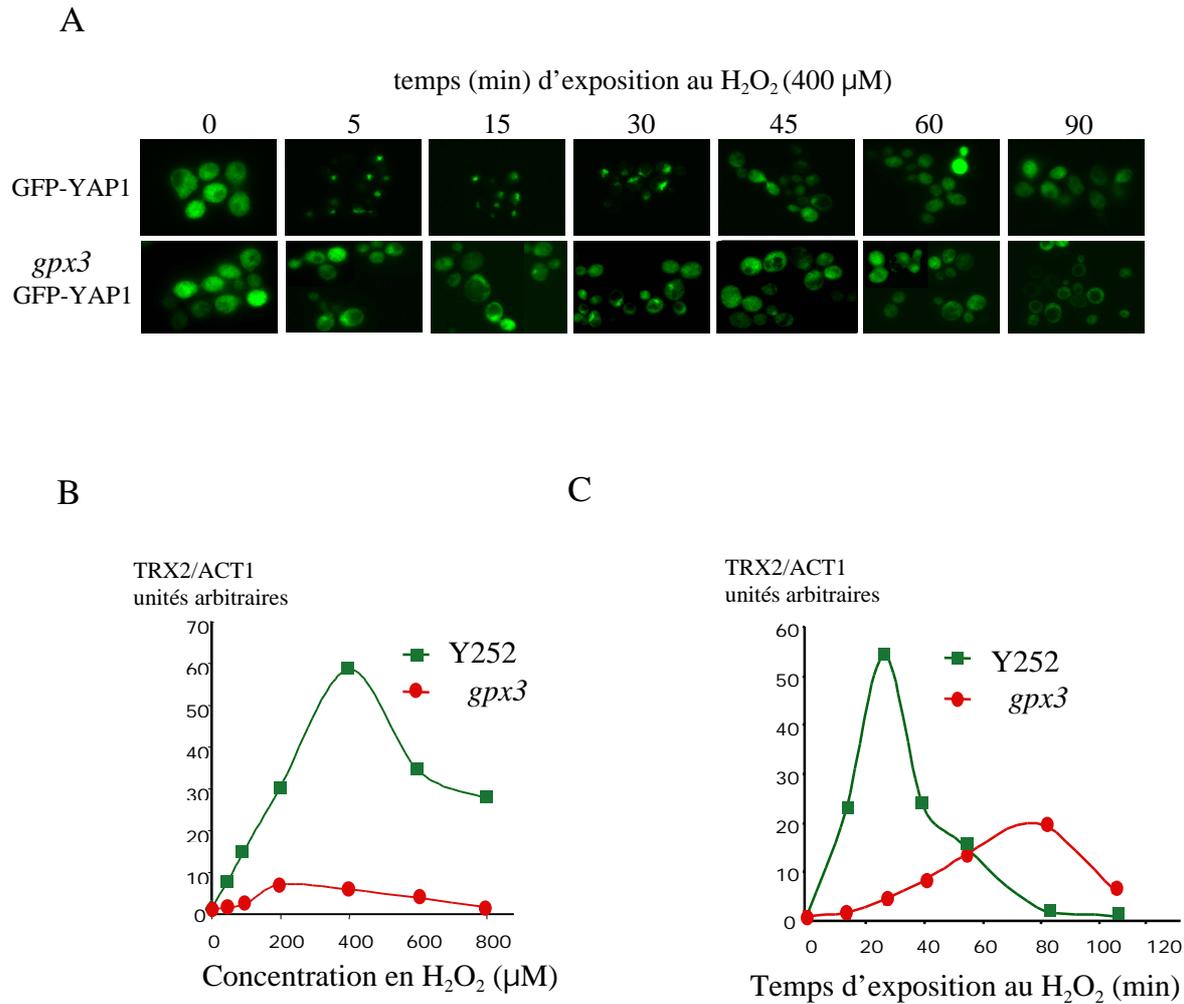


Figure 24. Gpx3 est essentielle à l'activation de Yap1 par le H₂O₂. A. Gpx3 est nécessaire à l'accumulation nucléaire de Yap1. Les souche *yap1* et *gpx3*, exprimant GFP-Yap1 ont été exposées à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués et le marquage GFP a été observé au microscope à fluorescence. B. Mesure de l'expression de *TRX2* dans la souche *gpx3* exposée au H₂O₂: dose-réponse. Les ARN totaux sont extraits à partir des souches sauvage (Y252) et *gpx3*, exposées pendant 30 minutes aux doses de H₂O₂ indiquées. Les rapports *TRX2/ACT1* ont été déterminés par RT-PCR quantitative « on line ». C. Cinétique d'induction de *TRX2* dans la souche *gpx3*. Les ARN totaux sont extraits à partir des souches sauvage (Y252) et *gpx3*, exposées à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués. L'expression de *TRX2* est mesurée comme en B.

L'analyse du même matériel après réduction et alkylation par l'iodoacétamide nous a permis d'observer la disparition du peptide correspondant au pont disulfure intermoléculaire et de détecter les peptides 598-604 de Yap1 et 36-43 de Gpx3 libres et carbamidométhylés (données non montrées).

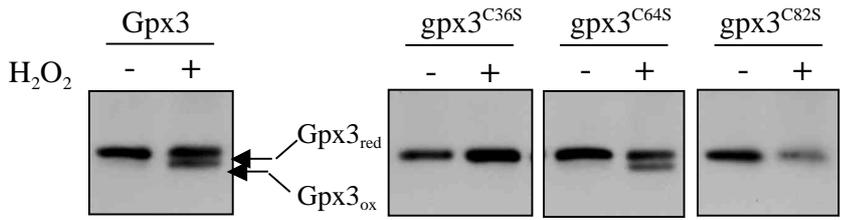
Nous avons montré qu'en réponse au H₂O₂, Gpx3 et Yap1 s'associent grâce à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre la cystéine 36 de Gpx3 et la cystéine 598 de Yap1. Cette association est indispensable à la formation du pont intramoléculaire 303-598 de Yap1. La cystéine 36 de Gpx3, qui est essentielle à l'activité de Yap1, est aussi le résidu conservé, présent sous forme cystéine ou sélénocystéine au sein du site actif des protéines appartenant à la famille des glutathion-peroxydases.

D. Gpx3 est essentiel à l'activation de Yap1 par les peroxydes

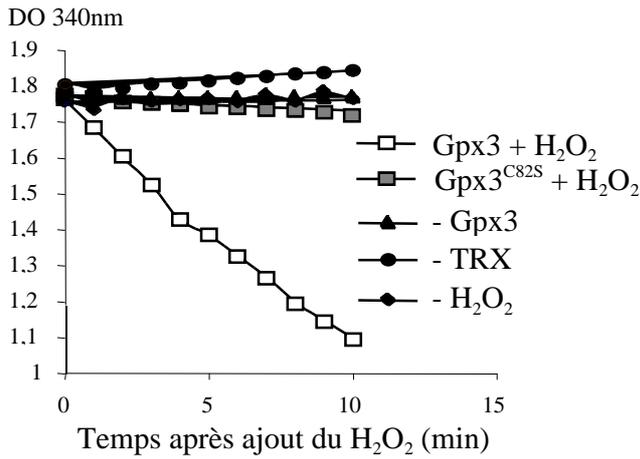
L'oxydation de Yap1 par les peroxydes entraîne son accumulation rapide dans le noyau, et permet l'induction de ses gènes cibles. Or, dans une souche *gpx3* exposée au H₂O₂, Yap1 reste majoritairement cytoplasmique et ce jusqu'à 90 minutes d'exposition, ce qui contraste avec la localisation exclusivement nucléaire observée durant les 30 premières minutes d'exposition d'une souche sauvage (Fig. 24A). Parallèlement, l'activité transcriptionnelle de Yap1 est très altérée en absence de Gpx3. L'induction de *TRX2* après 30 minutes d'exposition au H₂O₂ est très limitée quelles que soient les concentrations d'oxydant utilisées (50 à 800 μM) (Fig. 24B). En cinétique, l'absence de Gpx3 abolit la réponse transcriptionnelle durant la première heure d'exposition (0,4 mM), même si l'expression de *TRX2* augmente modérément après une heure de traitement (Fig. 24C).

Elle est corrélée avec l'observation d'un marquage partiellement nucléaire dans 10-30% des cellules *gpx3* après 30 minutes d'exposition au H₂O₂. Cette augmentation tardive de l'expression de *TRX2* n'est pas observée dans une souche invalidée à la fois pour *YAPI* et pour *GPX3* (données non montrées) ; cette réponse résiduelle est donc Yap1-dépendante mais Gpx3 indépendante (voir aussi Résultat 2^{ème} Partie paragraphe III A.2).

A



B



C

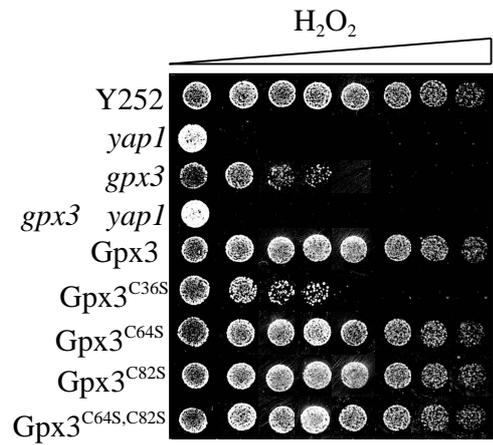


Figure 25. L'activité peroxydase de Gpx3 requiert la formation d'un pont disulfure intramoléculeire entre les cystéines 36 et 82. A. Mesure *in vivo* de l'état redox de Gpx3. Une souche *gpx3* exprimant HA-Gpx3, HA-Gpx3^{C36S}, HA-Gpx3^{C64S} ou HA-Gpx3^{C82S} a été exposée pendant 2 minutes à 0,4 mM de H₂O₂. Les extraits ont été réalisés comme décrit dans les méthodes (blocage NEM), séparés sur gel dénaturant non réducteur et révélés au moyen d'un anticorps anti-HA. B. Gpx3 possède une activité peroxydase *in vitro*. L'activité des protéines recombinantes Gpx3 et Gpx3^{C82S} purifiées a été testée en présence de thiorédoxine, thiorédoxine réductase et de H₂O₂ (carrés blancs et carrés gris). Les différents contrôles sont réalisés en omettant l'un des composants de la réaction. L'activité peroxydase est représentée par la décroissance de la densité optique à 340 nm en fonction du temps. C. Mesure de la tolérance au H₂O₂ des différents mutants de Gpx3. La sensibilité au H₂O₂ des souches sauvage (Y252) *yap1*, *gpx3 yap1*, *gpx3* exprimant ou non HA-Gpx3 ou les allèles mutantes HA- Gpx3^{C36S}, Gpx3^{C64S}, Gpx3^{C82S} et Gpx3^{C64S,C82S} a été testée comme décrit en figure 17A.

E. L'activité peroxydase de Gpx3 fait intervenir la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 36 et 82.

Nos résultats identifient Gpx3 comme la protéine permettant de détecter la présence de peroxydes à l'intérieur de la cellule et de transmettre le signal à Yap1. Cependant, d'autres études avaient attribué à Gpx3 un rôle enzymatique de réduction des peroxydes et des hydroperoxydes de lipides [67, 68]. Nous avons cherché à déterminer si ces deux fonctions étaient couplées en caractérisant les résidus cystéine essentiels à l'activité peroxydase de Gpx3. Pour cela, nous avons tout d'abord analysé les modifications de l'état redox de Gpx3 en réponse au H₂O₂. Avec une technique similaire à celle utilisée pour Yap1, nous avons observé que Gpx3 est très rapidement oxydé après exposition des cellules au H₂O₂ (Fig. 25A). Cette oxydation est visualisée par l'apparition d'une bande dont la migration électrophorétique est plus rapide. La disparition de cette bande en conditions réductrices (données non montrées) et dans les mutants Gpx3^{C36S} et Gpx3^{C82S} indique que Gpx3 s'oxyde très probablement par la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 36 et 82. La présence de ce pont a été confirmée par nanoESI-Q-TOF MS/MS après digestion chymotryptique de la forme oxydée de Gpx3 exprimée dans *E. coli* et purifiée (données non montrées). Afin de mieux cerner le rôle de ce pont disulfure intramoléculaire au cours du cycle peroxydatique, nous avons mesuré l'activité peroxydase de Gpx3 et de ses différents mutants *in vitro* (Fig. 25B). Pour cela, nous avons mesuré la consommation de NADPH, en suivant la décroissance de la DO_{340nm}, lors du mélange de Gpx3 purifiée à partir d'*E. coli*, du peroxyde d'hydrogène et du système de réduction (thiorédoxine, thiorédoxine réductase, NADPH ou glutathion, glutathion réductase, NADPH). Après purification, l'activité peroxydase de la protéine sauvage recombinante est significative en présence de H₂O₂ et du système thiorédoxine/thiorédoxine réductase (voir aussi paragraphe IV.B.1). En revanche, le mutant Gpx3^{C82S} ne présente aucune activité peroxydase détectable.

Ces données indiquent que le cycle peroxydatique de Gpx3 fait intervenir la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 36 et 82. La formation d'un pont disulfure intramoléculaire au cours du cycle catalytique d'une peroxydase et en particulier d'une GPx est inhabituelle.

F. L'activité régulatrice de Gpx3 est plus importante que son activité de peroxydase

Nous avons confirmé l'hypersensibilité au H₂O₂, précédemment décrite pour la souche *gpx3* [67, 68]. Cependant, ce phénotype, auparavant attribué à un défaut d'activité peroxydase, peut être également expliqué par un défaut d'activation de Yap1. Afin de préciser l'importance physiologique respective des deux phénomènes, nous avons utilisé les différents mutants de Gpx3 pour découpler ces deux fonctions. Alors que la cystéine 36 est indispensable à l'activation de Yap1 et à l'activité peroxydase de Gpx3, la cystéine 82 n'est nécessaire qu'à la fonction peroxydase. Le mutant Gpx3^{C36S} présente un phénotype de sensibilité similaire à *gpx3* (Fig. 25C). En revanche, les mutants Gpx3^{C64S}, Gpx3^{C82S}, Gpx3^{C64SC82S} sont normo-résistants. L'absence de sensibilité de ces deux derniers mutants suggère qu'*in vivo*, l'activité peroxydase de Gpx3 en réponse au H₂O₂ est négligeable par rapport à son activité régulatrice sur Yap1. Le phénotype d'hypersensibilité de la souche *gpx3* est donc majoritairement attribuable à un défaut d'activité de Yap1. Pourtant, l'invalidation de *GPX3* ne reproduit pas le phénotype d'hypersensibilité d'une souche invalidée pour *YAP1* (*yap1*). La tolérance résiduelle de la souche *gpx3* par rapport à la souche *yap1* est perdue lorsque les deux gènes sont simultanément invalidés (*gpx3 yap1*). Ces données, associées aux données de localisation et d'activation transcriptionnelle présentées ci-dessus suggèrent que Yap1 possède une activité résiduelle en l'absence de Gpx3.

III. Mécanisme de détection du peroxyde d'hydrogène chez *S. cerevisiae* : modèle et discussion

A. Présentation du modèle

En réponse à un traitement par le peroxyde d'hydrogène, Gpx3 et Yap1 interagissent covalamment via la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre les cystéines 36 de Gpx3 et 598 de Yap1.

Cette interaction est transitoire et coïncide avec la cinétique d'oxydation de Yap1. De plus, l'oxydation de Yap1 nécessite, *in vivo* et *in vitro*, la présence de Gpx3. Ces données suggèrent

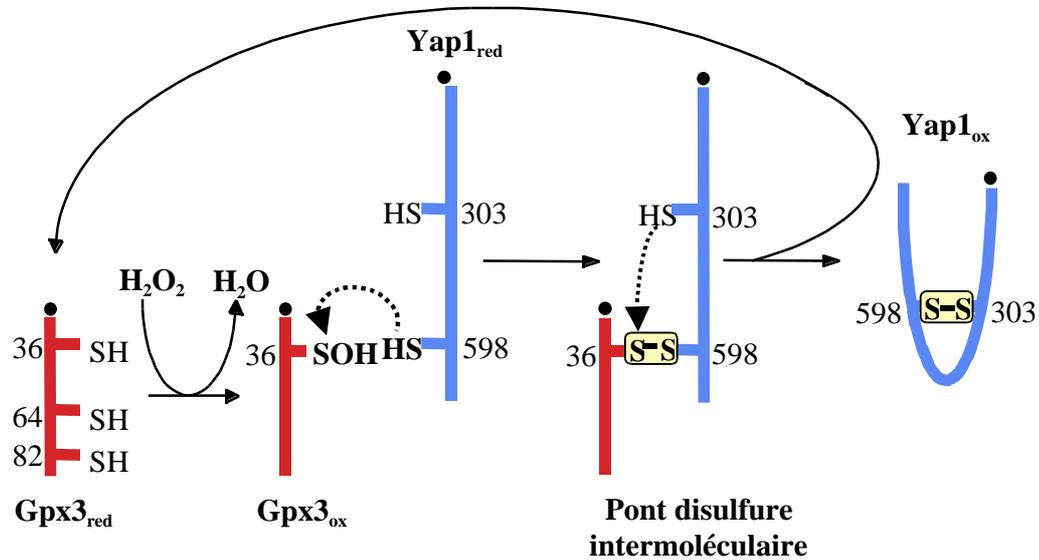
fortement que l'interaction redox entre Yap1 et Gpx3 promeut l'oxydation de Yap1, désignant Gpx3 comme le détecteur des peroxydes de la voie Yap1. Parmi les 3 cystéines présentes dans Gpx3, seule la cystéine 36 est essentielle à l'oxydation de Yap1. Ce résidu est également la cystéine conservée présente sous forme cystéine ou sélénocystéine dans le site actif de l'ensemble des glutathion-péroxydases. Ces deux observations la désignent comme le site primaire de détection des peroxydes. Ainsi, nous proposons qu'en réponse à une exposition des cellules au H₂O₂, la cystéine 36 de Gpx3 est directement oxydée en acide sulfénique (cys36-SOH). L'acide sulfénique ainsi formé va ensuite pouvoir réagir avec la cystéine 598, probablement sous forme thiolate, par substitution nucléophile et permettre la formation du pont disulfure intermoléculaire observé. La stabilisation de cette liaison dans le mutant Yap1^{C303A}, suggère que la cystéine 303 de Yap1 est capable de réaliser une attaque nucléophile du pont disulfure 36-598, permettant son isomérisation en 303-598. La formation du pont intramoléculaire de Yap1 a pour conséquence la libération de Gpx3 sous forme réduite (voir Fig. 26A).

B. Discussion du modèle : déterminants de la réactivité des cystéines

1) Formation de cys36-SOH et du pont disulfure 36-598

La formation transitoire d'un acide sulfénique lors de l'oxydation d'un thiol organique par l'H₂O₂ a été montrée *in vitro* [190]. Depuis, des exemples, de plus en plus nombreux, montrent que l'oxydation des cystéines entraîne la formation de dérivés sulféniques dans des protéines natives [191]. La formation d'un acide sulfénique constitue en particulier la première étape catalysant la dégradation du peroxyde d'hydrogène par la peroxydase de bactérie AhpC [40]. Ce mécanisme est vraisemblablement conservé lors de l'oxydation de Gpx3 par le H₂O₂. Nous chercherons cependant à identifier formellement cet intermédiaire grâce à l'utilisation du mutant Gpx3^{C82S}.

A



B

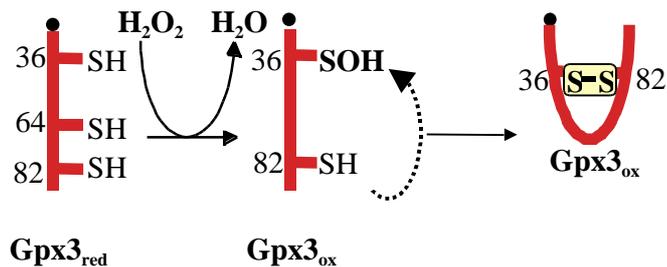


Figure 26. Modèle décrivant la double fonction de Gpx3, en tant que détecteur des peroxydes et en tant que peroxydase. A. Yap1 est associé en pré-complexe avec Gpx3. Le mécanisme de détection repose sur l'oxydation par les peroxydes de la cystéine 36 de Gpx3, en acide sulfénique (Cys36-SOH), réduisant de façon concomitante le peroxyde en alcool. La forme Cys36-SOH réagit alors avec la cystéine 598 de Yap1, entraînant la formation d'un pont disulfure intermoléculaire, converti en un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 303 et 598 de Yap1. La formation de ce pont entraîne la réduction simultanée de Gpx3. B. L'activité peroxydase de Gpx3 repose sur l'oxydation de la cystéine 36 en acide sulfénique et sur sa condensation avec la cystéine 82, permettant la formation d'un pont disulfure intramoléculaire dans Gpx3. L'efficacité de la fonction peroxydase de Gpx3 repose sur réduction par les thiorédoxines (voir aussi paragraphe IV B) et implique vraisemblablement un pool de Gpx3 libre.

La présence d'une cystéine vicinale permet la condensation de l'acide sulfénique et de ce résidu en un pont disulfure [192]. La formation du pont disulfure intermoléculaire entre Yap1 et Gpx3 suppose donc que le dérivé sulfénique Cys36-SOH et la cystéine 598 sont suffisamment proches l'un de l'autre. L'association non covalente de ces deux protéines en pré-complexe impose probablement des contraintes structurales propres au rapprochement de ces deux cystéines.

2) Attaque nucléophile de la cystéine 303

Le pont entre les cystéines 36 de Gpx3 et 598 de Yap1 est formé de façon transitoire. Il peut cependant être stabilisé en absence de la cystéine 303. Ces données montrent que ce pont disulfure est d'une part instable et d'autre part, que la cystéine 303 participe à cette instabilité. Le pKa des cystéines impliquées dans l'isomérisation d'un pont disulfure gouverne la dynamique et le sens de cet échange. En effet, lorsqu'un thiolate attaque un pont disulfure mixte, le thiol partant sera celui dont le pKa est le plus bas [6, 193]. De façon plus générale, un pKa bas limite la stabilité du pont disulfure dans lequel la cystéine réactive est impliquée. Cette instabilité permet en particulier le transfert de ce pont à d'autres cystéines, comme cela a été décrit pour la protéine thiol-oxydase DsbA [193]. Parmi les trois cystéines, 36 de Gpx3 et 303 et 598 de Yap1, la cystéine 36 doit donc être la cystéine dont le pKa est le plus bas. Nous chercherons à mesurer le pKa de ces cystéines en utilisant les deux protéines purifiées.

C. Discussion du modèle: modalités d'interaction de Gpx3 et de Yap1

1) Compétition des fonctions régulatrice et enzymatique de Gpx3.

L'exposition des cellules au H₂O₂ entraîne une oxydation de Yap1 Gpx3-dépendante mais aussi la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 36 et 82 de Gpx3 (voir Fig.13B). Une fois la cystéine 36 oxydée en acide sulfénique, les cystéines 598 de Yap1 et 82 de Gpx3 entrent donc en compétition pour la formation d'un pont disulfure. L'interaction des cystéines 598 de Yap1 et 36 de Gpx3 doit donc être favorisée soit par la réactivité de la cystéine 598, soit plus probablement par l'interaction préalable des protéines

Yap1 et Gpx3, permettant le rapprochement spatial des cystéines impliquées. L'étude structurale du pré-complexe Yap1/Gpx3 nous permettra de répondre à cette question.

2) Relation Structure-Fonction chez les PH-GPx

Gpx3, et deux autres protéines de *S. cerevisiae*, Gpx1 et Gpx2, appartiennent à la famille des glutathion-peroxydases [67], et à la sous-famille des phospholipide-hydroperoxydes glutathion peroxydases (PH-GPx) [68]. L'identification de Gpx3 en tant que détecteur des peroxydes et transducteur pour la voie Yap1 décrit donc une nouvelle fonction pour une protéine de la famille des PH-GPx. Une telle activité avait été pressentie pour la PH-GPx humaine [194], en se basant tout d'abord sur des données structurales. La modélisation de la structure des PH-GPx et sa comparaison avec la structure connue de la GPx d'érythrocytes bovins a permis de mettre en évidence des différences structurales notables entre ces deux enzymes [41]. Tout d'abord les PH-GPx sont monomériques, alors que les GPx sont des enzymes tétramériques. Le site actif est conservé chez ces deux enzymes, mais il adopte dans la PH-GPx, une conformation plus « ouverte », liée à l'absence de quatre résidus arginine. Cette structure est en théorie responsable de l'activité catalytique de la PH-GPx vis-à-vis des hydroperoxydes de phospholipides. Elle pourrait en outre permettre la réduction du site catalytique par des molécules de taille supérieure au GSH, et en particulier par les thiols des protéines, conférant ainsi à cette enzyme une activité de thiol-oxydase. L'existence de cette enzyme sous forme d'un monomère pourrait également favoriser son interaction avec des protéines substrats. Un rôle régulateur de la PH-GPx humaine, compatible avec les données structurales exposées ci-dessus, a ensuite été décrit au cours du processus de spermatogénèse [195-197]. Alors que la PH-GPx humaine est détectée sous forme soluble, active dans les spermatides, elle est majoritairement inactive dans les spermatozoïdes matures. Dans ce cas, elle est présente sous forme insoluble au niveau de la pièce intermédiaire, suggérant que l'activité thiol-oxydase de la PH-GPx serait responsable de l'oxydation de protéines dont elle entraînerait l'agrégation. L'activité de la PH-GPx lui confèrerait ainsi un rôle structural dynamique dans le processus de spermatogénèse [195] [197].

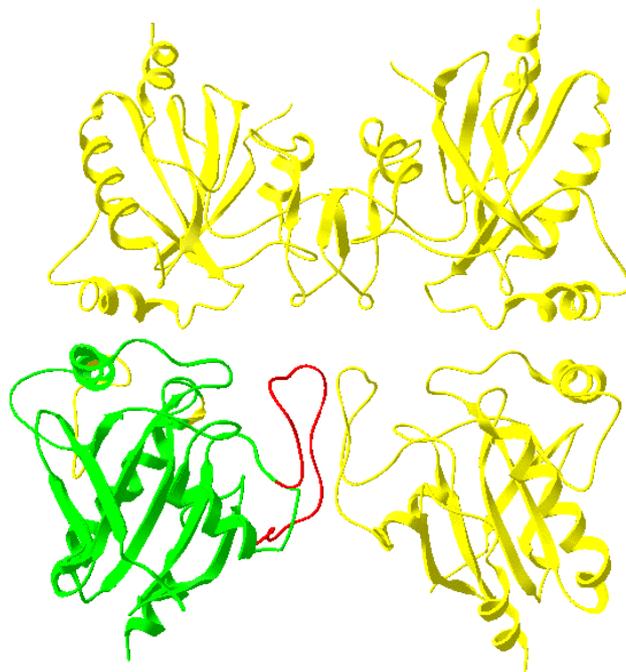
Chez la levure, Gpx1, Gpx2 et Gpx3 ne sont pas des sélénocystéine ; le sélénocystéine présent au sein du site actif des GPx chez les eucaryotes supérieurs est remplacée par une cystéine réactive. Cependant, une modélisation structurale de Gpx3 nous a permis de comparer les caractéristiques structurales majeures de cette enzyme avec la GPx bovine (Fig. 27). Cette structure est comparable à celle décrite pour la PH-GPx humaine. En particulier, les sites catalytiques de Gpx3 et de la PH-GPx présentent une structure similaire. L'absence de la boucle responsable de la tétramérisation de la GPx bovine est également absente chez Gpx3, suggérant que cette enzyme est monomérique. Ces données structurales sont donc compatibles avec le rôle de thiol-oxydase que nous avons décrit pour Gpx3. L'ensemble de ces données suggèrent que, contrairement aux GPx, la sous-famille des PH-GPx pourrait jouer un rôle régulateur majeur en tant que thiol-oxydases.

3) Essai de comparaison de la réactivité de Gpx1, Gpx2 et Gpx3 vis-à-vis de Yap1

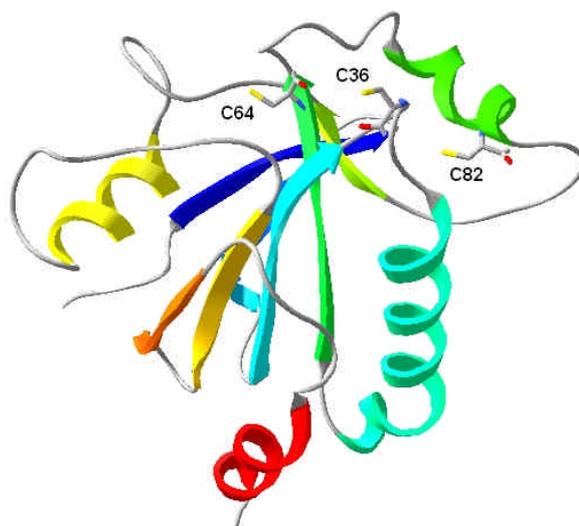
Gpx3 présente un haut degré d'identité avec Gpx2 (74%) mais aussi Gpx1 (58%) (voir aussi Annexe 1). Cependant, l'absence d'oxydation de Yap1 dans la souche *gpx3* indique que seul Gpx3 est capable d'être le détecteur et le transducteur de la voie Yap1. Contrairement à *GPX2* [67] et à la majorité des thiol-peroxydases de levure [22, 23], dont l'expression est induite de façon Yap1-dépendante en réponse aux peroxydes, l'expression de *GPX3* n'est pas modulée. D'autre part, le niveau d'expression basale de *GPX3* est supérieur à celui de *GPX1* et de *GPX2* (50 fois et 2 fois respectivement d'après les données du transcriptome obtenues par le laboratoire de Young : <http://web.wi.mit.edu/young/expression/>) [67]. Le profil d'expression de *GPX3* est donc compatible avec sa fonction de détecteur des peroxydes et moins avec une fonction d'anti-oxydant. Nous avons ensuite comparé les modélisations structurales de Gpx2 et de Gpx3, afin de chercher à comprendre les bases de la spécificité d'oxydation de Yap1 par Gpx3 (Fig. 28). Gpx2 et Gpx3 présentent des structures très comparables sauf au niveau de deux domaines. L'un, constitué de quatre acides aminés, est localisé à proximité de la cystéine 82 de Gpx3/Orp1. Ce domaine, conservé chez la GPx de *S. pombe*, pourrait notamment influencer sur la réactivité de ce résidu.

Figure 27. Modélisation structurale de Gpx3 et comparaison avec la GPX bovine

A. Superposition du modèle de Gpx3 monomérique (ruban vert) et de la structure du tétramère de la Bovin Glutathion Peroxidase (PDB : 1GP1) (ruban jaune). La boucle présente dans la protéine bovine et absente dans GPX3 est colorée en rouge. Cette boucle est directement impliquée dans la formation du tétramère.

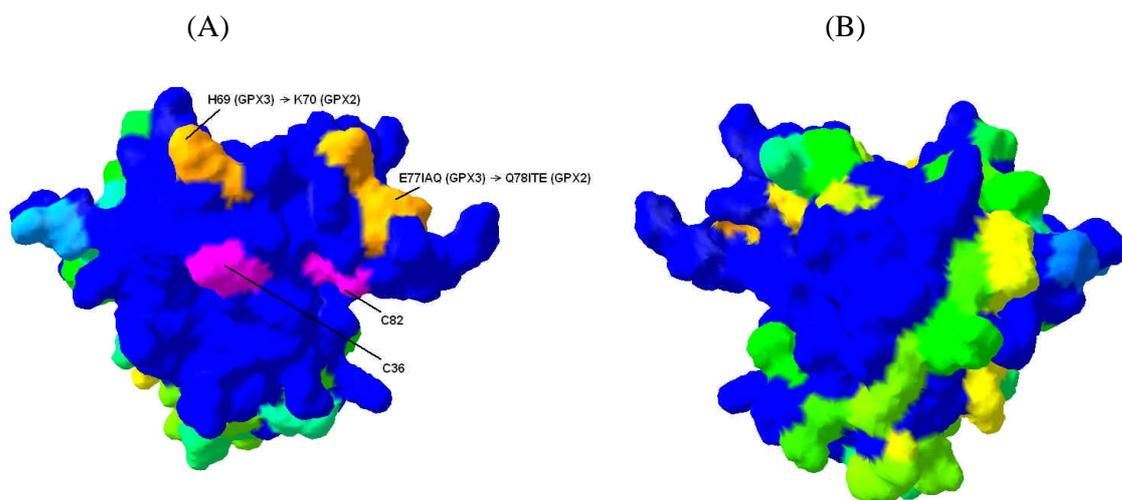


B. Représentation du modèle de GPX3 en rubans (du Nter bleu au Cter rouge). Les trois cystéines C36, C64 et C82 sont représentées.



L'autre domaine est présent sur une boucle externe et présente des différences significatives au niveau de la répartition des charges en surface des deux protéines, Gpx3 présentant un caractère plus basique. Ce domaine pourrait donc constituer une cible privilégiée pour l'étude d'une interaction entre Yap1 et Gpx3. Nous testerons par mutagenèse dirigée l'importance de ces domaines pour la formation du pré-complexe Yap1/Gpx3 et pour l'activité de thiol-oxydase de Gpx3.

Figure 28. Analyse comparée des surfaces des modèles de Gpx3 et Gpx2 (A) face aux deux cystéines C36 et C82, (B) vue de dos par rapport à l'orientation (A). Identification des variations de séquences entre les deux protéines et de leur distribution structurale. En magenta les cystéines 36 et 82 ; en bleu, les résidus identiques entre les deux protéines ; en orange, les régions qui varient à proximité des deux cystéines exposée à la surface C36 et C82. Les autres résidus différents entre les deux protéines adoptent des couleurs allant de cyan à jaune à mesure que le taux de similitude diminue.



Remarques :

- 1 – La face comportant les deux cystéines C36 et C82 (A) est plus conservée entre GPX2 et GPX3 que la face opposée (B).
- 2 - Le motif E77IAQ dans GPX3 est modifié en un motif proche mais non identique dans GPX2 (Q78IAE). Toutefois ce motif est identique à la séquence de la seule Gpx de *S. Pombe*.

D. Gpx3 est-elle une enzyme bi-fonctionnelle

La mesure *in vitro* de l'activité peroxydase des trois GPx de *S. cerevisiae* a confirmé la capacité de ces enzymes à réduire les peroxydes simples et les peroxydes estérifiés [68, 72]. Dans ces études, Gpx3 a été désignée comme l'enzyme la plus active. Cependant, nos données, montrant l'absence de sensibilité du mutant Gpx3^{C82S}, indiquent que l'hypersensibilité de la souche *gpx3* au H₂O₂ est essentiellement due au défaut d'activation de Yap1. Nos expériences n'excluent pas un rôle de Gpx3 dans la réduction des peroxydes esterifiés. En effet, l'activité peroxydase de Gpx3 est associée *in vitro* à la formation d'un pont disulfure entre les cystéines 36 et 82 et la formation de ce pont disulfure *in vivo* suggère que Gpx3 pourrait avoir conservé sa fonction de peroxydase (voir Fig. 26B). L'implication d'un pont disulfure intramoléculaire dans le cycle catalytique d'une peroxydase n'est pas sans précédent [198]. Cependant, ce mécanisme est peu courant et surprenant pour une enzyme appartenant à la famille des glutathion-péroxydases. Ainsi, le pool de Gpx3 associé à Yap1 en pré-complexe aurait la fonction de détecteur des peroxydes, et le pool libre, la fonction de peroxydase. De récents résultats obtenus au laboratoire utilisant une colonne d'exclusion, suggère que ces deux pools co-existent (Monceau et Toledano). La formation d'un pont disulfure entre les cystéines 36 et 82 de Gpx3 pourrait par ailleurs lui permettre d'oxyder d'autres substrats que Yap1 par échange de pont disulfure. En effet, de données obtenues récemment au laboratoire montrent qu'en réponse au H₂O₂, Gpx3 s'associe de façon redox à une autre protéine de 55 kDa (Barrault et Toledano) dont l'identité n'est pas encore connue.

IV. La réduction de Yap1

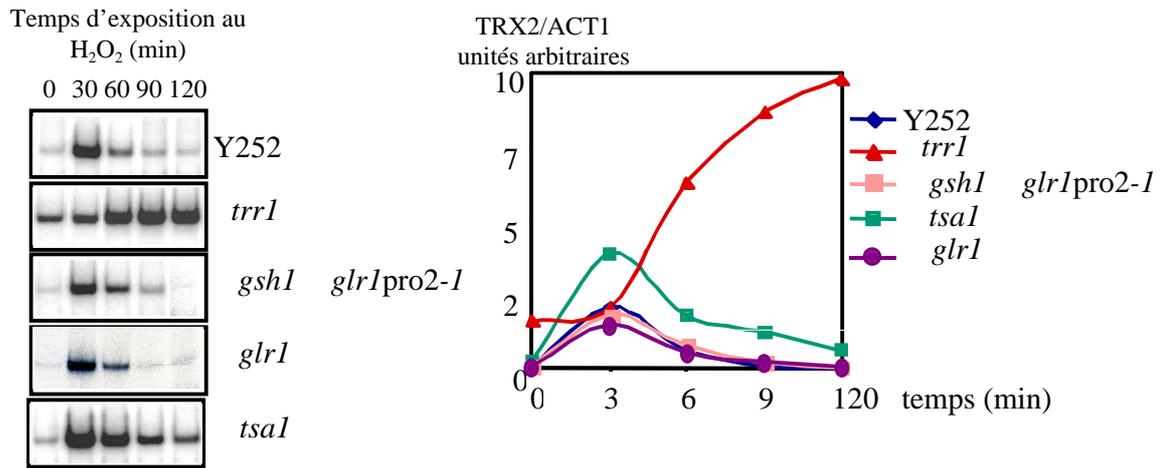
La désactivation de Yap1 peut être suivie par la chute de l'expression de *TRX2*, et par le retour de Yap1 dans le cytoplasme après 30 minutes d'exposition au H₂O₂ (0,4mM) (Fig. 14A et 14B). Elle est associée à sa réduction (Fig. 15B). La réduction de Yap1 pourrait être couplée, comme c'est le cas chez *E. coli*, aux systèmes de contrôle de l'état redox. Afin de tester cette hypothèse, nous avons donc mesuré la capacité de Yap1 à être désactivé/réduit dans des mutants de la voie des thiorédoxines et des mutants de la voie du glutathion.

A. La voie des thiorédoxines et non celle du glutathion est impliquée dans le contrôle de l'activité de Yap1

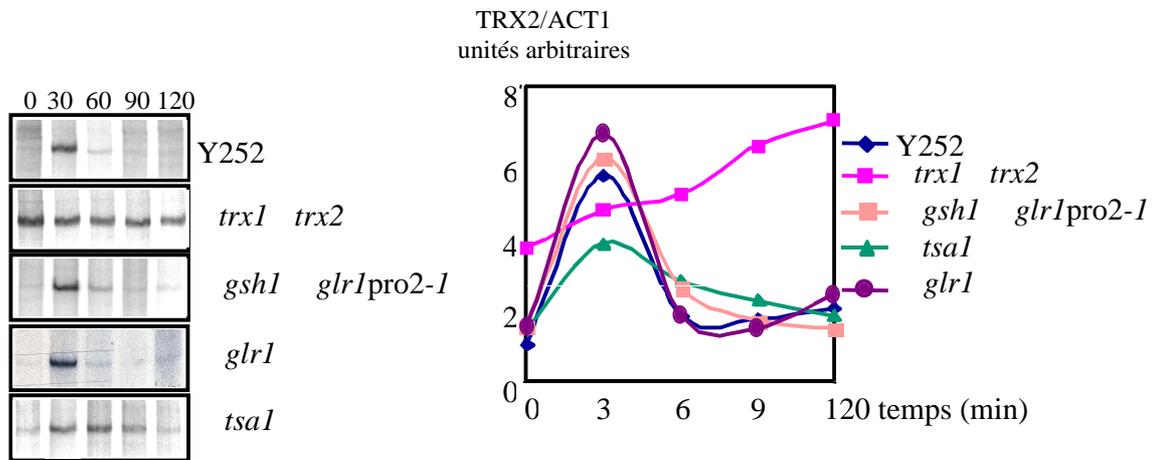
1) Utilisation de mutants spécifiques de la voie des thiorédoxines ou du glutathion

Nous avons mesuré l'activité transcriptionnelle et l'état d'oxydation de Yap1 dans des mutants affectant l'une ou l'autre des voies de réduction (Fig. 29). La voie du glutathion a été testée en utilisant deux mutants différents. Le premier est une souche invalidée pour la glutathion réductase (*glr1*), dans laquelle le glutathion est présent à 60% sous forme oxydé [199]. Le deuxième (*gsh1-pro2-1 glr1*) permet de tester l'effet d'une diminution drastique de la concentration en glutathion, qui est essentiel chez *S. cerevisiae* [50]. Il consiste en une délétion du gène codant la -glutamyl-cystéine synthétase (*gsh1*), l'enzyme limitante de la synthèse du glutathion, et possède une mutation dans un gène de la voie de biosynthèse de la proline, qui permet de restaurer 0,5% de la synthèse sauvage de glutathion (*pro2-1*). L'invalidation de la glutathion réductase (*glr1*) dans cette souche permet ensuite d'obtenir théoriquement les 0,5% de glutathion présents sous forme oxydée. L'effet de l'invalidation simultanée de la glutarédoxine 1 et de la glutarédoxine 2 a également été testé. La voie des thiorédoxines a été testée en utilisant soit une souche invalidée pour la thiorédoxine réductase (*trr1*) soit une souche invalidée pour les deux thiorédoxines cytosoliques (*trx1 trx2*).

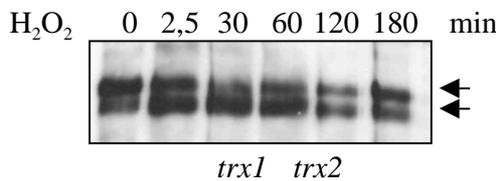
A



B



C



D

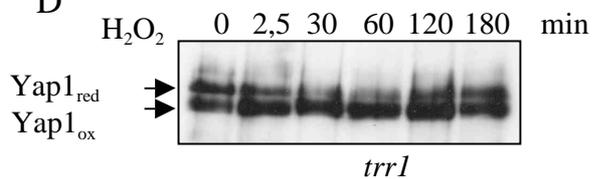


Figure 29. L'activité de Yap1 est dérégulée dans les mutants de la voie des thiorédoxines.

Expression de *TRX2* (A) et *TRR1* (B) dans les souches sauvage (Y252) et mutantes *glr1*, *gsh1 glr1pro2-1*, *trx1 trx2* (B), *trr1* (A) et *tsa1*. Les ARN totaux ont été extraits à partir de cellules exposées à 0,4 mM de H_2O_2 pendant les temps indiqués et la mesure de l'expression de *TRX2* et *TRR1*, par RT-PCR semi-quantitative a été réalisée comme décrit en figure 14A. C et D. Mesure de l'état redox *in vivo* de Yap1 dans les mutants *trx1 trx2* (C) et *trr1* (D). Les souches mutantes exprimant myc-Yap1 sont exposées à 0,4 mM de H_2O_2 pendant les temps indiqués. Les extraits sont ensuite préparés comme décrit en Fig. 15A puis séparés sur gel dénaturant non réducteur et révélés au moyen de l'anticorps anti-myc.

2) Le niveau basal d'activation et la désactivation de Yap1 sont dérégulés dans les mutants de la voie des thiorédoxines.

La cinétique d'expression de *TRX2* et *TRR1* est sauvage dans l'ensemble des mutants affectant la voie du glutathion, indiquant que Yap1 est normalement régulé dans ces conditions (Fig. 29 A et B). En revanche, l'activité de Yap1 est dérégulée dans les souches affectées dans la voie des thiorédoxines. Premièrement, le niveau basal d'activation transcriptionnelle de Yap1 est augmenté. Deuxièmement, Yap1 est encore inductible et reste actif pendant les 120 minutes suivant l'exposition au H₂O₂. Cette dérégulation est spécifique car seules les protéines du régulon Yap1, visibles sur gel d'électrophorèse à deux dimensions, présentent une élévation de leur expression basale (données non montrées). La dérégulation observée dans les mutants de la voie des thiorédoxines est corrélée avec une localisation partiellement nucléaire de Yap1 dans les mutants *trx1 trx2* et *trr1* mais pas dans les mutants de la voie du glutathion ([200] et nos données, non montrées). L'analyse de l'état redox de Yap1 dans les mutants *trx1 trx2* et *trr1* a montré que Yap1 était partiellement oxydé dans ces deux souches, en absence de tout oxydant (Fig. 29C et 29D). Après exposition des cellules au H₂O₂, Yap1 est encore oxydable, bien que plus faiblement dans la souche *trx1 trx2*, mais n'est plus réduit dans l'heure qui suit le traitement. Ces données indiquent que la présence ou l'absence des thiorédoxines influe sur la capacité de Yap1 à être réduit. Les thiorédoxines pourraient en particulier réduire directement Yap1 grâce à leur activité thiol-transférase. Elles pourraient également réduire Yap1 par l'intermédiaire d'une autre réductase.

B. Gpx3 joue-t-il un rôle dans la réduction de Yap1 ?

Nous avons montré que Gpx3 est le détecteur du peroxyde d'hydrogène et permet l'oxydation et l'activation de Yap1 en réponse au H₂O₂. Son état d'oxydation et celui de Yap1 sont donc couplés. Gpx3 intervient-il également dans la réduction de Yap1 ? Les données décrites précédemment suggèrent que les thiorédoxines participent directement ou non à la réduction de Yap1. Or, deux études ont décrit précédemment que l'état redox de Gpx3 est contrôlé *in vitro* par la voie du glutathion [67, 68]. Un rôle de Gpx3 dans la réduction de Yap1 semblait donc exclu. Nous avons donc réévalué *in vivo* et *in vitro* le mécanisme de réduction de Gpx3.

