



HAL
open science

Approches globales de l'état redox du résidu cystéine

Natacha Le Moan

► **To cite this version:**

Natacha Le Moan. Approches globales de l'état redox du résidu cystéine. Sciences du Vivant [q-bio].
Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT: . tel-00364199

HAL Id: tel-00364199

<https://theses.hal.science/tel-00364199>

Submitted on 25 Feb 2009

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.

UNIVERSITE PARIS XI-ORSAY
ÉCOLE DOCTORALE GENES GENOMES CELLULES

THESE

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS 11, ORSAY
Discipline: Biologie
Par

Natacha LE MOAN

Titre:

**Approches globales de l'état redox du
résidu cystéine**

Directeur de thèse: Michel Toledano

Soutenue le 26 septembre 2007

Jury

M. Giuseppe Baldacci (président)
M. Jean-Pierre Jacquot (rapporteur)
M. Charles Pineau (rapporteur)
M. Joris Messens (examineur)
M. Michel Toledano (directeur de thèse)

«La rigueur vient toujours à bout de l'obstacle»

Léonard de Vinci

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire Stress Oxydant et Cancer de l'Institut de Biologie et de Biotechnologies du CEA à Saclay. Au cours de cette thèse, de nombreuses personnes ont traversé ma route, souvent parsemée d'embûches, j'espère que je n'en oublierai aucune dans ces remerciements. Tout d'abord, je remercie Michel Toledano de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail. Je tiens également à remercier Benoit «le polonais» de surnom, une personne qui a su m'épauler dans mes périodes appelées «down» et égayer le reste de ma thèse grâce à son humour. Je remercie aussi Sophie, mon premier «mentor expérimental», de m'avoir aidée tout au long de mon DEA, de m'avoir supportée et d'avoir su gérer mon caractère peu évident. Merci également à Stéphanie, dont la charmante humeur matinale restera à jamais gravée dans mes souvenirs... En dépit de son caractère bien trempé, Stéphanie a su me maintenir à flot grâce à une thérapie bien particulière, très répandue dans le laboratoire, que j'appelle «JCSM». Je n'oublie pas non plus Agnès, une personne de grande valeur scientifique, que malheureusement je n'ai pas pu côtoyer plus d'un an et demi. Je tiens également à remercier Bénédicte sans qui le laboratoire aurait pu tourner en désastre anarchique le plus total, et dont l'absence a montré notre manque d'organisation. Je remercie Frédérique, ma seconde maman, pour son soutien dans les périodes les plus difficiles de l'écriture de ma thèse. Je ne m'excuserais jamais assez auprès d'elle pour l'angoisse qu'elle a du ressentir face à mes exigences en terme de rapidité d'analyse des données de spectrométrie de masse. Merci aussi à Ludivine un personnage dont le rire hantera à jamais les couloirs des bâtiments 532 et 142. Je ne te remercierai d'ailleurs jamais assez pour les crises de fou rire que tu as pu déclencher et pour mon erlen d'ergostérol que tu es allée chercher un samedi matin. Je n'oublie pas non plus Simon dont la passion pour les mots croisés tridimensionnels et le jeu de Go est sujette à beaucoup de plaisanteries (notamment ce fameux repas auquel je dois t'inviter). Je remercie également Chitranchu de m'avoir fait connaître l'aéroport de Roissy un samedi à 6 heures du matin. Sa bonne humeur intacte dans n'importe quelle situation m'étonnera toujours. Viens ensuite le second Benoit du laboratoire, nous en avons d'ailleurs conclu que ce prénom semblait associé aux publications dans Nature.

Merci aussi à Flora dont l'apparition dans le laboratoire fut trop brève, elle nous a néanmoins apporté un brin de soleil italien. Merci également à Marie-Elise et à Gaël dont l'humour peut sauver de nombreuses personnes de la dépression. Je suis heureuse d'avoir pu travailler avec toutes ces personnes et d'avoir pu les connaître en dehors du laboratoire pendant ces nombreuses «soirées labo», comme nous les appelons. Bien entendu, je n'oublie pas de remercier les personnes qui ont participé à ce projet et sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé, à savoir l'équipe de CIPHERGEN-BIORAD, et plus particulièrement Luc Guerrier. Je remercie également Jérôme et Arnaud Martel pour leur travail de développeur sur le logiciel de traitement des données de protéomique. Enfin, je tiens particulièrement à remercier Cyril sans qui je n'aurais pas pu supporter mon travail quotidien, sa présence et son soutien ont été essentiels au cours de cette thèse. Grâce à lui certaines épreuves qui me paraissaient insurmontables ont pu être franchies. Je ne m'excuserai jamais assez auprès de lui pour avoir souvent choisie la compagnie de mes pipettes, plutôt que la sienne. Je suis consciente que sa vie à mes côtés fut difficile pendant ces 4 années de thèse, mais indispensable à mon équilibre. Je termine donc en disant un grand merci à toutes ces personnes m'ont toujours soutenue et donné l'envie de travailler à leurs côtés.

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS.....	8
INTRODUCTION	17
I. LES DIFFERENTS ETATS REDOX DU GROUPEMENT THIOL DES RESIDUS CYSTEINES	17
A. <i>Les paramètres de réactivité du résidu cystéine</i>	17
B. <i>Les réactions d'oxydation des résidus cystéines</i>	18
1. La formation de l'acide sulfénique	18
2. La formation du disulfure	18
3. La formation des acides sulfiniques et sulfoniques.....	20
4. La formation du thiyl.....	20
5. La formation du nitrosothiol.....	22
6. Les modifications par les électrophiles.....	23
II. DES SYSTEMES D'ECHANGES DI-THIOL/ DISULFURE PERMETTENT DE REDUIRE OU D'OXYDER LES RESIDUS CYSTEINES	25
A. <i>Deux systèmes cellulaires catalysent les échanges di-thiol/disulfure</i>	25
B. <i>Oxydases ou réductases?</i>	27
1. Le potentiel redox.....	27
2. Les paramètres régissant l'activité des thiol-transférases de la superfamille des thiorédoxines	28
a. Les propriétés redox du motif catalytique CXXC.....	28
b. Des systèmes assurant un flux opposé d'électrons.....	30
i. Les systèmes de réduction des ponts disulfures	30
ii. Les systèmes de formation des ponts disulfures.....	32
iii. La compartimentation des flux d'électrons	33
c. Le paramètre essentiel	33
III. LES SYSTEMES CATALYSANT LA REDUCTION DES RESIDUS CYSTEINES: LES VOIES DES THIOREDOXINES ET DU GLUTATHION.....	35
A. <i>Présentation des composants de la voie des thiorédoxines et du glutathion</i>	35
1. La voie des thiorédoxines	35
a. Les thiorédoxines.....	35
b. La thiorédoxine réductase	36
2. La voie du glutathion GSH.....	38
a. Le glutathion.....	38
b. Les glutarédoxines	39
B. <i>Les fonctions cellulaires de la voie des thiorédoxines et du glutathion</i>	41
1. La voie des thiorédoxines	41
a. Le rôle des thiorédoxines dans le métabolisme des peroxydes	41
i. Le métabolisme des peroxydes	41
ii. Les thiorédoxines fournissent les électrons aux enzymes du catabolisme des peroxydes	43
iii. Les données génétiques sur la fonction des thiorédoxines dans le métabolisme des peroxydes	46
b. Les autres fonctions cellulaires des thiorédoxines	47
i. Le métabolisme de l'ADN	48
ii. Le métabolisme de l'assimilation du sulfate	49
iii. Les autres fonctions cellulaires des Trx	49
2. La voie du GSH.....	49
a. Les données génétiques sur la fonction essentielle du GSH	49
b. Le GSH intervient dans la détoxification cellulaire de plusieurs composés	51
i. L'élimination des composés toxiques	51
ii. L'élimination des peroxydes	51
c. Le GSH intervient dans la glutathionylation des protéines.....	52
i. Le GSH a un rôle de tampon redox par la glutathionylation des cystéines	52
ii. Un exemple illustrant le rôle du GSH dans la glutathionylation	53
d. Le GSH intervient dans la voie de sécrétion	54
e. Le GSH intervient dans l'élimination du fer.....	55
3. La redondance entre les deux voies de réduction existe-t-elle?	58
a. La spécialisation des deux voies de réduction	58
b. La spécificité des substrats des Trx et Grx.....	59
IV. LES SYSTEMES CATALYSANT L'OXYDATION DES RESIDUS CYSTEINES: LES VOIES ERO1/PDI1 ET ERV1/MIA40 ..	61
A. <i>Les flavines oxydases génèrent les équivalents oxydants</i>	61
1. Les membres de la famille des flavines sulfhydryles oxydases	61
a. Les protéines QSOX	62
b. Les protéines ERV/ALR.....	63