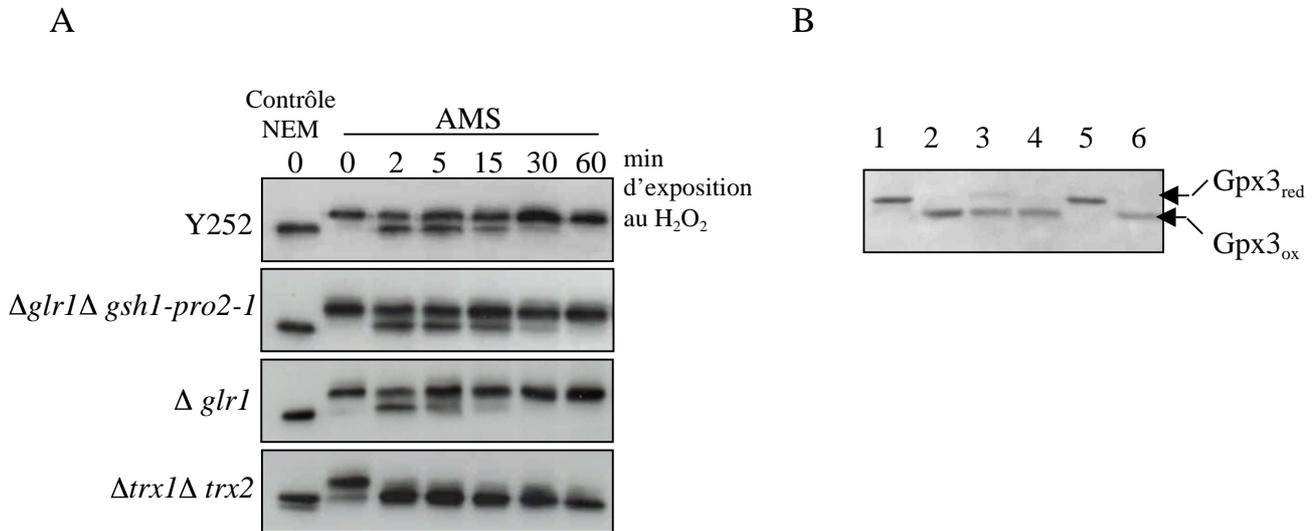


Figure 30. Gpx3 est réduite par la voie des thiorédoxines. Mesure *in vivo* de l'état redox de Gpx3 dans la souche sauvage (Y252) et les mutants $\Delta trx1 \Delta trx2$, $\Delta glr1$ et $\Delta glr1 \Delta gsh1-pro2-1$. Les différentes souches exprimant HA-Gpx3 ont été exposées à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués. Les extraits correspondant au point 0, réalisés à partir de cellules non traitées, ont été alkylés soit avec le NEM (contrôle de migration), soit avec l'AMS. Les autres points ont été alkylés uniquement avec l'AMS. Les extraits ont ensuite été séparés sur gel dénaturant non réducteur et révélés au moyen d'un anti-HA. B. Réduction *in vitro* de Gpx3. La protéine recombinante Gpx3 purifiée et réduite (ligne 1) a été oxydée en présence de 0,25 mM de H₂O₂ (ligne 2) et incubée en présence de GSH (0,3 mM), de glutathion réductase (2 μ M) et de NADPH (0,3 mM) (ligne 3), de glutathion réductase et de NADPH (ligne 4), de thiorédoxine (20 μ M), de thiorédoxine-réductase (1 μ M) et de NADPH (0,3 mM) (ligne 5) ou de thiorédoxine-réductase et de NADPH (ligne 6). La réaction, poursuivie à 30°C pendant 10 minutes, a été arrêtée par l'ajout de 10 mM final de NEM et le résultat a été analysé par migration sur gel dénaturant non réducteur.

1) La réduction de Gpx3 dépend des thiorédoxines

Nous avons mesuré l'état redox de Gpx3 dans les mutants de chacune des voies du glutathion et des thiorédoxines en employant une méthode similaire à celle utilisée pour la mesure de l'état redox de Yap1 (Fig. 30A). Afin de mieux résoudre les formes réduite et oxydée de Gpx3, nous avons utilisé un agent alkylant de haut poids moléculaire, l'AMS. La fixation covalente de cette molécule sur les cystéines entraîne un incrément de masse de 0,5 kDa. Les trois cystéines libres de la forme réduite de Gpx3 seront alkylées (incrément de 1,5 kDa) alors que dans la forme oxydée, seule la cystéine 64 est accessible à l'alkylation (incrément de 0,5 kDa). Cette alkylation différentielle ajoute une différence de 1kDa à la différence de migration déjà induite par le pont disulfure et permet de voir que Gpx3 est oxydé à 50% environ dès 2 minutes d'exposition au H₂O₂ puis réduit à partir de 15 minutes. Cette cinétique est comparable à la cinétique d'oxydation/réduction observée pour Yap1. L'interruption de la voie du glutathion n'entraîne aucune altération de la cinétique d'oxydation/réduction de Gpx3. En revanche, dans la souche *trx1 trx2*, Gpx3 est partiellement oxydé (10%) en absence d'oxydant, et s'oxyde totalement pour ne plus se réduire après traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène. Afin de confirmer *in vitro*, la réduction de Gpx3 par les thiorédoxines, nous avons mesuré son activité peroxydase. En présence de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase, l'activité peroxydase de Gpx3 est significative alors qu'en présence de glutathion et de glutathion réductase, elle n'est pas détectable (voir paragraphe I.E). La réduction de la protéine Gpx3 recombinante a également été testée *in vitro*, grâce à la visualisation des formes oxydée et réduite par migration sur gel (Fig. 30B). Gpx3, préalablement oxydé, est réduit efficacement par l'ajout de thiorédoxine, de thiorédoxine réductase et de NADPH (ligne 5), alors que cette réduction est minime en présence de glutathion, glutathion réductase et NADPH (ligne 3). L'ensemble de ces résultats montre que Gpx3 est réduit par la voie des thiorédoxines.

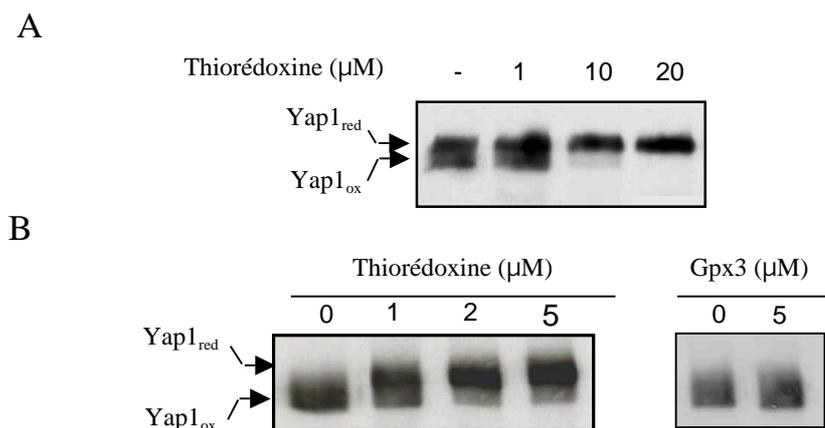


Figure 31. Les thiorédoxines réduisent Yap1 *in vitro*. A. Réduction de Yap1_{ox} dans un extrait brut en présence de thiorédoxine recombinante. Une souche *yap1* exprimant myc-Yap1, exposée à 0,4 mM de H₂O₂ pendant 5 minutes a été lysée dans un tampon contenant du Tris pH=8 (100 mM), du SDS (0,1%), de l'EDTA (1 mM), et des antiprotéases. 25 μg d'extrait brut ont été incubés en absence ou en présence de 1, 10 et 20 μM de thiorédoxine purifiée (*Spirulina* sp. SIGMA), 1,3 μM de thiorédoxine réductase et 1 mM de NADPH pendant 30 minutes à 37°C. La réaction a été arrêtée par ajout d'iodoacétamide (75 mM) et les échantillons ont été séparés sur gel dénaturant non réducteur. B. Réduction de Yap1_{ox} purifié en présence de thiorédoxine ou de Gpx3 recombinants. Yap1 a été purifié en absence d'agent réducteur, à partir d'une souche *yap1* surexprimant myc-Yap1. 1 μM de Yap1 purifié, oxydé a été incubé en anaérobiose pendant 30 minutes avec des concentrations croissantes de Gpx3 et de thiorédoxine réduites.

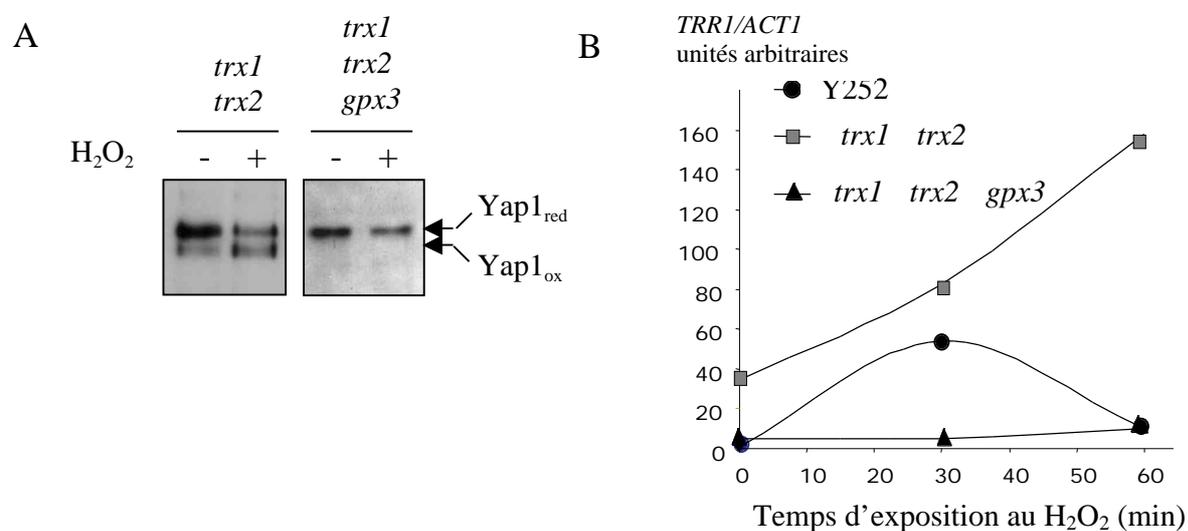


Figure 32. Gpx3 est responsable de la dérégulation de Yap1 dans la souche Δ *trx1* Δ *trx2*. A. Mesure de l'état redox de Yap1 dans les souches *trx1* *trx2* et *trx1* *trx2* *gpx3*. Les souches mutantes exprimant myc-Yap1 ont été exposées ou non à 0,4 mM de H₂O₂ pendant 2 minutes et les extraits ont été réalisés comme décrit en Fig. 15A. B. Mesure de l'expression de *TRR1* dans les souches sauvage (Y252), *trx1* *trx2* et *trx1* *trx2* *gpx3*. Les ARN totaux ont été extraits à partir des souches exposées à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués. L'induction de *TRR1* a été mesurée par RT-PCR « on line » comme décrit dans la figure 24B.

2) Les thiorédoxines et non Gpx3 réduisent Yap1 *in vitro*

Une fois réduit, Gpx3 pourrait réduire Yap1 et ainsi relayer le pouvoir réducteur des thiorédoxines. Afin de tester cette hypothèse, nous avons mesuré la capacité de la thiorédoxine et de Gpx3 à réduire Yap1, à partir des protéines purifiées. Pour cela, nous avons utilisé la protéine recombinante Gpx3 purifiée en conditions réduites et la thiorédoxine de *E. coli* commerciale, réduite soit chimiquement, soit en présence de thiorédoxine réductase et de NADPH. La thiorédoxine est capable de réduire Yap1 dans un extrait brut, en présence de thiorédoxine réductase et de NADPH (Fig. 31A). Afin de déterminer si cette réduction est directe ou fait intervenir Gpx3 ou une autre protéine du lysat, nous avons testé la capacité de la thiorédoxine, de Gpx3 ou du mélange des deux protéines à réduire Yap1 purifié à partir de la levure sous forme oxydée (Fig. 31B). La thiorédoxine et Gpx3 sont réduites en présence de DTT (20 mM). Après dialyse de l'agent réducteur en conditions anaérobiques, la thiorédoxine recombinante est capable de réduire Yap1 même en absence de Gpx3, alors que Gpx3 réduit n'en est pas capable. Ces données montrent qu'*in vitro*, les thiorédoxines, mais pas Gpx3, peuvent réduire directement Yap1.

3) Gpx3 est responsable de la dérégulation de Yap1 dans la souche *trx1 trx2*

L'intervention directe de Gpx3 dans la réduction de Yap1 a été écartée par les tests *in vitro*. Cependant, la dérégulation de Yap1 observée dans les mutants des thiorédoxines peut dépendre de Gpx3. En effet, le niveau basal d'oxydation de Yap1 observé dans la souche *trx1 trx2* ne peut être expliqué uniquement par un défaut de réduction. Il nécessite l'activation préalable de la voie Yap1 probablement via l'oxydation de Gpx3. Nous avons donc construit une souche invalidée à la fois pour les thiorédoxines 1 et 2 et pour Gpx3 (*trx1 trx2 gpx3*) et nous avons comparé l'état d'oxydation et d'activation de Yap1 dans cette souche et dans la souche *trx1 trx2* (Fig. 32). Contrairement à ce que nous avons observé dans le mutant *trx1 trx2*, dans la souche *trx1 trx2 gpx3*, Yap1 est complètement réduit en absence d'oxydant et n'est plus oxydable après exposition des cellules au H₂O₂ (Fig. 32A).

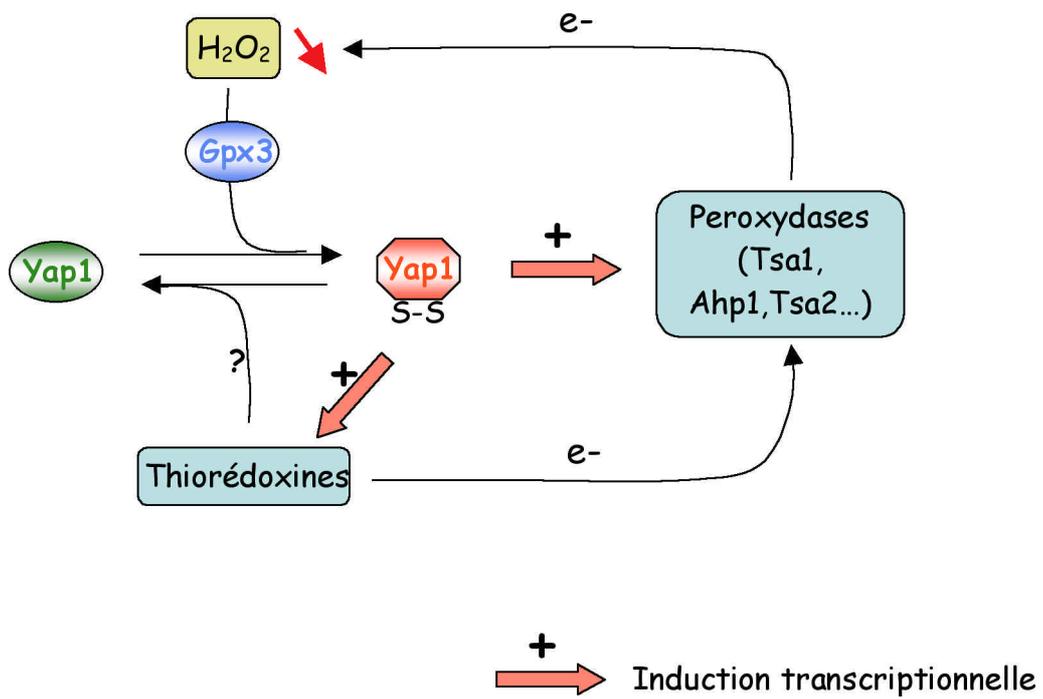


Figure 33. Modélisation du rôle de Gpx3 et des thiorédoxines dans le contrôle de l'activité de Yap1. Les thiorédoxines contrôlent indirectement la concentration en H_2O_2 par l'intermédiaire des peroxydases. Elles régulent donc l'activation Gpx3-dépendante de Yap1. Elles peuvent également réduire directement Yap1.

Corrélativement, la triple délétion abroge l'augmentation du niveau basal d'expression des gènes cibles, observée dans le mutant *trx1 trx2* et limite leur induction en réponse au H₂O₂ (Fig. 32B). L'oxydation de Yap1 par Gpx3 est donc une étape indispensable à l'observation d'une dérégulation de Yap1 dans les mutants de la voie des thiorédoxines, suggérant que cette dérégulation fait intervenir une production accrue de peroxydes. Ces données n'excluent cependant pas l'existence d'un défaut de réduction de Yap1 dans le mutant *trx1 trx2*.

C. Conclusion/Discussion

1) Deux modèles non exclusifs impliquant les thiorédoxines dans le contrôle de Yap1

L'importance de la voie des thiorédoxines dans le contrôle de l'activité de Yap1 a été montrée par différentes études [74, 188, 200]. L'absence de thiorédoxine ou de thiorédoxine réductase se traduit par une localisation partiellement nucléaire de Yap1 en absence de tout stress exogène, ainsi que par une augmentation de son activité basale. Les thiorédoxines catalysent la réduction des ponts disulfures grâce au pouvoir réducteur du NADPH et de la thiorédoxine-réductase. Elles peuvent donc directement réduire Yap1. D'autre part, elles contrôlent indirectement la concentration intracellulaire en peroxyde d'hydrogène, car elles réduisent les peroxydases thiorédoxine-dépendante de la cellule (Tsa1, Tsa2, Ahp1...). L'importance de cette fonction est soulignée par l'extrême sensibilité au H₂O₂ des souches *trx1 trx2* [55] et *trr1* ([74], données du laboratoire). Le défaut de réduction du H₂O₂ pourrait être responsable de la dérégulation de Yap1 observée dans ces mutants (Fig. 33).

Nos données ne permettent pas conclure quant au rôle des thiorédoxines dans la réduction de Yap1. En effet, nous avons montré que l'augmentation du niveau basal d'activation de Yap1 dans les mutants des thiorédoxines est dépendante de la présence de Gpx3. Gpx3 étant oxydé par les peroxydes, l'activation basale de Yap1 dans le mutant *trx1 trx2* est donc vraisemblablement associé à un défaut de contrôle de la concentration intracellulaire en H₂O₂. La stimulation de la voie d'activation de Yap1 peut cependant ne pas être suffisante pour observer une activation basale en présence d'un système efficace de réduction. Ces expériences n'excluent donc pas que les thiorédoxines réduisent Yap1. Ainsi, nous avons observé qu'*in vitro*, une thiorédoxine recombinante pouvait réduire Yap1 purifié. Nous

n'avons cependant pas pu obtenir de preuves de cette interaction *in vivo*, malgré l'utilisation de mutants susceptibles de stabiliser l'interaction (essai de co-précipitation). L'une des hypothèses pouvant expliquer cet échec est que Yap1 est réduit par une réductase utilisant le pouvoir réducteur des thiorédoxines. Les données *in vitro* suggèrent que Gpx3 n'est pas impliqué dans la réduction de Yap1. Il nous faudra cependant mettre au point un système permettant de tester cette hypothèse *in vivo*. La compréhension du rôle des thiorédoxines dans la réduction de Yap1 nécessitera l'utilisation de stratégies expérimentales permettant de découpler leur rôle dans le contrôle de la concentration intracellulaire en H₂O₂ et leur activité thiol-transférase. Par exemple, l'analyse de l'état redox de Yap1 dans des mutants simultanément invalidés pour les trois peroxydases thiorédoxine-dépendantes (Tsa1, Ahp1 et Tsa2) devrait nous permettre d'évaluer le seul effet d'un défaut de contrôle de la concentration en H₂O₂. L'analyse du mutant *tsa1*, présentant une persistance de la réponse au-delà de 60 minutes (Fig. 29A et 29B), souligne déjà l'importance de la concentration en H₂O₂ dans le contrôle de Yap1. D'autre part, nous rechercherons biochimiquement et génétiquement la réductase de Yap1

2) Contrôle cinétique de la réduction

L'efficacité de la réduction permet de contrôler la cinétique de réponse. La vitesse de réduction de Yap1 doit donc être inférieure à sa vitesse d'oxydation pendant la première demi-heure de traitement, puis cette tendance doit s'inverser. Dans le cadre d'un contrôle enzymatique de l'oxydation et de la réduction, la stabilité de la forme oxydée peut être modulée d'une part par l'abondance de la réductase et d'autre part par la concentration intracellulaire en peroxyde d'hydrogène. Dans l'hypothèse d'une réduction de Yap1 par les thiorédoxines, ces deux critères sont respectés, puisque l'induction des thiorédoxines, conjointement aux peroxydases permet en même temps d'augmenter la concentration en réductase et d'éliminer l'inducteur. La localisation des thiorédoxines n'étant pas régulée par le H₂O₂ [200], l'augmentation de son expression semble être un paramètre essentiel. Cette hypothèse pourra être testée grâce à l'utilisation d'un mutant inactif mais oxydable de Yap1 (mutant du domaine de liaison à l'ADN), dans lequel les concentrations en thiorédoxines et en H₂O₂ pourront être artificiellement contrôlées.

3) Gpx3 : une glutathion-peroxydase thiorédoxine-dépendante.

L'étude de la réduction de Gpx3 nous a permis de mettre à jour un nouveau type d'activité peroxydase, reposant sur la formation d'un pont disulfure intramoléculaire et sur sa réduction *in vitro* et *in vivo* par les thiorédoxines. La réduction d'une enzyme de la famille des GPx par les thiorédoxines et non par le glutathion n'est pas sans précédent [69] [70] et pourrait être liée à la structure particulière du site actif précédemment décrite [41]. La comparaison de la structure des PH-GPx et de la cGPx bovine montre en particulier que la PH-GPx (et par modélisation structurale, Gpx3) ne possède pas les résidus basiques responsables de l'orientation du GSH en direction de la sélénocystéine catalytique. Cet agencement structural ainsi que par l'oxydation de Gpx3 en un pont disulfure intramoléculaire pourraient favoriser la réduction de Gpx3 par un dithiol, plutôt que par le GSH. Par ailleurs, nous avons comparé les séquences primaires d'enzymes de type glutathion peroxydases, présentes chez différentes espèces (voir Annexe 1). Chez l'ensemble des enzymes bactériennes et fongiques, la cystéine correspondant au résidu 82 chez Gpx3, est conservée, suggérant que l'oxydation de ces enzymes peut à l'instar de Gpx3 conduire à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Elle est en revanche absente chez les GPx de mammifère. La présence de cette cystéine conservée est d'autre part associée à l'absence de conservation d'un résidu arginine (parfois histidine) impliqué dans la liaison du glutathion [201, 202]. Ces données suggèrent que l'ensemble des GPx présentes chez les microorganismes pourrait être paradoxalement thiorédoxine-dépendantes. De nouvelles expériences doivent être réalisées pour tester cette hypothèse. Chez les plantes, un second résidu cystéine est également conservé et se situe à un acide aminé de décalage par rapport à la cystéine 82 de Gpx3.

La description de Gpx3 comme une peroxydase thiorédoxine-dépendante relance la question du rôle du glutathion dans la réponse aux peroxydes. En effet, les cystéines 36 et 82 étant également conservés chez Gpx1 et Gpx2, il est possible que les trois GPx précédemment décrites chez la levure soient thiorédoxine-dépendantes. Dans ce cas, la voie du glutathion apparait isolée de toute activité peroxydase, mettant ainsi en exergue l'importance de la voie des thiorédoxines dans le contrôle de la concentration en peroxyde.

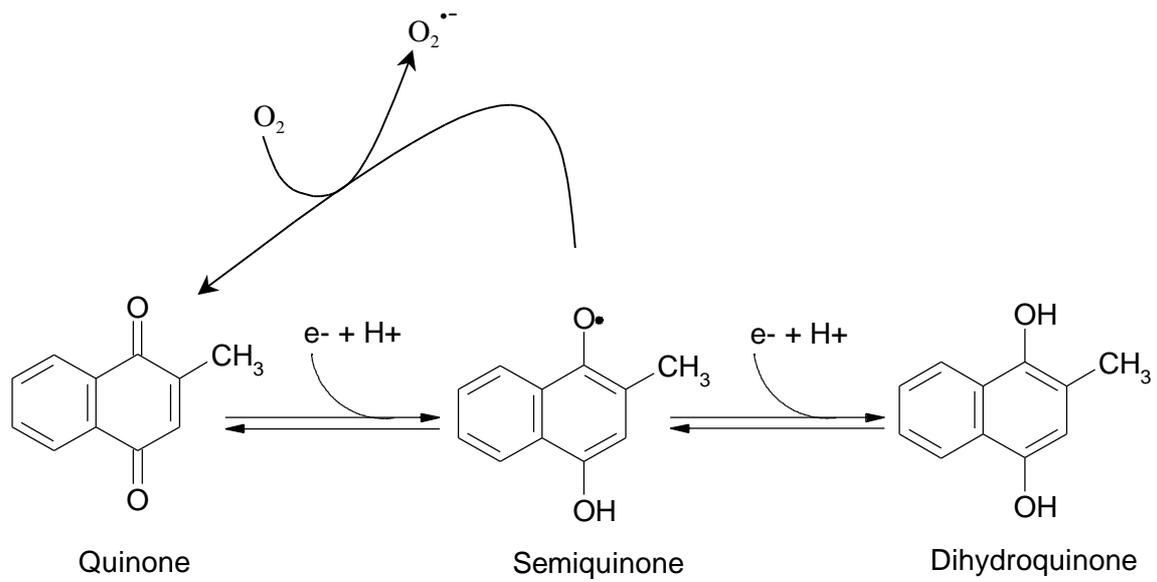


Figure 34. Production d'ions superoxyde par la ménadione. La ménadione alterne entre les formes quinone et semiquinone, alternativement réduite par des quinones réductases et oxydée par l'oxygène moléculaire. Cette réduction à un électron entraîne la production d'ions superoxyde.

. **RESULTATS Deuxième Partie :**

Un deuxième mode d'activation de Yap1 en réponse aux électrophiles

Chez *E. coli*, la réponse au peroxyde d'hydrogène, contrôlée par OxyR et la réponse à l'ion superoxyde, mise en oeuvre par le régulon SoxRS sont distinctes. Il existe également chez *S. cerevisiae* une réponse adaptative en réponse à la toxicité des composés à activité redox cycliques. Cependant, les bases moléculaires de cette réponse restent encore largement inconnues. Nous avons donc étudié chez *S. cerevisiae* la réponse cellulaire à la ménadione. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Dulce Azevedo, étudiante en thèse dans le laboratoire de Claudina Pousada-Rodrigues (Lisbonne, Portugal), et Frédérique Tacnet, chercheur au laboratoire.

I. Bases moléculaires de l'activation de Yap1 en réponse à la ménadione.

A. qu'est-ce que la ménadione ?

La ménadione ou vitamine K3 est un composé à activité redox cyclique entraînant la génération d'ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par réduction de l'oxygène moléculaire [116, 203]. La ménadione tire son activité redox de la présence d'un groupement quinone, qui peut être réduit en semiquinone (réduction à un électron) ou en hydroquinone (réduction à deux électrons) (Fig. 34). Seule la forme semiquinone peut se réoxyder efficacement en quinone en utilisant le pouvoir oxydant de l'oxygène. Cette forme est dite auto-oxydable. Elle est donc responsable de la production d'ions superoxyde et de son caractère cyclique. La ménadione est réduite *in vivo* par les chaînes de transfert d'électron en utilisant le pouvoir réducteur du NADPH. La mesure de la consommation en oxygène en présence d'inhibiteurs de la cytochrome oxydase (cyanure et/ou azide), permet de suivre l'activité redox de la ménadione, en mesurant la « respiration dite cyanure-résistante » [116, 204]. La ménadione possède également des propriétés électrophiles vis-à-vis des thiols organiques, tout d'abord mises en évidence par son addition sur le glutathion pour former un adduit appelé thiodione [205].

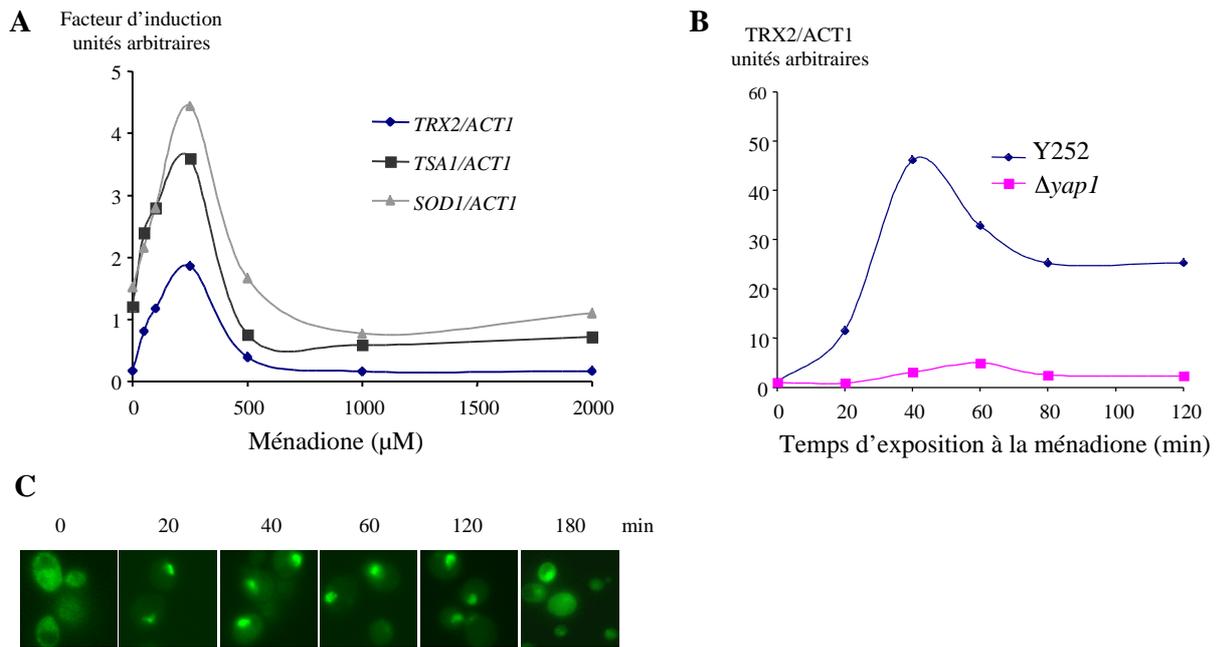


Figure 35. Mesure de l'activité de Yap1 en réponse à la ménadione. A. Mesure de l'expression de *TRX2*, *TRR1* et *SOD1* en fonction de la dose d'exposition. Les ARN totaux ont été extraits d'une souche sauvage exposée aux doses de ménadione indiquées pendant 30 minutes et la quantification de l'expression des gènes *TRX2*, *TRR1* et *SOD1*, rapportée à *ACT1* a été réalisée comme décrit en Fig. 14A. B. Cinétique d'expression de *TRX2*. Les ARN totaux ont été extraits d'une souche sauvage et d'une souche *yap1* exposée à 0,25 mM de ménadione pendant les temps indiqués et la quantification de l'expression de *TRX2*, rapportée à *ACT1* a été réalisée comme décrit en Fig. 24B. C. Cinétique d'accumulation nucléaire de Yap1. Le marquage GFP d'une souche *yap1* exprimant GFP-Yap1, exposée à 0,25 mM de ménadione pendant les temps indiqués, a été observée au microscope à fluorescence comme décrit en Fig. 14B.

La formation de cet adduit *in vivo* [206] permet probablement l'élimination du toxique par des pompes à efflux. A de faibles doses, la toxicité de la ménadione dépend de la production d'ions superoxyde. Ainsi, chez la levure, elle est exclusivement visible en conditions aérobies [204] et elle est accrue dans un mutant déficient en activité SOD [130].

B. Le rôle de Yap1 dans la réponse à la ménadione

A l'instar d'*E. coli*, la levure est capable de développer une réponse adaptative à la ménadione [19, 20]. Ce processus d'adaptation est dépendant d'une néo-synthèse protéique et implique l'induction d'un stimulon. La comparaison des stimulons ménadione et H₂O₂ [22] montre que les réponses génomiques impliquées sont pour une grande part similaires, suggérant l'existence de régulateurs communs. L'invalidation de Yap1 entraînant une hypersensibilité à la ménadione, nous avons analysé le rôle de Yap1 dans la réponse cellulaire à ce composé [136].

1) La ménadione induit une réponse Yap1-dépendante

(a) Yap1 est activé en réponse à la ménadione

La mesure par RT-PCR quantitative de l'expression de *TRX2*, *TSA1* et *SOD1*, trois gènes cibles de Yap1, en réponse à la ménadione nous a permis de conclure que Yap1 est activé en réponse à ce composé. Après 30 minutes d'exposition, l'induction de l'expression de ces trois gènes est maximale pour une dose de ménadione non toxique, égale à 250 µM, puis décroît lorsque les doses augmentent (Fig. 35A). L'analyse de la cinétique d'induction de *TRX2* en réponse à 250 µM de ménadione montre que l'expression de ce gène est maximale entre 40 et 60 minutes d'exposition puis décroît (Fig. 35B) ; l'expression de *TRX2* reste cependant élevée à moins que la ménadione ne soit éliminée par lavage des cellules (données non montrées). Cette induction est dépendante de Yap1 car elle est complètement abolie dans une souche *yap1*. L'activité de Yap1 dépend de son accumulation nucléaire en réponse à un inducteur. Nous avons donc analysé sa localisation sub-cellulaire après exposition des cellules à la ménadione.

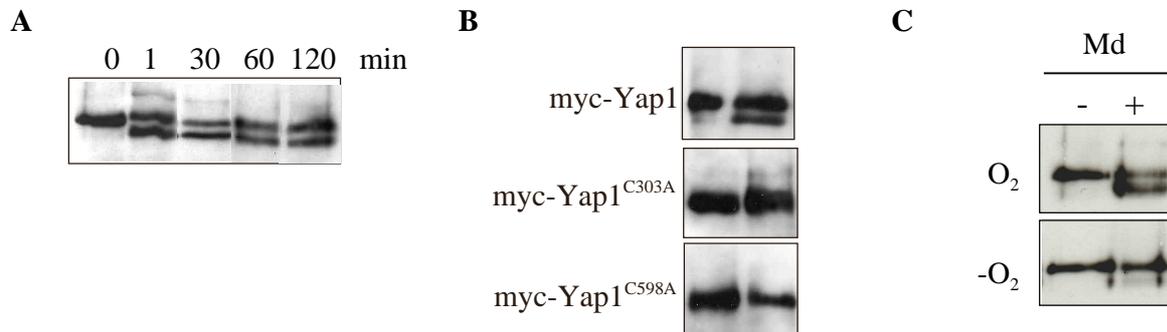


Figure 36. Yap1 est oxydé en réponse à la ménadione. A. Cinétique d'oxydation de Yap1. Une souche *yap1* exprimant myc-Yap1 a été exposée ou non à 0,25 mM de ménadione pendant les temps indiqués. Les extraits ont été réalisés comme décrit en figure 15A et séparés sur gel dénaturant non réducteur. B. L'oxydation de Yap1 par la ménadione nécessite la présence des cystéines 303 et 598. Une souche *yap1* exprimant myc-Yap1, myc-Yap1^{C303A} ou myc-Yap1^{C598A} a été exposée ou non à 0,25 mM de ménadione pendant 5 minutes. Les extraits ont été réalisés comme décrit en Fig. 15A et séparés sur gel dénaturant non réducteur. C. L'oxydation de Yap1 dépend de la production d'ions superoxyde. Une souche *yap1* exprimant myc-Yap1 a été exposée ou non à 0,25 mM de ménadione pendant 5 minutes, en aérobiose ou en anaérobiose. Les extraits ont été réalisés comme décrit en Fig. 15A et séparés sur gel dénaturant non réducteur.

En effet, la fusion GFP-Yap1 s'accumule efficacement dans le noyau après 20 minutes d'exposition à 250 μ M de ménadione (Fig. 35C) et Yap1 reste présent dans le noyau durant les deux heures suivant le traitement. Ces données indiquent que Yap1 est activé spécifiquement par la ménadione.

(b) Yap1 est oxydé en réponse à la ménadione

Nous avons vu précédemment que Yap1 est spécifiquement activé par le H₂O₂. Or, l'exposition des cellules à la ménadione engendre une production d'ions superoxyde, rapidement dismutés en H₂O₂, suggérant que l'activation de Yap1 par la ménadione pourrait être indirecte. L'analyse de l'état redox de Yap1 nous a permis de montrer que Yap1 est effectivement oxydé en réponse à la ménadione (Fig. 36). Cette oxydation est comparable à celle observée en réponse au H₂O₂, puisqu'elle dépend de la présence des cystéines 303 et 598 (Fig. 36B) et de Gpx3 (données non montrées). L'oxydation de Yap1 en réponse à la ménadione est cependant plus limitée puisqu'elle n'affecte au maximum que 50% de la protéine (contre 90 % en réponse au H₂O₂), quelle que soit la dose de ménadione utilisée (données non montrées). Après exposition des cellules à 250 μ M de ménadione, Yap1 est oxydé rapidement et de façon persistante (Fig. 36A), à moins que la ménadione ne soit éliminée (données non montrées). Ces données suggèrent donc que l'oxydation de Yap1 par la ménadione est effectivement indirecte. Ainsi, en conditions anaérobies, dans lesquelles il n'y a pas de production d'ions superoxyde ni de H₂O₂, le traitement des cellules par la ménadione n'entraîne pas d'oxydation de Yap1 (Fig. 36C).

2) L'oxydation de Yap1 n'est pas indispensable à son activation par la ménadione

Les données précédentes montrent que l'activation et l'oxydation de Yap1 suivent des cinétiques similaires, suggérant que l'oxydation de Yap1 par le H₂O₂ peut être responsable de son activation en réponse à la ménadione. Nous avons donc mesuré la tolérance à la ménadione des mutants Yap1^{C303A} et Yap1^{C598A}. Or, de façon surprenante, ces mutants sont normo-tolérants à la ménadione (Fig. 37A).

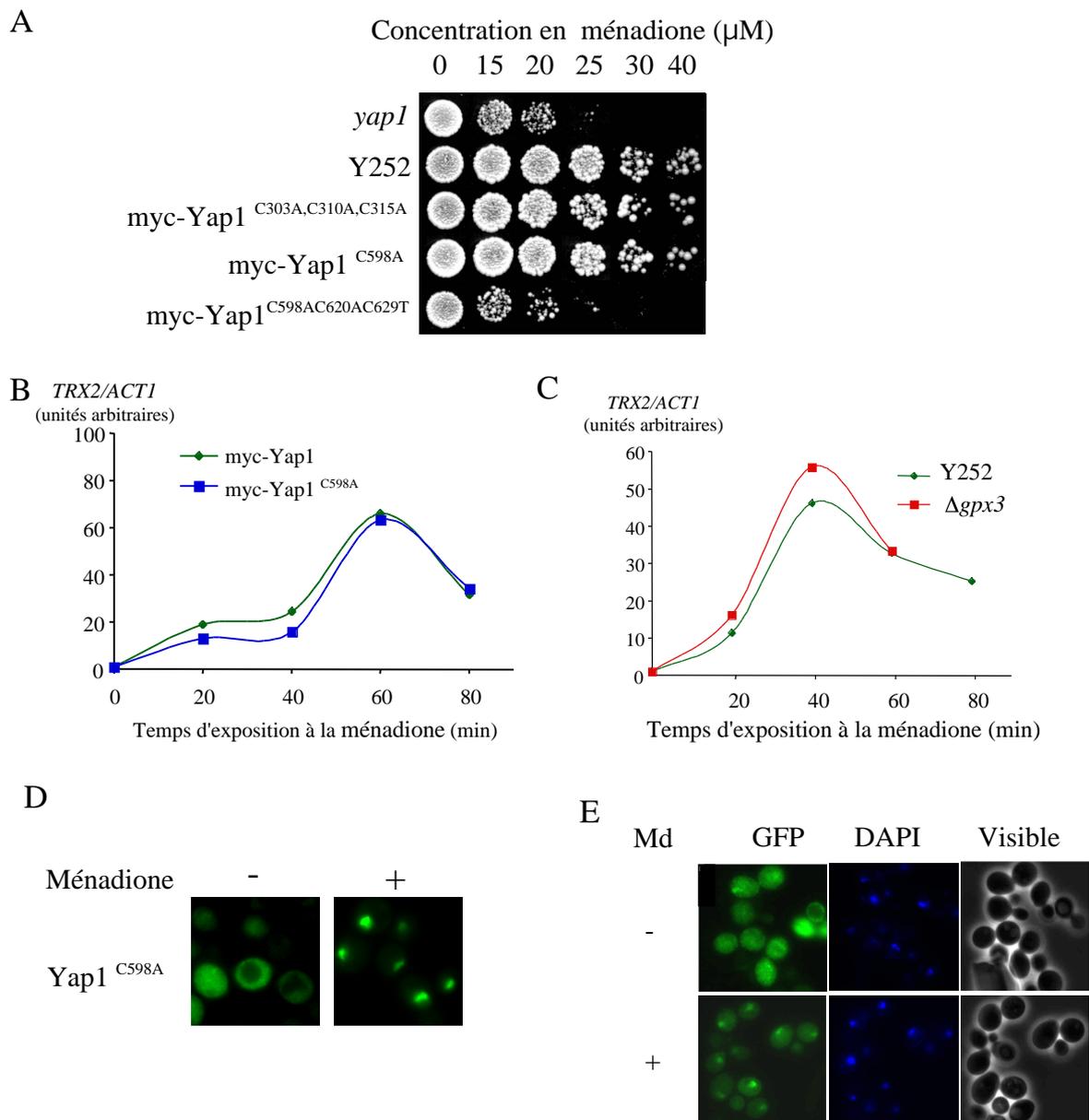


Figure 37. L'oxydation de Yap1 n'est pas essentielle à son activation par la ménadione (Md). A. Sensibilité à la ménadione des mutants cystéine de Yap1. Une souche *yap1*, transformée ou non avec les plasmides exprimant myc-Yap1 ou les différents mutants cystéine, est cultivée en phase stationnaire puis la tolérance à la ménadione de ces différentes souches est mesurée sur un milieu solide minimum contenant des concentrations croissantes de ce composé. B. Cinétique d'expression de *TRX2*. Les ARN totaux ont été extraits à partir d'une souche *yap1*, transformée avec myc-Yap1 ou myc-Yap1^{C598A}, exposée à 0,25 mM de ménadione pendant les temps indiqués. La quantification de l'expression de *TRX2*, rapportée à *ACT1* a été réalisée comme décrit en Fig. 24B. C. Cinétique d'expression de *TRX2*. Les ARN totaux ont été extraits à partir d'une souche sauvage ou dans une souche $\Delta gpx3$, exposée à 0,25 mM de ménadione pendant les temps indiqués. La quantification de l'expression de *TRX2*, rapportée à *ACT1* a été réalisée comme décrit en Fig. 24B. D. Le mutant Yap1^{C598A} s'accumule dans le noyau en réponse à la ménadione. Le marquage GFP d'une souche *yap1*, transformée avec GFP-Yap1^{C598A} est observée selon le protocole décrit en figure 14B. E. L'accumulation nucléaire de Yap1 en réponse à la ménadione ne dépend pas de la production d'ions superoxyde. Une souche *yap1*, transformée avec GFP-Yap1, est exposée sous argon à 0,25 mM de ménadione pendant 15 minutes. Les noyaux sont marqués par l'ajout de DAPI pendant les 5 dernières minutes d'induction. Les marquages sont observés au microscope à fluorescence après lavage des cellules et ajout de DABCO en anaérobiose.

Corrélativement, le mutant Yap1^{C598A} ne présente pas de défaut, ni d'activité transcriptionnelle (Fig. 37B) ni d'accumulation nucléaire (Fig. 37D) en réponse à ce composé et l'activation de Yap1 par la ménadione n'est pas affectée par l'absence de Gpx3 (Fig. 37C). Ces données indiquent donc que l'oxydation de Yap1 en réponse à la ménadione n'est pas indispensable à son activation. Ceci est confirmé par la capacité de la ménadione à promouvoir l'accumulation nucléaire de Yap1 en anaérobiose (Fig. 37 E). L'activation de Yap1 par la ménadione peut donc être relayée par un mécanisme indépendant de la production d'ions superoxyde et donc de peroxyde d'hydrogène.