2.	La flavine oxydase Ero1	64
3.	Le rôle du FAD dans la régénération de la forme oxydée active des flavine oxydases.....	66
4.	Bases moléculaire de la spécificité des substrats des flavines oxydases	67
B.	<i>Les protéines relais des flavines oxydases</i>	67
1.	Mia40 la protéine relais d'Erv1	68
2.	Pdi1 la protéine relais d'Ero1	68
a.	La Pdi1.....	69
b.	Les homologues de la Pdi1 dans le RE	70
C.	<i>Le relais disulfure Erv1/Mia40 de l'EIM</i>	70
1.	Le relais redox Erv1-Mia40 pour l'import des protéines dans l'EIM (schéma 16).....	70
2.	Le rôle d'Erv1 dans le métabolisme des centres Fe/S (schéma 12)	72
D.	<i>Similarités avec la voie Dsb du périplasma des bactéries</i>	73
V.	LES METHODES D'IDENTIFICATION DES PROTEINES OXYDEES	75
A.	<i>Pourquoi développer des méthodes d'identification des protéines oxydées?</i>	75
B.	<i>Les méthodes globales d'identification des protéines oxydées</i>	76
1.	La détection et l'identification des protéines sous forme de disulfure par les électrophorèses diagonales ...	76
2.	La détection et l'identification des protéines glutathionylées	77
3.	La détection et l'identification de toutes les formes oxydées.....	78
a.	Détection d'un ensemble spécifique de thiols oxydés.....	78
b.	Détection de l'ensemble des thiols oxydés	79
c.	Limites de ces méthodes globales.....	79
C.	<i>Les méthodes d'identification des cibles des thiol-transférases</i>	79
1.	Par réduction des extraits de protéines avec une thiorédoxine ou glutarédoxine	80
2.	Par utilisation de versions modifiées des thiorédoxines et glutarédoxines.....	80
D.	<i>L'émergence de nouvelles méthodes de quantifications de l'état redox des thiols</i>	81
VI.	PRESENTATION DU PROJET DE THESE	83
	RÉSULTATS	85
I.	RESULTATS ET DISCUSSION I: ETUDE DE L'ETAT REDOX DU RESIDU CYSTEINE.....	85
A.	<i>Les techniques de marquage des thiols oxydés</i>	85
1.	Aspects théoriques et expérimentaux.....	85
a.	Aspects théoriques de la réactivité des résidus cystéines	85
b.	Contrôle de la réactivité des résidus cystéines par abaissement du pH	86
c.	Description générale de la méthode de marquage des thiols oxydés.....	87
d.	Importance d'un marquage saturant des thiols.....	89
2.	Etude de l'état d'oxydation des résidus cystéines de deux protéines modèles	90
a.	Mesure in vivo de l'état redox de la thiorédoxine de levure par l'AMS	90
b.	Mesure de l'état redox in vitro de la peroxydase Tsa1 par le NEM C ¹⁴	92
3.	Etude de l'état d'oxydation des résidus cystéines à l'échelle du protéome.....	94
a.	Marquage des thiols oxydés et totaux par le NEM C ¹⁴	94
i.	Marquage des thiols oxydés d'un extrait de protéines (figures 3 et 4).....	94
ii.	Marquage des thiols totaux (réduits et oxydés) (figure 5 et 6)	96
iii.	Limites de la méthode de marquage par le NEM C ¹⁴	99
b.	Marquage des thiols oxydés et réduits par le NEM fluorescent	99
i.	La concentration d'IAM (figure 7).....	100
ii.	Le pH et la température (figure9).....	103
iii.	Application de cette méthode de marquage sur la protéine Tsa1 purifiée (figure 10)	104
iv.	Conclusion	105
c.	Marquage des thiols oxydés par la Biotine-HPDP et purification des protéines contenant des thiols oxydés.....	105
i.	Marquage différentiel des thiols par la Biotine-HPDP.....	105
ii.	Contrôle des différentes étapes de purification des protéines contenant des thiols marqués par la Biotine-HPDP.....	107
iii.	Spécificité de marquage par la Biotine-HPDP et de purification des protéines marquées	107
iv.	Spécificité de marquage des thiols oxydés et de purification des protéines oxydées	109
v.	Limites de la méthode de purification par la Biotine-HPDP	109
4.	La méthode d'égalisation.....	110
a.	Modification de la méthode d'extraction des protéines en en milieu acide.....	110
b.	Principe de la méthode d'égalisation (figure 13)	111
c.	Purification des protéines oxydées de l'égalisat (figure 14).....	113
5.	Les méthodes de quantification de l'état redox des thiols.....	115
a.	Le NEM C ¹⁴	115
i.	Définition de l'indice d'oxydation des protéines	115
ii.	Calcul de l'indice d'oxydation des protéines	117
iii.	Vérification de la corrélation entre la valeur I _{ox} calculée et la quantification de l'état redox de Tsa1 et Sod1 en western blot	117