3) Les trois cystéines C-terminales de Yap1 sont indispensables à son activation par la ménadione

Nous avons cherché à voir si des résidus cystéines, autres que les cystéines 303 et 598, sont nécessaires à l'activation de Yap1 par la ménadione. La mutagenèse de chacune des six cystéines de Yap1 en alanine n'altère pas la résistance des souches à ce composé (données non montrées). Seule la mutagenèse simultanée des trois cystéines C-terminales (Yap1^{C598A,C620A,C629T}), mais pas celle des cystéines N-terminales (Yap1^{C303A,C310A,C315A}), confère un phénotype d'hypersensibilité similaire à celui observée pour la souche *yap1* (Fig. 37A). De la même manière, le mutant Yap1^{C598A,C620A,C629T} est le seul à ne pas s'accumuler dans le noyau et à être transcriptionnellement inactif en réponse à la ménadione (Fig. 38A et 38B). Les cystéines C-terminales sont donc essentielles à l'activation de Yap1 en réponse à la ménadione. Sont-elles suffisantes ? La construction d'une fusion entre le c-CRD de Yap1, la GFP et le domaine de liaison à l'ADN de Gal4, contenant un signal de localisation nucléaire (NLS), a permis de montrer que le c-CRD contient les informations suffisantes pour que la protéine de fusion s'accumule dans le noyau en réponse à la ménadione (Fig. 38C). Contrairement au H₂O₂, le mécanisme moléculaire d'activation de Yap1 par la ménadione n'implique donc que la réactivité des cystéines C-terminales.

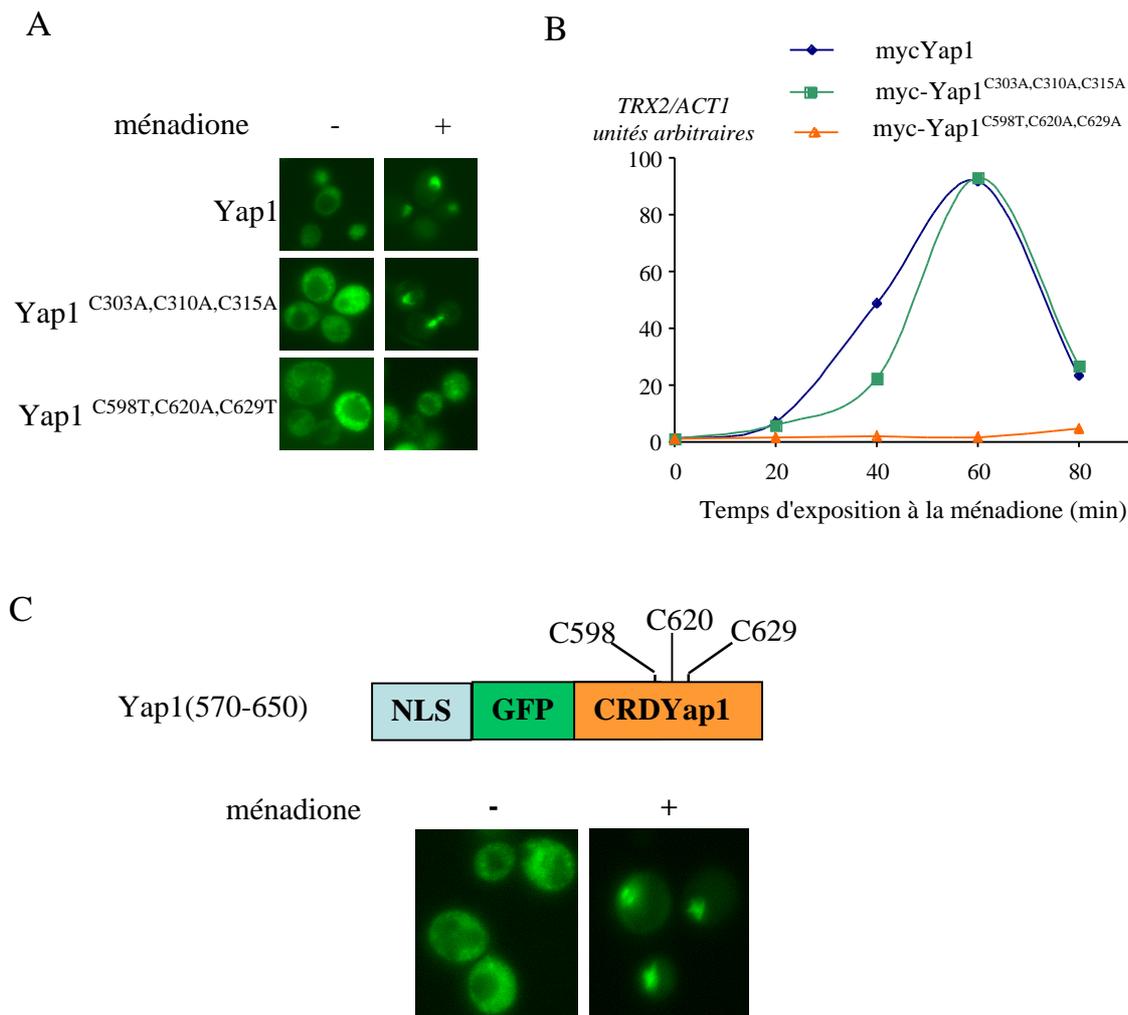
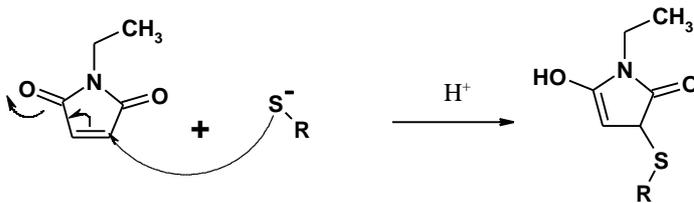


Figure 38. Les cystéines C-terminales de Yap1 sont nécessaires et suffisantes à son activation par la ménadione. A. Le c-CRD est essentiel à l'accumulation nucléaire de Yap1 en réponse à la ménadione. Le marquage GFP d'une souche *yap1*, transformée avec GFP-Yap1, GFP-Yap1^{C303A,C310A,C315A} ou GFP-Yap1^{C598T,C620A,C629T} est observée selon le protocole décrit en Fig. 14B. B. L'induction de *TRX2* par la ménadione nécessite la présence des cystéines C-terminales de Yap1. Les ARN totaux ont été extraits à partir d'une souche *yap1*, transformée avec myc-Yap1, myc-Yap1^{C303A,C310A,C315A} ou myc-Yap1^{C598T,C620A,C629T}, et exposée à 0,25 mM de ménadione pendant les temps indiqués. La quantification de l'expression de *TRX2*, rapportée à *ACT1* a été réalisée comme décrit en Fig. 24B. C. Le c-CRD de Yap1 s'accumule dans le noyau en réponse à la ménadione. Représentation schématique de la fusion du c-CRD avec la GFP et le NLS de Gal4. Une souche *yap1*, transformée avec GFP-CRDYap1 a été exposée à 0,25 mM de ménadione pendant 15 minutes et le marquage GFP a été observé comme décrit en Fig. 14B.

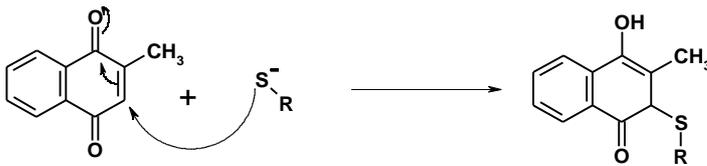
4) L'activation de Yap1 par la ménadione implique une modification des cystéines C-terminales

La structure chimique de la ménadione peut être comparée à celle du NEM, utilisé comme un alkylant des thiols. Ces molécules possèdent toutes deux des groupements carbonyles conjugués à une double liaison, leur conférant une réactivité de type accepteur de Michaël (voir schéma ci-dessous) [207]. La formation d'adduits ménadione au niveau des cystéines C-terminales de Yap1 pourrait masquer le NES et permettre ainsi son activation.

Formation d'un thio-éther par réaction d'un thiolate sur le NEM



Formation d'un thio-éther par réaction d'un thiolate sur la ménadione



(a) La partie C-terminale de Yap1 est modifiée *in vivo* par la ménadione

Nous avons montré précédemment que le c-CRD de Yap1 contient les éléments responsables de son activation en réponse à la ménadione. Nous avons donc utilisé une construction contenant le c-CRD fusionné à une étiquette protéine A et au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (contenant le NLS), afin de visualiser *in vivo*, la formation éventuelle de thio-éthers ménadione sur les cystéines C-terminales de Yap1 (Fig. 39A). Nous avons pour cela utilisé l'AMS, un agent de haut poids moléculaire (0,5 kDa par molécule) alkylant les cystéines. En absence de modification des cystéines, l'incrément de masse entraîné par l'AMS sera de 1,5 kDa ; en revanche, la formation d'adduits sur les cystéines limitera leur accessibilité à l'alkylation et diminuera d'autant l'incrément de masse lié à leur modification par l'AMS. Ainsi, nous avons observé que l'exposition des cellules à la ménadione entraîne une légère diminution de l'incrément de masse constaté dans l'échantillon contrôle.

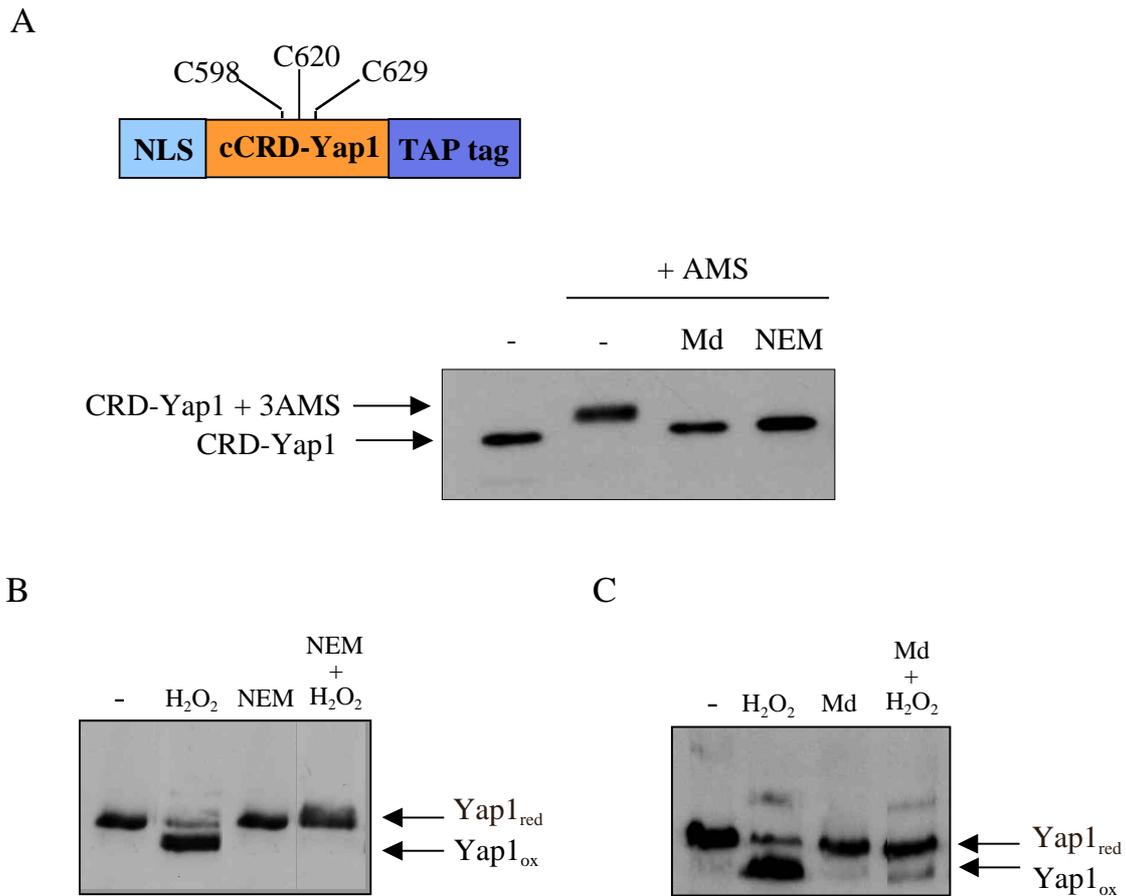


Figure 39. L'activation de Yap1 par la ménadione implique une modification de ses cystéines C-terminales. A. Le c-CRD de Yap1 est modifié après exposition au NEM ou à la ménadione. Représentation schématique de la fusion du c-CRD avec l'étiquette protéine A et le NLS de Gal4. Une souche *yap1*, transformée avec la construction Gal4-cCRD-Yap1-TAPtag a été exposée à 0,1 mM de NEM ou 0,25 mM de ménadione pendant 15 minutes et les extraits ont été réalisés selon le protocole décrit dans les méthodes. Les échantillons ont ensuite été séparés sur gel dénaturant réducteur. B. L'exposition au NEM empêche l'oxydation ultérieure de Yap1 par le H₂O₂. Une souche *yap1* exprimant myc-Yap1 a été exposée à 0,1 mM de NEM pendant 15 minutes. La moitié de l'échantillon est ensuite exposée à 0,4 mM d'H₂O₂ pendant 5 minutes. Après lavage des cellules au TCA, les extraits ont été réalisés comme décrit en Fig 15A et les échantillons ont été séparés sur gel dénaturant non réducteur. L'oxydation de Yap1 par le H₂O₂ sert de contrôle. C. L'exposition à la ménadione empêche l'oxydation ultérieure de Yap1 par le H₂O₂. Une souche *yap1* exprimant myc-Yap1 a été exposée à 0,25 mM de ménadione en anaérobiose pendant 15 minutes. La moitié de l'échantillon est ensuite exposée à 0,4 mM d'H₂O₂ pendant 5 minutes. Après lavage des cellules au TCA, les extraits ont été réalisés comme décrit en Fig. 15A et les échantillons ont été séparés sur gel dénaturant non réducteur. L'oxydation de Yap1 par le H₂O₂ sert de contrôle.

Cette diminution est comparable à celle observée après traitement des cellules au NEM. Ces données suggèrent que l'une au moins des cystéines C-terminales de Yap1 est modifiée par le traitement ménadione.

(b) L'oxydation de Yap1 par le H₂O₂ et sa modification par la ménadione sont deux phénomènes exclusifs

L'exposition de cellules au H₂O₂ entraîne la formation d'un pont disulfure entre les cystéines 303 et 598. Si au cours d'une exposition antérieure au NEM ou à la ménadione, ces cystéines étaient modifiées, la formation de ce pont serait empêchée. Ainsi, l'exposition des cellules au NEM (100 µM) pendant 5 minutes prévient totalement la formation du pont disulfure en réponse à un traitement ultérieur au H₂O₂ (Fig. 39B). De même, l'exposition anaérobique des cellules à la ménadione (250 µM pendant 5 minutes) limite l'oxydation ultérieure de Yap1 par le peroxyde d'hydrogène (Fig. 39C). Ces données indiquent que les cystéines 303 et/ou 598 sont directement modifiées ou que leur réactivité est altérée par la ménadione et le NEM. L'exposition à de faibles doses de NEM (100 µM) de cellules exprimant la partie C-terminale de Yap1 a permis de montrer par spectrométrie de masse que les 3 cystéines C-terminales de Yap1 étaient effectivement alkylées *in vivo* par le NEM (données non montrées). Aux vues de la structure chimique de la ménadione, la ménadione pourrait modifier les résidus cystéines de Yap1 par une addition covalente similaire. Cette modification n'a cependant pas pu être directement observée par spectrométrie de masse.

II. Existe-t-il un mécanisme général d'activation de Yap1 impliquant la réactivité des cystéines C-terminales ?

A. L'activation de Yap1 par le 4-hydroxynonéal est indépendante de Gpx3

Les données obtenues avec la ménadione suggèrent que Yap1 peut être activé par des molécules capables d'interagir avec ou de modifier les cystéines. Nous avons cherché à tester cette hypothèse en mesurant la capacité de Yap1, et des mutants Yap1^{C303AC310AC315A} et Yap1^{C598AC620AC629A} à s'accumuler dans le noyau en réponse à différents composés.

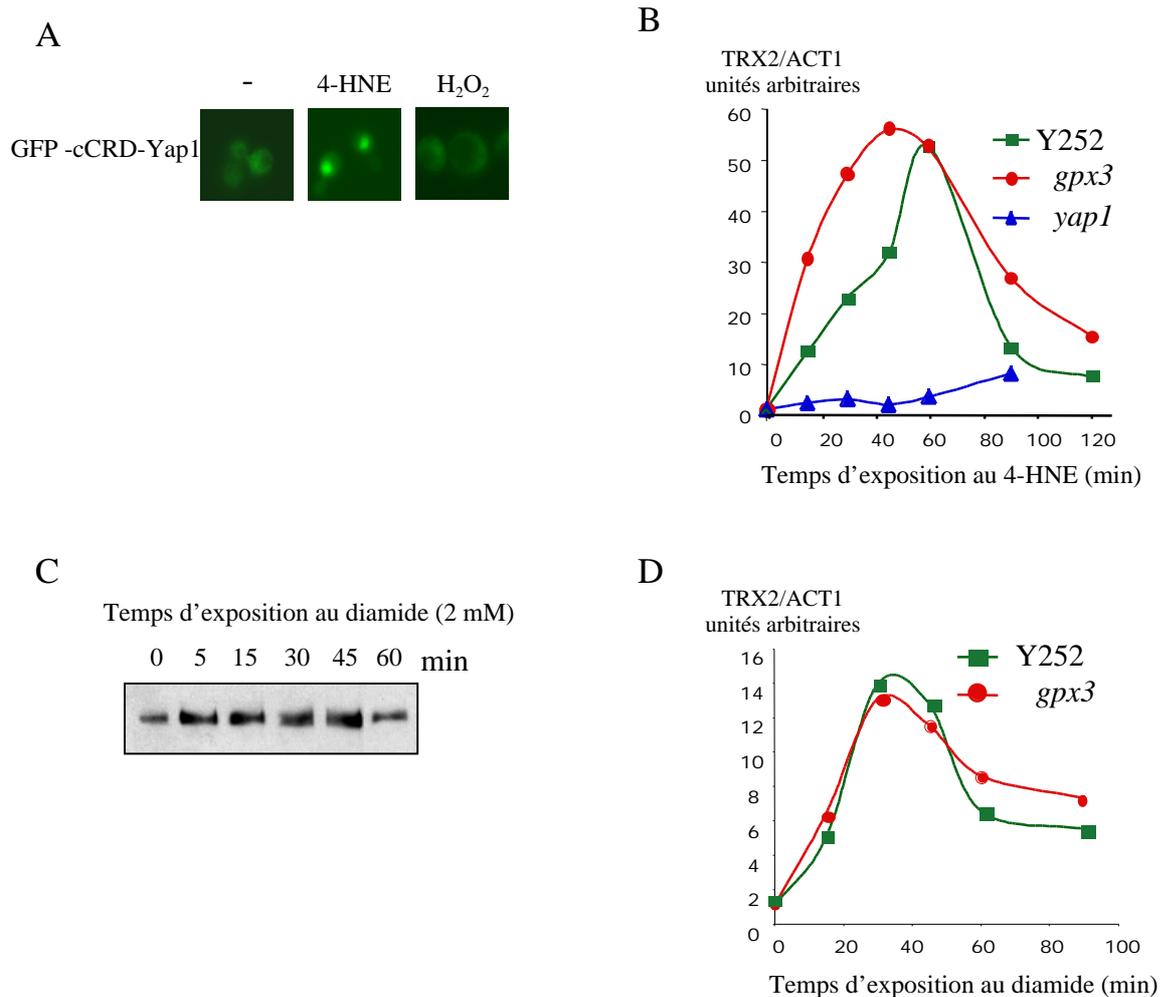


Figure 40. Yap1 est activé par diverses molécules ayant un réactivité vis à vis des thiols. A. Localisation cellulaire de la fusion GFP-cCRD-Yap1 après exposition au H₂O₂ ou au 4-hydroxy-nonéanal (4-HNE). Une souche *yap1*, transformée avec la construction GFP-cCRD-Yap1, est exposée à 0,4 mM de H₂O₂ ou 0,25 mM de 4-HNE pendant 15 minutes. Les marquages sont ensuite observés au microscope à fluorescence comme décrit en Fig. 14B. **B.** Expression de *TRX2* en réponse au 4-HNE. Les ARN totaux ont été extraits à partir des souches sauvage (Y252), *gpx3* et *yap1* exposées à 0,25 mM de 4-HNE pendant les temps indiqués. L'expression de *TRX2* est mesurée comme décrit en Fig. 24B. **C.** Mesure de l'état redox de Yap1 en réponse au diamide. Des cellules *yap1* exprimant myc-Yap1 ont été exposées à 2 mM de diamide pendant les temps indiqués. Les extraits ont été réalisés comme décrit dans la figure 15A et révélés après migration sur gel dénaturant non réducteur. **D.** Expression de *TRX2* en réponse au diamide. Les ARN totaux ont été extraits à partir des souches sauvage (Y252) et *gpx3*, exposées à 2 mM de diamide pendant les temps indiqués. L'expression de *TRX2* est mesurée comme décrit en Fig 24B.

Nous avons en particulier recherché des composés naturels dont la structure chimique leur confère une éventuelle réactivité avec les thiols. Ainsi, le 4-hydroxynonéal (4-HNE), un sous-produit de la peroxydation lipidique, possède une fonction carbonyle conjuguée à une double liaison. A l'instar de la ménadione, cette configuration chimique lui confère une réactivité de type accepteur de Michaël. L'exposition des cellules au 4-HNE entraîne une accumulation nucléaire de Yap1 et une induction de *TRX2*. Cette activation de Yap1 par le 4-HNE est indépendante de la présence de Gpx3 et, contrairement au H₂O₂, ne nécessite que la présence des cystéines C-terminales (Fig. 40A et 40B). L'activation de Yap1 par le 4-HNE est indépendante de toute production de H₂O₂ et repose vraisemblablement les propriétés électrophiles de cette molécule. D'autres électrophiles, comme le diéthyl-maléate et l'iodoacétamide ont également été testés et permettent l'accumulation nucléaire de la fusion cCRD-GFP (données non montrées). Yap1 apparaît donc comme le régulateur d'une réponse aux électrophiles.

B. Le cas du diamide

Le diamide a été largement utilisé dans la littérature comme un agent oxydant des thiols et en particulier du glutathion [208]. L'exposition de cellules au diamide induit l'expression transcriptionnelle de *TRX2* de façon Yap1-dépendante, ainsi que l'accumulation nucléaire de Yap1 [121, 183]. Nous avons donc analysé l'état redox de Yap1 en réponse au diamide. L'exposition des cellules au diamide n'induit pas la formation du pont disulfure intramoléculaire constatée en réponse aux peroxydes (Fig. 40C). Cette observation est compatible avec l'ensemble des données présentes dans la littérature suggérant que les mécanismes moléculaires de détection du diamide et du peroxyde d'hydrogène par Yap1 sont distincts [182, 187]. En particulier, la partie C-terminale (c-CRD) de Yap1 est suffisante à la régulation de l'interaction entre Yap1 et Crm1 par le diamide [183], alors qu'elle ne l'est pas pour le peroxyde d'hydrogène (Fig. 40A). L'analyse de l'activité transcriptionnelle de Yap1 nous a permis de montrer que l'activation de Yap1 par le diamide est également Gpx3-indépendante (Fig. 40D). Ces observations, associées à l'hyper-sensibilité au diamide du mutant Yap1^{C598A,C620T,C629T} [183] suggèrent que le diamide pourrait activer Yap1 par un mécanisme similaire à celui décrit pour les électrophiles.

III. Conclusion/Discussion

A. Activation de Yap1 par la ménadione

- 1) La ménadione active Yap1, indépendamment de la production d'ions superoxyde.

La capacité de la ménadione à activer Yap1 en anaérobiose, ainsi que l'inductibilité des mutants Yap1^{C303A}, Yap1^{C598A} et *gpx3* montrent que la stimulation de la voie Yap1 peut se faire indépendamment de la production d'ions superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Ces données impliquent que la ménadione en tant que composé chimique stimule, directement ou non, l'activation de Yap1. Nous avons pu voir que la ménadione modifie le c-CRD *in vivo* et que cette modification prévient l'oxydation ultérieure de Yap1 par le H₂O₂. L'une des hypothèses que nous favorisons est que ces cystéines sont bloquées par leur liaison covalente avec la ménadione. Bien que ce composé puisse être considéré comme un accepteur de Michael, nous n'avons pas pu détecter de thio-éther correspondant à la fixation d'une molécule de ménadione sur une cystéine de Yap1. Ce résultat peut être expliqué par divers problèmes techniques. D'une part, l'adduction due la ménadione peut être instable lors de la lyse et du traitement de l'échantillon. Il a en particulier été montré qu'une liaison thio-éther entre la ménadione et le glutathion peut être hydrolysée *in vitro* par passage en milieu alcalin, et que cette liaison est par ailleurs photosensible [209]. D'autre part, le lysat peut contenir des enzymes capables de réduire l'adduit. Nous avons essayé de bloquer l'activité de ces éventuelles réductases en traitant les cellules et/ou le lysat au NEM, après exposition à la ménadione. Mais dans ce cas, les cystéines de Yap1 sont alkylées par le NEM et non par la ménadione (données de spectrométrie de masse). Cette observation peut être expliquée par une attaque nucléophile du NEM sur les éventuelles cystéines modifiées, ou par l'instabilité des adduits ménadione, lors de la lyse, laissant les thiols libres à l'alkylation par le NEM. Notre capacité à observer ces modifications semble donc directement dépendante des constantes d'association et de dissociation propres à chaque type d'adduit et de leur stabilité au cours des différents traitements subis par l'échantillon. L'étude de la modification des cystéines par la ménadione est donc difficile et les expériences de spectrométrie de masse ne permettent pas d'étayer l'hypothèse que nous avons formulée.

Cependant, une étude très récente a montré que Pap1, l'homologue de Yap1 chez *S. pombe* est modifié *in vitro* par le diéthylmaléate. Cette modification implique l'addition de cette molécule sur deux des cystéines C-terminales de Pap1 [210]. L'ensemble de ces données suggèrent que Yap1 et Pap1 sont effectivement impliqués dans une réponse aux électrophiles. Il sera cependant essentiel de montrer formellement l'existence d'adduits au niveau des cystéines C-terminales de ces deux régulateurs *in vivo*.

2) Coexistence des mécanismes d'activation Gpx3-dépendant et Gpx3-indépendant

(a) en réponse à la ménadione

Nos données indiquent que la formation du pont disulfure 303-598 n'est pas nécessaire à l'activation de Yap1 par la ménadione. L'exposition aérobie des cellules à la ménadione entraîne cependant l'oxydation de Yap1, très probablement via la dismutation du superoxyde en H₂O₂. Il est donc probable que dans ces conditions, cette oxydation joue un rôle dans l'activation de Yap1. En effet, la forme oxydée représente environ 50% de la protéine totale, suggérant que la moitié de Yap1 est activé par la présence de H₂O₂. Ces données indiquent que les deux modes d'activation co-existent mais que la cinétique d'activation associée au mécanisme Gpx3-indépendant doit être légèrement plus lente.

(b) en réponse aux peroxydes dans la souche $\Delta gpx3$

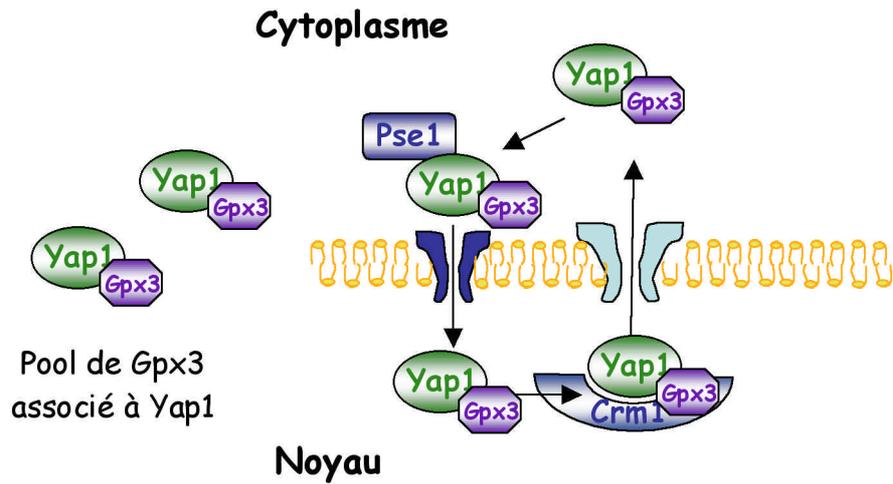
La description d'un deuxième mode d'activation de Yap1 permet plus généralement de commenter l'existence d'une réponse transcriptionnelle tardive de Yap1 dans la souche *gpx3* exposée au H₂O₂ (Fig. 24C). En effet, l'exposition au H₂O₂ de cellules incapables d'induire rapidement les antioxydants, pourrait entraîner la formation de sous-produits d'oxydation responsables de la stimulation de la voie d'activation Gpx3-indépendante. Il nous faudra caractériser le mécanisme responsable de cette activation tardive. D'autre part, nous chercherons à savoir si la présence de lipides insaturés, dont la peroxydation entraîne en particulier la production de 4-HNE, stimule l'activité de Yap1.

B. Relation réactivité-toxicité

Nos données suggèrent que tout composé électrophile présentant une réactivité vis-à-vis des thiols va induire plus ou moins efficacement la voie Yap1. Cette hypothèse pose un certain nombre de questions. Premièrement, tout composé activant Yap1 par ce biais est-il nécessairement toxique ? L'activation de Yap1 par ces molécules est-elle spécifique ? L'activation anaérobie de Yap1 par la ménadione indique que la voie Yap1 peut être activée à des doses ne présentant pas de toxicité réelle pour la cellule [204]. A des doses plus élevées, une certaine toxicité peut cependant être associée au caractère électrophile des quinones telles que la ménadione [207]. En effet, la modification par les composés électrophiles, des cystéines ou d'autres résidus possédant des propriétés nucléophiles comparables, peut entraîner l'inhibition de certaines activités. Ainsi, la toxicité du 4-HNE est également liée à son caractère électrophile. Ce composé réagit avec les cystéines mais aussi avec les résidus lysine et histidine des protéines, permettant entre-autres l'inhibition d'enzymes telles que la Glyceraldéhyde-3-Phosphate deshydrogénase [211]. L'activation de la voie Yap1 permet de contrer la toxicité des électrophiles par l'induction de pompes à efflux. Ces protéines transportent, dans la vacuole ou dans le milieu extérieur, le toxique, sous forme conjuguée au glutathion [46]. Le caractère électrophile de ces composés est donc responsable de leur toxicité mais aussi de leur détection et de leur élimination. Une souche *yap1* possède une tolérance diminuée vis-à-vis de nombreux composés électrophiles (données non montrées), suggérant que cette réponse est physiologique. Cependant, la détection des électrophiles par Yap1 apparaît moins spécifique que la détection des peroxydes. En effet, l'activation de Yap1 par la ménadione, mais aussi par le diamide et le cadmium est accrue dans la souche *gsh1-pro2-1* (données non montrées), suggérant que les cystéines du glutathion sont en compétition avec les cystéines de Yap1 pour la formation d'adduits.

DISCUSSION GENERALE

A



B

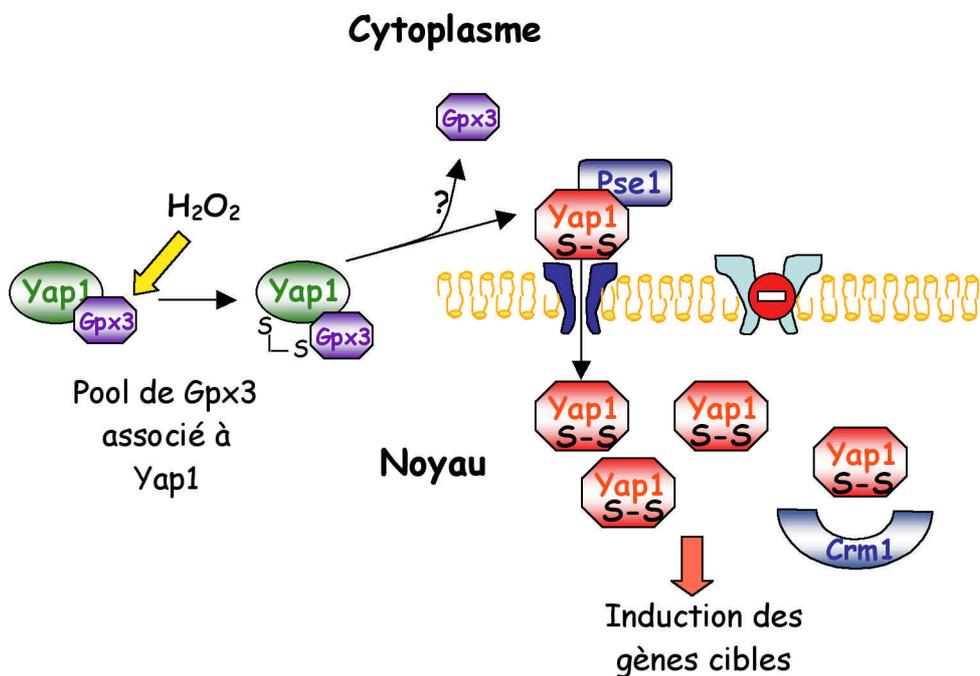


Figure 41. Modèle d'activation de Yap1 par le peroxyde d'hydrogène. A. En absence de H_2O_2 , Yap1 est associé à Gpx3, et décrit un cycle entre le noyau et le cytosol grâce à l'importine Pse1 et l'exportine Crm1. Yap1 et Gpx3 sont associés en pré-complexe. B. La détection du H_2O_2 par Gpx3 entraîne la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre Yap1 et Gpx3. La résolution rapide de ce pont en un pont intramoléculaire dans Yap1 entraîne la réduction concomitante de Gpx3. Une fois oxydé, Yap1 n'est plus capable d'interagir avec l'exportine Crm1 et s'accumule dans le noyau, où il induit l'expression de ses gènes cibles.

. DISCUSSION GENERALE

I. Yap1/Gpx3 est le système détecteur des peroxydes chez *S. cerevisiae*.

A. Récapitulation des deux modes d'activation de Yap1

1) Le modèle d'activation de Yap1 par les peroxydes

(a) Description du modèle

- Existence d'une homéostasie du peroxyde d'hydrogène

Nos données montrent que comme *E. coli*, *S. cerevisiae* possède un système détectant spécifiquement les peroxydes (Fig. 41). Ce système comprend un détecteur, Gpx3, et un régulateur Yap1. En absence de Gpx3, Yap1 n'est pas activé par les peroxydes. Gpx3 possède une activité thiol-oxydase capable de relayer l'oxydation de Yap1 par le H₂O₂. Une fois oxydé, Yap1 s'accumule dans le noyau, où il active l'expression de ses gènes cibles. L'activité de Yap1 est soumise à un rétrocontrôle négatif, impliquant vraisemblablement une réduction par les thiorédoxines. L'identification du système Yap1/Gpx3 suggère que chez *S. cerevisiae*, comme chez *E. coli*, la concentration intracellulaire en peroxydes est soumise à un contrôle homéostatique.

- Gpx3, un récepteur des peroxydes

Le système Yap1/Gpx3 possède deux niveau de spécificité : une spécificité au niveau du mécanisme de détection (Gpx3 et non Yap1 est oxydé par le H₂O₂) et une spécificité au niveau de la transduction du signal redox (seul Yap1, et peut être une autre protéine sont oxydés par Gpx3). Il peut ainsi être comparé aux systèmes ligand-récepteur-transducteur classiques. Ces données nous ont donc amené à proposer une nouveau nom pour Gpx3 : Orp1 pour « Oxidant Receptor Peroxidase 1 ». En outre, Gpx3/Orp1 peut réduire des peroxydes complexes tels que hydroperoxydes de lipides [68], permettant outre une spécificité et une efficacité de la réponse cellulaire au H₂O₂, une certaine diversification des inducteurs.

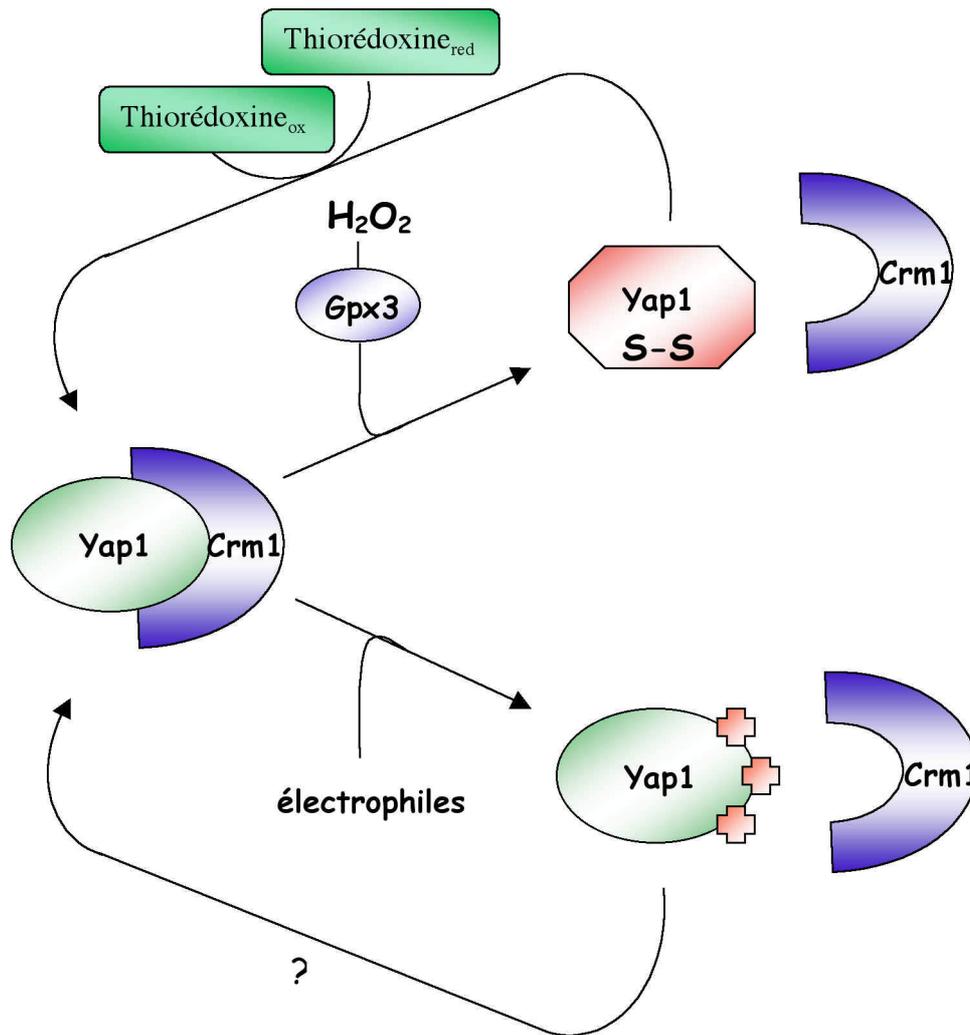


Figure 42. Deux modes d'activation de Yap1, l'un Gpx3-dépendant, l'autre Gpx3-indépendant. Le H_2O_2 induit la formation d'un pont disulfure dans Yap1 alors que les électrophiles modifient, probablement par liaison covalente, les cystéines du c-CRD. Ces deux modifications entraînent une inhibition de l'interaction entre Yap1 et Crm1 et permettent son accumulation nucléaire. Le pont disulfure intramolécule induit par l'exposition des cellules est probablement réduit, directement ou non, par les thiorédoxines. La voie permettant la désactivation de Yap1 après son activation par les électrophiles n'est pas connue.

(b) Questions posées par le modèle

L'étude du mécanisme de détection des peroxydes par Gpx3/Orp1 doit être affinée. Premièrement, des études biochimiques et structurales devront être menées afin de mieux comprendre comment Gpx3/Orp1 s'oxyde en réponse au H₂O₂. Deuxièmement, le mécanisme de détection devra être replacé dans son contexte cellulaire. Nous ignorons en particulier si l'oxydation de Yap1 par Gpx3/Orp1 a lieu dans un compartiment cellulaire préférentiel.

Le mécanisme de transduction du signal redox de Gpx3/Orp1 à Yap1 devra également être affiné. Dans le modèle actuel, la forme oxydée de Gpx3/Orp1, responsable de l'oxydation de Yap1 est l'acide sulfénique (Cys36-SOH) et l'oxydation de Yap1 en un pont disulfure intramoléculaire entraîne la réduction de Gpx3/Orp1. Nous ne savons pas si la réduction de Gpx3/Orp1 et l'oxydation de Yap1 entraîne une dissociation du complexe. Par ailleurs, l'exposition des cellules au H₂O₂ entraîne aussi la formation d'un pont disulfure intramoléculaire Cys36-S-S-Cys82 dans Gpx3/Orp1. Ce pont pourrait oxyder Yap1 par un mécanisme d'échange de pont disulfure. Bien que les données génétiques indiquent que la formation de ce pont n'est pas nécessaire à l'oxydation de Yap1 par Gpx3/Orp1, il est important de savoir s'il existe un deuxième mode d'oxydation de Yap1 par Gpx3. Les essais préliminaires de reconstitution du système avec Yap1 et Orp1 purifiés permettent une oxydation de Yap1 dépendante de Gpx3/Orp1. Cependant, la relative inefficacité de cette oxydation indique qu'un autre composant du système est probablement manquant.

2) Comparaison du mode d'activation de Yap1 par le H₂O₂ et par les électrophiles

Yap1 est activé par un nombre important de composés de natures chimiques variées. Ces différents inducteurs agissent tous au niveau de l'interaction entre Yap1 et Crm1, par deux mécanismes clairement distincts: la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 303 et 598 par les peroxydes et la modification des cystéines C-terminales, probablement par addition de molécules à caractère électrophile (Fig. 42). Chacune de ces modifications résulte en une altération du NES de Yap1 et dans les deux cas, les cystéines constituent la cible de la régulation. Comment les mêmes résidus sont-ils capables de détecter

des molécules aussi diverses que les peroxydes, le cadmium ou les électrophiles ? La réactivité des cystéines de Yap1 vis-à-vis de molécules électrophiles suppose que ces résidus présentent un caractère nucléophile (associé à leur présence sous forme thiolate). L'oxydation d'une cystéine en acide sulfénique par le H₂O₂ étant également une réaction de substitution nucléophile, Yap1 devrait pouvoir être directement oxydé par le H₂O₂. Ce n'est pas le cas. Pourquoi ? La présence d'une cystéine sous forme thiolate est nécessaire mais peut ne pas être suffisante à son oxydation par les peroxydes. L'environnement de la cystéine réactive doit aussi permettre la stabilisation de l'alcoolate (RO⁻), produit consécutivement à la réduction du peroxyde (Ellis et Poole, 1997). Il est possible que Yap1 ne possède pas un tel environnement favorable à proximité de ses cystéines réactives. Il est également possible que la formation d'un pont disulfure entre Yap1 et Gpx3/Orp1 permette le rapprochement structural des cystéines 303 et 598, sans lequel le pont disulfure intramoléculaire de Yap1 ne peut se faire. L'ensemble de ces hypothèses devra être testé par des études biochimiques et structurales et l'étude de la réactivité des cystéines de Yap1 vis-à-vis des électrophiles devra être poursuivie.

B. Comparaison des systèmes fongique et bactérien de détection du stress oxydant

1) Yap1 et OxyR sont des homologues fonctionnels

Yap1 et OxyR permettent tous deux le contrôle de la concentration intracellulaire en peroxydes chez *S. cerevisiae* et *E. coli*.

(a) L'activité d'OxyR et de Yap1 est contrôlée par leur état redox

L'activation d'OxyR comme de Yap1 dépend de la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Il existe cependant une différence majeure entre ces deux systèmes. Alors qu'OxyR sert à la fois de détecteur et de régulateur [151], ces deux fonctions sont découplées chez *S. cerevisiae*. Ainsi, OxyR associe la fonction peroxydatique de Gpx3/Orp1 et la fonction effectrice de Yap1.

OxyR et Yap1 sont rapidement réduits/désactivés après exposition des cellules au peroxyde d'hydrogène. Bien que les données obtenues ne permettent pas de conclure formellement, la

réduction de Yap1 apparaît dépendante de la voie des thiorédoxines, et celle d'OxyR, de la voie du glutathion via la glutarédoxine 1. Les thiorédoxines et la glutarédoxine 1 étant respectivement des gènes cibles de Yap1 et d'OxyR, l'activité des deux régulateurs est rétrocontrôlée. Alors que les thiorédoxines sont essentielles au contrôle de la concentration intracellulaire en peroxydes chez *S. cerevisiae*, chez *E. coli*, la glutarédoxine 1 n'est pas impliquée dans la réduction du H₂O₂ [212]. Ainsi, contrairement à *S. cerevisiae*, il ne semble pas y avoir de couplage entre la réduction du H₂O₂ et la réduction d'OxyR chez *E. coli*. Le défaut de désactivation d'OxyR observé dans les mutants de la voie du glutathion peut donc à priori être considéré comme une mesure directe du défaut de réduction de ce facteur.

(b) L'état redox de Yap1 et d'OxyR contrôle leur activité à des niveaux différents

L'oxydation de Yap1 régule sa localisation subcellulaire alors que l'oxydation d'OxyR contrôle sa liaison aux promoteurs des gènes cibles [97, 148]. Le système levure revêt donc une dimension plus complexe liée à la présence d'une compartimentalisation cellulaire.

2) La réponse au stress « disulfure »

L'activité basale d'OxyR est augmentée dans des mutants simultanément inactivés pour la voie des thiorédoxines et du glutathion. Or, chez *E. coli*, ces deux voies de réduction ne sont pas essentielles au maintien de l'homéostasie des peroxydes. Ainsi, OxyR peut être activé indépendamment d'une augmentation de la concentration en H₂O₂ [151]. Quel est mécanisme d'activation impliqué ? Les auteurs ont observé, dans ces mutants, une accumulation de thiols oxydés sous forme de ponts disulfures. Ce phénomène, appelé stress « disulfure » peut être suivi par la mesure du rapport GSSG/GSH et l'activation dans le cytosol d'une enzyme périplasmique, la phosphatase alcaline³ Les auteurs proposent que dans ces mutants, le potentiel redox intracellulaire atteint une valeur supérieure à celle du potentiel du couple OxyR_{red}/ OxyR_{ox}, entraînant ainsi l'oxydation d'OxyR. Ils proposent également que le diamide, un agent oxydant des thiols, pourrait de même activer indirectement OxyR, en

³ L'activité de cette enzyme, normalement périplasmique, dépend de la formation de deux ponts disulfures. Dans le cytoplasme, ces ponts sont réduits et l'activité de l'enzyme est négligeable.

oxydant le glutathion en GSSG. Nos données n'ont pas permis de mettre en évidence une telle réponse pour Yap1, bien qu'il soit activé par le diamide. En effet, l'élévation du rapport GSSG/GSH, dans un mutant de la glutathion réductase (*gsh1*) où 60% du glutathion est sous forme oxydée, n'entraîne pas l'activation de Yap1. Bien que le mécanisme moléculaire d'activation de Yap1 par le diamide ne soit pas encore clairement établi, la modification impliquée est clairement différente de l'oxydation du facteur observée en réponse aux peroxydes.

3) La nature de la modification des cystéines module-t-elle la réponse cellulaire ?

L'équipe de Stamler a proposé qu'il existe différentes formes actives d'OxyR et que la nature de la modification activant OxyR entraîne des transitions allostériques différentes permettant de moduler la réponse physiologique [154]. Cette hypothèse est séduisante car elle permettrait, à partir de la réactivité d'une seule protéine, d'obtenir une réponse cellulaire complexe et adaptée à l'inducteur. Ce modèle s'oppose au mécanisme d'activation « tout ou rien » associé par l'équipe de Storz à la formation du pont disulfure intramoléculaire [150]. Ainsi, l'équipe de Stamler a montré que la cystéine 199 d'OxyR peut être modifiée par formation d'un acide sulfénique (Cys199-SOH), par formation d'un pont disulfure avec le glutathion (Cys199-SSG) ou par nitrosylation (Cys199-SNO). Ces trois formes sont transcriptionnellement actives *in vitro* mais leur conformation et leur mode de recrutement aux promoteurs sont différents [154]. Chez *S. cerevisiae*, il existe également différentes formes du régulateur, associées aux deux modes d'activation de Yap1. Cependant, la nature de l'étape contrôlée par ces modifications (l'accumulation nucléaire) semble plutôt s'apparenter à un mécanisme d'activation de type « tout ou rien », rendant peu probable une modulation de la réponse, similaire à celle décrite par Stamler.

C. Il existe d'autres niveaux de contrôle de l'activité de Yap1

Nos données et les données de la littérature [187] ont montré que des mutants constitutivement nucléaires ne sont pas hyper-résistants au H₂O₂ comme on aurait pu l'attendre, mais au contraire, hyper-sensibles. Ainsi, le mutant Yap1^{L619SL623S}, dont le NES est

muté, est hypersensible au H₂O₂ et son activité transcriptionnelle n'est pas inductible (données non montrées). L'accumulation nucléaire de Yap1 est donc une étape nécessaire mais pas suffisante à son activation par le H₂O₂. En revanche, le mutant Yap1^{L619SL623S} est hyper-résistant et reste transcriptionnellement actif en réponse au diamide ou au cadmium. L'activation de Yap1 par le H₂O₂ semble donc impliquer un niveau supplémentaire de régulation, absent dans le mutant *yap1*^{L619SL623S}. Or, l'H₂O₂ induit spécifiquement l'oxydation de Yap1 et nous avons observé que le mutant Yap1^{L619SL623S} n'est plus oxydable par le H₂O₂. (données non montrées). Ce défaut d'oxydation apparaît comme un défaut intrinsèque de ce mutant et n'est pas lié à sa localisation constitutivement nucléaire (données non montrées). Ces données suggèrent donc que le rôle du pont disulfure Cys303-Cys598 en réponse aux peroxydes pourrait aller au-delà de la seule régulation de l'interaction Yap1-Crm1. La phosphorylation de Yap1 pourrait également constituer un autre niveau du contrôle de l'activité de ce facteur. En effet, Yap1 est phosphorylé en réponse au H₂O₂ et cette phosphorylation dépend de la capacité de Yap1 à s'accumuler dans le noyau (voir annexe Delaunay et col., 2000). Il est intéressant de noter que les mutants constitutivement nucléaires, inactif en réponse au H₂O₂, sont incomplètement phosphorylés (voir annexe, Delaunay et col., 2000).

II. Un système de détection conservé chez les eucaryotes ?

A. Chez les autres levures

Des homologues structuraux de Yap1 ont été identifiés chez *Schizosaccharomyces pombe* (Pap1), chez *Candida albicans* (Cap1) et chez *Kluyveromyces lactis* (Klyap1). La comparaison des séquences de ces protéines avec celle de Yap1 indique la conservation, dans Pap1, Cap1 et Klyap1, du domaine de liaison à l'ADN de type b-ZIP, mais aussi des deux domaines c-CRD et n-CRD. Pap1, Cap1 et Klyap1 sont essentiels à la tolérance aux peroxydes chez ces trois levures [213-215]. A l'instar de Yap1, Pap1 [213] et Cap1 [216] s'accumulent dans le noyau en réponse au H₂O₂ et l'accumulation nucléaire de Pap1 est dépendante de son interaction avec l'exportine Crm1 [213, 217]. Il a été récemment montré que les résidus cystéine de Pap1, homologues aux résidus 303 et 598 de Yap1 sont également essentiels à l'activation de Pap1 par le H₂O₂ [210]. Le mécanisme de détection des peroxydes

que nous avons décrit chez *S. cerevisiae* est donc vraisemblablement conservé chez ces levures. En particulier, *S. pombe* possède un homologue structural de Gpx3/Orp1 [218], dont le rôle dans la réponse peroxyde chez cet organisme devra être testé.

B. Chez les eucaryotes supérieurs

1) Bach1 et Bach2

Il est intéressant de noter que chez l'homme, deux régulateurs, Bach1 et Bach2 appartiennent à la famille des facteurs de transcription de type b-ZIP et que leur régulation en réponse au H₂O₂ est similaire à celle décrite pour Yap1. En effet, Bach1 et Bach2 s'accumulent tous deux dans le noyau en réponse au H₂O₂, par un mécanisme dépendant de Crm1 [219]. Le rôle de Bach1 et de Bach2 en réponse au H₂O₂ n'est pas connu. Une étude récente suggère qu'en réponse à un stress oxydant, Bach2 et non Bach1 aurait un rôle pro-apoptotique dans les lignées lymphoïdes [220]. Ces deux régulateurs sont actuellement étudiés au laboratoire.

La description d'une régulation homéostatique de la concentration en peroxydes est encore prématurée chez les mammifères. En particulier, si l'activité de nombreux facteurs de transcription semble pouvoir être modulée par le H₂O₂, il n'a pas été montré que ces régulateurs contrôlent une réponse anti-oxydante comparable à celle décrite chez la bactérie ou la levure.

2) Nrf2 et la réponse aux électrophiles

Une réponse au stress chimique, lié à l'exposition des cellules à des composés électrophiles, a été mise en évidence grâce à des études *in vivo* et *in vitro*, effectuées sur un modèle murin [221, 222]. Le facteur de transcription Nrf2 contrôle, en réponse aux électrophiles, l'expression des gènes de phase II, permettant entre autres la détoxification de ces molécules. L'activité de Nrf2 est modulée par sa localisation subcellulaire. En absence d'inducteur, Nrf2 est maintenu dans le cytosol grâce à son interaction avec Keap1, une protéine riche en cystéine [223]. La modification de certaines cystéines de Keap1 par les électrophiles entraîne une inhibition de l'interaction entre Keap1 et Nrf2 et permet l'accumulation de Nrf2 dans le noyau [224]. A l'instar de Yap1, la modification des résidus cystéine par les électrophiles apparaît responsable de l'activation du régulateur.

III. L'activité d'une protéine peut être régulée par son oxydation

De nombreuses études montrent que l'état redox d'une protéine peut réguler son activité. Ce mode de contrôle nécessite la présence au sein de la protéine d'un centre redox, capable d'être oxydé puis réduit. Il existe différents types de centres redox, dont les mieux documentés sont les protéines à thiols réactifs (cystéine) et les protéines à centre Fer-Soufre.

A. Les différents types de modifications redox

Comme nous l'avons vu, les résidus cystéine d'une protéine peuvent être la cible d'une oxydation et ainsi contrôler son activité. Il existe différents types d'oxydation d'un résidu cystéine dont le mieux décrit est le pont disulfure. Il peut être intramoléculaire, impliquant deux cystéines de la même protéine, comme dans le cas d'OxyR ou de Yap1, ou intermoléculaire ; dans ce cas, le pont est formé entre deux cystéines n'appartenant pas à la même chaîne polypeptidique. La glutathionylation d'une protéine, impliquant la liaison d'une cystéine avec le glutathion (Cys-S-SG) est un cas particulier de pont disulfure intermoléculaire (revue en [225]). Dans certains cas, l'oxydation d'une cystéine peut conduire à la formation d'un acide sulfénique stable (Cys-SOH) [191]. L'ensemble de ces modifications est réversible, par le jeu de réductases spécifiques (thiorédoxines, glutarédoxines). L'oxydation des résidus cystéines est donc propice à la mise en place d'un contrôle redox. Bien qu'aucun exemple bien documenté ne soit décrit, les résidus méthionine représentent également une cible potentielle de régulation redox. La méthionine peut être oxydée en méthionine sulfoxyde, dont la réduction est catalysée par une enzyme spécifique, la méthionine sulfoxyde réductase.

Les centres Fer-Soufre peuvent en théorie présenter différents états d'oxydo-réduction, dépendant de l'état redox du Fer. Ainsi, l'oxydation d'un centre Fer-Soufre peut comme dans le cas de SoxR conduire à l'activation de la protéine [226]. L'oxydation du Fer peut également conduire à la déstabilisation et à la perte du centre métallique. Ainsi, l'oxydation puis la perte de son centre Fer-Soufre, conduit à l'inactivation de FNR, un régulateur de la réponse à l'anaérobiose chez *E. coli*, [227]. Il est donc difficile dans ce cas de distinguer régulation redox et assemblage/désassemblage du centre métallique.

B. Régulation redox et contrôle de l'homéostasie

Comment la cellule peut-elle concilier homéostasie redox et régulation redox ? Le milieu intracellulaire étant un milieu globalement réducteur, une régulation redox implique généralement, en premier lieu, une oxydation. Or, cette oxydation devrait être prévenue par les systèmes responsables du maintien de l'homéostasie redox. Cette observation pose deux questions essentielles : comment l'oxydation transitoire de certaines protéines est-elle possible ? et comment une telle oxydation peut-elle engendrer une régulation spécifique ? L'étude des protéines régulées par formation d'un pont disulfure a permis de montrer que l'oxydation des cystéines est un processus sélectif catalytique. Ainsi, l'oxydation d'OxyR par de très faibles doses de H₂O₂ intervient en présence de concentrations millimolaires de GSH [150]. De même, l'étude des mécanismes de formation des ponts disulfures structuraux dans les voies de sécrétions a montré que ce processus était catalysé, chez *E. coli*, comme chez *S. cerevisiae*, par des thiol-oxydases spécifiques [228]. Ainsi, notre étude et la découverte du système Yap1/Orp1 conforte l'idée que le peroxyde d'hydrogène et des enzymes à activité thiol-oxydase peuvent catalyser la formation spécifique de ponts disulfures indépendamment de l'état redox intracellulaire et ainsi permettre la mise en place d'une régulation redox. L'efficacité et la spécificité de la régulation dépend également du temps pendant laquelle l'oxydation est maintenue. Selon les principes de l'homéostasie redox, la demi-vie d'une protéine oxydée dans un environnement globalement réducteur devrait être très courte. Or, la réduction des ponts disulfures apparaît également comme un processus sélectif, catalysé par des réductases spécifiques [229] dont l'activité peut être contrôlée. Ainsi, l'intervention de mécanismes catalytiques d'oxydation et de réduction rend possible l'existence d'une régulation redox, indépendante du maintien de l'homéostasie redox. Comment cette régulation peut-elle être spécifique ? Le mécanisme le plus simple permettant une spécificité d'oxydation est la compartimentalisation des réactions. Or, l'implication d'une catalyse dans les processus d'oxydo-réduction permet d'aborder la question de la spécificité de la régulation redox sous un angle différent. Dans ce cas, les réactions d'oxydo-réduction sont des réactions contrôlées de façon cinétique. Les vitesses relatives d'oxydation et de réduction de protéines réactives détermine donc la stabilité de la modification redox et peuvent ainsi jouer sur la

nature de la réponse induite. Comment les paramètres cinétiques peuvent-ils être modulés, afin d'autoriser des régulations redox spécifiques différentes ? Les cinétiques de réactions peuvent tout d'abord être modulées par la concentration des oxydases et des réductases. D'autre part, l'oxydation et la réduction d'un substrat dépendent de sa capacité à interagir avec ces enzymes. Ainsi, la spécificité des mécanismes de régulation redox reposerait sur l'existence d'oxydases et de réductases spécifiques permettant l'oxydation et la réduction de protéines cibles via des interactions régulées.

C. Conclusion

Gpx3/Orp1 est le deuxième exemple, après OxyR, d'un mécanisme de détection des peroxydes, reposant sur l'activité peroxydatique d'un thiol réactif. La spécificité de la détection est associée à la très haute réactivité de ce thiol vis-à-vis des peroxydes. Cette réactivité pourrait être partagée par une famille de peroxydases (peut-être les PH-GPX), dont la fonction serait de canaliser le signal redox et de le transférer par oxydation sur des protéines spécifiques. En particulier, la très haute réactivité des sélénothiols, présents chez les PH-GPx des eucaryotes supérieurs, suggère que toute oxydation d'un thiol en réponse aux peroxydes pourrait être relayée par ces enzymes, qui joueraient alors le rôle de récepteurs des peroxydes.

Ces données mettent également en avant le rôle majeur joué par le H_2O_2 dans l'oxydation sélective des thiols. L'existence de thiol-oxydases capables de transduire un signal grâce au pouvoir oxydant du H_2O_2 suggère que cette molécule pourrait être plus généralement responsable de la formation de ponts disulfures régulateurs. Cependant, l'étude récente du détecteur de l'aérobiose, CrtJ, chez la bactérie photosynthétique *Rhodobacter capsulatus*, montre que la formation d'un pont disulfure dans ce régulateur est spécifiquement induite par l'oxygène moléculaire (et non par le H_2O_2) [230]. Cette étude suggère donc que l'oxydation d'une protéine peut non seulement être sélective, mais aussi dépendre de la nature du signal redox, dévoilant encore un autre niveau de complexité.

MATERIELS ET METHODES

• Matériels et méthodes

I. Milieux et conditions de cultures

Les cellules de levure sont cultivées à 30°C en YPD (1% d'extrait de levure, 2% de Peptone, et 2% de glucose) ou en milieu minimum (SD) (0.67 % de « yeast nitrogen base », 2% de glucose). Le glucose peut être remplacé par 2% de raffinose (S raffinose) ou 2% de galactose (S galactose). Les acides aminés sont ajoutés en fonction des besoins. L'ajout de casamino acides (0,1%) conduit à l'obtention d'un milieu sans tryptophane, sans uracile, sans adénine et sans tyrosine. Les autres acides aminés sont ajoutés séparément selon les conditions décrites par Sherman [231]. Les cultures anaérobiques sont réalisées dans les mêmes milieux supplémentés en ergosterol (30 mg/L) et en Tween 80 (0.2%), et dégazés à l'argon. Les cellules sont ensuite cultivées dans une boîte à gants sous flux d'argon (Jacomex, France). Les conditions d'anaérobioses sont contrôlées par le changement de couleur d'un indicateur coloré (Anaerocult, Merck). Les cultures d'*E. Coli* sont réalisées à 37°C dans un milieu LB (1% tryptone, 0.5% d'extrait de levure, 1% NaCl) supplémenté en ampicilline (100 ug/mL) ou en milieu TB (bacto-tryptone (12 g/L), extraits de levure (24 g/L), glycerol (0.4%), KH₂PO₄ (1.15 g/L), K₂HPO₄ (6.25 g/L)), supplémenté en kanamycine (40 mg/L) pour les plasmides d'expression de protéines recombinantes.

II. Souches

Toutes les souches ont été construites à partir de la souche YPH98 [232] (MATa, *ura3-52*, *lys2-801amber*, *ade2-101ochre*, *trp1- 1*, , *leu2- 1*). L'ensemble des invalidations de gène a été réalisé par intégration en une étape de la cassette d'invalidation par recombinaison homologue au locus [233]. Différents marqueurs ont été utilisés pour invalider les gènes: les gènes *TRP1* et *LEU2* de *S. cerevisiae*, le gène *URA3* de *K. lactis*, et la cassette d'invalidation *KAN*, portée par le plasmide pKan-Mx4 (Eurofan, [234]), permettant la résistance au G418 (Sigma).

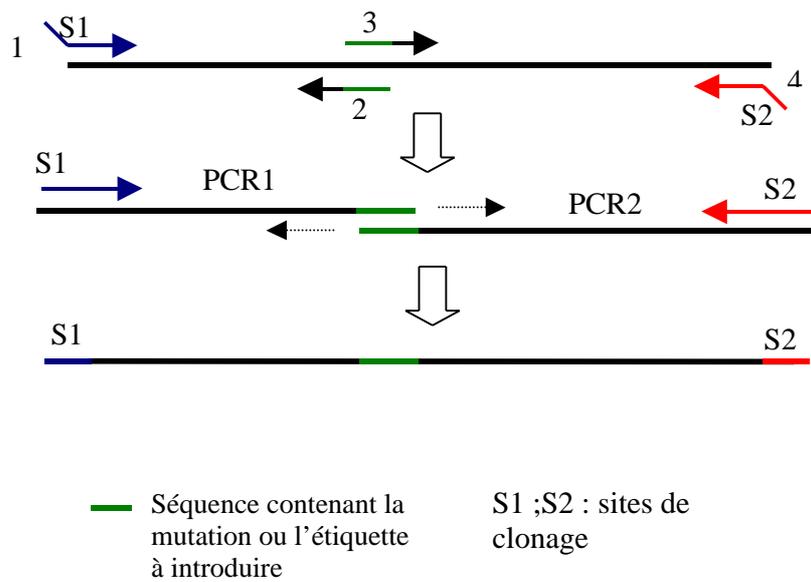


Figure 43. Introduction d'une mutation ou d'une étiquette par PCR en deux étapes. Deux fragments de PCR (PCR1 et PCR2) sont produits par une première amplification (1+2 ; 3+4). Les PCR1 et PCR2 s'hybrident par l'intermédiaire de la partie complémentaire (en vert). Puis le fragment est allongé et amplifié grâce aux oligonucéotides 1 et 4, contenant les sites de clonage..

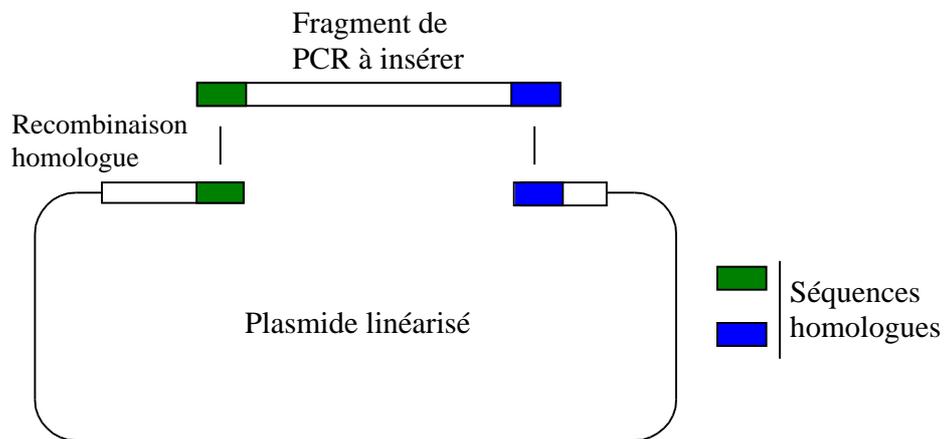


Figure 44. Introduction du fragment de PCR mutagénisé par recombinaison homologue. Le fragment de PCR est co-transformé dans la levure avec le plasmide linéarisé. Il recombine ensuite avec le plasmide linéarisé grâce aux homologies de séquences, permettant la recircularisation du plasmide et sa réplication dans la levure.

III. Plasmides

Construction de myc-Yap1 et des mutants cystéines de *YAP1*

La construction myc-Yap1 contient 9 épitopes Myc insérés en N-terminal de Yap1, clonés au site AccI, un site naturel de *YAP1*, situé trois codons après l'ATG. Elle est clonée au site EcoRI du plasmide centromérique pRS316 [123]. Myc-Yap1 a ensuite été sous-cloné entre les sites SacI et HindIII de pRS315. La protéine de fusion complémente l'hypersensibilité aux oxydants d'une souche *yap1*. Un fragment de 1.17 kb codant les substitutions C303A, C310A et C315A a été amplifié à partir de pLDB538 (un don de L. Davis, université de Brandeis) [185]. Ce fragment a ensuite été inséré par recombinaison homologue chez la levure dans pRS316 myc-Yap1 ; la construction est extraite puis amplifiée chez *E. coli*, conduisant à l'obtention du mutant Yap1^{C303A,C310A,C315A}. Yap1^{L619S,L623S}, Yap1^{C303A}, Yap1^{C310A}, Yap1^{C315A}, Yap1^{C598A}, Yap1^{C620A} et Yap1^{C629A} ont été préparés par une méthode de PCR en deux étapes (Fig. 43), et les fragments mutés ont également été introduits dans myc-Yap1 par recombinaison homologue dans la levure (Fig. 44). Pour cela, le plasmide pRS316 myc-Yap1 a été digéré par BseRI et PacI pour l'introduction des mutants N-terminaux et par PacI et BstEII pour l'introduction des mutants C-terminaux. 2 µg de plasmide linéarisé et 500 ng de produit de PCR ont été co-transformés dans une souche *yap1*, et les transformants ont été sélectionnés sur milieu -URA. Les plasmides sont ensuite été extraits et amplifiés dans *E. coli*, pour être séquencés. Un fragment de 327 pb codant les substitutions C598T, C620A et C629T a été extrait de Pldb518 [185] par digestion NdeI-PacI et sous-cloné dans pRS315 myc-Yap1 conduisant à l'obtention du mutant Yap1^{C598T,C620A,C629T}. GFP-Yap1 est une fusion N-terminale de Yap1 avec la GFP exprimée à partir du vecteur pRScp-GFP HA-YAP1 (TRP1, CEN6-ARSH4) (un don de S. Kuge, Université de Tokyo) [183]. Les fusions GFP-Yap1 contenant les mutations individuelles Cys-Ala ont été réalisées par sous-clonage des fragments correspondants entre les sites BamHI et BstEII de pRScp-GFP HA-YAP1.

Construction de HA-Gpx3, His-Gpx3 et des mutants cystéines de *GPX3*

Un fragment d'ADN contenant la phase codante de *GPX3* flanquée de 400 pb en amont et de 210 pb en aval a été amplifié par PCR et cloné au site BamHI de pRS316. Les mutants de *GPX3* contenant les substitutions des cystéines en sérines ont été préparés par une méthode d'amplification par PCR en deux étapes et clonés de même dans pRS316, conduisant à l'obtention de Gpx3^{C36S}, Gpx3^{C64S}, Gpx3^{C82S}, et Gpx3^{C64S,C82S}. La fusion N-terminale entre l'étiquette 3HA et Gpx3 (HA-Gpx3) a également été réalisée grâce à deux étapes de PCR au moyen d'oligonucléotides contenant la séquence de l'épitope HA.

Oligonucléotide (brin supérieur)

TGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGC.TCAGA
ATTCTATAAGCTAGC

Oligonucléotide (brin inférieur)

CTGCATAGTCCGGGACGTCATACGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAAAAGAT.C
ATGATAAACTTGAATACTTTAC)

La fonctionnalité de la protéine de fusion a été testée en mesurant la tolérance au H₂O₂ d'une souche *gpx3*, transformée avec HA-Gpx3.

Les mutants de substitution des cystéines en sérines ont été transférés dans HA-Gpx3 en remplaçant le fragment EcoRI-EcoRI de pRS316-HA-Gpx3 par la séquence mutante correspondante, présente dans les mutants dérivés de pRS316-Gpx3. Pet28a-His-Gpx3 a été construit par sous-clonage de la phase codante de *GPX3* entre les sites BamHI et XhoI du plasmide d'expression Pet28a (Novagen), plaçant l'étiquette 6His à l'extrémité N-terminale de Gpx3.

Construction des plasmides GFP-CRDYap1 et Gal4-cCRD-Yap1-TAPTag

La GFP a été introduite en N-terminal du c-CRD de Yap1 par PCR en deux étapes. La séquence codant la GFP entière a été amplifiée à partir de pYGFP3 [235]. Le c-CRD (acides aminés 570 à 650) a été amplifié, à partir de la séquence *YAP1* sauvage. Les séquences GFP et c-CRD ont ensuite été couplées par une troisième PCR. Le produit de cette PCR est purifié, digéré par *EcoRI* et *BamHI* et cloné dans le plasmide pGBT9, en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4, contenant le signal d'export nucléaire.

La fusion c-CRDYap1-TAPtag est construite de manière analogue à celle décrite ci-dessus. Le TAPtag est amplifié à partir du plasmide pBS1479 [236]. Le produit final de PCR est purifié, puis digéré avec *PstI* et cloné dans pGBT9, en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4.

IV. Tests de sensibilité en milieu solide

Le milieu utilisé est un milieu solide, réalisé à partir de milieu minimum (SD) dans lequel 5g/L d'agar ont été rajoutés avant l'autoclavage. Ce milieu est ensuite refondu et supplémenté en acides aminés selon les besoins. Lorsque le milieu est à une température d'environ 60°C, les boîtes sont préparées selon le protocole suivant : une quantité appropriée d'oxydant est ajoutée à une petite quantité de milieu liquéfié (cela afin de faciliter le mélange et l'homogénéité du milieu) puis une quantité plus importante est rajoutée (qsp 20 mL). Après une nouvelle phase de mélange, le milieu contenant l'oxydant est versé dans une boîte de Petri. L'oxydant est ajouté dans un volume compris entre 10 µL et 250 µL de solvant. Les cellules en phase stationnaire sont diluées à une concentration d'environ 100 cellules par µL. Pour ce faire, nous avons considéré qu'une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,1 représente approximativement $3,5 \cdot 10^6$ cellules/mL. Les cellules (20 µL) sont ensuite déposées sur les boîtes contenant des concentrations croissantes d'oxydant. La tolérance des différentes souches à un oxydant donné est déterminée après 2 jours d'incubation à 30 °C.

V. Transformations

Electroporation des levures [237]

Les cellules sont cultivées sur la nuit en milieu YPD ou milieu sélectif. Environ 25 mL d'une culture à saturation ou 50 mL d'une culture de $DO_{600\text{ nm}}$ de 1.3-1.5 sont centrifugés et le culot de cellules est resuspendu dans 10 mL de milieu neuf auquel sont ajoutés 250 µL d'une solution de DTT à 1M et 200 µL d'une solution tampon HEPES 1M. Les cellules sont ensuite incubées pendant 15 min à 30°C, puis lavées et centrifugées à froid, trois fois, avec 30 mL d'eau à 4°C. Entre les lavages, les cellules sont maintenues dans la glace. Les cellules sont ensuite lavées avec une solution 1 M de sorbitol, et resuspendues dans 70 µL d'une solution

de sorbitol 1 M et conservées dans la glace. 40 µL de cellules compétentes et environ 100 ng de plasmide sont utilisés pour une transformation. Pour l'intégration de cassettes d'inactivation par recombinaison homologue, 500 ng à 2 µg d'ADN linéaire sont nécessaires. L'électroporation est effectuée dans une cuvette Biorad Gene Pulser de 0.2 cm (ref 165-2089) sous une tension de 1500 Volts à l'aide d'un Electroporateur Eppendorf 2510. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 600 µL d'une solution de sorbitol 1 M dont 100 à 200 µL sont étalés sur milieu sélectif. L'efficacité de l'électroporation peut être améliorée par l'utilisation de boîtes contenant du sorbitol 1 M. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 2 à 4 jours.

Transformation par choc thermique

Les cellules, en phase exponentielle de croissance ($D.O._{600nm}=0,4-0,8$), sont centrifugées et lavées une fois dans l'eau et une fois dans un tampon TELiAc (Acétate de Lithium 100mM ; TrisEDTA 1x). Les cellules sont ensuite reprises dans le tampon TeLiAc (100 µl de tampon pour 10 ml de culture initiale) et incubées pendant 30 minutes à 30°C. L'ADN plasmidique (300ng) ou la cassette d'inactivation (1 à 2 µg) sont ensuite mélangés à 100 µl de cellules puis 400 µl de PEGTeLiAc (TELiAc 100 mM et PEG 40 %) est ajouté et le mélange est incubé pendant 30 minutes à 30°C. Les cellules subissent ensuite un choc thermique de 20 minutes à 42°C, puis le PEG et l'acétate de lithium sont éliminés par centrifugation. Les cellules sont reprises dans de l'eau et étalées sur milieu sélectif. Dans le cas d'une inactivation par la cassette kan-Mx4, une fois centrifugées, les cellules sont reprises dans 500 µl de YPD liquide et incubées à 30°C pendant 2 heures avant d'être étalées sur des boîtes YPD solide supplémenté avec 200 µg/ml de Généticine (G418, Sigma). Les transformants sont visibles après 2 à 5 jours d'incubation à 30 °C selon les souches.

Electroporation d' *E. coli* [238]

Une préculture de 50 ml d'*E.coli* (DH10 ou XL1Blue) est réalisée en LB sur la nuit . Les cellules sont ensuite diluées à une $D.O._{600}$ de 0.1 dans 1 litre de milieu et incubées à 37°C pendant environ 2 heures jusqu'à ce que la $D.O._{600nm}$ atteigne 0.5-0.6. La croissance des cellules est arrêtée dans la glace pendant 30 à 60 min puis les cellules sont centrifugées à froid, et lavées 2 fois avec de l'eau stérile, et 1 fois avec du glycérol 10%, les deux solutions

ayant été préalablement refroidies. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 2 mL de glycérol 10%, échantillonnées par 90 μ l et conservées à -80°C . La transformation par électroporation nécessite 40 μ L de cellules compétentes, mélangées à 5 μ L d'une solution contenant l'ADN à transformer. Les cellules sont ensuite électroporées à 1500 Volts dans une cuvette Biorad Gene Pulser de 0.1 cm. Puis, les cellules sont resuspendues dans 200 μ L de LB et incubées pendant 30 min à 37°C . Les cellules sont ensuite étalées sur boîtes LB supplémentée en ampicilline (ou TB supplémenté en kanamycine pour les plasmides de la famille Pet28) et incubées une nuit à 37°C .

VI. Séquençage

Le séquençage automatique a été réalisé à l'aide d'un kit de réaction de séquençage « Big dye terminator cycle » et d'un séquenceur d'ADN Perkin Elmer ABI Prism 377 selon le protocole indiqué par le constructeur. Les séquences sont ensuite analysées à l'aide du logiciel « Sequencher 3.1 ».

VII. Extraction de plasmides à partir de la levure

1 à 2 mL d'une culture saturée sont centrifugés et resuspendus dans 200 μ L de tampon de lyse (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8), 1 mM Na_2EDTA), puis 0,3 g de bille de verre (« acid washed glass beads » Sigma), et 200 μ L de phénol-chloroforme sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite vortexés 2 à 3 minutes à température ambiante, centrifugés pendant 10 minutes et la phase aqueuse est récupérée. 1 μ L de cet échantillon est dilué dans 5 μ L d'eau et électroporé dans *E.coli* pour amplification.

VIII. Analyse de cellules exprimant les fusions Yap1-GFP par microscopie à fluorescence

Des cellules exprimant la fusion Yap1-GFP et ses dérivés sont cultivées en phase exponentielle de croissance. Lorsque leur $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atteint 0,3-0,4, les cellules sont induites avec les doses et pendant le temps indiqués. Cinq minutes avant la fin de l'induction, 5 $\mu\text{g/ml}$

de DAPI (un colorant de l'ADN) sont ajoutés, les cellules sont centrifugées, lavées dans de l'eau et resuspendues dans 100 µl d'une solution de DABCO (75% glycerol, 0.25x de tampon phosphate salin, 200 mM de diazabicyclooctane). Les marquages GFP et DAPI sont ensuite analysés à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DMRXA équipé d'une caméra CCD refroidie Roper Scientific Micro-Max et du logiciel MetaMorph (Universal Imaging, Inc.).

IX. Expériences de double hybride

La souche EGY48 portant le plasmide psH18-34 (un plasmide de 2µ comportant un gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle de huit opérateurs *lexA*) [239] a été transformée avec les plasmides PKW442 [CRM1-LexA^{BD} [240] ou pEG202 (lexA₍₁₋₂₀₂₎^{BD}) et soit le plasmide pJG4-5 vide soit le plasmide pLDB439 contenant Yap1 [YAP1-B42^{AD} [185]], ou les plasmides contenant les mutants de Yap1, pYAP1^{C303A}-B42^{AD} ou pYAP1^{C598A}-B42^{AD}. Les mutations C303 et C598 ont été introduites par clonage d'un fragment muté issu d'une PCR en deux étapes dans pLDB439, entre les sites *Bam*HI et *Pac*I (C303A) ou entre les sites *Pac*I et *Xho*I (C598A). L'interaction Yap1/Crm1 a été mesurée en phase liquide : les cellules ont été cultivées dans un milieu sélectif contenant 2% de raffinose jusqu'à ce que la DO_{600 nm} atteigne 0.3-0.5. Elles ont ensuite été transférées dans un volume équivalent d'un milieu contenant 2% de galactose pendant 30 min afin de permettre l'expression des protéines de fusion. Les cellules sont alors exposées ou non à 500 µM de H₂O₂ pendant 1 heure. L'activité -galactosidase a été mesurée selon le protocole décrit en [241]. L'interaction a également été mesurée en phase solide : une culture de cellules en phase exponentielle de croissance, réalisée en milieu 2% S raffinose, a été déposée en goutte à une densité de 4.5.10⁷ cellules sur un milieu solide contenant 1% S raffinose/2% galactose et incubée pendant 2 heures et demi à 30°C . L'activité -galactosidase est révélée grâce au dépôt sur les cellules d'un top agar contenant 0.04% de X-gal.

X. Expériences de RT-PCR quantitative

Les ARN totaux ont été isolés selon le protocole décrit par Lee et col [123]. Les expériences de RT-PCR quantitative radioactive ont été réalisées selon le protocole décrit par Godon et col [23]. Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1 µg d'ARN total et rétrotranscrits à partir de l'hybridation aléatoire d'hexanucléotides. Les PCR quantitatives ont été réalisées en utilisant des oligonucléotides spécifiques pour

TRX2 (GGTCACTCAATTA AAAATCCGCTTC / GGAAGCAATAGCTTGCTTGATAGC),

TRR1 (CCAGGGCAGAAATCAAGCCAATCC / ATAAACCGCTGACTGGCAAATCGG),

ACT1 (TTGGATTCCGGTGATGGTGTACT/ TGAAGAAGATTGAGCAGCGGTTTG)

et une solution de dNTP contenant du dCTP radiomarqué.

Les produits de la PCR marqués au ³²P sont séparés sur gel de polyacrylamide, séchés, et exposés sur un film d'autoradiographie. Les signaux sont quantifiés à l'aide d'un PhosphorImager.

Les RT-PCR quantitatives « on-line » ont été réalisées au moyen d'un appareil Bio-Rad iCycler. La PCR est réalisée grâce à des oligonucléotides spécifiques, en présence de SYBRGreen (Molecular Probe), permettant de suivre l'amplification par fluorescence.

5 pM de de chaque oligonucléotide sont utilisés amplifiant spécifiquement TRX2,TRR1, ou ACT1.

TRR1 : CACACACCGCCGCCATCT/ ACCTGGGAAGTTTTTCGATTTTC ;

TRX2 : GAACAATATTCTGACGCTGCT/ CCGACGACTCTGGTAACCT ;

ACT1 : CTATTGGTAACGAAAGATTCAG/ CCTTACGGACATCGACATCA

Les réactions sont réalisées en triplicats, dans les conditions recommandées par le fournisseur.

Les cycles-seuils ainsi que les rapports TRX2/ACT1 ou TRR1/ACT1 ont été calculés grâce au logiciel iCycler iQ RT (Bio-Rad).

XI. Extraits protéiques, analyses électrophorétiques et purification des protéines

Protocole d'extraction TCA permettant de visualiser l'état redox de myc-Yap1 et de Gal4-cCRDYap1-TAPtag

A partir d'une pré-culture en milieu sélectif, les cellules sont diluées à une DO_{600nm} de 0.1 et incubées à 30°C jusqu'à ce que la DO_{600nm} atteigne 0.3-0.4. Les cellules sont ensuite induites aux doses et aux temps indiqués. 10 ml de culture sont utilisés par point de cinétique ou de dose-réponse. L'induction est arrêtée par ajout dans le milieu d'acide trichloroacétique (TCA) (20% final) et les cellules sont centrifugées pendant 1 minute. Le culot est ensuite lavé dans 500 μ L de TCA 20% et les échantillons sont transférés dans un tube de microcentrifugation. Le culot est ensuite congelé dans un bain carboglace/éthanol (EtOH) puis éventuellement conservé à -80°C. La lyse est effectuée dans 100 μ L de TCA 20% en présence de 50 à 100 mg de bille de verre (taille 425-600 μ m). Les échantillons sont alternativement vortexés pendant une minute et refroidis sur de la glace. Cette étape est répétée 5 fois. Le lysat est ensuite récupéré et placé dans un nouveau tube. Les billes de verre sont lavées avec 100 μ L de TCA 5% et ce lavage est poolé avec le lysat récupéré à l'étape précédente. Les extraits sont ensuite centrifugés 3 minutes à 20000g, et le surnageant est soigneusement décanté. Le culot, contenant les protéines précipitées, est ensuite lavé 3 fois avec 200 μ L d'acétone froid (resuspension et centrifugation 3 minutes à 20000g), puis séché sous vide afin d'éliminer les restes d'acétone. Les culots sont alors resuspendus dans 100 μ L d'un tampon contenant 1.5% de SDS, 100 mM de Tris pH=8, 1 mM d'EDTA, un cocktail d'antiprotéases (PMSF 1 mM et Complete Protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim ref 1836145) (1 pastille pour 10 ml)), et 75 mM d'iodoacétamide. Les protéines sont ensuite resolubilisées et alkylées par incubation sous agitation (1000 rpm) à 25°C pendant 20 min. Les extraits sont ensuite centrifugés pendant 3 minutes à 20000g et le surnageant est récolté.

Les extraits sont ensuite dialysés en sacs collodions (Sartorius, 13202), contre une solution tampon contenant 50 mM de NaCl, 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de Tris pH=8, pendant la nuit.

La concentration des extraits protéiques est déterminée par Test de Bradford, et myc-Yap1 est déphosphorylé par ajout de 20 U de phosphatase alcaline bovine pendant une heure à 37°C.

Les échantillons sont ensuite préparés par ajout d'une solution tampon de Laemli (2% SDS, 62.5 mM Tris-Cl pH 8.7, 10% glycérol, 0.01% de bleu de bromophénol). Le β -mercaptoethanol (5%) est rajouté ou omis comme indiqué (conditions réductrices ou non réductrices). Les échantillons sont incubés 5 minutes à 95°C, puis déposés sur gel 8% (acrylamide/bisacrylamide 30:0,4). Après transfert des gels sur membrane de nitrocellulose, l'immunodétection est réalisée au moyen d'un anticorps anti-myc monoclonal (9^E10) et du kit de détection ECL-Plus (Amersham-Pharmacia).

Les cellules exprimant la construction Gal4-cCRP-TAPtag sont exposées à la ménadione ou au NEM aux concentrations et pendant les temps indiqués. Elles sont ensuite lysées en présence de TCA 20 % selon le protocole utilisé pour myc-Yap1, puis les culots protéiques sont resolubilisés en présence d'AMS (15 mM) (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, Molecular Probe) dans 50 μ L d'un tampon contenant 1.5% de SDS, 100 mM de Tris, 1 mM d'EDTA et un cocktail d'antiprotéases (PMSF 1 mM et Complete Protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim ref 1836145) (1 pastille pour 10 ml)) et incubés pendant 2 heures à 37°C. Ils sont ensuite séparés sur gel SDS-PAGE non réducteur 15% et révélés au moyen d'un anticorps peroxydase anti-peroxydase reconnaissant l'étiquette protéine A (SIGMA P2026).

Analyse de l'état redox de HA-Gpx3 par lyse TCA

Des cellules exprimant la fusion HA-Gpx3 sont induites au H₂O₂ pendant le temps et à la concentration indiqués. L'induction des cellules est stoppée par ajout de TCA 100% dans la culture et les cellules sont lysées selon un protocole identique à celui décrit pour myc-Yap1. Les protéines précipitées sont resolubilisées dans un tampon contenant 100 mM Tris pH8, 1% SDS, et soit 50 mM de NEM (N-ethylmaleimide) soit 15 mM d'AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, Molecular Probe), comme indiqué dans la légende des figures. Après dosage des protéines par test de Bradford et reprise des échantillons en tampon Laemli contenant ou non du β -mercaptoéthanol, les extraits sont incubés pendant 5 minutes à 95 °C et séparés sur gel 15% SDS-PAGE (acrylamide/bisacrylamide 30 ;0,4).

Purification de Yap1 pour analyse par spectrométrie de masse et tests fonctionnels.

Pour l'analyse de myc-Yap1 et myc-Yap1^{303A} par spectrométrie de masse, 10 litres d'une souche *yap1* exprimant pRS-316-myc-Yap1 ou myc-Yap1^{303A} ont été cultivés en milieu sélectif jusqu'à une DO_{600nm} d'environ 0,8 puis exposés à 0,4 mM d'H₂O₂ pendant 5 min. Les cellules induites ont ensuite été sédimentées, lavées avec une solution d'eau froide contenant du NEM (10 mM) et reprises dans un tampon L [Tris-Cl pH=8 (100 mM), NaCl (50 mM), 0.2% deoxycholate, 0.15% NP-40, NEM (50 mM), anti-protéases] pour être lysées dans une presse de French. Les extraits sont ensuite ultracentrifugés à 100000g pendant 30 minutes puis ce premier surnageant est centrifugé une nouvelle fois pendant une heure à 100000g. Le S100 ainsi obtenu est alors dialysé contre un tampon D [Tris-Cl pH=8 (100 mM), NaCl (50 mM), 0.15 NP-40] sur la nuit afin d'éliminer le NEM en excès. L'extrait dialysé est ensuite incubé pendant deux heures avec 500 µl de phase Sépharose 4B non couplée afin d'éliminer les protéines se fixant non spécifiquement sur la phase solide puis, myc-Yap1 ou myc-Yap1^{303A} est purifié par deux immunoprécipitations successives réalisées à 4°C au moyen l'anticorps monoclonal anti-Myc (9^E10) couplé covalamment à une résine de sépharose (protocole au bromure de cyanogène). Après lavages, Yap1 est élué dans un tampon E [Tris-Cl pH=8 (50 mM), NaCl (50 mM)] contenant 2 µg/µL d'un peptide Myc synthétique (AEEQKLISEEDLLRKR). Les éluations sont concentrées sur centricon YM100 (Millipore) et la concentration protéique de l'éluat est mesurée par test de Bradford. La protéine purifiée est ensuite déposée sur un gel 8% SDS-PAGE en conditions non réductrices. Le gel est ensuite précautionneusement coloré avec du bleu de Coomassie colloïdal (Bio-Rad), en évitant toute contamination de kératine.

Pour les essais de reconstitution *in vivo*, Yap1 est purifié à partir de cellules exprimant pRS426-myc-Yap1 (un plasmide de surexpression). Les cellules sont lysées à la presse de French dans un tampon D, contenant du DTT (1 mM). La purification est menée dans des conditions identiques à celles décrites ci-dessus, excepté que l'ensemble des tampons contient 1 mM de DTT.

Expression et Purification de Gpx3 dans *E. coli*

La protéine Gpx3 recombinante est exprimée dans une souche d'*E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen), exprimant le plasmide Pet28a-His-Gpx3. La culture est réalisée à 37°C dans un milieu Terrific Broth [bacto-tryptone (12 g/L), extraits de levure (24 g/L), glycerol (0.4%), KH₂PO₄ (1.15 g/L), K₂HPO₄ (6.25 g/L), kanamycine (40 mg/L)]. Une pré-culture saturée est ré-ensemencée dans 20 ml de milieu à une DO_{600 nm} de 0.1. Lorsque la DO_{600 nm} atteint 0.5, les cellules sont induites pendant 2 heures avec de l'isopropyl b-D-thiogalactopyranoside (IPTG, 1 mM), puis lavées et resuspendues dans 500 µl de tampon de lyse [Tris-Cl pH=8 (100 mM), NaCl (50 mM), DTT (20 mM), PMSF (1mM)]. Les cellules sont lysées par trois cycles successifs de congélation-décongelation dans de l'azote liquide, puis les extraits sont soniqués (20 secondes à puissance moyenne). Les extraits sont ensuite clarifiés par centrifugation (20000 g, 4°C pendant 20 minutes), puis le surnageant est incubé pendant une heure avec 100 µl de résine de Nickel (agarose Ni-NTA, Qiagen), en présence de 50 mM d'imidazole. La résine est ensuite lavée avec un tampon E contenant de l'imidazole (50 mM) et les protéines retenues sont éluées dans un tampon E contenant 500 mM d'imidazole.