iv.	Comparaison avec le calcul de l'état d'oxydation des protéines réalisé par d'autres auteurs..	118
v.	Limites de la méthode de quantification par le NEM C ¹⁴	118
b.	Le NEM fluorescent.....	119
i.	Quantification de l'état d'oxydation des protéines.....	119
ii.	Comparaison avec d'autres méthodes de quantification des thiols oxydés	121
iii.	Limites de notre méthode de quantification par le NEM fluorescent.....	121
B.	<i>Identification des protéines oxydées</i>	123
1.	Identification des protéines oxydées dans une souche sauvage non traitée.....	123
2.	Identification des protéines oxydées après égalisation.....	127
C.	<i>Etude de l'altération de l'état redox du résidu cystéine</i>	129
1.	Croissance en conditions anaérobiques.....	129
2.	Effet d'un traitement au peroxyde d'hydrogène	130
3.	Effet de l'absence d'une des deux voies cytoplasmiques de réduction des thiols.....	134
a.	Invalidation de la voie des thiorédoxines.....	134
i.	$\Delta trr1 \Delta trx1 \Delta trx2$	134
ii.	$\Delta trr1$	138
b.	Invalidation de la voie du glutathion.....	148
i.	L'oxydation des thiols par le GSSG.....	149
ii.	Analyse du rôle du glutathion à l'échelle du protéome	149
iii.	Analyse du rôle du glutathion sur une protéine modèle	151
iv.	Conclusions.....	152
4.	En l'absence de chaîne respiratoire mitochondriale fonctionnelle (Rho ⁰)	153
D.	<i>Discussion</i>	155
II.	RESULTATS ET DISCUSSION 2: ETUDE DU MECANISME D'OXYDATION DE LA SOD1	161
A.	<i>La Superoxyde Dismutase 1 (Sod1)</i>	161
1.	Mécanisme enzymatique des superoxyde dismutases (Pelmenschikov and Siegbahn, 2005).....	161
2.	Données de la littérature	162
a.	Les SOD sont essentielles au métabolisme aérobie	162
b.	Sod1 participe au métabolisme des métaux	162
c.	Le rôle de Ccs1 «Copper Chaperone for Sod1» dans l'activation de Sod1.....	164
i.	Sod1 nécessite du cuivre pour son activité catalytique	164
ii.	Sod1 nécessite un pont disulfure intramoléculaire pour être active	165
d.	La localisation de Sod1 et Ccs1 dans l'espace intermembranaire mitochondrial (EIM).....	166
e.	L'invalidation de la Sod1 chez l'homme	167
3.	Notre hypothèse de la formation du pont disulfure de Sod1 (schéma 25).....	168
B.	<i>Résultats</i>	171
1.	Données expérimentales du protéome oxydé.....	171
a.	La Sod1.....	171
b.	La Ccs1	172
2.	Analyse de l'état d'oxydation de Ccs1	173
3.	Etat redox et activité de la Sod1	177
a.	Etat redox de Sod1.....	177
b.	Activité de Sod1	179
4.	Interaction de Sod1 et Ccs1	180
a.	Visualisation d'une interaction Sod1/Ccs1 in vivo	180
i.	Extraction des protéines totales en milieu acide.....	180
ii.	Co-précipitation de Sod1 et Ccs1.....	182
b.	Effet de la mutation des cystéines de Sod1 sur l'interaction avec Ccs1	183
i.	Extraction des protéines totales en milieu acide.....	183
ii.	Co-précipitation de Sod1 et Ccs1	183
c.	Effet de la mutation des cystéines de Ccs1	184
5.	Effets de l'inactivation de la voie Erv1/Mia40	186
a.	La répression d'Erv1 est létale.....	186
i.	L'effet de la température.....	186
ii.	L'effet de la tétracycline	187
iii.	Combinaison de la température et de la tétracycline	187
iv.	Conclusion	188
b.	Analyse du niveau d'expression d'Erv1	189
c.	L'effet de l'extinction de l'expression d'Erv1 sur l'état redox de son substrat Mia40.....	191
i.	Analyse de l'état d'oxydation de Mia40-Flag dans les mitochondries.....	191
ii.	Analyse de la réduction de Mia40 par différents agents réducteurs	193
iii.	Analyse de l'oxydation de la protéine endogène Mia40 dans un extrait brut.....	193
d.	L'effet de l'extinction de l'expression de Erv1 sur Sod1 et Ccs1	194
i.	Contrôle des conditions expérimentales.....	194
ii.	Localisation de Ccs1	196
iii.	Localisation de Sod1	197

iv.	Oxydation et activité de Sod1	198
6.	Recherche de nouvelles cibles de la voie Erv1/Mia40.....	199
7.	Analyse des cystéines de Mia40 impliquées dans le mécanisme d'échange di-thiol/disulfure avec Erv1 ..	202
C.	<i>Discussion</i>	205
III.	CONCLUSION	207
	MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	209
I.	MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE.....	209
A.	<i>Souches utilisées dans cette étude</i>	209
B.	<i>Conditions de cultures des cellules</i>	210
1.	De <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	210
2.	D' <i>Escherichia coli</i>	210
C.	<i>Techniques de manipulation de S. cerevisiae</i>	211
1.	Transformation par choc thermique de <i>S. cerevisiae</i>	211
2.	Test de sensibilité en milieu solide	211
a.	Sensibilité aux agents oxydants	211
b.	Thermosensibilité	212
3.	Fractionnement cellulaire pour l'isolement des mitochondries de levure (d'après le protocole de (Daum et al., 1982))	212
4.	Obtention d'une souche dépourvue d'ADN mitochondrial (Rho ⁰).....	213
5.	Sporulation et dissection des tétrades pour obtenir une souche invalidée pour <i>ERV1</i>	214
II.	BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	215
A.	<i>Construction des plasmides</i>	215
B.	<i>Liste des plasmides</i>	216
C.	<i>Techniques</i>	217
1.	Invalidation de gène par recombinaison homologue.....	217
2.	Extraction de l'ADN génomique	218
3.	Transformation des bactéries compétentes <i>E.coli</i> par électroporation	218
4.	Séquençage	219
III.	BIOCHIMIE DES PROTEINES	219
A.	<i>Purification des protéines étiquetées</i>	219
1.	Purification de Ccs1-8His et de ses partenaires à partir de <i>S. cerevisiae</i>	219
2.	Co-purification de Sod1-8His et Ccs1-HA	220
3.	Expression et purification de Tsa1 chez <i>E. coli</i> pour obtenir des échantillons sous différents état redox...	220
a.	Expression	220
b.	Purification	221
c.	Réduction, Oxydation et Suroxydation in vitro.....	221
B.	<i>Méthode d'extraction des protéines pour l'analyse de l'état d'oxydation in vivo des protéines</i>	221
1.	En milieu acide (protocole adapté de (Delaunay et al., 2000))	221
2.	En milieu natif contenant un agent alkylant (pour l'égalisation)	222
C.	<i>Marquage des protéines oxydées (pour revue voir (Le Moan N., 2007))</i>	223
1.	Pour le marquage par le NEM C ¹⁴	224
2.	Pour le marquage par la Biotine-HPDP	224
3.	Pour le marquage par le NEM fluorescent.....	224
D.	<i>Purification des protéines oxydées marquées par la Biotine-HPDP</i>	225
E.	<i>Séparation sur un gel bidimensionnel et révélation des protéines oxydées</i>	225
1.	Première dimension	225
2.	Seconde dimension	226
3.	Méthodes de détection	226
F.	<i>Analyse de l'état redox des protéines en western blot</i>	227
G.	<i>Méthode d'égalisation (réalisée par Luc Guerrier CIPHERGEN-Biorad)</i>	228
H.	<i>Identification des protéines par spectrométrie de masse</i>	229
1.	L'analyse par MALDI-TOF-MS.....	230
2.	L'analyse par LC-MS/MS	231
I.	<i>Test NBT (d'après le protocole de (Flohe and Otting, 1984))</i>	233
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	235
	ANNEXES	253
I.	ANNEXE 1: IDENTIFICATION DES PROTEINES OXYDEES	253
II.	ANNEXE 2: PUBLICATIONS.....	263
A.	<i>Publication n°1: Article paru dans «Journal of Biological Chemistry»</i>	263
B.	<i>Publication n°2: Revue parue dans FEBS letters</i>	275
C.	<i>Publication n°3: Chapitre à paraître dans le livre «Methods in Molecular Biology»</i>	285