Les extraits contenant His-Gpx3, utilisés pour les essais d'interaction non covalente entre Yap1 et Gpx3 (« pull-down »), ont été réalisés en anaérobiose, dans une boîte à gants sous flux d'argon (Jacomex, France). Les cellules exprimant le plasmide Pet28a-His-Gpx3 sont lysées en présence de billes de verre dans le tampon de lyse décrit ci-dessus, préalablement dégazé à l'argon. Les cellules sont alternativement vortexées et congelées dans de l'azote liquide. Puis 10 U d'ADNase1 et 10 mM de MgCl₂ sont ajoutés au lysat afin de diminuer la viscosité de l'extrait, liée à la présence d'ADN. Après incubation pendant 5 minutes à 37°C, les extraits sont centrifugés et le surnageant est utilisé pour l'essai d'interaction.

XII. Tests peroxydase

L'activité peroxydase de Gpx3 est suivie par la décroissance de la DO à 340 nm, mesurant la consommation de NADPH par le système. La réaction est réalisée dans un tampon contenant

du 100 mM de Tris-Cl pH=8, 0,3 mM de NADPH (Sigma), et 1,34 μ M de thioredoxine (*E. Coli*, Sigma) et 0.18 μ M de thioredoxine réductase (*E. coli*, Sigma) ou 0,3 à 3mM de GSH (Sigma) et 2 μ M de glutathion reductase (Sigma). La protéine Gpx3 purifié (2.5 μ g = 1.35 μ M) est ajoutée à 100 μ L de tampon, et la mesure de la densité optique est débutée 1 min après l'addition de H₂O₂ (100 μ M).

XIII. Analyses de spectrométrie de masse (CPL-MS/MS et analyses MS/MS)

Les protéines séparées sur gel SDS-PAGE ont été digérées par la trypsine, d'après le protocole de Shevchenko [242]. La moitié de chaque échantillon a été réduite et alkylée par le dithiothréitol (DTT) et l'iodoacétamide avant la digestion enzymatique.

Pour identifier Gpx3, le produit de digestion de la bande de gel correspondant à Yap1^{C303A} associé à son partenaire a été analysé par chromatographie capillaire en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), à l'aide d'un système chromatographique Famos-Switchos-UltiMate (LC Packings, Amsterdam, Pays-Bas) connecté à un spectromètre de masse hybride nanoESI-QqTOF (QTOF2, Micromass, Manchester, Royaume-Uni). Les séparations chromatographiques ont été menées sur une colonne capillaire à polarité de phase inversée (Pepmap C18, 75 μ m d.i., 15 cm de longueur, LC Packings), à un débit de 200 nL/min, avec un gradient de 100% de tampon A (H₂O/acétonitrile/AF, 96/4/0,1, v:v) à 50% de tampon B (H₂O/acétonitrile/AF, 10/90/0,085, v:v) en 50 min, suivi par 15 min à 100% B. Les données de LC-MS/MS ont été obtenues en mode automatique et converties en fichiers .PKL grâce au logiciel Masslynx (Micromass), puis soumises au programme de recherche Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). Les protéines ont été identifiées par confrontation des données expérimentales à la banque de données NCBIInr.

Pour identifier les ponts disulfures, les peptides tryptiques des protéines Yap1 et Gpx3 ont été analysés par fragmentation manuelle en spectrométrie de masse en tandem sur le QTOF2. Des ions de masses correspondant aux peptides liés par un pont disulfure ou à leurs constituants réduits et alkylés ont été détectés, sélectionnés et fragmentés, permettant la détermination de la séquence les composant.

Tableau 5. Liste des souches de levure

Nom de la souche	Génotype	Origine
Y252	a <i>ura3 lys2 ade2 trp1 leu2</i>	[232]
yap1 (LEU2)	Y252 <i>yap1::LEU2</i>	[123]
yap1 (TRP1)	Y252 <i>yap1::TRP1</i>	[123]
<i>tsa1</i>	Y252 <i>tsa1::TRP1</i>	[123]
<i>glr1</i>	Y252 <i>glr1::URA</i>	[123]
<i>gsh1pro2-1</i>	Y252 <i>gsh1::LEU PRO2-1</i>	[50]
<i>glr1 gsh1pro2-1</i>	Y252 <i>glr1::URA gsh1::LEU PRO2-1</i>	[50]
<i>trx1 trx2</i>	Y252 <i>trx1::URA3 trx2::KAN</i>	[188]
<i>trr1</i>	Y252 <i>trr1::KAN</i>	[123]
<i>gpx3 (TRP)</i>	Y252 <i>gpx3::TRP</i>	Delaunay et col., 2002
<i>gpx3 (KAN)</i>	Y252 <i>gpx3::KAN</i>	Delaunay et col., 2002
<i>yap1 gpx3 (TRP)</i>	Y252 <i>yap1::LEU2 gpx3::TRP</i>	Delaunay et col., 2002
<i>yap1 gpx3 (KAN)</i>	Y252 <i>yap1::TRP1 gpx3::KAN</i>	Delaunay et col., 2002
<i>trx1 trx2 gpx3</i>	Y252 <i>trx1::URA trx2::Kan gpx3::TRP</i>	Delaunay et col., 2002
<i>grx1 grx2</i>	CY4 <i>grx1::KEU2 grx2::HIS3</i>	[120]
EGY48	<i>ura3 trp1 his3 LEXA_{op(x8)}-LEU2</i>	[239]

Tableau 6. Liste des plasmides

Nom du plasmide	description	Origine
pRS316 Myc-Yap1	Plasmide URA3, AMP ^R portant Yap1 étiqueté avec 9 myc exprimé sous son propre promoteur	Cette étude [123]
pRS316 Myc-Yap1 ^{C303A}	pRS316 Myc-Yap1, mutant C303A	[188]
pRS316 Myc-Yap1 ^{C310A}	pRS316 Myc-Yap1, mutant C310A	[188]
pRS316 Myc-Yap1 ^{C315A}	pRS316 Myc-Yap1, mutant C315A	[188]
pRS316 Myc-Yap1 ^{C598A}	pRS316 Myc-Yap1, mutant C598A	[188]
pRS316 Myc-Yap1 ^{C620A}	pRS316 Myc-Yap1, mutant C620A	[188]
pRS316 Myc-Yap1 ^{C629A}	pRS316 Myc-Yap1, mutant C629A	[188]
pRS316 Myc-Yap1 ^{C303AC310AC315A}	pRS316 Myc-Yap1, mutant C303AC310AC315A	[188]
pRS315 Myc-Yap1	Plasmide LEU2, AMP ^R portant Yap1 étiqueté avec 9 myc exprimé sous son propre promoteur	Cette étude
pRS315 Myc-Yap1 ^{C598TC620AC629T}	pRS315 Myc-Yap1, mutant C598TC620AC629T	[188]
pRS315 Myc-Yap1 ^{C303A}	pRS315 Myc-Yap1, mutant C303A	Delaunay et col, 2002
pRScp-GFP-YAP1	Plasmide TRP1, AMP ^R portant Yap1 fusionné à la GFP (N-terminal), exprimé sous le promoteur Cup1	[183]
pRScp-GFP-YAP1 ^{C303A}	Plasmide dérivé de pRScp-GFP-YAP1 contenant la mutation C303A	[188]
pRScp-GFP-YAP1 ^{C310A}	Plasmide dérivé de pRScp-GFP-YAP1 contenant la mutation C310A	[188]
pRScp-GFP-YAP1 ^{C315A}	Plasmide dérivé de pRScp-GFP-YAP1 contenant la mutation C315A	[188]
pRScp-GFP-YAP1 ^{C598A}	Plasmide dérivé de pRScp-GFP-YAP1 contenant la mutation C598A	[188]
pRScp-GFP-YAP1 ^{C620A}	Plasmide dérivé de pRScp-GFP-YAP1 contenant la mutation C620A	[188]
pRScp-GFP-YAP1 ^{C629A}	Plasmide dérivé de pRScp-GFP-YAP1 contenant la mutation C629A	[188]
pRScp-GFP-YAP1 ^{C303AC310AC315A}	Plasmide dérivé de pRScp-GFP-YAP1 contenant la mutation C303AC310AC315A	[188]
pRScp-GFP-YAP1 ^{C598TC620AC629T}	Plasmide dérivé de pRScp-GFP-YAP1 contenant la mutation C598TC620AC629T	[188]
pRS316 Gpx3	Plasmide URA3, AMP ^R portant Gpx3, exprimé sous son propre promoteur	Cette étude (Delaunay et col., 2002)
pRS316 Gpx3 ^{C36S}	pRS316 Gpx3, mutant C36S	Cette étude (Delaunay et col., 2002)
pRS316 Gpx3 ^{C64S}	pRS316 Gpx3, mutant C64S	Cette étude (Delaunay et col., 2002)
pRS316 Gpx3 ^{C82S}	pRS316 Gpx3, mutant C82S	Cette étude (Delaunay et col.,

		2002)
pRS316 Gpx3 ^{C64SC82S}	pRS316 Gpx3, mutant C64SC82S	Cette étude (Delaunay et col., 2002)
pRS316 Gpx3-HA	Plasmide URA3, AMP ^R portant Gpx3 étiqueté 3HA exprimé sous son propre promoteur	Cette étude (Delaunay et col., 2002)
PRS314 Gpx4-HA	Plasmide TRP1, AMP ^R portant Gpx3 étiqueté 3HA exprimé sous son propre promoteur (clonage KpnI)	Cette étude (Delaunay et col., 2002)
pRS316 Gpx3 ^{C36S} -HA	pRS316 Gpx3-HA, mutant C36S	Cette étude (Delaunay et col., 2002)
pRS316 Gpx3 ^{C64S} -HA	pRS316 Gpx3-HA, mutant C64S	Cette étude (Delaunay et col., 2002)
pRS316 Gpx3 ^{C82S} -HA	pRS316 Gpx3-HA, mutant C82S	Cette étude (Delaunay et col., 2002)
pRS316 Gpx3 ^{C64SC82S} -HA	pRS316 Gpx3-HA, mutant C64SC82S	Cette étude (Delaunay et col., 2002)
GFP-CRDYap1	Plasmide exprimant la fusion du c-CRD de Yap1 en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 contenu dans PGBT9 et la GFP.	Azevedo et col (en préparation)
Gal4-cCRD-Yap1-TAPtag	Plasmide exprimant la fusion du c-CRD de Yap1 en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 contenu dans PGBT9 et l'étiquette TAPtag	Azevedo et col (en préparation)
PSH18-34	Plasmide URA3, AMP ^R portant un gène rapporteur <i>LacZ</i> exprimé sous le contrôle de 8 opérateurs LexA	[239]
PEG202	Plasmide HIS3, AMP ^R portant le domaine de liaison à l'ADN de LexA	[239]
PKW422	Plasmide PEG202 portant <i>CRMI</i> en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de LexA	[240]
PJG4-5	Plasmide TRP1, AMP ^R portant le domaine d'activation (B42 ^{AD} étiqueté HA) de LexA	[239]
pLDB439	Plasmide PJG4-5 portant <i>YAP1</i> en fusion avec le domaine d'activation (B42 ^{AD} étiqueté HA) de LexA	[185]
pLDB518	Plasmide LEU2, AMP ^R exprimant Yap1 ^{C598TC620AC629T} -GFP	[185]
pLDB538	Plasmide exprimant Yap1 ^{C303A310A315AC598TC629T} -GST	[185]

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*. Third edition ed. 1999: Oxford Science Publications.
2. Fridovich, I., *The biology of oxygen radicals*. Science, 1978. **201**(4359): p. 875-80.
3. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage*. Lancet, 1984. **2**(8411): p. 1095.
4. Lai, C.S. and L.H. Piette, *Spin-trapping studies of hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation*. Arch Biochem Biophys, 1978. **190**(1): p. 27-38.
5. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(1): p. 81-128.
6. Gilbert, H.F., *Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1990. **63**: p. 69-172.
7. Lim PK, G.D., Cha JA, *The aerobic and peroxyde-induced coupling of aqueous thiols- II Reaction mechanisms, model analysis, and comparison of the model and experimental results*. Chemical Engineering Science, 1986. **41**(12): p. 3141-3153.
8. Fridovich, I., *Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18515-7.
9. Gardner, P.R. and I. Fridovich, *Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase*. J Biol Chem, 1991. **266**(29): p. 19328-33.
10. Flint, D.H., et al., *The inactivation of dihydroxy-acid dehydratase in Escherichia coli treated with hyperbaric oxygen occurs because of the destruction of its Fe-S cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated*. J Biol Chem, 1993. **268**(34): p. 25547-52.
11. Derman, A.I., et al., *Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli*. Science, 1993. **262**(5140): p. 1744-7.
12. Debarbieux, L. and J. Beckwith, *The reductive enzyme thioredoxin I acts as an oxidant when it is exported to the Escherichia coli periplasm*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10751-6.
13. Imlay, J.A. and I. Fridovich, *Assay of metabolic superoxide production in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1991. **266**(11): p. 6957-65.
14. Gonzalez-Flecha, B. and B. Demple, *Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing Escherichia coli*. J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 13681-7.

15. Gonzalez-Flecha, B. and B. Demple, *Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing Escherichia coli*. J Bacteriol, 1997. **179**(2): p. 382-8.
16. Demple, B. and J. Halbrook, *Inducible repair of oxidative DNA damage in Escherichia coli*. Nature, 1983. **304**(5925): p. 466-8.
17. Christman, M.F., et al., *Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in Salmonella typhimurium*. Cell, 1985. **41**(3): p. 753-62.
18. Collinson, L.P. and I.W. Dawes, *Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress*. J Gen Microbiol, 1992. **138**(Pt 2): p. 329-335.
19. Jamieson, D.J., *Saccharomyces cerevisiae has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione*. J Bacteriol, 1992. **174**(20): p. 6678-81.
20. Flattery-O'Brien, J., L.P. Collinson, and I.W. Dawes, *Saccharomyces cerevisiae has an inducible response to menadione Which differs from that to hydrogen peroxide*. J Gen Microbiol, 1993. **139**: p. 501-507.
21. Greenberg, J.T. and B. Demple, *A global response induced in Escherichia coli by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress*. J Bacteriol, 1989. **171**(7): p. 3933-9.
22. Gasch, A.P., et al., *Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes [In Process Citation]*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(12): p. 4241-57.
23. Godon, C., et al., *The H2O2 stimulon in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22480-9.
24. Pomposiello, P.J., M.H. Bennik, and B. Demple, *Genome-wide transcriptional profiling of the Escherichia coli responses to superoxide stress and sodium salicylate*. J Bacteriol, 2001. **183**(13): p. 3890-902.
25. Zheng, M., et al., *DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the Escherichia coli response to hydrogen peroxide*. J Bacteriol, 2001. **183**(15): p. 4562-70.
26. Carlioz, A. and D. Touati, *Isolation of superoxide dismutase mutants in Escherichia coli: is superoxide dismutase necessary for aerobic life?* Embo J, 1986. **5**(3): p. 623-30.

27. Chang, E.C. and D.J. Kosman, *O₂-dependent methionine auxotrophy in Cu,Zn superoxide dismutase-deficient mutants of Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 1990. **172**(4): p. 1840-5.
28. Gralla, E.B. and J.S. Valentine, *Null mutants of Saccharomyces cerevisiae Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates*. J Bacteriol, 1991. **173**(18): p. 5918-20.
29. Bilinski, T., et al., *Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction in vivo?* Biochem Biophys Res Commun, 1985. **130**(2): p. 533-9.
30. Culotta, V.C., *Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism*. Curr Top Cell Regul, 2000. **36**: p. 117-32.
31. Srinivasan, C., et al., *Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29187-92.
32. Keyer, K. and J.A. Imlay, *Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13635-40.
33. Benov, L. and I. Fridovich, *Growth in iron-enriched medium partially compensates Escherichia coli for the lack of manganese and iron superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10313-6.
34. De Freitas, J.M., et al., *Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 11645-9.
35. Corson, L.B., et al., *Oxidative stress and iron are implicated in fragmenting vacuoles of Saccharomyces cerevisiae lacking Cu,Zn-superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27590-6.
36. Loewen, P.C., *Isolation of catalase-deficient Escherichia coli mutants and genetic mapping of katE, a locus that affects catalase activity*. J Bacteriol, 1984. **157**(2): p. 622-6.
37. Loewen, P.C., et al., *Genetic mapping of katG, a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1985. **162**(2): p. 661-7.
38. Hartig, A. and H. Ruis, *Nucleotide sequence of the Saccharomyces cerevisiae CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T*. Eur J Biochem, 1986. **160**(3): p. 487-90.

39. Cohen, G., W. Rapatz, and H. Ruis, *Sequence of the Saccharomyces cerevisiae CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it*. Eur J Biochem, 1988. **176**(1): p. 159-63.
40. Ellis, H.R. and L.B. Poole, *Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium*. Biochemistry, 1997. **36**(43): p. 13349-56.
41. Ursini, F., et al., *Diversity of glutathione peroxidases*. Methods Enzymol, 1995. **252**: p. 38-53.
42. Holmgren, A., *Thioredoxin*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 237-71.
43. Holmgren, A. and M. Bjornstedt, *Thioredoxin and thioredoxin reductase*. Methods Enzymol, 1995. **252**: p. 199-208.
44. Chae, H.Z., S.J. Chung, and S.G. Rhee, *Thioredoxin-dependent peroxyde reductase from yeast*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 27670-27678.
45. Grant, C.M., F.H. MacIver, and I.W. Dawes, *Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 1996. **29**(6): p. 511-5.
46. Penninckx, M., *A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses*. Enzyme Microb Technol, 2000. **26**(9-10): p. 737-742.
47. Holmgren, A. and F. Aslund, *Glutaredoxin*. Methods Enzymol, 1995. **252**: p. 283-92.
48. Collinson, E.J., et al., *The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases*. J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 16712-7.
49. Aslund, F., K.D. Berndt, and A. Holmgren, *Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30780-6.
50. Spector, D., J. Labarre, and M.B. Toledano, *A genetic investigation of the essential role of glutathione: Mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast*. J Biol Chem, 2000.
51. Chae, H.Z. and S.G. Rhee, *A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function*. Biofactors, 1994. **4**(3-4): p. 177-80.
52. Poole, L.B., *Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium. 2. Cystine disulfides involved in catalysis of peroxide reduction*. Biochemistry, 1996. **35**(1): p. 65-75.

53. Chae, H.Z., T.B. Uhm, and S.G. Rhee, *Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. **91**: p. 7022-7026.
54. Netto, L.E.S., et al., *Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties*. J. Biol. Chem., 1996. **271**: p. 15315-15321.
55. Garrido, E.O. and C.M. Grant, *Role of thioredoxins in the response of Saccharomyces cerevisiae to oxidative stress induced by hydroperoxides*. Mol Microbiol, 2002. **43**(4): p. 993-1003.
56. Tartaglia, L.A., et al., *Alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium. Sequence and homology to thioredoxin reductase and other flavoprotein disulfide oxidoreductases*. J Biol Chem, 1990. **265**(18): p. 10535-40.
57. Poole, L.B. and H.R. Ellis, *Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins*. Biochemistry, 1996. **35**(1): p. 56-64.
58. Li Calzi, M. and L.B. Poole, *Requirement for the two AhpF cystine disulfide centers in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase*. Biochemistry, 1997. **36**(43): p. 13357-64.
59. Poole, L.B., et al., *AhpF can be dissected into two functional units: tandem repeats of two thioredoxin-like folds in the N-terminus mediate electron transfer from the thioredoxin reductase-like C-terminus to AhpC*. Biochemistry, 2000. **39**(22): p. 6602-15.
60. Wood, Z.A., L.B. Poole, and P.A. Karplus, *Structure of intact AhpF reveals a mirrored thioredoxin-like active site and implies large domain rotations during catalysis*. Biochemistry, 2001. **40**(13): p. 3900-11.
61. Park, S.G., et al., *Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 5723-32.
62. Jeong, J.S., et al., *Purification and Characterization of a Second Type Thioredoxin Peroxidase (Type II TPx) from Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry, 1999. **38**: p. 776-783.
63. Lee, J., et al., *A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast*. J Biol Chem, 1999. **274**: p. 4537-44.
64. Wong, C.M., et al., *Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5385-94.

65. Jeong, W., M.K. Cha, and I.H. Kim, *Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2924-30.
66. Tran, L.T., Y. Inoue, and A. Kimura, *Oxidative stress response in yeast: purification and some properties of a membrane-bound glutathione peroxidase from Hansenula mrakii*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1164**(2): p. 166-72.
67. Inoue, Y., et al., *Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 27002-27009.
68. Avery, A.M. and S.V. Avery, *Saccharomyces cerevisiae expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33730-5.
69. Sztajer, H., et al., *The putative glutathione peroxidase gene of Plasmodium falciparum codes for a thioredoxin peroxidase*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7397-403.
70. Bjornstedt, M., et al., *The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29382-4.
71. Chae, H.Z., et al., *Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1993. **268**(22): p. 16815-21.
72. Izawa, S., Y. Inoue, and A. Kimura, *Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J, 1996. **320**(Pt 1): p. 61-7.
73. Grant, C.M., G. Perrone, and I.W. Dawes, *Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(3): p. 893-8.
74. Carmel-Harel, O., et al., *Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 2001. **39**(3): p. 595-605.
75. Nogae, I. and M. Johnston, *Isolation and characterization of the ZWF1 gene of Saccharomyces cerevisiae, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase*. Gene, 1990. **96**(2): p. 161-9.
76. Krems, B., C. Charizanis, and K.D. Entian, *Mutants of Saccharomyces cerevisiae sensitive to oxidative and osmotic stress*. Curr Genet, 1995. **27**(5): p. 427-34.

77. Juhnke, H., et al., *Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress.* Mol Gen Genet, 1996. **252**(4): p. 456-64.
78. Greenberg, J.T. and B. Demple, *Overproduction of peroxide-scavenging enzymes in Escherichia coli suppresses spontaneous mutagenesis and sensitivity to redox-cycling agents in oxyR-mutants.* Embo J, 1988. **7**(8): p. 2611-7.
79. Storz, G., et al., *An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in Salmonella typhimurium and Escherichia coli: genetic characterization and cloning of ahp.* J Bacteriol, 1989. **171**(4): p. 2049-55.
80. Seaver, L.C. and J.A. Imlay, *Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in Escherichia coli.* J Bacteriol, 2001. **183**(24): p. 7173-81.
81. Farr, S.B., D. Touati, and T. Kogoma, *Effects of oxygen stress on membrane functions in Escherichia coli: role of HPI catalase.* J Bacteriol, 1988. **170**(4): p. 1837-42.
82. Loewen, P.C., J. Switala, and B.L. Triggs-Raine, *Catalases HPI and HPII in Escherichia coli are induced independently.* Arch Biochem Biophys, 1985. **243**(1): p. 144-9.
83. Cha, M.K., H.K. Kim, and I.H. Kim, *Thioredoxin-linked "thiol peroxidase" from periplasmic space of Escherichia coli.* J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28635-41.
84. Cha, M.K., H.K. Kim, and I.H. Kim, *Mutation and Mutagenesis of thiol peroxidase of Escherichia coli and a new type of thiol peroxidase family.* J Bacteriol, 1996. **178**(19): p. 5610-4.
85. Takemoto, T., Q.M. Zhang, and S. Yonei, *Different mechanisms of thioredoxin in its reduced and oxidized forms in defense against hydrogen peroxide in Escherichia coli.* Free Radic Biol Med, 1998. **24**(4): p. 556-62.
86. Ritz, D., et al., *Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in Escherichia coli.* J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2505-12.
87. Greenberg, J.T. and B. Demple, *Glutathione in Escherichia coli is dispensable for resistance to H₂O₂ and gamma radiation.* J Bacteriol, 1986. **168**(2): p. 1026-9.
88. Christman, M.F., G. Storz, and B.N. Ames, *OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in Escherichia coli and Salmonella typhimurium, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3484-8.

89. Tsaneva, I.R. and B. Weiss, *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1990. **172**(8): p. 4197-205.
90. Tao, K., et al., *Molecular cloning and nucleotide sequencing of oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. *Mol Gen Genet*, 1989. **218**(3): p. 371-6.
91. Tartaglia, L.A., G. Storz, and B.N. Ames, *Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress*. *J Mol Biol*, 1989. **210**(4): p. 709-19.
92. Morgan, R.W., et al., *Hydrogen peroxide-inducible proteins in Salmonella typhimurium overlap with heat shock and other stress proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(21): p. 8059-63.
93. Tao, K., et al., *Purification and characterization of the Escherichia coli OxyR protein, the positive regulator for a hydrogen peroxide-inducible regulon*. *J Biochem (Tokyo)*, 1991. **109**(2): p. 262-6.
94. Tao, K., *oxyR*-dependent induction of *Escherichia coli* *grx* gene expression by peroxide stress. *J Bacteriol*, 1997. **179**(18): p. 5967-70.
95. Mukhopadhyay, S. and H.E. Schellhorn, *Identification and characterization of hydrogen peroxide-sensitive mutants of Escherichia coli: genes that require OxyR for expression*. *J Bacteriol*, 1997. **179**(2): p. 330-8.
96. Zheng, M., et al., *OxyR and SoxRS regulation of fur*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(15): p. 4639-43.
97. Toledano, M.B., et al., *Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection*. *Cell*, 1994. **78**: p. 897-909.
98. Greenberg, J.T., et al., *Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(16): p. 6181-5.
99. Amabile-Cuevas, C.F. and B. Dimple, *Molecular characterization of the soxRS genes of Escherichia coli: two genes control a superoxide stress regulon*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(16): p. 4479-84.
100. Wu, J. and B. Weiss, *Two divergently transcribed genes, soxR and soxS, control a superoxide response regulon of Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1991. **173**(9): p. 2864-71.

101. Nunoshiba, T., et al., *Two-stage control of an oxidative stress regulon: the Escherichia coli SoxR protein triggers redox-inducible expression of the soxS regulatory gene.* J Bacteriol, 1992. **174**(19): p. 6054-60.
102. Wu, J. and B. Weiss, *Two-stage induction of the soxRS (superoxide response) regulon of Escherichia coli.* J Bacteriol, 1992. **174**(12): p. 3915-20.
103. Li, Z. and B. Dimple, *SoxS, an activator of superoxide stress genes in Escherichia coli. Purification and interaction with DNA.* J Biol Chem, 1994. **269**(28): p. 18371-7.
104. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *Modulation of the fumarases of Escherichia coli in response to oxidative stress.* Arch Biochem Biophys, 1993. **301**(2): p. 379-84.
105. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *Fumarase C, the stable fumarase of Escherichia coli, is controlled by the soxRS regulon.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5892-6.
106. Liochev, S.I., et al., *NADPH: ferredoxin oxidoreductase acts as a paraquat diaphorase and is a member of the soxRS regulon.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(4): p. 1328-31.
107. Manchado, M., C. Michan, and C. Pueyo, *Hydrogen peroxide activates the SoxRS regulon in vivo.* J Bacteriol, 2000. **182**(23): p. 6842-4.
108. Chou, J.H., J.T. Greenberg, and B. Dimple, *Posttranscriptional repression of Escherichia coli OmpF protein in response to redox stress: positive control of the micF antisense RNA by the soxRS locus.* J Bacteriol, 1993. **175**(4): p. 1026-31.
109. Nunoshiba, T., et al., *Negative autoregulation by the Escherichia coli SoxS protein: a dampening mechanism for the soxRS redox stress response.* J Bacteriol, 1993. **175**(22): p. 7492-4.
110. Liochev, S.I., et al., *Induction of the soxRS regulon of Escherichia coli by superoxide.* J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9479-81.
111. Aono, R., N. Tsukagoshi, and M. Yamamoto, *Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of Escherichia coli K-12.* J Bacteriol, 1998. **180**(4): p. 938-44.
112. Prieto-Alamo, M.J., et al., *Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress.* J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13398-405.
113. Bagg, A. and J.B. Neilands, *Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in Escherichia coli.* Biochemistry, 1987. **26**(17): p. 5471-7.

114. Touati, D., et al., *Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of Escherichia coli: protective role of superoxide dismutase.* J Bacteriol, 1995. **177**(9): p. 2305-14.
115. Greenberg, J.T., et al., *Activation of oxidative stress genes by mutations at the soxQ/cfxB/marA locus of Escherichia coli.* J Bacteriol, 1991. **173**(14): p. 4433-9.
116. Hassan, H.M. and I. Fridovich, *Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds.* Arch Biochem Biophys, 1979. **196**(2): p. 385-95.
117. Stephen, D.W.S., S.L. Rivers, and D.J. Jamieson, *The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of Saccharomyces cerevisiae.* Molec. Microbiol., 1995. **16**: p. 415-423.
118. Sugiyama, K., S. Izawa, and Y. Inoue, *The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 2000. **275**: p. 15535-40.
119. Grant, C.M., et al., *Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation.* Mol Microbiol, 1996. **21**: p. 171-9.
120. Luikenhuis, S., et al., *The yeast Saccharomyces cerevisiae contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species.* Mol Biol Cell, 1998. **9**: p. 1081-91.
121. Kuge, S. and N. Jones, *YAP1 dependent activation fo TRX2 is essential for the response of Saccharomyces cerevisiae to oxidative stress by hydroperoxides.* Embo J, 1994. **13**: p. 655-664.
122. Morgan, B.A., et al., *The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast Saccharomyces cerevisiae.* EMBO J., 1997. **16**: p. 1035-1044.
123. Lee, J., et al., *Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast.* J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 16040-16046.
124. Charizanis, C., et al., *The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Gen Genet, 1999. **261**: p. 740-52.
125. Jungmann, J., et al., *MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast.* Embo J, 1993. **12**: p. 5051-6.

126. Marchler, G., et al., *A Saccharomyces cerevisiae UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions*. *Embo J*, 1993. **12**: p. 1997-2003.
127. Amoros, M. and F. Estruch, *Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of Saccharomyces cerevisiae genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner*. *Mol Microbiol*, 2001. **39**(6): p. 1523-32.
128. Galiazzo, F. and R. Labbe-Bois, *Regulation of Cu,Zn- and Mn-superoxide dismutase transcription in Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 1993. **315**: p. 197-200.
129. Liu, X.D. and D.J. Thiele, *Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF- dependent activation of yeast metallothionein gene transcription*. *Genes Dev*, 1996. **10**: p. 592-603.
130. Jamieson, D.J., S.L. Rivers, and D.W. Stephen, *Analysis of Saccharomyces cerevisiae proteins induced by peroxide and superoxide stress*. *Microbiology*, 1994. **140**(Pt 12): p. 3277-83.
131. Raitt, D.C., et al., *The Skn7 response regulator of Saccharomyces cerevisiae interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress*. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(7): p. 2335-47.
132. Nguyen, D.T., A.M. Alarco, and M. Raymond, *Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator FLR1 gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(2): p. 1138-45.
133. Izawa, S., et al., *Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 1998. **330**: p. 811-7.
134. Navarro-Avino, J.P., et al., *A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in Saccharomyces cerevisiae and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes*. *Yeast*, 1999. **15**: p. 829-42.
135. Garay-Arroyo, A. and A.A. Covarrubias, *Three genes whose expression is induced by stress in Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1999. **15**: p. 879-92.
136. Schnell, N., B. Krems, and K.-D. Entian, *The PAR1 (YAPI/SNQ3) gene of Saccharomyces cerevisiae, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism*. *Curr Gen*, 1992. **21**: p. 269-273.
137. Harshman, K.D., W.S. Moye-Rowley, and C.S. Parker, *Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4*. *Cell*, 1988. **53**(2): p. 321-30.

138. Moye-Rowley, W.S., K.D. Harshman, and C.S. Parker, *Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins*. *Genes Dev*, 1989. **3**(3): p. 283-92.
139. Wu, A.L. and W.S. Moye-Rowley, *GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(9): p. 5832-9.
140. Fernandes, L., C. Rodrigues-Pousada, and K. Struhl, *Yap, a novel family of eight bZIP proteins in Saccharomyces cerevisiae with distinct biological functions*. *Mol. Cel. Biol.*, 1997. **17**: p. 6982-6993.
141. Krems, B., C. Charizanis, and K.-D. Entian, *The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of Saccharomyces cerevisiae is involved in oxidative stress resistance*. *Curr. Genet.*, 1996. **29**: p. 327-334.
142. Brown, L.L. and H. Bussey, *SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall β -glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors*. *J. Bacteriol.*, 1993. **175**: p. 6908-6915.
143. Schmitt, A.P. and K. McEntee, *Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 5777-82.
144. Martinez-Pastor, M.T., et al., *The Saccharomyces cerevisiae zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE)*. *EMBO J.*, 1996. **15**: p. 227-2235.
145. Hasan, R., et al., *The control of the yeast H2O2 response by the Msn2/4 transcription factors*. *Mol Microbiol*, 2002. **45**(1): p. 233-41.
146. Gonzalez-Flecha, B. and B. Dimple, *Transcriptional regulation of the Escherichia coli oxyR gene as a function of cell growth*. *J Bacteriol*, 1997. **179**(19): p. 6181-6.
147. Michan, C., et al., *In vivo transcription of the Escherichia coli oxyR regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(9): p. 2759-64.
148. Storz, G., L.A. Tartaglia, and B.N. Ames, *Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation*. *Science*, 1990. **248**: p. 189-194.

149. Kullik, I., et al., *Mutational analysis of the redox-sensitive Transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation*. J Bacteriol, 1995. **177**: p. 1275-1284.
150. Zheng, M., F. Aslund, and G. Storz, *Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation*. Science, 1998. **279**: p. 1718-1721.
151. Aslund, F., et al., *Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6161-5.
152. Tao, K., *In vivo oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in Escherichia coli*. FEBS Lett, 1999. **457**(1): p. 90-2.
153. Choi, H., et al., *Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor*. Cell, 2001. **105**(1): p. 103-13.
154. Kim, S.O., et al., *OxyR: a molecular code for redox-related signaling*. Cell, 2002. **109**(3): p. 383-96.
155. Rocha, E.R., G. Owens, Jr., and C.J. Smith, *The redox-sensitive transcriptional activator OxyR regulates the peroxide response regulon in the obligate anaerobe Bacteroides fragilis*. J Bacteriol, 2000. **182**(18): p. 5059-69.
156. Mongkolsuk, S., et al., *Mutations in oxyR resulting in peroxide resistance in Xanthomonas campestris*. J Bacteriol, 2000. **182**(13): p. 3846-9.
157. Kim, J.A. and J. Mayfield, *Identification of Brucella abortus OxyR and its role in control of catalase expression*. J Bacteriol, 2000. **182**(19): p. 5631-3.
158. Bsat, N., et al., *Bacillus subtilis contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors*. Mol Microbiol, 1998. **29**(1): p. 189-98.
159. Herbig, A.F. and J.D. Helmann, *Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the Bacillus subtilis PerR peroxide regulon repressor with operator DNA*. Mol Microbiol, 2001. **41**(4): p. 849-59.
160. Fuangthong, M., et al., *Regulation of the Bacillus subtilis fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible*. J Bacteriol, 2002. **184**(12): p. 3276-86.
161. Fuangthong, M., et al., *OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2001. **183**(14): p. 4134-41.

162. Fuangthong, M. and J.D. Helmann, *The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 6690-5.
163. Hidalgo, E. and B. Dimple, *An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein*. Embo J, 1994. **13**(1): p. 138-46.
164. Hidalgo, E., et al., *Binuclear [2Fe-2S] clusters in the Escherichia coli SoxR protein and role of the metal centers in transcription*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 20908-14.
165. Bradley, T.M., et al., *Cysteine-to-alanine replacements in the Escherichia coli SoxR protein and the role of the [2Fe-2S] centers in transcriptional activation*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(8): p. 1469-75.
166. Gaudu, P. and B. Weiss, *SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10094-8.
167. Ding, H., E. Hidalgo, and B. Dimple, *The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33173-5.
168. Ding, H. and B. Dimple, *In vivo kinetics of a redox-regulated transcriptional switch*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8445-9.
169. Gaudu, P., N. Moon, and B. Weiss, *Regulation of the soxRS oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR in vivo*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 5082-6.
170. Ding, H. and B. Dimple, *Glutathione-mediated destabilization in vitro of [2Fe-2S] centers in the SoxR regulatory protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9449-53.
171. Hidalgo, E. and B. Dimple, *Activation of SoxR-dependent transcription in vitro by noncatalytic or NifS-mediated assembly of [2Fe-2S] clusters into apo-SoxR*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7269-72.
172. Hidalgo, E. and B. Dimple, *Spacing of promoter elements regulates the basal expression of the soxS gene and converts SoxR from a transcriptional activator into a repressor*. Embo J, 1997. **16**(5): p. 1056-65.
173. Gaudu, P., S. Dubrac, and D. Touati, *Activation of SoxR by overproduction of desulfoferrodoxin: multiple ways to induce the soxRS regulon*. J Bacteriol, 2000. **182**(6): p. 1761-3.

174. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *Effects of overproduction of superoxide dismutases in Escherichia coli on inhibition of growth and on induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by paraquat*. Arch Biochem Biophys, 1992. **294**(1): p. 138-43.
175. Krapp, A.R., et al., *The flavoenzyme ferredoxin (flavodoxin)-NADP(H) reductase modulates NADP(H) homeostasis during the soxRS response of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2002. **184**(5): p. 1474-80.
176. Kobayashi, K. and S. Tagawa, *Isolation of reductase for SoxR that governs an oxidative response regulon from Escherichia coli*. FEBS Lett, 1999. **451**(3): p. 227-30.
177. Wu, A., et al., *Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance*. J. Biol. Chem., 1993. **268**: p. 18850-18858.
178. Wemmie, J.A., et al., *Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 14690-14697.
179. Hirata, D., K. Yano, and T. Miyakawa, *Stress-induced transcriptional activation mediated by YAP1 and YAP2 genes that encode the Jun family of transcriptional activators in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet, 1994. **242**(3): p. 250-6.
180. Stephen, D.W. and D.J. Jamieson, *Amino acid-dependent regulation of the Saccharomyces cerevisiae GSH1 gene by hydrogen peroxide*. Mol Microbiol, 1997. **23**(2): p. 203-10.
181. Pinson, B., I. Sagot, and B. Daignan-Fornier, *Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 2000. **36**(3): p. 679-87.
182. Wemmie, J.A., S.M. Steggerda, and W.S. Moye-Rowley, *The Saccharomyces cerevisiae AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7908-14.
183. Kuge, S., N. Jones, and A. Nomoto, *Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress*. EMBO J., 1997. **16**: p. 1710-1720.
184. Isoyama, T., et al., *Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21863-9.
185. Yan, C., L.H. Lee, and L.I. Davis, *Crmlp mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor*. EMBO J., 1998. **17**: p. 7416-7429.
186. Kuge, S., et al., *Crml (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress*. Genes to Cells, 1998. **3**: p. 521-532.

187. Coleman, S.T., et al., *Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion*. Mol. Cell. Biol., 1999. **19**: p. 8302-8313.
188. Delaunay, A., A.D. Isnard, and M.B. Toledano, *H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor*. EMBO J, 2000. **19**(19): p. 5157-5166.
189. Takeuchi, T., et al., *Mutational analysis of Yap1 protein, an AP-1-like transcriptional activator of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett., 1997. **416**: p. 339-343.
190. Davis, A., Billmers, RL, *Chemistry of Sulfenic Acids. 4. the first Direct Evidence for the Involvement of Sulfenic Acids in the Oxidation of Thiols*. American Chemical Society, 1981. **103**(23): p. 7016-7018.
191. Claiborne, A., et al., *Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation*. Biochemistry, 1999. **38**(47): p. 15407-16.
192. Claiborne, A., et al., *Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation*. Faseb J, 1993. **7**(15): p. 1483-90.
193. Nelson, J.W. and T.E. Creighton, *Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation in vivo*. Biochemistry, 1994. **33**(19): p. 5974-83.
194. Ursini, F., M. Maiorino, and A. Roveri, *Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme?* Biomed Environ Sci, 1997. **10**(2-3): p. 327-32.
195. Ursini, F., et al., *Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation*. Science, 1999. **285**(5432): p. 1393-6.
196. Godeas, C., et al., *Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa*. Biol Reprod, 1997. **57**(6): p. 1502-8.
197. Roveri, A., et al., *PHGPx and spermatogenesis*. Biofactors, 2001. **14**(1-4): p. 213-22.
198. Seo, M.S., et al., *Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20346-54.
199. Muller, E.G., *A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(11): p. 1805-13.
200. Izawa, S., et al., *Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 28459-28465.

201. Epp, O., R. Ladenstein, and A. Wendel, *The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2- nm resolution*. Eur J Biochem, 1983. **133**(1): p. 51-69.
202. Ren, B., et al., *The crystal structure of seleno-glutathione peroxidase from human plasma at 2.9 Å resolution*. J Mol Biol, 1997. **268**(5): p. 869-85.
203. Smith, M., Evans, C.G., Thir, H., Orrenius, S., *Oxidative stress*, ed. H.e. Sies. 1985: Academic Press Inv (London). p 91-111.
204. Chaput, M., et al., *Potential of oxygen toxicity by menadione in Saccharomyces cerevisiae*. Biochimie, 1983. **65**(8-9): p. 501-12.
205. Nickerson WJ., F.G., Strauss G., *Studies on Quinone-thioethers. I. Mechanism of Formation and Properties of Thiodione*. Biochemistry, 1963. **2**(3): p. 537-543.
206. Di Monte, D., et al., *Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes*. Arch Biochem Biophys, 1984. **235**(2): p. 334-42.
207. Bolton, J.L., et al., *Role of quinones in toxicology*. Chem Res Toxicol, 2000. **13**(3): p. 135-60.
208. Kosower, N.S. and E.M. Kosower, *Formation of disulfides with diamide*. Methods Enzymol, 1987. **143**: p. 264-269.
209. Strauss G., F.G., Nickerson WJ., *Studies on Quinone-Thioether. II Photochemical and Hydrolytic Cleavage of Thiodione*. Biochemistry, 1963. **2**(3): p. 543-546.
210. Castillo, E.A., et al., *Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues*. Mol Microbiol, 2002. **45**(1): p. 243-54.
211. Uchida, K. and E.R. Stadtman, *Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6388-93.
212. Vlamis-Gardikas, A., et al., *Characterization of Escherichia coli null mutants for glutaredoxin 2*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 10861-8.
213. Toone, W.M., et al., *Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1*. Genes Dev, 1998. **12**(10): p. 1453-63.
214. Billard, P., H. Dumond, and M. Bolotin-Fukuhara, *Characterization of an AP-1-like transcription factor that mediates an oxidative stress response in Kluyveromyces lactis*. Mol Gen Genet, 1997. **257**(1): p. 62-70.

215. Alarco, A.M. and M. Raymond, *The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in Candida albicans*. J Bacteriol, 1999. **181**(3): p. 700-8.
216. Zhang, X., et al., *Analysis of the oxidative stress regulation of the Candida albicans transcription factor, Cap1p*. Mol Microbiol, 2000. **36**(3): p. 618-29.
217. Kudo, N., et al., *A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 15151-8.
218. Yamada, K., C.W. Nakagawa, and N. Mutoh, *Schizosaccharomyces pombe* homologue of glutathione peroxidase, which does not contain selenocysteine, is induced by several stresses and works as an antioxidant. Yeast, 1999. **15**(11): p. 1125-32.
219. Hoshino, H., et al., *Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15370-6.
220. Muto, A., et al., *Activation of Maf/AP-1 repressor Bach2 by oxidative stress promotes apoptosis and its interaction with promyelocytic leukemia nuclear bodies*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20724-33.
221. Dinkova-Kostova, A.T., et al., *Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3404-9.
222. Ramos-Gomez, M., et al., *Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3410-5.
223. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 76-86.
224. Dinkova-Kostova, A.T., et al., *Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11908-13.
225. Klatt, P. and S. Lamas, *Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress*. Eur J Biochem, 2000. **267**(16): p. 4928-44.
226. Hidalgo, E., H. Ding, and B. Dimple, *Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(6): p. 207-10.

227. Popescu, C.V., et al., *Mossbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13431-5.
228. Rietsch, A. and J. Beckwith, *The genetics of disulfide bond metabolism*. Annu Rev Genet, 1998. **32**: p. 163-84.
229. Danon, A., *Redox reactions of regulatory proteins: do kinetics promote specificity?* Trends Biochem Sci, 2002. **27**(4): p. 197-203.
230. Masuda, S., et al., *Repression of photosynthesis gene expression by formation of a disulfide bond in CrtJ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 7078-83.
231. Sherman F., F., GR., Hicks JB., *Laboratory course manual for methods in yeast genetics, p163*. Cold Spring Harbor ed. 1986.
232. Sikorski, R.S. and P. Hieter, *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1989. **122**: p. 19-27.
233. Guthrie C., F.G., *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Methods in enzymology*. Academic press ed. 1991.
234. Dujon, B., *European Functional Analysis Network (EUROFAN) and the functional analysis of the Saccharomyces cerevisiae genome*. Electrophoresis, 1998. **19**(4): p. 617-24.
235. Cormack, B.P., et al., *Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in Candida albicans*. Microbiology, 1997. **143**(Pt 2): p. 303-11.
236. Rigaut, G., et al., *A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 1030-2.
237. Chen, D.C., B.C. Yang, and T.T. Kuo, *One-step transformation of yeast in stationary phase*. Curr Genet, 1992. **21**(1): p. 83-4.
238. Sambrook, F., Maniatis, *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor ed. 1989.
239. Gyuris, J., et al., *Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2*. Cell, 1993. **75**(4): p. 791-803.
240. Stade, K., et al., *Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1041-50.
241. Miller, J. Cold Spring Harbot Laboratory Press, NY ed. Experiments in Molecular genetics. 1972.

242. Shevchenko, A., et al., *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*. *Anal Chem*, 1996. **68**(5): p. 850-8.

ANNEXE 1

ANNEXE 1(pages suivantes):

Alignement multiple d'une sélection représentative de différentes séquences homologues à GPX3 dans différents règnes du vivant. En haut, sont indiquées les structures secondaires observée dans la structure de cGPx bovine (séquence GSHC_BOVIN indiquée en rouge), le code couleur correspondant à celui utilisé pour la figure 27B. La position des cystéines conservées est indiquée par un astérisque. La colonne correspondant à Cys82 est en rouge sur gris dans la section des Champignons, Bactéries, et Plantes (gris foncé). Elle est absente chez les métazoaires sauf dans le cas de la GSHC_BOVIN (non significatif).



Fungi :

GSHJ_YEAST (GPX3) 1 MSEFYKLPVDDKKGQPPFFDQLKCKVLLIVNVASKCCFTTPQ-YKELEALYKRYKDEGFTIILGFPCNOFGHOBPGSDE 76
 GSHI_YEAST (GPX2) 1 -TSFYDLECKDKKGESFKFDQLKCKVLLIVNVASKCCFTTPQ-YKELEALYKRYKQDKGFVILGFPCNOFGKOBPGSDE 75
 GSHJ_SCHPO 1 MSHFYDLAPKDKDGNPFPPSNLCKVLLIVNVASKCCFTTPQ-YKGLLEALYQKYKDRGFILGFPCNOFGHOBPGSDE 76
 GSHH_YEAST (GPX1) 1 MQEFYSFSPIDENGNPFPPSNLRNKKVLLIVNVASHCACFTTPQ-YKELEALYKRYKSHGLVIVAFPCGQFGHOBFEKDK 76
 Q8X1N8 (BLUMER.) 1 ----YDFMPKDKNGEVPLEKYKQVLLIVNVASKCCFTTPQ-FEGLLEKLYK(6)PGKFTIILGFPCNOFGHOBPGSND 75

Bacteria :

GPO_LACLC 1 ---FYDFSAVKMNGETVSMDDYKCKVLLIVNVASKCCFTTPQ-FEGLLEKLYETKYDQGLELILGFPCNOFANODAGENT 73
 GPO_SYNY3 1 -----GSPVALRDFECKVLLIVNVASQCCFTTPQ-YQGLQALYNRFGDRGFTVLGFPCNOFGQOBPGSG 63
 BSAA_BACHD 1 -----GEEKALSDYKQVLLIVNVASKCCFTTPQ-YBELQILYETKYDQGFVILGFPCNOFMNOBPGDHN 63
 BSAA_BACSU 1 -----GKDMTLQPFACKVLLIVNVASKCCFTTPQ-LKQLQELDYTYQEGLELILGFPCNOFMNOBPGEEA 63
 GPXA_NEIMA 1 ----YDFQMKDAGNAVDLSGYRCKVLLIVNVASRCCLTTPQ-YEALQKLYAQYTAEGLELILDFPCNOFREOAPESSG 72
 BTUE_ECOLI 1 -----DIDGVEVTTLEKFAENVLLIVNVASKCCFTTPQ-YEQLENIQKAWVDRGFVILGFPCNOFLEOBPGSDE 66
 GPWA_PSEWI 1 ----ELPKLRKGENIELCQYACKPLVVVNTASFCCTTPQ-FKGLLEALYQRYKQLELILGFPCNOFSDER-OBESADSK 70

ViridiPlantae :

GSHH_CITSI 1 -----DAKGQVDLSIYKCKLLIVNVASQCCFTTPQ-TNSNYTELSQLYDKYKNOGLELILAFPCNOFGAEBPGDNE 67
 GSHH_NICSY 1 ----YDFTVKDAKGNVDLSIYKCKVLLIVNVASQCCFTTPQ-TNSNYTDLTEIYKRYKQDQGLELILAFPCNOFGQOBPGSIE 73
 GSHY_HELAN 1 -----DVKGQDVLELSKYKCKVLLIVNVASQCCFTTPQ-TNSNYPELTLTYQKYKQDQGLELILAFPCNOFGQOBPGSNE 67
 GSHY_ARATH 1 -----DIDGKDVALKFKCKVLLIVNVASRCCLTTPQ-TNSNYSELSHLYEKYKQDQGLELILAFPCNOFGQOBPGSNS 67
 GSHZ_HELAN 1 ----YDFTVKDAKGNVDLSVYKCKVLLIVNVASKCCFTTPQ-TNSNYDELNLQIYLYKYEKGFELILAFPCNOFGQOBPGTNE 73

Eukaryota Metazoa :

GSHD_CAEL 1 MASVHGITVKNAGQEDTPLSNYQCKVLLIVNVASQCCFTTPQ-TNSNYNQFKELLDVYKDKGLELILAFPCNOFGQOB--PSC 75
 GSHC_CAEL 1 MSSVYDFNVKNANGDDVSLSDYKCKVLLIVNVASQCCFTTPQ-TNKNYTQLKELLDVYKDKGLELILAFPCNOFAGOB--PSC 75
 GSHH_MOUSE 1 ----HEFSAKDIDGHMVCLDKYRCFVILVNVASQCCFTTPQ-TDVMYTLQVLDLHARYAECGLRILAFPCNOFGROBPGSN 72
 GSHH_HUMAN 1 ----HEFSAKDIDGHMVNLDKYRCFVILVNVASQCCFTTPQ-TDVMYTLQVLDLHARYAECGLRILAFPCNOFGROBPGSN 72
 GSHE_HUMAN 1 ----KNEYVSFKQYVCKHILFVNVATYCCGLTTPQ-YPELNLALQELKPYGLVILGFPCNOFGKOBPGDN 63
 GSHE_MOUSE 1 ----EDIPFKQYRCKHVLVNVATYCCGLTTPQ-YPELNLALQEDLKPFGVILGFPCNOFGKOBPGDN 61
 GSHP_HUMAN 1 ----PFKQYACKYVLFVNVASQCCFTTPQ-TNSNYIELNLALQELAPFGLVILGFPCNOFGKOBPGEN 58
 GSHP_BOVIN 1 ----PFKQYACKYVLFVNVASQCCFTTPQ-TNSNYIELNLALQELAPFGLVILGFPCNOFGKOBPGEN 58
 GSHP_MOUSE 1 ----PFKQYACKYVLFVNVASQCCFTTPQ-TNSNYIELNLALQELAPFGLVILGFPCNOFGKOBPGEN 58
 GSHG_HUMAN 1 ----FYDLSAISLDGEKVDNFTFRCAVLLIENVASLCCGTTPQ-TRDFTQLNELQCRFPRR-LVVLGFPCNOFGHOEN-CQN 72
 GSHG_MOUSE 1 ----FYDLSAISLDGEKIDFNFTFRCAVLLIENVASLCCGTTPQ-TRDFTQLNELQCRFPRR-LVVLGFPCNOFGHOEN-CQN 72
 GSHC_MOUSE 1 ----GEPVSLGSLRCKVLLIENVASLCCGTTPQ-TRDFTQLNELQCRFPRR-LVVLGFPCNOFGHOEN-GKN 63
 GSHC_BOVIN 1 RTVYAFSARPLAGGEPFNLSLRCVLLIENVASLCCGTTPQ-TRDFTQLNELQCRFPRR-LVVLGFPCNOFGHOEN-AKN 63
 GSHC_HUMAN 1 ----GEPVSLGSLRCKVLLIENVASLCCGTTPQ-TRDFTQLNELQCRFPRR-LVVLGFPCNOFGHOEN-AKN 63
 GSHU_CAEL 1 ----QGEYTDLSYRCKVLLIENVATFCANTTPQ-YTDFNEMLEKYQAQGLTILVAFPCNOFYLOBPGEN-AEN 63



Fungi :

GSHJ_YEAST (GPX3) 77 -EIAQFCQLN-----YGVTFPIIMKKIDVNGCNEDPVYKFKLSQKSG----- 116
 GSHI_YEAST (GPX2) 76 -QITEFCQLN-----YGVTFPIIMKKIDVNGCNADSVYNYKLSQKAG----- 115
 GSHJ_SCHPO 77 -EIAQFCQKN-----YGVTFPVLAKINVCNDNVDVYQFLKSQKK----- 115
 GSHH_YEAST (GPX1) 77 -EINKFCQDK-----YGVTFPIILHKIRCNQKQKQDPVYKFKLNSVSG----- 116
 Q8X1N8 (BLUMER.) 76 -EIQNFCRIN-----YGVTFPMLGKVNVCNDTADPLEEWLKVKEKPGIM----- 117

Bacteria :

GPO_LACLC 74 -EINEFCQLN-----YGVTFPIIMFKIKVNGKEAHPLYQFL-----KKE 110
 GPO_SYNY3 64 -EIKNFCETR-----YGVTFPIIFEKVEVNCNNAHPLFKFLTAASPGMAI-----PF 108
 BSAA_BACHD 64 -EIAAFCERN-----YGVTFPIFEKVKVNGKEAHPLYQFLTSQQGGLF----- 105
 BSAA_BACSU 64 -DIQFCETN-----YGVTFPIPMFSKVDVNGKNAHPLFVYLTEHAKGML----- 105
 GPXA_NEIMA 73 -EIAQVCMK-----FGTKFKLFDKIEVNCANTAPLYAYLKSVPKQDKGNHLFKDFVLKL-----AAL 129
 BTUE_ECOLI 67 -EIKTYCTTT-----WGVTFPIPMFSKIEVNGEGRHPLYQKLIAAAPTAVAPEESGFYARMV-----SKG 123
 GPWA_PSEWI 71 -ETATVCYVN-----YGVTFPIAMTEPQPVSCANAIPLEKGLAEQSRQ----- 110

ViridiPlantae :

GSHH_CITSI 68 EQIQEFACTR-----FKAEFPIFDKVDVNGDNAAPLYKHLKSSKGGFLG----- 110
 GSHH_NICSY 74 EEIQNMVCTR-----FKAEFPIFDKVDVNGDNAAPLYKFLKSSKGGFFG----- 116
 GSHY_HELAN 64 EEIQVFACTR-----FKAEFPIVFSKVNVMNGKEADPLYKFLKSSKGGFLG----- 110
 GSHY_ARATH 68 SEIKQFACTR-----FKAEFPIFDKVDVNGCPSTAPIYEFLLKSNAGGFLG----- 110
 GSHZ_HELAN 74 EEIVDFVTK-----FKSEFPIFDKIDVNGENAAPVYEFLLKTFGYGILG----- 116

Eukaryota Metazoa :

GSHD_CAEL 76 EIDIAAFVADK-----FKFEPTLFQKIDVNGDNAAPLYKFLKQEKGGFLV----- 120
 GSHC_CAEL 76 EIDIQAFVADK-----FKFEPTLFQKIDVNGDKQSPLEKFLKNEKGGFMF----- 120
 GSHH_MOUSE 73 QEIKEFAAG-----YNVKFDMSFKICVNGDDAHPLEKWKMKVQPKGRGMLGN----- 118
 GSHH_HUMAN 73 EEIKEFAAG-----YNVKFDMSFKICVNGDDAHPLEKWKMKIQPKGKILGN----- 118
 GSHE_HUMAN 64 KEILPGLKYVRPGGGFVP--NFQLFEKGDVNGEKEQKFTFLKNSCPTPSE-----LLGTFKSIS 121
 GSHE_MOUSE 62 LEILPGLKYVRPVGKFLP--NFQLFAKGDVNGENEQKIFLFLKRSRCPHPSE-----TVVMSKHTS 119
 GSHP_HUMAN 59 SEILPPTLYVRPGGGFVP--NFQLFEKGDVNGEKEQKFTFLKNSCPTPSE-----LLGTFKSIS 116
 GSHP_BOVIN 59 SEILPGLKYVRPGGGFVP--NFQLFEKGDVNGEKEQKFTFLKNSCPTPSE-----LLGTFKSIS 116
 GSHP_MOUSE 59 SEILPGLKYVRPGGGFVP--NFQLFEKGDVNGEKEQKFTFLKNSCPTPSE-----LLGTFKSIS 116
 GSHG_HUMAN 73 EEILNLSKYVRPGGGYQP--TFLLVQKCEVNGQNEHPLVAYLKDCLKPYDDPFS-----LMTDPKLI 134
 GSHG_MOUSE 73 EEILNLSKYVRPGGGYQP--TFLLVQKCEVNGQNEHPLVAYLKDCLKPYDDPFS-----LMTDPKLI 134
 GSHC_MOUSE 64 SEILNLSKYVRPGGGFEP--NFQLFEKGDVNGEKEQKFTFLKNSCPTPSE-----LMTDPKLI 125
 GSHC_BOVIN 64 EEILNLSKYVRPGGGFEP--NFMLFEKCEVNGEKAHPLFAFLREVLPTPSDDATA-----LMTDPKIT 125
 GSHC_HUMAN 64 EEILNLSKYVRPGGGFEP--NFMLFEKCEVNGEKAHPLFAFLREALPAPSDDATA-----LMTDPKIT 125
 GSHU_CAEL 64 HELMNGLTYYVRPNGWTPHQELHYGKIDVNGDNHPLYEFVKESCPQTVDK-----IGKTDELM 123



Fungi :

GSHJ_YEAST (GPX3) 116 --MLGLRGIK NFEKFLVDKCKVYERYSSLTKPS--SLSETTEELLKEVE- 163
 GSHI_YEAST (GPX2) 115 --LLGFKGIK NFEKFLVDSNGKVVQRFSSLTGPS--SLDQETQSLLSK--- 160
 GSHJ_SCHPO 115 --QLGLERIK NFEKFLVNRQGVIERYSISKPE--HLENDIESVL----- 158
 GSHH_YEAST (GPX1) 116 --KSGIKMIK NFEKFLVDRNGKVVRFSCMTRPL--ELCPIIEELLNQ--- 161
 Q8X1N8 (BLUMER.) 117 --G--MKRVK NFEKFLVSKDGKPIKRYSSSTAGPEG--FQSLTIEEIEK--- 160

Bacteria :

GPO_LACLC 111 AKGALSGTIK NFKFLVDRDQVIERFAPKTEPEE--MEEETKLL----- 155
 GPO_SYNY3 109 LGG--AEDIK NFKFLVDRQCKVVRYGSIAPDE--IAADTEKLL----- 151
 BSAA_BACHD 105 -----TEIK NFKFLIDRSCNVVKRYAPSTSPIK--IKDDTEELL----- 145
 BSAA_BACSU 105 -G---TKAIK NFKFLVDRNCEIVGRYSPNTNPKE--LEDDIVKLLLEQ--- 148
 GPXA_NEIMA 130 GEKRDEGDIK NFKFLVNRDGEVVERFAPSVPTEE--TEADIRALL----- 174
 BTUE_ECOLI 124 RAPLYPDDIL NFEKFLVGRDGKVIQRFS----- 152
 GPWA_PSEWI 110 -----PR NFKYVVDRCQKVVASFSSLTGP----- 136

ViridiPlantae :

GSHH_CITSI 110 -----DSIK NFKFLVDKCGNVVRYAPTSP--LSIEKDTKLL----- 150
 GSHH_NICSY 116 -----DSIK NFKFLVDKCGNVVDRYSPPTTP--ASMEKDTKLL----- 155
 GSHY_HELAN 110 -----DSIK NFKFLVDRQCKVVDRYAPTSP--LSIEKDTKLL----- 149
 GSHY_ARATH 110 -----GLIK NFEKFLIDKCKVVERYPPPTSP--FQIEKDTQKLLAELK- 153
 GSHZ_HELAN 116 -----GDIQ NFKFLVDKNGQPVDCCYPTSP--LTVERDTQKLL----- 155

Eukaryota Metazoa :

GSHD_CAEEL 120 -----DAIK NFKFLVGRDGHVIRKRFSPPTTEP--KDMKDTAALQ---- 160
 GSHC_CAEEL 120 -----DAIK NFKFLVGRDCKIIRFGPTTDP--KDMKDTKEALGE--- 161
 GSHH_MOUSE 118 -----AIK NFKFLIDKNGCVVKRYGPMEEP--QVIEKDT----- 152
 GSHH_HUMAN 118 -----AIK NFKFLIDKNGCVVKRYGPMEEP----- 145
 GSHE_HUMAN 122 WDPVKVHDIR NFEKFLVCPDGIPVMRWSHRATV--SSVKTDTLAYLKQ--- 168
 GSHE_MOUSE 120 WEPKIVHDIR NFEKFLVCPDGVPMRWFHQAPV--STVKSDI----- 160
 GSHP_HUMAN 117 WEPKIVHDIR NFEKFLVCPDGIPIMRWHHRTTV--SNVKMDI----- 157
 GSHP_BOVIN 117 WEPKIVHDIR NFEKFLVCPDGIPIMRWHHRTTV--NSVKMDI----- 157
 GSHP_MOUSE 117 WEPKIVHDIR NFEKFLVCPDGIPVMRWHHRTTV--SNVKMDI----- 157
 GSHG_HUMAN 135 WSPVRRSDVA NFEKFLICPEGEPFRYSRRTFPT--INIEPDKRLLK---- 180
 GSHG_MOUSE 135 WSPVRRSDVS NFEKFLICPEGEPFRYSRRTFPT--INIEPDKRLLK---- 180
 GSHC_MOUSE 126 WSPVCRNDIA NFEKFLVCPDGVVRRYSRRFRT--IDIEPDETLLSQ--- 172
 GSHC_BOVIN 126 WSPVCRNDVS NFEKFLVCPDGVVRRYSRRFLT--IDIEPDETLLSQ--- 172
 GSHC_HUMAN 126 WSPVCRNDVA NFEKFLVCPDGVPLRRYSRRFQT--IDIEPDEALLSQ--- 172
 GSHU_CAEEL 124 YNPVPRSDIT NFEKFLIDRNGQPRFRFHPTAWSHGDVVTPTTEQLLAE--- 172

ANNEXE 2

H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor

Agnès Delaunay, Anne-Dominique Isnard and Michel B.Toledano¹

Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, DBCM, DSV, CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette, 91191 Cedex, France

¹Corresponding author
e-mail: toledano@jonas.saclay.cea.fr

The yeast transcription factor Yap1 activates expression of antioxidant genes in response to oxidative stress. Yap1 regulation involves nuclear accumulation, but the mechanism sensing the oxidative stress signal remains unknown. We provide biochemical and genetic evidence that upon H₂O₂ treatment, Yap1 is activated by oxidation and deactivated by enzymatic reduction with Yap1-controlled thioredoxins, thus providing a mechanism for autoregulation. Two cysteines essential for Yap1 oxidation are also essential for its activation by H₂O₂. The data are consistent with a model in which oxidation of Yap1 leads to disulfide bond formation with the resulting change of conformation masking recognition of the nuclear export signal by Crm1/Xpo1, thereby promoting nuclear accumulation of the protein. In sharp contrast to H₂O₂, diamide does not lead to the same Yap1 oxidized form and still activates mutants lacking cysteines essential for H₂O₂ activation, providing a molecular basis for differential activation of Yap1 by these oxidants. This is the first example of an H₂O₂-sensing mechanism in a eukaryote that exploits the oxidation of cysteines in order to respond rapidly to stress conditions.

Keywords: oxidation/oxidative stress/sensing/thiol/Yap1

Introduction

Living cells have adaptive responses to oxidative stress, indicating that they sense increased levels of reactive oxygen species and respond to the signal by increasing the expression of defence activities. The mechanisms by which cells sense reactive oxygen species are relatively well understood in prokaryotes (Zheng and Storz, 2000), but not in eukaryotes.

The yeast transcription factor Yap1, a bZIP DNA-binding protein of the AP-1 family (Moye-Rowley *et al.*, 1989), is an essential regulator of the H₂O₂ adaptive response (Schnell *et al.*, 1992; Kuge and Jones, 1994) and controls many proteins of the H₂O₂ stimulon (Lee *et al.*, 1999a). These include most cellular antioxidants and enzymes of the glutathione and pentose phosphate pathways.

Yap1 is activated upon exposure to peroxides or to thiol-modifying drugs such as diamide (Kuge and Jones, 1994) by a mechanism acting at the level of subcellular protein

localization (Kuge *et al.*, 1997). Yap1 is restricted to the cytoplasm by virtue of rapid nuclear export by the export receptor Crm1/Xpo1 (Kuge *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1998). Upon exposure to oxidants, Yap1 accumulates in the nucleus due to loss of the Yap1–Crm1 interaction. Yap1 contains a short C-terminal domain (the CRD) carrying a non-canonical leucine rich nuclear export signal (NES) embedded in three repeated cysteine-containing motifs (see Figure 3A), which is important for the interaction with Crm1 (Kuge *et al.*, 1997, 1998; Yan *et al.*, 1998). Oxidation of these cysteines might modify the NES in a way that prevents recognition by Crm1, as suggested by (i) the constitutive cytoplasmic phenotype of a Yap1 allele bearing substitutions of all three C-terminal CRD cysteines (Kuge *et al.*, 1998), (ii) the dithiothreitol (DTT) enhancement of the co-precipitation of Crm1 with Yap1 (Yan *et al.*, 1998) and (iii) the sensitivity of the Yap1–Crm1 two-hybrid interaction to diamide (Yan *et al.*, 1998). Yap1 has another cluster of three cysteines (C303, C310, C315), but these appear not to be involved in Yap1–Crm1 interaction (Yan *et al.*, 1998). However, deletion mutagenesis has shown that a mutant protein lacking an internal segment between amino acids 225 and 335 was still inducible by diamide, but not by H₂O₂ (Wemmie *et al.*, 1997). This suggested the intriguing possibility that different mechanisms are used to activate Yap1 by these two oxidants, and that Yap1 N-terminal cysteines might be important for activation by H₂O₂ but not by diamide.

We sought to understand how H₂O₂ activates Yap1. We provide biochemical and genetic evidence that, in response to H₂O₂, Yap1 is activated by oxidation and deactivated by enzymatic reduction with Yap1-controlled thioredoxins, thus providing a mechanism for autoregulation. Two cysteines essential for Yap1 activation by H₂O₂ are likely to form a disulfide bond upon oxidation. In sharp contrast, diamide does not lead to the same oxidized form of Yap1 and still activates mutants lacking cysteines essential for the H₂O₂ response, thus providing a molecular basis for the differential activation of Yap1 by these oxidants. This is the first example of an H₂O₂-sensing mechanism in a eukaryote that exploits the oxidation of cysteines in order to respond rapidly to stress.

Results

Kinetics of the activation of Yap1 by H₂O₂

In response to 0.3 mM H₂O₂, the Yap1 target gene *TRX2* is expressed rapidly and transiently, with expression peaking at ~30 min and returning to baseline after 60 min (Figure 1A). The nuclear accumulation of a green fluorescent protein (GFP)–Yap1 fusion protein and its subsequent cytoplasmic redistribution paralleled the expression of *TRX2* (Figure 1B). Nuclear GFP–Yap1 staining was maximal 5 min after H₂O₂ treatment and was sustained for

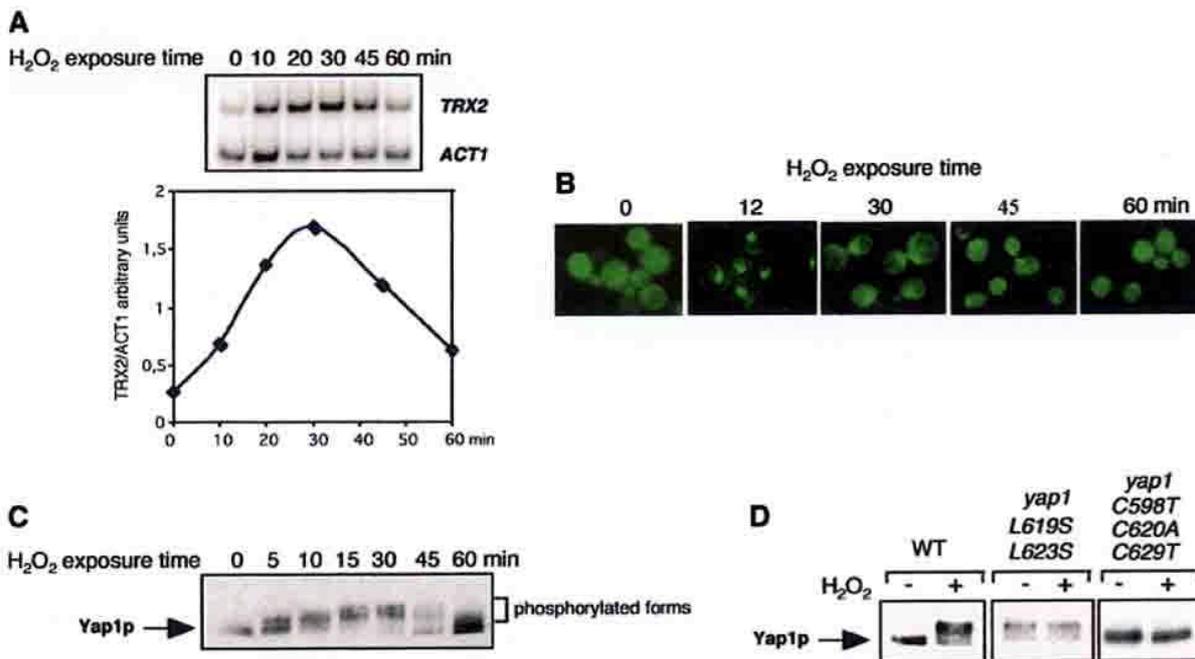


Fig. 1. Kinetics of Yap1 activation. (A) Expression of *TRX2*. Total RNA was isolated from a wild-type strain, grown to an OD₆₀₀ of 0.3 in selective minimal medium, before and 10, 20, 30, 45 and 60 min after treatment with 300 μ M H₂O₂, and *TRX2* and *ACT1* (control gene) mRNAs were quantified by RT-PCR. An autoradiogram of the separated ³²P-labelled PCR products is shown in the upper panel and a plot of the *TRX2/ACT1* signal ratio quantified on a PhosphorImager in the lower panel. (B) Nuclear redistribution of Yap1. A *Δyap1* strain expressing GFP-Yap1 at an OD₆₀₀ of 0.3, treated with 300 μ M H₂O₂ for the time indicated and analysed for GFP staining. (C) Yap1 phosphorylation. Extracts of a *Δyap1* strain expressing Myc-tagged Yap1 (yMyc-Yap1), before and 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min after treatment with 300 μ M H₂O₂ were immunoblotted with the anti-Myc monoclonal antibody after SDS-PAGE. (D) Yap1 phosphorylation correlates with Yap1 nuclear localization. *Δyap1* strain cultures expressing Myc-Yap1, Yap1^{L619S.L623S} or Yap1^{C598T.C620A.C629T}, before and 20 min after H₂O₂ treatment, were processed as in (C).

30 min. After 45 min, nuclear staining was half-maximal; after 60 min, it was indistinguishable from that of untreated cells. Yap1 activation also correlated with an altered migration of the protein on SDS-polyacrylamide gels. Within 5 min of H₂O₂ treatment, Myc-tagged Yap1 was shifted to more slowly migrating bands and this migration shift persisted for 1 h, being maximal at 30 min (Figure 1C). This migration shift must have been caused by protein phosphorylation, because it disappeared when extracts were treated with calf intestinal phosphatase (not shown). Yap1 phosphorylation could occur in the nucleus as suggested by (i) its kinetics, (ii) the constitutive phosphorylation of a constitutively nuclear mutant Yap1^{L619S.L623S} and (iii) its absence in the constitutively cytoplasmic mutant Yap1^{C598T.C620A.C629T} (Figure 1D). Therefore, although its role is not elucidated, phosphorylation of Yap1 correlates with its presence in the nucleus.

Yap1 becomes oxidized upon exposure to H₂O₂

The non-inducible nature of the cytoplasmic Yap1^{C598T.C620A.C629T} mutant demonstrated the importance of the C-terminal cysteines in Yap1 control and further suggested that Yap1 could be activated by direct oxidation. To test this hypothesis, we established a method to analyse directly the *in vivo* redox state of Yap1. If oxidation leads to covalent modification of Yap1, a change in conformation might be detectable by electrophoresis

under non-reducing conditions, as previously shown for OxyR (Tao, 1999). After H₂O₂ treatment, yeast cells were lysed with trichloroacetic acid (TCA) to protonate all free thiols and the precipitated proteins were re-solubilized with excess iodoacetamide to alkylate free thiols irreversibly and prevent their subsequent oxidation. As suspected, Yap1 from H₂O₂-treated cells migrated more quickly than the protein from untreated cells under non-reducing conditions (Figure 2A, lanes 1 and 2). However, this mobility shift was not seen when the extract was treated with 200 mM DTT prior to iodoacetamide (Figure 2A, lanes 3 and 4) or after electrophoresis under reducing conditions (Figure 2B). These data demonstrate that the more quickly migrating species observed under non-reducing conditions is an oxidized form of Yap1. Cellular treatment with *t*-butyl hydroperoxide, an organic peroxide, resulted in a similar oxidation-dependent electrophoretic migration shift (Figure 2A, lanes 5 and 6). We next performed a time-course analysis of the Yap1 redox status after H₂O₂ treatment. In this experiment, Yap1 was dephosphorylated *in vitro* to prevent an offset of the redox-dependent migration by the shift induced by phosphorylation. The oxidized form was observed as early as 2.5 min after H₂O₂ treatment and disappeared at 60 min (Figure 2B). The minimum concentration of H₂O₂ required to detect oxidized Yap1 was 100 μ M and the amount of the oxidized form increased with increasing

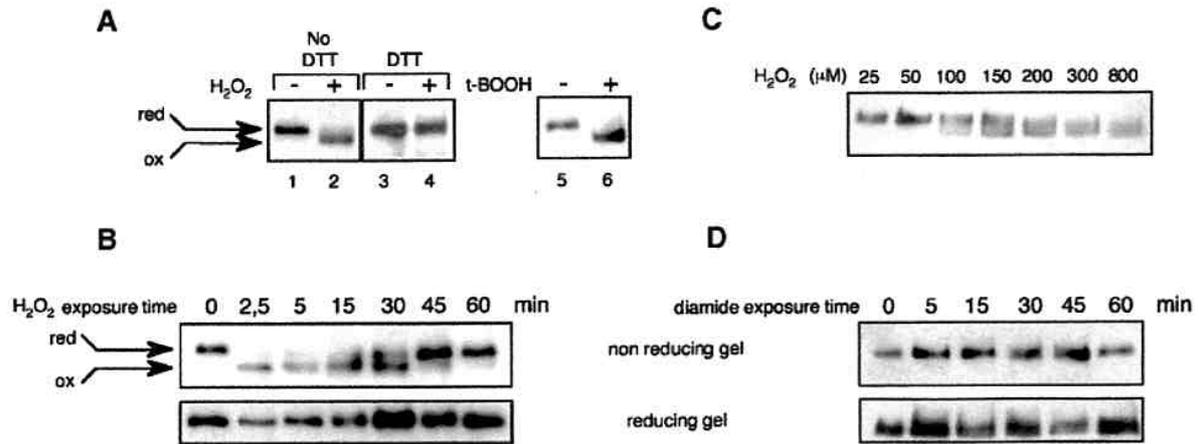


Fig. 2. *In vivo* oxidation of Yap1. (A) yMyc-Yap1 cultures (grown to an OD₆₀₀ of 0.4) before and after 2.5 min treatment with 400 μM H₂O₂ (lanes 1 and 2) or 1 mM *t*-butyl hydroperoxide (lanes 5 and 6) were lysed using TCA, treated with iodoacetamide and immunoblotted after non-reducing SDS-PAGE. Lanes 3 and 4 are the same as lanes 1 and 2 except that the TCA-precipitated protein pellet was dissolved in the presence of 200 mM DTT, before adding a 3.2 M excess of iodoacetamide. (B) Time course of Yap1 oxidation by H₂O₂. A yMyc-Yap1 culture before and 2.5, 5, 15, 30, 45 and 60 min after treatment with 400 μM H₂O₂, processed as in (A) (lanes 1 and 2), except that Yap1 was dephosphorylated and separated under non-reducing or reducing conditions as indicated. (C) The minimum H₂O₂ concentration required to oxidize Yap1 *in vivo*. A yMyc-Yap1 culture treated for 5 min with 25, 50, 100, 150, 200, 300 and 800 μM H₂O₂ and processed as in (A) (lanes 1 and 2). (D) Time-course analysis of Yap1 redox status in response to diamide. A yMyc-Yap1 culture before and 5, 15, 30, 45 and 60 min after treatment with 2 mM diamide, processed as in (A) (lanes 1 and 2) and separated under non-reducing or reducing conditions as indicated.

H₂O₂ concentration (Figure 2C). Therefore, the appearance of the oxidized form of Yap1 was well correlated with the kinetics of Yap1 activation.

Since diamide can also activate Yap1-target gene expression and Yap1 nuclear redistribution (Kuge and Jones, 1994; Kuge *et al.*, 1997), we monitored the *in vivo* redox status of Yap1 after treatment with this oxidant. Unexpectedly, ≤ 1 h after treatment with 2 mM diamide, a concentration able to activate Yap1 fully (not shown), we did not observe the redox-dependent migration shift of Yap1 observed on non-reducing PAGE after treatment with H₂O₂ (Figure 2D). The redox-dependent migration shift was not observed with higher concentrations of diamide (≤ 10 mM). These experiments indicate that treatment with H₂O₂ or *t*-butyl hydroperoxide, but not diamide, results in a distinctive oxidation-dependent change of conformation of Yap1 and suggest different modes of activation of Yap1 by these oxidants.

Cysteine residues important for the *in vivo* oxidation of Yap1

The residues important for the peroxide-induced redox-dependent mobility shift were identified by analysing Yap1 cysteine substitution mutants (Figure 3). The Yap1^{C598T,C620A,C629T} constitutive cytoplasmic allele and a mutant allele, Yap1^{C303A,C310A,C315A}, with alanine substitutions for all three N-terminal cysteine residues could not reproduce the redox-dependent mobility shift observed under non-reducing PAGE (Figure 3B), demonstrating that one or more cysteines of both the N- and C-terminal parts of the protein are required for the formation of the oxidized form of Yap1. Analysis of individual cysteine to alanine substitution mutants showed that of the six cysteines of Yap1, only C303 and C598 were required

for the occurrence of the oxidized form (Figure 3C). These two residues were also sufficient for the occurrence of the oxidized form of Yap1 since a mutant protein with substitution of all four other cysteines, Yap1^{C310T,C315A,C620A,C629T}, retained the redox-dependent mobility shift observed with the wild-type protein (Figure 3C). However, it is noteworthy that Yap1^{C310A} and Yap1^{C310T,C315A,C620A,C629T}, and, to a lesser degree, Yap1^{C629A}, could not be fully oxidized, suggesting that C310 might play an accessory role in the oxidation of C303 and C598.

Cysteine C303 and C598 are essential for the regulation of Yap1 by H₂O₂

The importance of C303 and C598 for the *in vivo* oxidation of Yap1 by H₂O₂ suggested that these two amino acid residues are essential for the regulation of Yap1 by this oxidant. This suggestion was tested by investigating the capacity of cysteine substitution mutants to rescue the H₂O₂ hypersensitivity of the $\Delta yap1$ strain (Figure 4A). Yap1^{C315A} and Yap1^{C620A} had a wild-type H₂O₂ tolerance phenotype. All the other cysteine mutants were defective in this assay, with Yap1^{C303A} and Yap1^{C310A} displaying the highest sensitivity. The Yap1 cysteine mutants were also tested for their capacity to activate *TRX2* expression (Figure 4B and C) and to redistribute into the nucleus in response to H₂O₂ (Figure 5A). Again, in both assays, Yap1^{C315A} and Yap1^{C620A} had a wild-type phenotype. In contrast, Yap1^{C303A} and Yap1^{C598A} were unable to activate *TRX2* transcription and did not redistribute to the nucleus upon H₂O₂ treatment. Yap1^{C310A} and Yap1^{C629A} had a more complex phenotype. In these mutants, slight expression of *TRX2* was seen 1 h after H₂O₂ treatment. Yap1^{C310A} had an inefficient and delayed H₂O₂-induced redistribution

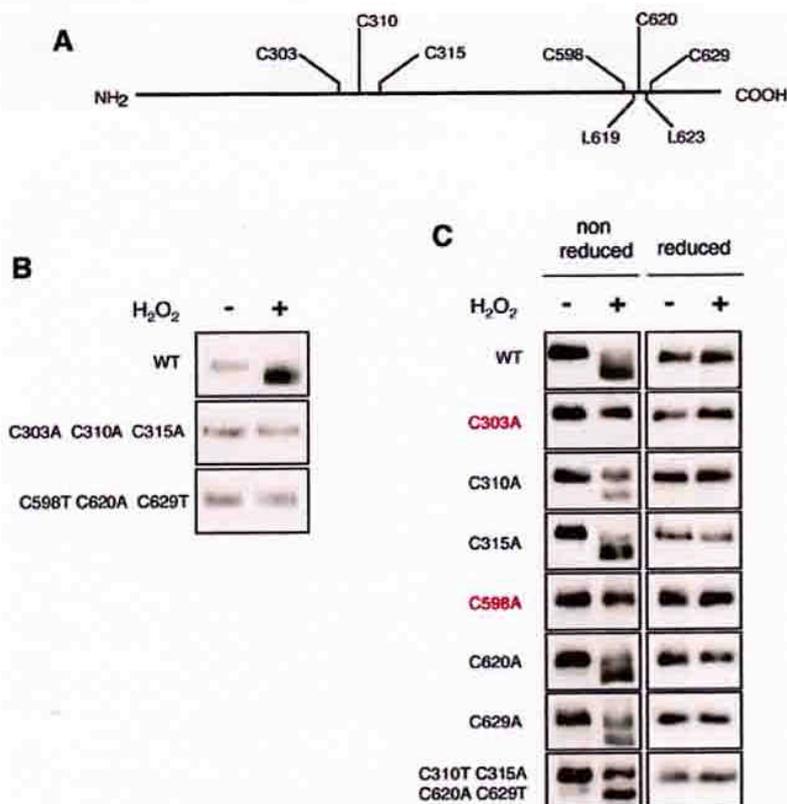


Fig. 3. Identification of Yap1 redox-active cysteines. (A) Schematics of Yap1. (B) Both N- and C-terminal cysteines are required to oxidize Yap1. *Δyap1* strain cultures expressing Myc-Yap1, Yap1^{C303A,C310A,C315A} or Yap1^{C598T,C620A,C629T} before and 5 min after treatment with 400 μM H₂O₂ were processed as in Figure 2A (lanes 1 and 2) and immunoblotted after non-reducing SDS-PAGE. (C) Cysteines C303 and C598 are the redox-active Yap1 cysteines. *Δyap1* strain cultures expressing Myc-Yap1, Yap1^{C303A}, Yap1^{C310A}, Yap1^{C315A}, Yap1^{C598A}, Yap1^{C620A} or Yap1^{C629A}, and Yap1^{C310T,C315A,C620A,C629T} before and 5 min after H₂O₂ treatment, as in Figure 2B and immunoblotted after non-reducing or reducing SDS-PAGE, as indicated.

to the nucleus and Yap1^{C629A} had a partial constitutive nuclear phenotype but further concentrated in the nucleus after H₂O₂ treatment. The ability of cysteine mutants to redistribute to the nucleus was confirmed by their phosphorylation pattern (Figure 5B). Yap1^{C315A} and Yap1^{C620A} had a wild-type phosphorylation pattern whereas Yap1^{C303A} and Yap1^{C598A} did not undergo phosphorylation. Yap1^{C310A} and Yap1^{C629A} retained an inducible but lower phosphorylation level. Other Yap1 substitutions, C303S, C310S, C310T, C598S, C629S and C629T, were analysed and produced phenotypes similar to the corresponding C→A substitutions in all functional assays tested.

The critical role of C303 and C598 is at the level of the Crm1–Yap1 interaction

The data above demonstrate the critical role of the Yap1 N-terminal C303 and the C-terminal C598 in the activation of Yap1 by H₂O₂, probably due to their oxidation to a disulfide bond resulting in a change of conformation masking recognition of the Yap1 NES by Crm1. To provide further support for this model, we sought to evaluate whether the defective nuclear redistribution of Yap1^{C303A} and Yap1^{C598A} was due to their maintained

interaction with Crm1/Xpo1 under oxidative stress conditions, using a two-hybrid assay. As shown by Kuge *et al.* (1997) and Yan *et al.* (1998), Crm1 and full-length Yap1 interact in the two-hybrid assay. This interaction has also been shown to be sensitive to diamide (Yan *et al.*, 1998). We therefore evaluated the effect of H₂O₂ on the interaction between CRM1–LexA^{BD} and either full-length Yap1–B42^{AD}, Yap1^{C303A}–B42^{AD} or Yap1^{C598A}–B42^{AD} (Figure 6). Whereas the interaction of Crm1 with wild-type protein was, as expected, sensitive to H₂O₂, interaction of Crm1 with both Yap1^{C303A} and Yap1^{C598A} was not modified by this treatment. These data demonstrate that the effect of these two mutations is exerted at the level of the interaction between Yap1 and Crm1.

Yap1 is deactivated (reduced) by the thioredoxin system

The data presented demonstrate that activation of Yap1 by H₂O₂ involves the oxidation of the protein to a probable disulfide bond, indicating that this regulator might directly sense the increased levels of H₂O₂. In yeast, the H₂O₂-sensing mechanism might be coupled to the systems that control the cell redox status, as in *Escherichia coli* (Zheng *et al.*, 1998). To explore this possibility, Yap1 activation

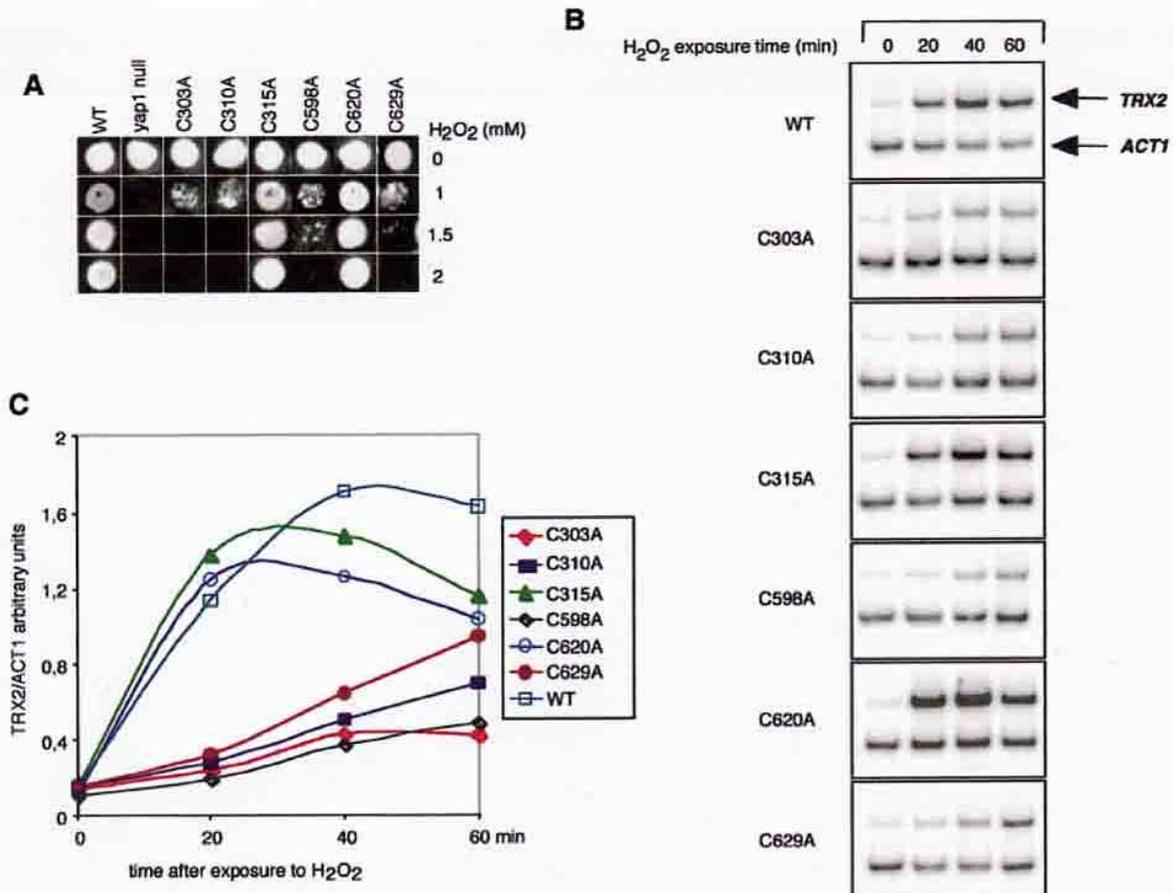


Fig. 4. Activity of Yap1 cysteine substitution mutants. (A) Yap1 cysteine residues important for tolerance to H₂O₂. The *Yap1* strains not expressing or expressing Myc-Yap1, Yap1^{C303A}, Yap1^{C310A}, Yap1^{C315A}, Yap1^{C598A}, Yap1^{C620A} or Yap1^{C629A} were tested for their tolerance to increasing concentrations of H₂O₂ by the patch assay on solid medium. (B) The same strains as in (A) were used to measure the amount of *TRX2* and *ACT1* mRNAs by RT-PCR as in Figure 1A. Cells were treated with 300 μ M H₂O₂ for the time indicated. (C) The *TRX2*/*ACT1* signal ratios quantified from the RT-PCR shown in (B) on a PhosphorImager were calculated and plotted as a function of time of exposure to H₂O₂.

was monitored in strains carrying mutations of the two main cellular thiol disulfide reducing pathways (Figure 7). The GSH pathway was tested with strains deleted for the glutathione reductase gene *GLR1* (*Δglr1*), or for both glutaredoxin genes *GRX1* and *GRX2* (*Δgrx1Δgrx2*), and with the *Δgsh1pro2-1Δglr1* strain. The latter strain lacks the γ -glutamyl cysteine synthase gene (*GSH1*), encoding the rate-limiting enzyme of glutathione synthesis, and the glutathione reductase gene (*GLR1*), and harbours a third mutation in the proline biosynthesis enzyme gene *PRO2*, which restores the synthesis of GSH to ~0.5% of the wild-type cellular content (our unpublished observations). The thioredoxin pathway was tested with strains lacking the thioredoxin reductase gene *TRR1* (*Δtrr1*), or both thioredoxin genes *TRX1* and *TRX2* (*Δtrx1Δtrx2*). The time-course-induced expression of *TRX2* and *TRR1* in response to H₂O₂ was similar to that of the wild-type strain in *Δglr1*, *Δgsh1pro2-1Δglr1* (Figure 7A and B) and *Δgrx1Δgrx2* (not shown). By contrast, in strains inactivated in the thioredoxin pathway, Yap1 was constitutively partially active (~20–50%), further activated after H₂O₂

treatment and remained maximally active after 2 h. This deregulated gene expression was specific to Yap1, since only the proteins of the Yap1 regulon were constitutively high in *Δtrx1Δtrx2*, as shown by two-dimensional gel electrophoresis (data not shown). We also monitored Yap1 activity in a strain deleted for *TSA1* (*Δtsa1*), which encodes a thioredoxin-dependent thiol peroxidase (Chae *et al.*, 1994). In this strain, Yap1 was not activated constitutively, but activation by H₂O₂ was prolonged (Figure 7A and B). However, Yap1 activity still decreased to baseline levels after ~1.5 h, suggesting that the deregulation of Yap1 observed in the thioredoxin mutants is not solely related to a strain-intrinsic peroxide-scavenging defect, but to a lack of a direct effect of thioredoxins on the protein redox status. Consistent with the deregulated expression of Yap1-target genes, Yap1 was constitutively partially oxidized in *Δtrr1* and *Δtrx1Δtrx2* (Figure 7C). Deregulation was also correlated with a constitutive nuclear localization of Yap1 in *Δtrr1* and *Δtrx1Δtrx2*, but not in mutants of the GSH pathway or in the *Δtsa1* strain (Izawa *et al.*, 1999; data not shown).

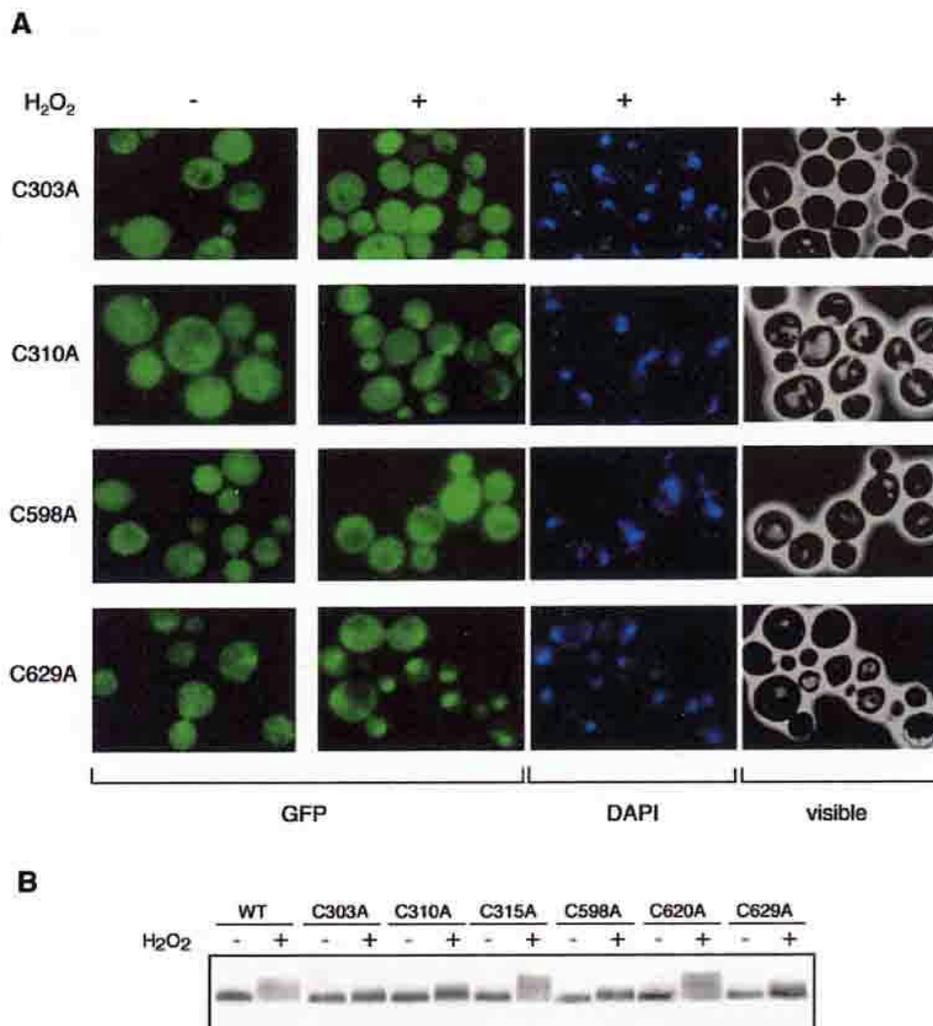


Fig. 5. Essential role of C303 and C598 for H₂O₂-induced Yap1 nuclear redistribution. (A) Analysis of the cellular distribution of GFP-tagged Yap1^{C303A}, Yap1^{C310A}, Yap1^{C598A} and Yap1^{C629A}. Cells taken before or 12 min after treatment with 300 μ M H₂O₂ were analysed for GFP or DAPI staining or under visible light. (B) Phosphorylation of Yap1 cysteine mutants as an indicator of their subcellular localization. *Yap1* cultures expressing Myc-Yap1, Yap1^{C303A}, Yap1^{C310A}, Yap1^{C315A}, Yap1^{C598A}, Yap1^{C620A} or Yap1^{C629A} were taken before and after treatment with 300 μ M H₂O₂ and processed as in Figure 1C.

Because thioredoxins are known to catalyse protein disulfide bond reduction by NADPH-dependent thioredoxin reductase, they could catalyse the reduction (deactivation) of oxidized Yap1. To test this hypothesis, we incubated extracts containing oxidized Yap1 with increasing amounts of thioredoxin, thioredoxin reductase and NADPH. The oxidation-dependent shift of migration was completely eliminated within 30 min in the presence of 20 μ M thioredoxin (Figure 7D).

Discussion

Yap1 as the yeast H₂O₂ sensor

The data presented here establish that the Yap1 transcription factor is activated by oxidation within minutes of H₂O₂ treatment and therefore fulfils the function of a redox sensor. These data also provide evidence for an

oxidation-induced change of conformation of Yap1, and the requirement of residues C303 and C598 in its formation. This requirement, and the lack of H₂O₂ reactivity of Yap1^{C303A} and Yap1^{C598A}, establish that C303 and C598 are part of the Yap1 redox centre. Although a glutathione mixed disulfide or a sulfenic acid are possible cysteine oxidation products, C303 and C598 probably oxidize to form an intramolecular disulfide bond. The prolonged activation of Yap1 in mutants of the thioredoxin pathway and the ability of thioredoxin to catalyse Yap1 reduction *in vitro* indicate that the thioredoxin system acts to deactivate (reduce) Yap1, which is consistent with the presence of a disulfide bond in its oxidized form. Since both *TRX2* and *TRR1* are targets of Yap1, activation of the pathway by H₂O₂ is auto-regulated. These data substantiate the presence of a disulfide bond in oxidized Yap1, but the participation of

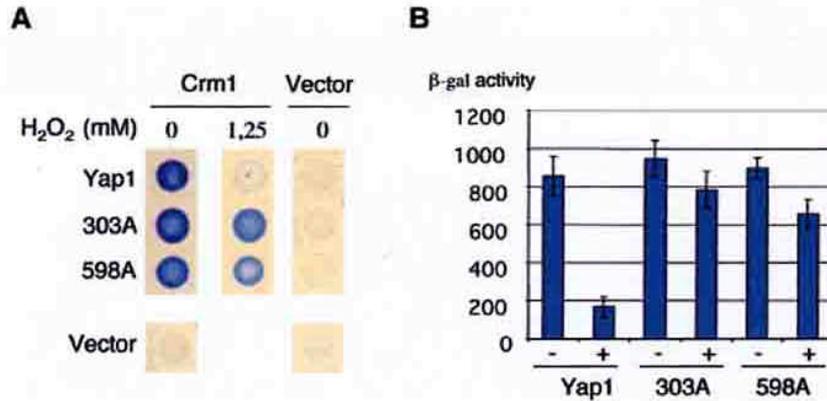


Fig. 6. The critical role of C303 and C598 is at the level of Crm1–Yap1 interaction. β -galactosidase production from a *lacZ* reporter gene was assayed in strain EGY48 carrying pKW442 (*Crm1-lexA^{BD}*) or pEG202 (empty vector) and one of the following: pLDB439 (YAP1-B42^{AD} or pYAP1^{C303A}-B42^{AD}), pYAP1^{C598A}-B42^{AD} or pJG4-5 (empty vector). (A) Assay performed on solid medium in the absence or presence of H₂O₂ at the concentration indicated. (B) Assay performed on liquid medium in the absence (-) or presence (+) of 500 μ M H₂O₂. The results are the averages of four independent experiments.

a metal or another prosthetic group in its redox-active centre cannot be ruled out. Of the other cysteines of Yap1, C315, C620 and C629 do not appear essential for redox sensing. However, C620 and C629 might be important in Yap1 control by being close to or part of the NES (Kuge *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 1999). In the case of C620, an alanine substitution appears to be tolerated for NES function (this work), whereas a threonine substitution is not (Kuge *et al.*, 1997). Similarly, an alanine substitution of C629 partially disrupts the NES function (Coleman *et al.*, 1999; this work) while a threonine substitution has a wild-type phenotype (Kuge *et al.*, 1997). The depressed activity of Yap1^{629A} is similar to the previously observed, but not understood, decreased activity towards H₂O₂ of all nuclear constitutive Yap1 alleles tested (Kuge *et al.*, 1997; Coleman *et al.*, 1999; data not shown). The role of C310 is more complex. As the corresponding substitution mutant can reproduce the oxidation-dependent electrophoretic migration shift and is still capable of redistributing to the nucleus upon H₂O₂ treatment, this cysteine residue is dispensable for redox sensing. One remarkable phenotype of Yap1^{C310A} is its inefficient oxidation and delayed nuclear redistribution, which suggests that C310 could have a role in the formation of the oxidized conformation, perhaps by modifying the vicinal electronic environment if this residue becomes partially oxidized to a sulfenate upon exposure to H₂O₂. However, the profoundly decreased activity of Yap1^{C310A} may also indicate another undefined functional role for the domain containing this residue (Coleman *et al.*, 1999). Our data also showed that Yap1 becomes phosphorylated upon exposure to H₂O₂. This modification occurs outside the C-terminal CRD since it was still observed in a Yap1 truncated version lacking this domain (not shown). As it did not occur in mutants unable to redistribute to the nucleus, and was constitutive in a constitutive nuclear mutant (Figure 1), this modification probably occurs in the nucleus, and therefore at a step after protein oxidation, which is the critical event triggering Yap1 nuclear redistribution. Although its role is not understood, phosphorylation could be important by

providing a regulated interaction with other substrates or as a marker for protein degradation.

The data presented here establish that activation of Yap1 by H₂O₂ involves the critical oxidation of the N-terminal CRD C303 and the C-terminal CRD C598 probably to a disulfide bond, with the resulting change of conformation masking recognition of the Yap1 NES by Crm1/Xpo1, thereby promoting accumulation of Yap1 into the nucleus. This model would provide a new example of a protein regulated by reversible disulfide bond formation, as a way to respond rapidly to oxidative stress (Åslund and Beckwith, 1999).

The mechanisms by which H₂O₂ and diamide activate Yap1 are different

The model proposed above seems to contradict studies that analysed the activation of Yap1 by diamide (Kuge *et al.*, 1997, 1998; Yan *et al.*, 1998). In particular, Kuge *et al.* (1997) showed that the Yap1 C-terminal CRD by itself could confer regulated nuclear redistribution to a reporter protein in response to diamide, while Yan *et al.* (1998) showed that any one of the C-terminal cysteines was required for the diamide regulation of Yap1. These published data clearly rule out involvement of disulfide bond formation between N- and C-terminal cysteine in the activation of Yap1 by diamide. This apparent contradiction could indicate, as pointed out by Wemmie *et al.* (1997), that there is a difference in the mechanism by which H₂O₂ and diamide activate Yap1. This is now clearly demonstrated by lack of the H₂O₂-induced redox-dependent migration shift upon diamide treatment (Figure 2), indicating that this oxidant does not generate the H₂O₂ oxidation product of C303 and C598. In addition, Yap1^{C303} and Yap1^{C598} still redistributed to the nucleus in response to diamide (data not shown), which demonstrates the specificity of their defective H₂O₂ response, and is consistent with the notion that any one cysteine can fulfil the required regulatory function needed in this process (Yan *et al.*, 1998). In conclusion, we propose that diamide may activate Yap1 by direct modification of one or more C-terminal cysteines, perhaps by creation of a stable

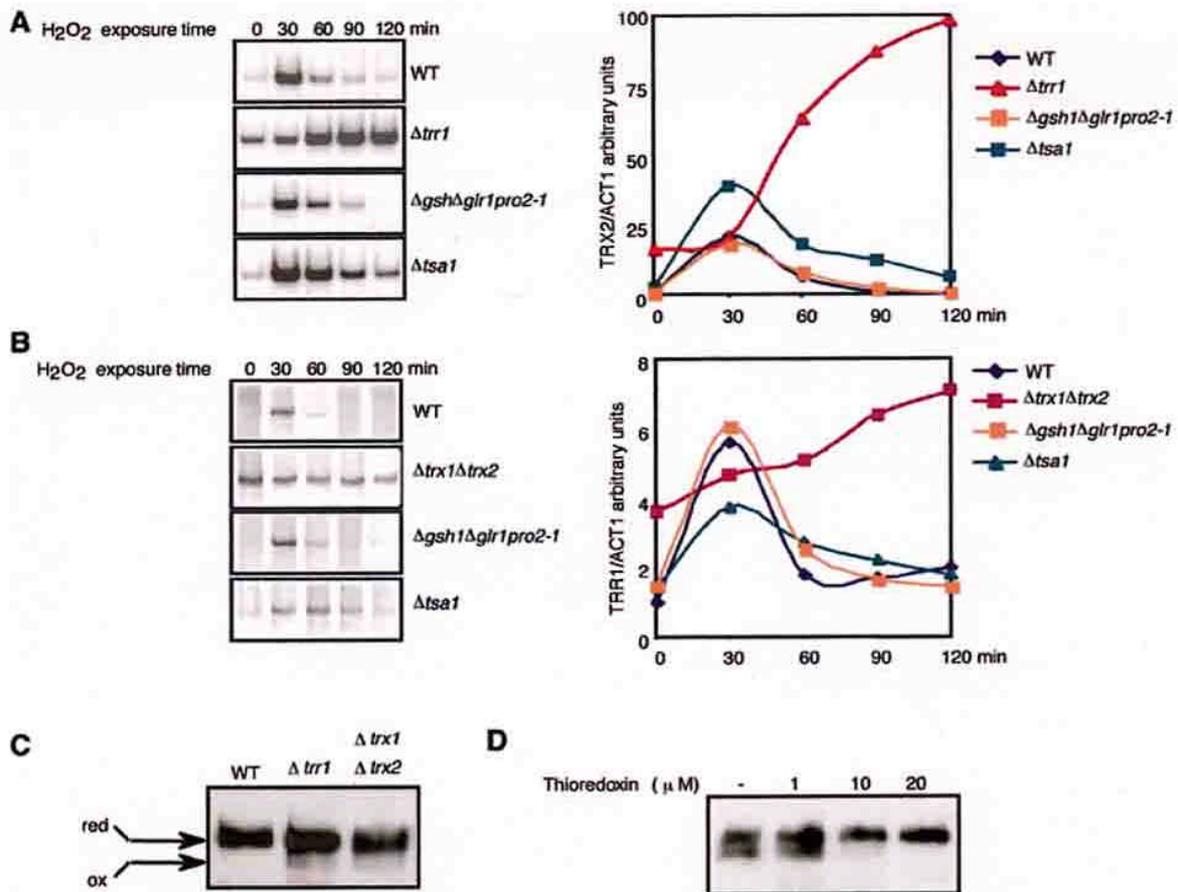


Fig. 7. Deactivation (reduction) of Yap1 by the thioredoxin system. (A and B) Expression of *TRX2* (A) and *TRR1* (B) in wild-type, *Δtrr1* (A), *Δtrx1Δtrx2* (B), *Δgsh1Δglr1pro2-1* and *Δtsa1* strains. Cells were treated with 300 μ M H_2O_2 for the indicated time and processed for RT-PCR as in Figure 1A. The *ACT1* autoradiograms are not shown. (C) Yap1 is oxidized in mutants of the thioredoxin system. yMyc-Yap1, *Δtrx1Δtrx2* and *Δtrr1* expressing Myc-Yap1 (grown to an OD_{600} of 0.3) were processed as in Figure 2A and extracts were analysed by immunoblotting after non-reducing PAGE. (D) Reduction of oxidized Yap1 by the thioredoxin system. yMyc-Yap1 (grown to an OD_{600} of 0.4), treated with 400 μ M H_2O_2 , lysed with glass beads in 100 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, complete protease inhibitors and PMSF. Twenty-five micrograms of extracts were incubated with 1, 10 or 20 μ M thioredoxin (from *Spirulina* sp.), 1.3 μ M *E.coli* thioredoxin reductase and 1 mM NADPH (Sigma) for 30 min at 37°C. Iodoacetamide (75 mM) was added and the samples were analysed by immunoblotting after non-reducing PAGE.

sulfenylhydrazine thereby modifying the vicinal NES and, hence, the recognition of Yap1 by Crm1.

Conservation of the H_2O_2 -sensing mechanism between eukaryotes and prokaryotes

The two best characterized oxidative stress sensors are the *E.coli* transcriptional regulators OxyR and SoxR. SoxR is activated by reversible one-electron oxidation of its iron-sulfur centres in response to superoxide-generating compounds or nitric oxide (Gaudu *et al.*, 1997; Hidalgo *et al.*, 1997). OxyR is directly activated by H_2O_2 through formation of an intramolecular disulfide bond, and is deactivated by glutaredoxins (Zheng *et al.*, 1998). Therefore, Yap1 and OxyR appear functionally homologous. Both activators control activities important for cellular thiol redox control and for scavenging reactive oxygen species (Lee *et al.*, 1999a; Zheng and Storz, 2000) and share the function of sensing increased H_2O_2 levels. The quite different molecular control of these regulators,

which is exerted at the level of the subcellular localization of the protein in the case of Yap1 (Kuge and Jones, 1997) and at the level of promoter selection and DNA binding in the case of OxyR (Toledano *et al.*, 1994), reflects the greater cellular complexity in eukaryotes compared with prokaryotes. However, the biochemical modifications that reversibly activate these regulators, involving disulfide bond formation and deactivation by a thioltransferase system, appear to be conserved. Furthermore, although OxyR is preferentially deactivated by the glutathione pathway and Yap1 by the thioredoxin pathway, in both cases the whole system is autoregulated since each factor is deactivated by its target genes. It will still be important to demonstrate directly the presence of a disulfide bond in oxidized Yap1, and whether Yap1, like OxyR (Åslund *et al.*, 1999), is directly oxidized by H_2O_2 . We indeed do not rule out the possibility that another molecule acts to transduce the H_2O_2 redox potential to Yap1, in the same way as protein disulfide isomerase transmits the reducing

equivalent generated during photosynthesis to the chloroplast polyadenylate binding protein, cPABP (Kim and Mayfield, 1997).

Yap1 does not sense GSH/GSSG status

Apart from their conserved features, significant differences could exist between the prokaryotic and eukaryotic redox sensing systems. OxyR can sense the cellular thiol-disulfide status, in addition to sensing H₂O₂. This disulfide stress sensing is based on OxyR constitutive activation in *E. coli* mutants simultaneously compromised in both thioredoxin and GSH pathways, and was proposed to explain OxyR activation by diamide (Åslund *et al.*, 1999). However, the data presented here do not support that conclusion for Yap1. We observed that Yap1 is only constitutive in mutants of the thioredoxin pathway, but not in mutants of the GSH pathway. This could be interpreted as meaning that, in yeast, the drop in the cellular redox status needed to activate Yap1 is achieved after inactivation of the thioredoxin but not the glutathione pathway. However, this possibility can be ruled out by the status of the thiol-disulfide balance, which is more oxidized in mutants of the GSH pathway. Indeed, the percentage of oxidized GSH (GSSG), which is thought to be the best index of the cellular thiol redox balance, was 54% in *Δgtr1* compared with 22% in *Δtrx1Δtrx2*; in wild type the proportion of GSSG was <5% (not shown), as shown previously (Muller, 1996). Alternatively, the constitutive activation of Yap1 in mutants of the thioredoxin pathway could be interpreted as the sole consequence of the defective enzymatic deactivation of oxidized protein, which accumulates as a result of endogenous production of reactive oxygen species, and not as re-equilibration of Yap1 with an oxidizing cellular redox environment. This hypothesis would be consistent with the idea that diamide, although dramatically shifting the GSH/GSSG ratio towards its oxidized form (Kosower and Kosower, 1995; data not shown), activates Yap1 not through this perturbation, as proposed for OxyR (Åslund *et al.*, 1999), but directly, as discussed above. We conclude that Yap1 has evolved to sense increased peroxide levels but not the GSH redox balance.

Materials and methods

Strains and culture conditions

Most of the experiments were performed with the wild-type strain YPH98 (Sikorski and Hieter, 1989) (*Matra ura3-52 lys2-801^{amber} ade2-101^{ochre} trp1Δ1 leu2Δ1*) and its isogenic derivatives. The *Yap1*, *Δgtr1*, *Δtsa1*, *Δgsh1* and *Δtrr1* strains were described previously (Lee *et al.*, 1999b). *Δtrx1Δtrx2* was prepared by a one-step amplification protocol that successively replaced the entire *TRX1* and *TRX2* open reading frames (ORFs) with the *TRP1* and *kanamycin* genes, respectively. *Δgsh1pro2-1Δgtr1* is the *Δgsh1* strain carrying a *PRO2* mutation that rescues the strain's GSH auxotrophy by allowing the synthesis of traces of GSH (0.5% of the wild-type GSH content as determined by a microbiological assay and by thin layer chromatography after [³⁵S]methionine pulse labelling) and a deletion of the entire *GLR1* ORF replaced by *URA3*. The *pro2-1* suppressor mutation acts by diverting the γ-glutamyl synthesized in the first step of the proline biosynthetic pathway into the synthesis of GSH (D.Spector and M.B.Toledano, unpublished observations). Given the GSH auxotrophy of the *Δgsh1* mutation, the *pro2-1* suppressor mutation ensures the presence of very low and constant levels of GSH on minimal medium. *Δgrx1*, *Δgrx2* and the double deletion *Δgrx1Δgrx2* are not isogenic with YPH98 and were a gift from Dr C.Grant (UMIST, Manchester) (Luikenhuis *et al.*, 1998). EGY48 (*Matra ura3-52 his3*

LEXA_{optX69}-LEU2 <pSH18-34 *URA3* 2μ>) (R.Brent) was used for the two-hybrid assay. The minimal medium (SD) was yeast nitrogen base (6.7 g/l) and dextrose (20 g/l) supplemented with the required amino acids. Dextrose can be replaced by 2% raffinose (S raffinose) or 2% galactose (S galactose). The H₂O₂ sensitivity assays were performed as described (Lee *et al.*, 1999a).

Preparation of cell extracts and western blot analysis

Pelleted cells were washed in 20% TCA, frozen and lysed by vortexing after adding glass beads and 12.5% TCA. The lysate was centrifuged and the precipitated pellet dissolved in 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 8.7, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, boiled and loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel (30:0.4 acrylamide:bisacrylamide). To monitor the Yap1 redox state, the TCA-precipitated pellet was washed in acetone, air dried, dissolved in 75 mM iodoacetamide, 1% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, complete protease inhibitors (Boehringer Mannheim) and incubated at 25°C for 15 min. Where indicated, Yap1 was dephosphorylated with 20 U calf intestinal phosphatase (New England Biolabs) for 45 min at 37°C, after dialysis of the resuspended iodoacetamide-treated protein pellet for 4 h against 10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂. Protein extracts were separated by non-reducing SDS-PAGE after adding 3× Laemmli sample buffer not containing β-mercaptoethanol and boiling. The separated proteins were blotted on to a nitrocellulose membrane and probed with the 9E10 anti-Myc monoclonal antibody; bound antibodies were detected using an enhanced chemiluminescence western blotting reagent kit (Amersham Pharmacia).

Analysis of cell GFP staining by immunofluorescence microscopy

Five minutes after addition of DAPI, cells were centrifuged, washed, resuspended in DABCO (75% glycerol, 0.25× phosphate-buffered saline, 200 mM diazabicyclooctane) and analysed with a Leica DMRXA fluorescent microscope equipped with a Roper Scientific Micro-Max cooled CCD camera and MetaMorph software (Universal Imaging, Inc.).

Two-hybrid assay

EGY48 carrying pSH18-34 (2μ plasmid carrying a *lacZ* reporter gene under the control of eight *lexA* operators) (Gyuris *et al.*, 1993) was transformed with PKW442 [CRM1-LexA^{BD} (Stade *et al.*, 1997)] or pEG202 (*lexA₍₁₋₂₀₂₎*) and one of the following: pJG4-5 [B42^{AD} haemagglutinin (HA) epitope tag TRP1], pLDB439 [YAP1-B42^{AD}; full-length Yap1 cloned between the *EcoRI* and *XhoI* sites (Yan *et al.*, 1998) of pJG4-5], pYAP1^{C303A}-B42^{AD} or pYAP1^{C598A}-B42^{AD}. The C303 and C598 mutations were introduced by cloning into YAP1-B42^{AD} a mutagenized fragment generated by the two-step PCR method and inserted in pLDB439 between the *BamHI* and *PacI* sites (C303) or between the *PacI* and *XhoI* sites (C598). To test interaction in liquid medium, cells pre-grown in 2% S raffinose lacking uracil, histidine and tryptophan were re-inoculated in the same medium to an OD₆₀₀ of 0.3–0.5 and were transferred to an equivalent volume of 2% S galactose for 30 min. Cells were then treated or not with H₂O₂ (500 μM) for 1 h. The β-galactosidase assay was performed as described (Miller *et al.*, 1972). To test interaction on solid medium, cells grown in 2% S raffinose were patched at a density of 4.5 × 10⁷ cells on solid 1% S raffinose/2% galactose medium and incubated for 2.5 h at 30°C. The assay was revealed by overlaying the cells with top agar containing X-gal (0.04%).

Construction of plasmids

Myc-Yap1 contains a Myc₃ epitope tag inserted at the unique *AccI* site, three codons downstream from the ATG, and is expressed from the centromeric pRS316 plasmid (Lee *et al.*, 1999b). A 1.17 kb fragment encoding the C303A, C310A and C315A substitutions, amplified from PldB583 (a gift from L.Davis, Brandeis University) (Yan *et al.*, 1998), was recombined to Myc-Yap1 by gap repair, resulting in Yap1^{C303A,C310A,C315A}. A 327 bp *NdeI*-*PacI* fragment of PldB518 encoding the C598T, C620A and C629T substitutions (Yan *et al.*, 1998) was subcloned into Myc-Yap1, resulting in Yap1^{C598T,C620A,C629T}. Yap1^{L619S,L623S}, Yap1^{C303A}, Yap1^{C310A}, Yap1^{C598A}, Yap1^{C620A}, Yap1^{C629A} and Yap1^{C315A} were prepared by a two-step PCR method and the mutagenized fragments were introduced into Myc-Yap1 by gap repair. GFP-Yap1 is a GFP N-terminal fusion expressed from vector pRS cp-GFP HA-YAP1 GFP (*TRP1*, *CEN6*-ARSH4) (a gift from S.Kuge, University of Tokyo) (Kuge *et al.*, 1997). GFP-Yap1 fusions carrying individual C→A mutations were prepared by subcloning the corresponding mutagenized fragments into the *BamHI* and *BstEII* sites of pRS

cp-GFP HA-YAP1. All the constructs used in this study were sequenced completely.

Quantitative RT-PCR assays

Total RNA was isolated as described by Lee *et al.* (1999b). RT-PCR assays were performed as described by Godon *et al.* (1998). cDNAs were synthesized by random hexanucleotide-primed reverse transcription from 1 µg of total RNA. Quantitative PCR was performed using primers specific for *TRX2* (CGTCACTCAATTAAAATCCGCTTC, GGAAGC-AATAGCTTGCTTGCTTGATAGC), *TRR1* (CCAGGGCAGAAA-TCAAGCCAATCC, ATAAACCGTGACTGGCAAATCGG) and *ACT1* (TTGGATTCCGGTGATGGTGTTACT, TGAAGAAGATTG-AGCAGCGGTTTG). ³²P-labelled PCR products were separated on a native polyacrylamide gel, dried, exposed to autoradiography film and quantified on a PhosphorImager.

Acknowledgements

We are indebted to Scott Moye-Rowley, Shusuke Kuge, Laura Davis and Karsten Weis for reagents, Jean Labarre for two-dimensional gel analysis and Dan Spector for measuring GSH redox balance. We especially thanks Françoise Stutz for her gifts of plasmids and Christophe Créminon for the 9E10 monoclonal antibody. Many thanks to Jean-Marie Buhler, Jean Labarre, Carl Mann, André Sentenac and Daniel Spector for critical review of the manuscript. This work was supported by grants from the French Ministère de l'Éducation Nationale and l'Association pour la Recherche contre le Cancer (no. 9575) to M.B.T.

References

Åslund, F. and Beckwith, J. (1999) Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell*, **96**, 751–753.
 Åslund, F., Zheng, M., Beckwith, J. and Storz, G. (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 6161–6165.
 Chac, H.Z., Chung, S.J. and Rhee, S.G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.*, **269**, 27670–27678.
 Coleman, S.T., Epping, E.A., Steggerda, S.M. and Moye-Rowley, W.S. (1999) Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 8302–8313.
 Gaudu, P., Moon, N. and Weiss, B. (1997) Regulation of the soxRS oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 5082–5086.
 Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B. and Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22480–22489.
 Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. and Brent, R. (1993) Cdi1, a human G₁ and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*, **75**, 791–803.
 Hidalgo, E., Ding, H. and Dimple, B. (1997) Redox signal transduction: mutations shifting [2Fe-2S] centers of the SoxR sensor-regulator to the oxidized form. *Cell*, **88**, 121–129.
 Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K., Mano, J., Inoue, Y. and Kimura, A. (1999) Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28459–28465.
 Kim, J. and Mayfield, S.P. (1997) Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translation activation. *Science*, **278**, 1954–1957.
 Kosower, N. and Kosower, E.M. (1995) Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol.*, **251**, 123–133.
 Kuge, S. and Jones, N. (1994) YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.*, **13**, 655–664.
 Kuge, S., Jones, N. and Nomoto, A. (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.*, **16**, 1710–1720.
 Kuge, S., Toda, T., Lizuka, N. and Nomoto, A. (1998) Crm1 (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells*, **3**, 521–532.
 Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J. and Toledano, M.B. (1999a) A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4537–4544.
 Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J. and Toledano, M.B. (1999b) Yap1 and Skn7 control two specialized

oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16040–16046.
 Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W. and Grant, C.M. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1081–1091.
 Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 Moye-Rowley, W.S., Harshma, K.D. and Parker, C.S. (1989) Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev.*, **3**, 283–292.
 Muller, E.G.D. (1996) A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 1805–1813.
 Schnell, N., Krems, B. and Entian, K.-D. (1992) The *PAR1(VAP1/SNQ3)* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr. Genet.*, **21**, 269–273.
 Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19–27.
 Stader, K., Ford, C.S., Guthrie, C. and Weis, K. (1997) Exportin (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*, **90**, 1041–1050.
 Tao, K. (1999) *In vivo* oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **457**, 90–92.
 Toledano, M.B., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P.T., Schneider, T.D. and Storz, G. (1994) Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell*, **78**, 897–909.
 Wemmie, J.A., Steggerda, S.M. and Moye-Rowley, W.S. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7809–7914.
 Yan, C., Lee, L.H. and Davis, L.I. (1998) Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.*, **17**, 7416–7429.
 Zheng, M. and Storz, G. (2000) Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 1–6.
 Zheng, M., Åslund, F. and Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, **279**, 1718–1721.

Received April 14, 2000; revised July 12, 2000;
 accepted August 3, 2000

ANNEXE 3

A Thiol Peroxidase Is an H₂O₂ Receptor and Redox-Transducer in Gene Activation

Agnès Delaunay,¹ Delphine Pflieger,²
Marie-Bénédicte Barrault,¹ Joelle Vinh,²
and Michel B. Toledano^{1,3}

¹Laboratoire Stress Oxydants et Cancers
SBGM
DBJC
CEA-Saclay
91191 Gif-sur-Yvette
Cedex
France

²Laboratoire de Neurobiologie et Diversité
Cellulaire
CNRS
UMR 7637
ESPCI
10, rue Vauquelin
75231 Paris
Cedex 05
France

Summary

The Yap1 transcription factor regulates hydroperoxide homeostasis in *S. cerevisiae*. Yap1 is activated by oxidation when hydroperoxide levels increase. We show that Yap1 is not directly oxidized by hydroperoxide. We identified the glutathione peroxidase (GPx)-like enzyme Gpx3 as a second component of the pathway, serving the role of sensor and transducer of the hydroperoxide signal to Yap1. When oxidized by H₂O₂, Gpx3 Cys36 bridges Yap1 Cys598 by a disulfide bond. This intermolecular disulfide bond is then resolved into a Yap1 intramolecular disulfide bond, the activated form of the regulator. Thioredoxin turns off the pathway by reducing both sensor and regulator. These data reveal a redox-signaling function for a GPx-like enzyme and elucidate a eukaryotic hydroperoxide-sensing mechanism. Gpx3 is thus a hydroperoxide receptor and redox-transducer.

Introduction

The concentration of reactive oxygen species (ROS) (hydroperoxides and superoxide anion) is narrowly set by changes in oxidant-scavenging enzymes levels that compensate for the continuous alterations in ROS production rates during growth and impromptu exogenous insults (Gonzalez-Flecha and Demple, 2000). This homeostatic control is essential to preserve cellular integrity. Specialized pathways that detect minimal increases in ROS intracellular concentration regulate this homeostasis, raising the important question of the biochemical mechanisms sensing and translating ROS signals into a coordinated output. Solutions to this question have been provided by the detailed characterization of the

prokaryotic OxyR and SoxR transcription factors that sense and transduce hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion signals, respectively (Kim et al., 2002; Pomposiello and Demple, 2001; Zheng et al., 1998).

In budding yeast, the bZip transcription factor Yap1 is a functional homolog of OxyR. Yap1-deleted strains are hypersensitive to H₂O₂ and t-butyl hydroperoxide (t-BOOH) due to their inability to elevate the expression of genes encoding most antioxidants and components of the cellular thiol-reducing pathways (Carmel-Harel et al., 2001; Gasch et al., 2000; Kuge and Jones, 1994; Lee et al., 1999). Yap1 also regulates the stress tolerance to other classes of compounds including the thiol oxidant diamide, the electrophile diethylmaleate, and cadmium (Kuge and Jones, 1994; Vido et al., 2000; Wu et al., 1993). Yap1 is primarily controlled by a redox-sensitive nuclear export regulating its nuclear accumulation upon activation (Delaunay et al., 2000; Kuge et al., 1997, 1998; Yan et al., 1998). Redox signals inhibit Yap1 export by causing modifications of its nuclear export signal (NES). These modifications differ in response to peroxides and diamide (Coleman et al., 1999; Delaunay et al., 2000; Kuge et al., 2001). Upon activation by H₂O₂, Yap1 is oxidized to an intra-molecular disulfide bond between Cys303 and Cys598, with the resulting change of conformation probably masking the Yap1 NES (Delaunay et al., 2000). The close correlation between Yap1 oxidation and activation further indicates that oxidation is the trigger for activation and suggests that Yap1 itself is a component of the cellular mechanism sensing H₂O₂. Activation of Yap1 by diamide does not lead to the formation of the Cys303-Cys598 disulfide bond (Delaunay et al., 2000), but instead to disulfide bonds between C-terminal cysteines C598, C620, and C629 which also probably modify the Yap1 NES (Kuge et al., 2001). Two important questions remain in the actual redox signals that are sensed by the Yap1 pathway and in the molecular events that lead from these signals to Yap1 oxidation.

Here, we demonstrate that Yap1 is not directly oxidized by hydroperoxide. We identify the thiol peroxidase Gpx3 as the hydroperoxide sensor that promotes the oxidation of Yap1 to its intra-molecular disulfide bond, the activated form of the regulator. This function of Gpx3 uncovers a tight coupling between the mechanisms of hydroperoxide sensing and scavenging. Our findings describe a redox-sensing mechanism in a eukaryote involving a receptor-initiated hydroperoxide signaling pathway based on a thiol oxidation cascade.

Results

Yap1 Is Transiently Disulfide-Linked to a 20 kDa Protein upon Activation by H₂O₂

Yap1 is activated by oxidation when cells are exposed to H₂O₂, but the way oxidation occurs is not understood (Delaunay et al., 2000). We analyzed the redox forms of Myc epitope-tagged Yap1 (Myc-Yap1) by Western blot with an anti-Myc antibody. Using the cysteine-trapping method, we previously showed that in H₂O₂-treated cells

³Correspondence: toledano@jonas.saclay.cea.fr

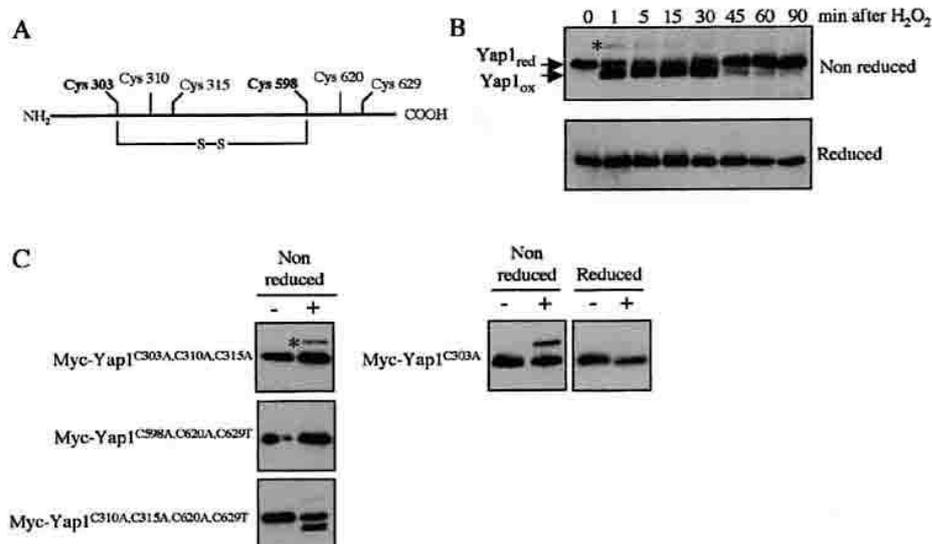


Figure 1. Yap1 Is Transiently Disulfide-Linked to a Small Protein upon Activation by H₂O₂
 (A) Schematics of Yap1 depicting its six cysteine residues and intra-molecular disulfide bond.
 (B) Analysis of the *in vivo* Yap1 redox state by an anti-Myc immunoblot. Crude extracts from a $\Delta yap1$ strain carrying Myc-Yap1, untreated or exposed to H₂O₂ (0.4 mM) during the indicated period were resolved under non-reducing or reducing conditions, as indicated. The Yap1 mixed-disulfide is indicated by an asterisk, and the Yap1 reduced and intra-molecular disulfide forms by arrows.
 (C) Effects of Yap1 cysteine mutations on mixed disulfide formation. Extracts from $\Delta yap1$ strains carrying the indicated Yap1 alleles not treated or exposed for 2 min to H₂O₂ (0.4 mM) were prepared and analyzed as in (B) under non-reducing and reducing conditions as indicated.

Yap1 has a distinct faster mobility than in untreated cells (Delaunay et al., 2000; see Figure 1B). This mobility shift occurs as early as 1 min after H₂O₂ treatment and starts to disappear after 30 min. It is diagnostic of a Cys303-S-S-Cys598 intra-molecular disulfide bond, because it completely disappears upon reduction or when alanine is substituted for either Cys303 or Cys598 (see schematics, Figures 1A and 1C). Further inspection of the autoradiogram revealed a faint anti-Myc stained higher molecular weight (MW) band whose presence correlated with Yap1 oxidation, disappearing after 15 min (Figure 1B). The absence of this band under reducing conditions indicated a probable intermolecular disulfide linkage of a small fraction (<10%) of Yap1 with a protein of about 20 kDa, as predicted from the band migration (Figure 1B). Analysis of Yap1 cysteine mutants showed that the high MW Yap1 band was almost completely erased with an allele carrying substitutions of its three carboxy-terminal cysteines (Yap1^{C598A, C620A, C629T}). In contrast, the high MW band was strongly increased with an allele carrying substitutions of its three amino-terminal cysteines (Yap1^{C303A, C310A, C315A}) (Figure 1C). Such stabilization of the Yap1 mixed disulfide was also seen in Yap1^{C303A}, with about 30%–50% of the total Yap1 protein involved in this linkage (Figure 1C and see Figure 2A). Notably, the high MW Yap1 band had a wild-type intensity in a Yap1 allele only containing Cys303 and Cys598 (Yap1^{C310A, C315A, C620A, C629T}).

The data indicate the transient formation of a Yap1 mixed-disulfide. This linkage presumably involves Cys598 and is stabilized when Cys303 is missing.

The Yap1 Disulfide-Linked Partner Is Glutathione Peroxidase

We purified H₂O₂-treated Myc-Yap1^{C303A} by one-step anti-Myc affinity chromatography under non-reducing conditions. The mixed-disulfide partner copurified with Yap1 under these conditions (Figure 2A). Analysis of the tryptic digest of the Yap1 high MW band by nanoscale capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) identified Yap1^{C303A} as the first protein candidate (40% sequence coverage) and Gpx3 as the only other protein (27% sequence coverage, peptides 26–35, 96–108, and 142–160) (Figure 2B). The identification of Gpx3 as the Yap1^{C303A} mixed disulfide-linked partner was confirmed by the absence of the high MW band in a *GPX3* deleted strain ($\Delta gpx3$) after exposure to hydroperoxide (Figure 2C). Gpx3 is one of the three budding yeast glutathione peroxidases (GPx), which are non-selenium enzymes (Avery and Avery, 2001; Inoue et al., 1999). The Gpx3 theoretical size of 18.5 kDa is in agreement with the predicted size of the Yap1 mixed disulfide partner, indicating that the two proteins form a 1:1 stoichiometric complex. Gpx3 is a constitutively expressed enzyme, and its expression is not altered by oxidative stress or by mutations in *YAP1* (Inoue et al., 1999).

We next tested whether Gpx3 is also the disulfide-linked partner of wild-type Yap1, by a Myc-Yap1 immunoprecipitation from TCA lysates of H₂O₂-induced cells expressing a HA-tagged version of Gpx3 (HA-Gpx3) (Figure 2D). The immunoprecipitated material contained a unique anti-HA stained band that migrated at the size of the anti-Myc stained Yap1 high MW band. A HA-Gpx3

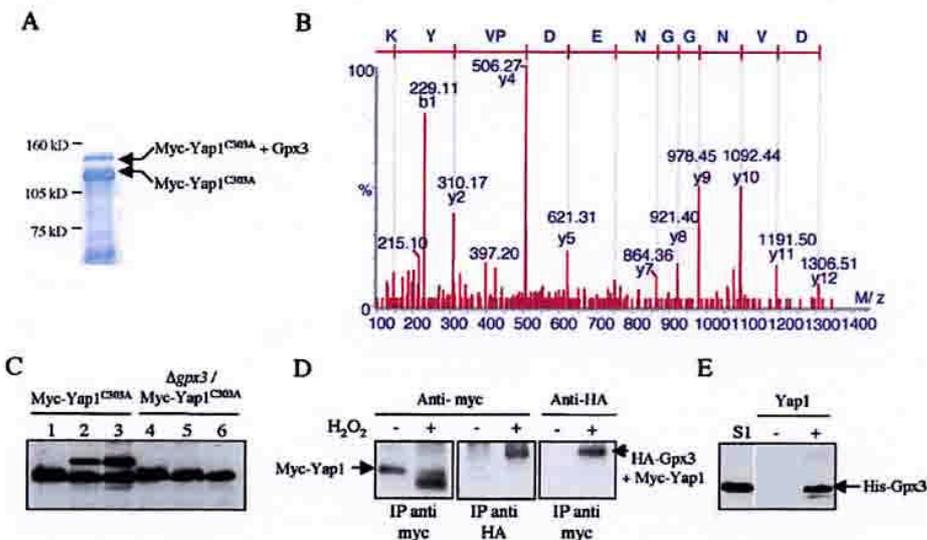


Figure 2. Gpx3 is the Yap1-Mixed Disulfide Partner

(A) Preparative non-reducing SDS-PAGE of purified Myc-Yap1^{C303A}. The free and mixed-disulfide forms are indicated. Yap1 was purified from extracts of a $\Delta yap1$ strain carrying Myc-Yap1^{C303A} exposed during 5 min to H₂O₂ (0.6 mM).
 (B) Identification of peptide 96–108 of Gpx3 by fragmentation using tandem mass spectrometry. For identification, experimental fragmentation patterns of selected peptides were compared to theoretical values calculated according to the NCBI nr database.
 (C) The Yap1^{C303} mixed-disulfide is absent in a strain lacking Gpx3. Extracts from $\Delta yap1$ or $\Delta yap1\Delta gpx3$ strains carrying Yap1^{C303A} and left untreated (lanes 1, 4) or exposed during 2 min to H₂O₂ (0.4 mM) (lanes 2 and 5) or t-BOOH (1 mM) (lanes 3 and 6), were prepared and analyzed as in Figure 1B under non-reducing conditions.
 (D) The mixed-disulfide partner of wild-type Yap1 is also Gpx3. Yap1 was immunoprecipitated with the anti-Myc Mab (IP anti myc) or with the anti-HA Mab (IP anti HA) from extracts of a $\Delta yap1$ strain carrying both Myc-Yap1 and HA-Gpx3 and left untreated or exposed to H₂O₂ (0.4 mM) during 2 min. Extracts were prepared as in Figure 1B. The immunoprecipitated material resolved under non-reducing conditions was immunoblotted with either the anti-Myc or anti-HA Mab as indicated.
 (E) Reduced Yap1 and Gpx3 interact in a pull-down assay. Extracts from $\Delta yap1$ strains carrying or not Myc-Yap1, were incubated under reducing conditions (DTT 2 mM) with anti-Myc Mab-bound sepharose beads during 3 hr at 4°C. A low speed supernatant fraction from a lysate of *E. coli* expressing His-Gpx3 (S1) was applied onto the anti-Myc Mab-bound sepharose beads. After iterative washings, the anti-Myc bound material was eluted by competition with an excess Myc peptide and immunoblotted with anti-His Mab after non-reducing SDS-PAGE. The experiment was performed under anaerobiosis.

immunoprecipitation under the same conditions also showed a unique anti-Myc stained band of the size of the high MW band (Figure 2D).

In view of the mixed-disulfide formed by wild-type Yap1 and Gpx3 in H₂O₂-treated cells, we also tested whether these proteins could interact non-covalently under non-induced conditions (Figure 2E). *E. coli*-expressed Gpx3 was specifically retained by Myc-Yap1 that had been immobilized on an anti-Myc immunoaffinity column. This result was obtained both under anaerobiosis with fully reduced proteins (Figure 2E) and under aerobiosis with reduced and then alkylated proteins (not shown).

In summary, these data demonstrate that upon exposure to H₂O₂, Yap1 associates with Gpx3 by a disulfide bridge. A preformed Yap1-Gpx3 non-covalent complex might favor this redox interaction.

Disulfide Linkage between Gpx3 Cys36 and Yap1 Cys598 Leads to Yap1 Oxidation

Inspection of the Yap1 redox state in $\Delta gpx3$ showed that neither the Yap1 high MW band nor the shift to a faster mobility occurred, up to 90 min after treatment

with either H₂O₂ (Figure 3A) or t-BOOH (not shown), establishing that Gpx3 is critical for the oxidation of Yap1 in vivo. We next evaluated if Gpx3 is also required for oxidation of Yap1 by hydroperoxides in vitro (Figure 3B). When H₂O₂ (100 μ M) was added to premixed reduced purified Yap1 and *E. coli*-expressed Gpx3, a disulfide bond was formed between the two proteins, and Yap1 became partially oxidized to its faster mobility band in a Gpx3-dependent manner (Figure 3B). Therefore, Gpx3 is also required for Yap1 oxidation by H₂O₂ in vitro, although oxidation is not as efficient as in vivo, maybe due to a missing component of the reaction. At a higher H₂O₂ concentration (400 μ M), some oxidation of Yap1 was seen in the absence of Gpx3 (not shown), indicating that the Gpx3 requirement can be bypassed in vitro.

Gpx3 carries three cysteines at positions 36, 64, and 82, with Cys36 being the conserved GPx active site-selenocysteine/cysteine residue (see schematics in Figure 3C). To identify which of these cysteines are required for Yap1 oxidation, we coexpressed Gpx3 cysteine mutants with Myc-Yap1 in $\Delta gpx3$ (Figure 3C). Upon H₂O₂ treatment of the strain carrying Gpx3^{C36S}, Yap1 formed neither the shift to a faster mobility corresponding to its intra-molecular disulfide form, nor the high MW Gpx3-

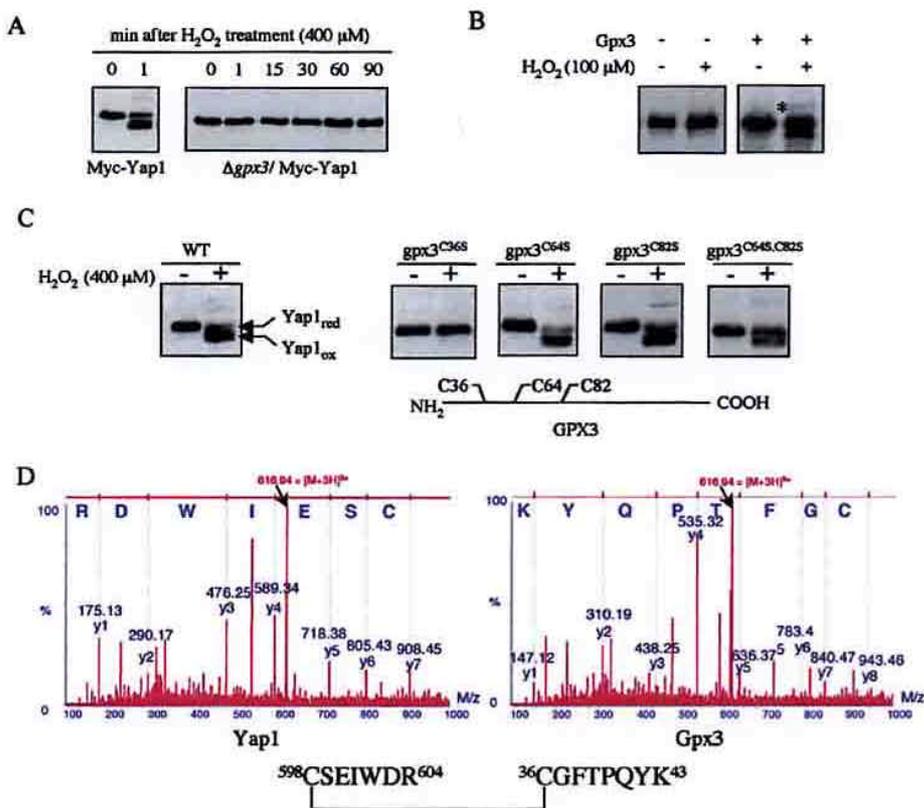


Figure 3. Disulfide Linkage between Gpx3 Cys36 and Yap1 Cys598 Leads to Yap1 Oxidation

(A) Gpx3 is required for in vivo oxidation of Yap1. $\Delta yap1$ or $\Delta yap1\Delta gpx3$ strains carrying Myc-Yap1 were left untreated or exposed to H₂O₂ (0.4 mM) during the indicated period. Extracts were prepared and analyzed under non-reducing conditions as in Figure 1B.

(B) Gpx3 is required for in vitro oxidation of Yap1. H₂O₂ (0.1 mM) was added or not to purified reduced Myc-Yap1 (1 μM) alone or mixed with a 10-fold molar excess of purified reduced Gpx3 as indicated, at room temperature under anaerobiosis. The reaction was stopped by NEM (10 mM) after 10 min and the Yap1 redox state was monitored by immunoblotting. The Yap1-Gpx3 mixed-disulfide is indicated by an asterisk. Purified Yap1 and *E. coli*-expressed His-Gpx3 were maintained reduced by overnight incubation in buffer E supplemented with DTT (20 mM), dialyzed against buffer E, under anaerobiosis.

(C) Identification of Gpx3 cysteines required to oxidize Yap1. $\Delta yap1\Delta gpx3$ strains carrying Myc-Yap1 and either Gpx3, Gpx3^{C36S}, Gpx3^{C64S}, Gpx3^{C82S}, or HA-Gpx3^{C64S,C82S} as indicated, were left untreated or exposed to H₂O₂ (0.4 mM) during 2 min. Inspection of the Yap1 redox state is as in Figure 1B. Shown under the immunoblot is a schematic of Gpx3 depicting its three cysteines.

(D) Identification of the cysteines involved in the mixed-disulfide. The MS/MS spectrum of the fragmentation of the Yap1-Gpx3 disulfide-linked peptide (MW = 1847.82 Da) is interpreted twice according to the sequence of either of its Yap1 or Gpx3 constituting peptides. The base peak (m/z = 616.94 Da) corresponds to the triply charged precursor.

mixed disulfide. In contrast, in strains carrying Gpx3^{C64S}, Gpx3^{C82S}, or Gpx3^{C64S,C82S}, oxidation of Yap1 occurred normally (Figure 3C) and with wild-type kinetics (not shown). Thus, Cys36 is uniquely required for Yap1 oxidation, probably forming the mixed disulfide with Yap1 Cys598 as suggested above. To confirm the identity of the mixed-disulfide linked cysteines, we performed a nanoESI-Q-TOF MS/MS analysis of the non-reduced Yap1^{C303A}-Gpx3 sample shown in Figure 2A. An ion with a mass matching the theoretical mass of a disulfide linkage between peptides 598–604 of Yap1 and 36–43 of Gpx3 was detected in the tryptic digest. Fragmentation of this peptide by MS/MS formally identified the Yap1 and Gpx3 expected sequences (Figure 3D). The free Yap1 Cys598 and Gpx3 Cys36-containing peptides were not detected in this sample, indicating that the mixed disulfide could not involve another Yap1 cysteine,

unless a second disulfide bond was bridging Yap1 and Gpx3. However, the normal Yap1-Gpx3 mixed-disulfide bond formation and Yap1 oxidation observed with Gpx3^{C64S,C82S} rules out this possibility. MS analysis of the same material after reduction and alkylation by iodoacetamide showed the disappearance of this mixed disulfide and the appearance of its two constitutive peptides (not shown).

These data establish that the H₂O₂-induced Yap1^{C303A}-Gpx3 mixed disulfide is formed between Cys598 and Cys36. The same residues are probably bridging Yap1 with Gpx3 in the wild-type context, although in the absence of Yap1 Cys598, another probably illegitimate inter-molecular disulfide bond forms (see Figure 1C). Moreover, formation of the Yap1-Gpx3 mixed disulfide bond is essential for the generation of the Yap1 intra-molecular disulfide bond.

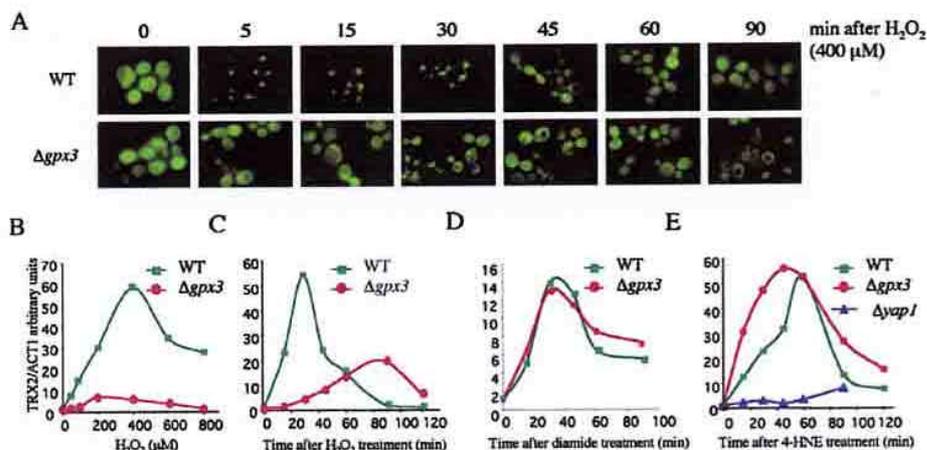


Figure 4. Gpx3 Is Exclusively Required for Yap1 Activation by Hydroperoxides

(A) Analysis of the GFP-Yap1 cellular localization. Exponentially growing wild-type or $\Delta gpx3$ strains carrying GFP-Yap1 were treated with H₂O₂ (0.4 mM) during the indicated period and analyzed for GFP staining as described (Delaunay et al., 2000). (B) Dose-response of *TRX2* induction. Total RNA was extracted from wild-type and $\Delta gpx3$ left untreated or exposed during 30 min at the indicated H₂O₂ concentration. *TRX2/ACT1* mRNA ratios were quantified by on-line RT-PCR. (C) Kinetics of *TRX2* induction. Wild-type and $\Delta gpx3$ cells were exposed to H₂O₂ (0.4 mM) during the indicated period. (D) Wild-type and $\Delta gpx3$ were exposed to diamide (1.5 mM) during the indicated period and *TRX2* induction measured as in (B). (E) Wild-type, $\Delta gpx3$, and $\Delta yap1$ cells were exposed to 4-HNE (250 μM) during the indicated period and *TRX2* induction measured as in (B).

Gpx3 Is Exclusively Required for the Activation of Yap1 by Hydroperoxides

Oxidation of Yap1 by peroxides triggers its nuclear redistribution and its ability to activate target-gene expression (Delaunay et al., 2000). In $\Delta gpx3$, a GFP-Yap1 fusion remained mainly cytoplasmic up to 90 min after H₂O₂ treatment, in contrast to its exclusive nuclear localization in the wild-type strain during the first 30 min of this treatment (Figure 4A). Nevertheless, a few cells (10%–30%) showed a very partial GFP-Yap1 staining in the nucleus in $\Delta gpx3$ after 30 min, demonstrating that Yap1 nuclear redistribution, although significantly inhibited, could still occur. In $\Delta gpx3$ cells, induction of the Yap1 target-gene *TRX2* measured after 30 min of treatment was defective through a range of H₂O₂ concentration from 50 to 800 μM (Figure 4B). Furthermore, *TRX2* induction was delayed by an hour and significantly diminished in $\Delta gpx3$ in comparison to the wild-type kinetics (Figure 4C). This residual *TRX2* induction is dependent upon Yap1 since it was absent in $\Delta gpx3\Delta yap1$ strain (not shown). Yap1 is also activated by diamide through a mechanism not involving the C303-S-S-C598 bond formation (Delaunay et al., 2000), and by electrophiles that supposedly operate by covalent modification of Yap1 C-terminal cysteines (D.A., A.D., C. R.-P., F.T. and M.B.T., unpublished data). We thus evaluated whether Gpx3 was also required for activation of Yap1 by these compounds. *TRX2* was fully induced by diamide irrespective of the presence of Gpx3 (Figure 4D). *TRX2* was also induced in a Yap1-dependent manner by the electrophile by-product of lipid peroxidation, 4-hydroxynonenal (4-HNE) irrespective of the presence of Gpx3 (Figure 4E). Gpx3 is thus exclusively required for Yap1 activation by hydroperoxide. The Gpx3-independent Yap1 activation by 4-HNE and diamide provides an explanation for the residual, hydroperoxide-induced

Yap1 activation occurring in the absence of Gpx3. In this case, secondary oxidation by-products generated by hydroperoxide might trigger the Gpx3-independent Yap1 activation mechanism.

The Gpx3 Peroxidase Function Involves an Active-Site Disulfide

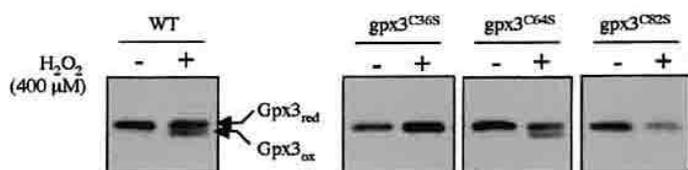
The Yap1 hydroperoxide sensor Gpx3 is a previously identified hydroperoxide scavenger. It was thus important to determine whether different Gpx3 cysteine residue(s) operate in its different functions.

We analyzed the redox forms of HA-Gpx3 with the procedure used for the analysis of Yap1. In untreated cells, HA-Gpx3 migrated as a single band, but in cells treated with H₂O₂, a second faster mobility band was apparent (Figure 5A). This faster band was diagnostic of a Cys36-S-S-Cys82 disulfide bond because it was seen neither under reducing conditions nor in Gpx3 cysteine mutants Gpx3^{C36S} or Gpx3^{C82S}. An MS/MS analysis by nanoESI-Q-TOF of the chymotryptic digest of *E. coli*-expressed oxidized Gpx3 confirmed the presence of this disulfide bond (not shown). We tested the significance of this disulfide bond by assaying *in vitro* the peroxidase activity of purified *E. coli*-expressed Gpx3 and its cysteine substitution derivatives (Figure 5B). Gpx3 had a significant peroxidase activity in the presence of thioredoxin and thioredoxin reductase (see below). In contrast, Gpx3^{C82S} did not have any detectable peroxidase activity (Figure 5B), indicating that the Gpx3 intra-molecular Cys36-S-S-Cys82 disulfide is essential for the peroxidase catalytic mechanism.

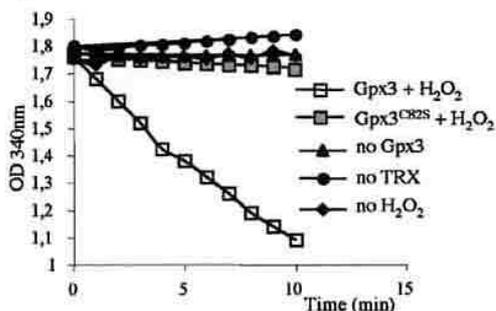
The Yap1 Regulatory Role of Gpx3 Is Prevalent over its Peroxidase Function

The respective *in vivo* hydroperoxide sensing and scavenging Gpx3 functions were evaluated. We confirmed

A



B



C

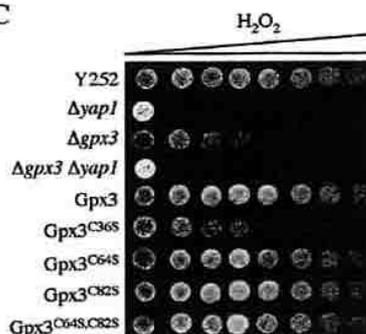


Figure 5. The Gpx3 Peroxidase Catalytic Mechanism Involves an Active-Site Disulfide

(A) In vivo analysis of the Gpx3 redox state. NEM-blocked extracts from $\Delta gpx3$ carrying HA-Gpx3, HA-Gpx3^{C36S}, HA-Gpx3^{C64S}, or HA-Gpx3^{C82S} left untreated or exposed to H₂O₂ (0.4 mM) for 2 min were prepared as described in methods, and immunoblotted with an anti-HA Mab after non-reducing SDS-PAGE.

(B) Gpx3 peroxidase assays. The complete assay in the presence of Gpx3, thioredoxin, thioredoxin reductase, NADPH, and H₂O₂ (open squares). Complete reaction with Gpx3 C82S replacing Gpx3 (gray squares). Complete reaction without Gpx3 (filled triangles). Complete reaction without thioredoxin (filled circles). Complete without H₂O₂ (filled diamonds). Data are expressed as the decrement of the O.D. = 340 nm over time.

(C) Plate hydroperoxide sensitivity assays. $\Delta gpx3$, $\Delta yap1$, $\Delta yap1\Delta gpx3$, or $\Delta gpx3$ carrying pRS316-HA-Gpx3 or the indicated Gpx3 cysteine mutants were grown in CASA medium to stationary phase and spotted on medium containing increasing H₂O₂ concentrations (0.4 to 2.5 mM). Growth was inspected after three days at 30°C.

the previously reported decreased tolerance of $\Delta gpx3$ toward hydroperoxides (Avery and Avery, 2001; Inoue et al., 1999) (Figure 5C). However, this phenotype, previously attributed to a defective peroxidase activity, could be caused by the defective Yap1 activation, or by both defects. We thus took advantage of Gpx3 mutants that uncouple its two functions. While Cys36 is required for both Yap1 activation and hydroperoxide reduction, Cys82 is only required for the latter function. A $\Delta gpx3$ strain carrying Gpx3^{C36S} was as sensitive to H₂O₂ as the $\Delta gpx3$ strain. However a $\Delta gpx3$ strain carrying either Gpx3^{C64S}, or Gpx3^{C82S}, or Gpx3^{C64S,C82S} had a wild-type tolerance to hydroperoxides (Figure 5C). These data suggest that the hydroperoxide phenotype of $\Delta gpx3$ is primarily due to defective Yap1 activation. Tolerance assays also showed that the $\Delta gpx3$ strain, although hypersensitive to H₂O₂, was more resistant than the $\Delta yap1$ strain. However, when YAP1 was deleted in $\Delta gpx3$, the resulting strain ($\Delta yap1\Delta gpx3$) was as sensitive as $\Delta yap1$, indicating that the higher H₂O₂ tolerance of $\Delta gpx3$ is due to Yap1 and might relate to the Gpx3-independent activation mechanism suggested above.

Gpx3 Is Reduced by Thioredoxin and not by GSH

Our data, by showing that Gpx3 oxidizes Yap1, imply that their redox states are coupled. However, this is

seemingly contradictory with the exclusive coupling of Yap1 to thioredoxin (Carmel-Harel et al., 2001; Delaunay et al., 2000; Izawa et al., 1999) and the purported coupling of Gpx3 to GSH (Avery and Avery, 2001). We thus evaluated the GSH dependence of Gpx3 by comparing its in vivo redox state in a wild-type and in isogenic strains with inactivation of either thiol reducing pathways. To better monitor Gpx3 oxidation, we increased the separation of its reduced and disulfide forms by alkylating free thiol groups with the high molecular mass alkylating agent AMS. In reduced Gpx3, Cys36, Cys64, and Cys82 are available for alkylation by AMS (3 × 0.5 kDa) whereas in oxidized Gpx3, only Cys64 is available (0.5 kDa). This differential alkylation, by giving a further 1 kDa difference between reduced and oxidized bands, clearly indicated that fully reduced Gpx3 became about half-oxidized as early as 2 min after exposure to H₂O₂ and was then reduced after 15 min (Figure 6A), closely paralleling the occurrence of the Yap1-Gpx3 mixed disulfide (see Figure 1A). The GSH pathway was tested in a strain lacking the glutathione reductase gene *GLR1* ($\Delta glr1$) or in $\Delta glr1\Delta gsh1PRO2-1$ (Spector et al., 2000). The latter strain lacks both *GLR1* and γ -glutamyl cysteine synthase (*GSH1*), but still carries approximately 0.5% of the WT cellular GSH content. In both strains, the redox state of Gpx3 before and after treatment with H₂O₂ had a wild-type pattern (Figure 6A). In contrast,

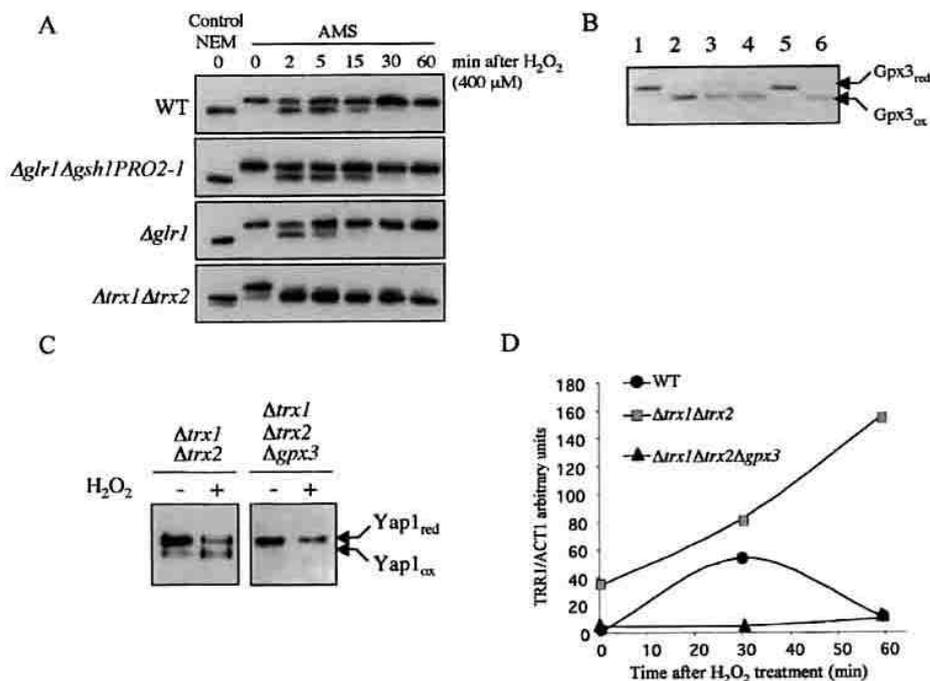


Figure 6. Gpx3 Is Reduced by the Thioredoxin Pathway

(A) The Gpx3 redox state in thiol redox pathways mutants. Wild-type, $\Delta glr1\Delta gsh1PRO2-1$, $\Delta glr1$, and $\Delta trx1\Delta trx2$ carrying pRS316-HA-Gpx3 were left untreated or were exposed to H₂O₂ (0.4 mM) for the indicated period. TCA precipitated proteins were dissolved in the presence of NEM or AMS as indicated.

(B) In vitro reduction of Gpx3. Ponceau staining of blotted recombinant Gpx3 after separation under non-reducing conditions. Reduced Gpx3 alone (lane 1). Oxidized Gpx3 (lane 2). Oxidized Gpx3, GSH, glutathione reductase, and NADPH (lane 3). Oxidized Gpx3, glutathione reductase, and NADPH (lane 4). Oxidized Gpx3, thioredoxin, thioredoxin reductase, and NADPH (lane 5). Oxidized Gpx3, thioredoxin reductase, and NADPH (lane 6). Recombinant reduced Gpx3 (25 μ M) oxidized by H₂O₂ (0.25 mM) was incubated with GSH (0.3 mM), glutathione reductase (2 μ M), thioredoxin (20 μ M), thioredoxin reductase (1 μ M), and NADPH (0.3 mM) in a 20 μ l final volume for 10 min at 30°C. The reaction was interrupted by NEM (10 mM) and analyzed by non-reducing SDS-PAGE.

(C) In vivo Yap1 redox state in thioredoxin pathway mutants. Extracts from $\Delta trx1\Delta trx2$ or $\Delta trx1\Delta trx2\Delta gpx3$ carrying Myc-Yap1 were left untreated or were exposed to H₂O₂ (0.4 mM) for 2 min and processed as in Figure 1B. Samples were separated under non-reducing conditions.

(D) Gpx3 mediates Yap1 deregulation in thioredoxin mutants. Total RNA was extracted from wild-type, $\Delta trx1\Delta trx2$ and $\Delta trx1\Delta trx2\Delta gpx3$ cells exposed to H₂O₂ (0.4 mM) for the indicated period. Induction of *TRR1* was measured as in Figure 4B.

in a strain lacking both cytoplasmic thioredoxin genes *TRX1* and *TRX2* ($\Delta trx1\Delta trx2$), Gpx3 was constitutively partially oxidized (about 10%), and became fully oxidized by H₂O₂ for up to one hour. We confirmed this in vivo observation by assaying the Gpx3 peroxidase activity in vitro. This activity was significant with thioredoxin and thioredoxin reductase as the reducing system (see above, Figure 5B), but undetectable with glutathione reductase and GSH (not shown). We also assayed the reduction of Gpx3 in vitro. Recombinant Gpx3 oxidized by H₂O₂ (Figure 6B, lane 2) was completely reduced by the thioredoxin system (lane 5), but only minimally by the GSH system (lane 3), as shown by its distinct electrophoretic redox forms (Figure 6B). These data establish that thioredoxin and not GSH is the physiological electron donor system for Gpx3.

Gpx3 Mediates the Deregulation of Yap1 in Thioredoxin Mutants

Yap1 is deregulated in strains with an inactivated thioredoxin pathway (Carmel-Harel et al., 2001; Delaunay et al., 2000; Izawa et al., 1999; see also Figure 6D), sug-

gesting that thioredoxin is required for Yap1 reduction, and/or that its absence promotes Yap1 activation. With the above-demonstrated essential requirement of Gpx3 for Yap1 oxidation and activation, we tested whether Gpx3 could mediate the deregulation of Yap1 in thioredoxin pathway mutants. We thus deleted *GPX3* in a strain lacking both thioredoxin genes ($\Delta trx1\Delta trx2\Delta gpx3$) (Figures 6C and 6D). In contrast to its partial constitutive oxidation seen in $\Delta trx1\Delta trx2$, Yap1 was fully reduced in $\Delta trx1\Delta trx2\Delta gpx3$ and did not oxidize upon H₂O₂ treatment (Figure 6C). Similarly, the constitutive and unregulated H₂O₂ induction of the Yap1-target gene *TRR1*, seen in $\Delta trx1\Delta trx2$, was suppressed in the triple deleted strain (Figure 6D). Hence, Gpx3 is also essential for the constitutive partial activation of Yap1 in thioredoxin pathway mutants.

Discussion

We have identified Gpx3 as the hydroperoxide sensor of the Yap1 pathway. Gpx3, hitherto known as a thiol peroxidase, is shown to perceive intracellular hydroper-

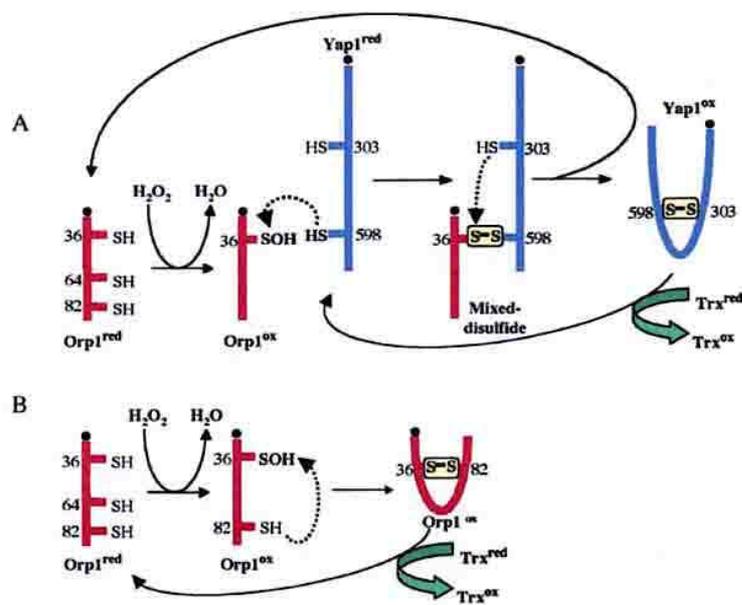


Figure 7. A Working Model Depicting the Dual Hydroperoxide Sensing and Scavenging Functions of Orp1/Gpx3

Two pools of Orp1/Gpx3 exist, (A) one in a pre-complex with Yap1 and serving the hydroperoxide sensing function, and (B) the other, either free in the cell or perhaps membrane bound, serving the hydroperoxide scavenging function. Sensing involves the peroxidatic reaction of Orp1 Cys36 with hydroperoxides to yield ROH and a sulfenic acid Cys36-SOH. Cys36-SOH then reacts with Yap1 Cys598 to form the Orp1-Yap1 disulfide linkage, followed by its conversion to the intra-molecular Cys303-S-S-Cys598 disulfide of activated Yap1 and the recycling of the Orp1 reduced form. During this cycle, Yap1 reduces Orp1, whereas the former is reduced by thioredoxin. The peroxidase function also involves the peroxidatic reaction of Orp1 Cys36 with hydroperoxides yielding a Cys36-SOH that condensate with the Orp1 Cys82 thiolate to form the intra-molecular Cys36-S-S-Cys82 bridge. Reduction of Orp1 by thioredoxin allows for the efficiency of hydroperoxide scavenging.

oxide levels and to transduce this signal to Yap1 by virtue of specific thiol oxidation. This function of Gpx3 can be easily conceived in view of its thiol peroxidase structure endowed with high hydroperoxide reactivity, thus highlighting a previously unrecognized coupling between hydroperoxide scavenging and sensing. The data presented elucidate a hydroperoxide sensing and signaling pathway based on a thiol oxidation cascade in a eukaryote and stress the high specificity of thiol oxidation reactions *in vivo*. In this pathway, Gpx3 actually functions as a highly specific hydroperoxide receptor transducing the redox signal to downstream protein thiols. We propose changing the name of Gpx3 to "Oxidant Receptor Peroxidase 1" (Orp1).

Upon exposure to H₂O₂ or t-BOOH, Yap1 Cys598 and Orp1 Cys36 transiently form an inter-molecular disulfide linkage essential for oxidation and activation of Yap1. This is demonstrated by the *in vivo* and *in vitro* defective hydroperoxide-induced oxidation of Yap1 in the absence of Orp1, further indicating that Orp1 is the peroxide receptor of the Yap1 pathway. The exclusive requirement of Orp1 Cys36 in Yap1 activation (Figure 3C) indicates that this cysteine is the site of peroxide sensing, agreeing with it being the conserved peroxidase active-site residue. We propose the following model of how Orp1 senses hydroperoxide and oxidizes Yap1 (Figure 7). Orp1 Cys36 is directly oxidized by H₂O₂ to yield H₂O and a sulfenic acid Cys36-SOH, the expected oxidation product of a cysteine residue by hydroperoxides (Claiborne et al., 1999; Ellis and Poole, 1997). The nascent Cys36-SOH reacts with Yap1 Cys598 to form the Orp1-Yap1 disulfide linkage. This Yap1-Orp1 inter-molecular disulfide linkage is then transposed to the intramolecular C303-S-S-C598 disulfide of activated Yap1 with recycling of reduced Orp1. The thiol-disulfide exchange reaction probably results from a nucleophilic attack of the mixed-disulfide bond by Yap1 Cys303A, as suggested by stabilization of the inter-molecular disulfide

bond in Yap1^{C303A}. This is the simplest model that fits the experimental data. One of the *in vivo* oxidized forms of Orp1 contains a Cys36-S-S-Cys82 intra-molecular disulfide bond (Figure 5A) that could also oxidize Yap1 by a mechanism of thiol-disulfide exchange reaction. Although this possibility cannot be formally excluded, the existence of two mechanisms of oxidation is unlikely. The proposed model thus supposes that when formed, the Cys36 sulfenic acid is poised to react with either Yap1 Cys598 or Orp1 Cys82. Yet, mixed disulfide bond formation might be favored at the expense of the Orp1 intra-molecular disulfide, if a pool of Orp1 is in a pre-complex with Yap1, as suggested by their *in vitro* non-covalent interaction (Figure 2E). Such a model describes a two-components system for sensing and transducing the hydroperoxide signal thus distinguishing four cysteines (Cys36, Cys82, Cys303, and Cys598), each carrying a unique redox reactivity. As the sensor, Orp1 Cys36 is endowed with high hydroperoxide reactivity, which might relate to high nucleophilicity, low pK_a value, and the ability to stabilize the RO⁻-leaving group of the peroxide substrate by a proton-donating group (Ellis and Poole, 1997). The Cys36 amino acid environment probably determines its unique reactivity. The three other cysteines must have both a high nucleophilicity and a much lower reactivity toward peroxides.

As presented, the proposed model addresses the mechanism of Yap1 oxidation by hydroperoxide, but not its reduction. Based on genetic and biochemical data, both Yap1 (Carmel-Harel et al., 2001; Delaunay et al., 2000; Izawa et al., 1999) and Orp1 (Figure 6) redox states are coupled to the thioredoxin pathway. The above model also postulates that the redox states of Yap1 and Orp1 are coupled, suggesting that Orp1 could reduce oxidized Yap1 with electrons from thioredoxin, in addition to oxidizing it. The Orp1-Yap1 disulfide linkage, which starts resolving 15 min after exposure to H₂O₂ at the outset of Yap1 reduction (see Figure 1A), is compati-

ble with this hypothesis. However, in vitro, thioredoxin and not Orp1 is capable of reducing oxidized Yap1 (De-launay et al., 2000; and data not shown), which favors a separate reduction of Yap1 and Orp1 by the thioredoxin pathway.

Function of Orp1 as a Dual Peroxide Sensor and Scavenger

Orp1 was identified as one of the three yeast GPxs that encode a cysteine residue at the conserved active site instead of a selenocysteine most commonly found in other GPxs (Inoue et al., 1999). All three yeast enzymes resemble more the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases (PHGPx) subfamily, based on their sequence and substrate specificity that includes H₂O₂, t-BOOH, and hydroperoxides esterified to phospholipids (Avery and Avery, 2001). They also share with PHGPxs two gaps at similar positions that correspond to dimerization and tetramerization interfaces in other GPxs (Ursini et al., 1995), suggesting that, as PHGPx, the yeast GPxs are monomeric. Our data suggest the following model of peroxide reduction by Orp1, unusual for a GPx-like enzyme. The reduction of hydroperoxide by the active-site cysteine thiolate Cys36 leads to a cysteine sulfenic acid Cys-SOH that reacts with Cys82 to generate an active-site intra-molecular Cys36-S-S-Cys82 disulfide bond, which is then reduced by thioredoxin (see Figure 7). This mechanism is similar to the peroxiredoxin catalytic mechanism (Chae et al., 1994; Ellis and Poole, 1997) and contrasts with the current GPx catalytic model involving hydroperoxide oxidation of the active site-selenocysteine/cysteine residue to a selenic/sulfenic acid and its reduction by GSH (Ursini et al., 1995). The finding of thioredoxin as the Orp1 physiological electron donor system is not unprecedented in GPx family enzymes (Bjornstedt et al., 1994) and not surprising in view of the predicted structure of PHGPx (Ursini et al., 1995) and hence of Orp1. Indeed, both enzymes lack the basic residues of cytosolic GPx that contribute to the orientation of GSH to the peroxidase active site.

Among the three yeast enzymes, Orp1/Gpx3 was reported as the major PHGPx, on the basis of the effect of its deletion on the tolerance to peroxides (Avery and Avery, 2001; Inoue et al., 1999) and of its higher activity toward phospholipid hydroperoxides in vitro (Avery and Avery, 2001). However, one question arising from our study is the actual in vivo contribution of Orp1 to hydroperoxide scavenging. Indeed, our data attribute most if not all the hydroperoxide hypersensitive phenotype of the $\Delta orp1$ strain to the defective regulatory function of Orp1 in Yap1 activation (see Figure 5). In addition, the observed low constitutive expression and lack of inducibility of Orp1 (Gasch et al., 2000; Inoue et al., 1999), also predicts a limited in vivo hydroperoxide scavenging function for this enzyme, contrasting with other yeast thiol peroxidases, including Gpx2, that are induced by oxidative stress (Gasch et al., 2000; Lee et al., 1999). Nevertheless, the in vivo negligible H₂O₂ and t-BOOH scavenging function of Orp1 observed in this study does not rule out an important activity toward hydroperoxides esterified to phospholipids in membranes, as suggested by in vitro assays (Avery and Avery, 2001).

Orp1 Is a Sensor and Transducer of the Hydroperoxide Signal

Orp1 is identified as both a hydroperoxide sensor and redox transducer of the Yap1 pathway. Hence, after the prokaryotic regulator OxyR (Kim et al., 2002; Zheng et al., 1998), Orp1 is an example of a hydroperoxide-sensing mechanism that relies on the peroxidatic reaction of a highly reactive thiol, which now appears as a universal mechanism. Nevertheless, the yeast hydroperoxide-sensing system differs fundamentally from its prokaryotic counterpart as involving a two-component mechanism instead of one, thus restricting the hydroperoxide Yap1 response to an on-off switch, in contrast to the graded response proposed for OxyR (Kim et al., 2002). The redox-transducing activity of Orp1 establishes the function of a thiol oxidase for a PHGPx-like enzyme. This function appears highly specific, based on preliminary experiments indicating that potential Orp1 thiol oxidase substrates might be present in addition to Yap1 but in a very limited number. Such thiol oxidase activity has been suspected for mammalian PHGPxs, based on their more "opened" structure relative to other GPxs allowing to react with thiols in bulky molecules other than GSH, thus conferring the potential for a diversified substrate specificity (Brigelius-Flohe, 1999; Ursini et al., 1995, 1997). The finding that PHGPx switches its function during sperm maturation from a soluble active peroxidase to an inactive oxidatively cross-linked form indicates a structural role in the capsule of sperm mitochondria (Ursini et al., 1999). This observation also suggests that PHGPx could oxidize specific sperm protein thiols in the presence of hydroperoxides (Godeas et al., 1997; Maiorino et al., 1999). These examples, and the elucidation of the redox signaling function of Orp1, suggest a more widespread usage of selenol/thiol PHGPxs as general hydroperoxide receptors that funnel oxidizing equivalents into diverse thiol redox-based pathways. Further, the very high hydroperoxide reactivity of PHGPx, especially the selenol enzymes, relative to other cellular thiols, suggests that protein thiol oxidation in redox-based signal pathways might be uniquely initiated by such hydroperoxide receptors.

Experimental Procedures

Strains and Growth Conditions

The *S. cerevisiae* strain YPH98 (Sikorski and Hieter, 1989) (MATa, *ura3-52*, *lys2-801^{amber}*, and *ade2-101^{ocm} trp1- Δ 1 leu2- Δ 1*) and isogenic derivatives were used in all experiments. The $\Delta yap1$, $\Delta glr1$, $\Delta trx1\Delta trx2$, and $\Delta glr1\Delta gsh1PRO2-1$ were previously described (Lee et al., 1999; Spector et al., 2000). The $\Delta gpx3$, $\Delta yap1\Delta gpx3$, and $\Delta trx1\Delta trx2\Delta gpx3$ were derived from wild-type, $\Delta yap1::LEU2$, $\Delta trx1::URA3\Delta trx2::KAN$ strains respectively by replacing the entire GPX3 ORF with TRP1 or KAN. Cells were grown at 30°C in YPD [1% yeast extracts, 2% bactopectone, and 2% glucose] or CASA medium [0.67% yeast nitrogen base, 0.1% casaminoacids, and 2% glucose].

Constructs

Myc-Yap1, a N-terminal Yap1 fusion with a 9 Myc epitope, its mutant alleles, and the GFP-Yap1 fusion were previously described (De-launay et al., 2000; Kuge et al., 1997). A DNA fragment comprising the GPX3 ORF flanked by 400 bp upstream and 210 bp downstream sequences was PCR-amplified and cloned into the BamHI site of pRS316. The GPX3 mutant carrying cysteine to serine substitution were created by a two-steps PCR amplification method. The N-ter-

- Ellis, H.R., and Poole, L.B. (1997). Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 36, 13349–13356.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241–4257.
- Godeas, C., Tramer, F., Mical, F., Soranzo, M., Sandri, G., and Panfili, E. (1997). Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57, 1502–1508.
- Gonzalez-Flecha, B., and Demple, B. (2000). Genetic responses to free radicals. Homeostasis and gene control. *Ann. N Y Acad. Sci.* 899, 69–87.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, S., Izawa, S., and Kimura, A. (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 27002–27009.
- Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K., Mano, J., Inoue, Y., and Kimura, A. (1999). Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 28459–28465.
- Kim, S.O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W.F., Jr., Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A., and Stamler, J.S. (2002). OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* 109, 383–396.
- Kuge, S., and Jones, N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* 13, 655–664.
- Kuge, S., Jones, N., and Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* 16, 1710–1720.
- Kuge, S., Toda, T., Lizuka, N., and Nomoto, A. (1998). Crm1 (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* 3, 521–532.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., and Nomoto, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6139–6150.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M.B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 16040–16046.
- Maiorino, M., Flohe, L., Roveri, A., Steinert, P., Wissing, J.B., and Ursini, F. (1999). Selenium and reproduction. *Biofactors* 10, 251–256.
- Pomposiello, P.J., and Demple, B. (2001). Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* 19, 109–114.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19–27.
- Spector, D., Labarre, J., and Toledano, M.B. (2000). A genetic investigation of the essential role of glutathione: mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast. *J. Biol. Chem.* 276, 7011–7016.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., and Flohe, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285, 1393–1396.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigellus-Flohe, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., and Flohe, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* 252, 38–53.
- Ursini, F., Maiorino, M., and Roveri, A. (1997). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme? *Biomed. Environ. Sci.* 10, 327–332.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B., and Labarre, J. (2000). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 8469–8474.
- Wu, A., Wemmie, J.A., Nicholas, P., Edgington, N.P., Goebel, M., Guevara, J.L., and Moye-Rowley, W.S. (1993). Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J. Biol. Chem.* 268, 18850–18858.
- Yan, C., Lee, L.H., and Davis, L.I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.* 17, 7416–7429.
- Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718–1721.