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1. EVALUATION DE L'ETAT REDOX DE LA THIORÉDOXINE 2 (Trx2) PAR MARQUAGE DES THIOLS PAR L'AMS.	91
FIGURE 2. EVALUATION DE L'ÉTAT REDOX DE TSA1 PAR MARQUAGE DES THIOLS PAR LE NEM C ¹⁴	92
FIGURE 3. EVALUATION DE LA SPÉCIFICITÉ DE MARQUAGE DES THIOLS OXYDÉS PAR LE NEM C ¹⁴ EN GEL MONODIMENSIONNEL.	95
FIGURE 4. EVALUATION DE LA SPÉCIFICITÉ DE MARQUAGE DES THIOLS OXYDÉS PAR LE NEM C ¹⁴ EN GEL BIDIMENSIONNELS.	96
FIGURE 5. EVALUATION DE LA SATURATION DE LA TOTALITÉ DES THIOLS PAR LE NEM C ¹⁴ PAR COMPARAISON AVEC LE MARQUAGE DES THIOLS OXYDÉS.	97
FIGURE 6. EVALUATION DE LA SATURATION DE LA TOTALITÉ DES THIOLS PAR LE NEM C ¹⁴ PAR BLOCAGE PRÉLIMINAIRE AVEC DE L'IAM.	98
FIGURE 7. RECHERCHE DE LA CONCENTRATION OPTIMALE D'IAM POUR DILUER LE NEM FLUORESCENT.	101
FIGURE 8. EVALUATION DU MARQUAGE NON SPÉCIFIQUE DES THIOLS OXYDÉS PAR SUPERPOSITION DU MARQUAGE PAR LE NEM FLUORESCENT DES THIOLS RÉDUITS ET OXYDÉS.	102
FIGURE 9. RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES DE pH ET DE TEMPÉRATURE POUR LE MARQUAGE DES THIOLS OXYDÉS PAR LE NEM-780.	103
FIGURE 10. ETUDE DE L'ÉTAT REDOX DE TSA1 APRÈS MARQUAGE DES THIOLS RÉDUITS ET OXYDÉS PAR LE NEM FLUORESCENT.	104
FIGURE 11. CONTRÔLE DES CONDITIONS DE PURIFICATION DES PROTÉINES MARQUÉES PAR LA BIOTINE-HPDP (A), ET DE LA PURIFICATION SPÉCIFIQUE DES PROTÉINES OXYDÉES MARQUÉES PAR LA BIOTINE-HPDP (B).	106
FIGURE 12. CONTRÔLES DU MARQUAGE SPÉCIFIQUE DES THIOLS PAR LA BIOTINE-HPDP ET DE LA SPÉCIFICITÉ DE PURIFICATION DES PROTÉINES OXYDÉES APRÈS MARQUAGE À LA BIOTINE-HPDP.	108
FIGURE 13. EVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE L'ENRICHISSEMENT DES PROTÉINES PEU ABONDANTES PAR LA MÉTHODE D'ÉGALISATION.	112
FIGURE 14. CONTRÔLE DE LA PURIFICATION DES PROTÉINES OXYDÉES MARQUÉES PAR LA BIOTINE-HPDP APRÈS ÉGALISATION.	114
FIGURE 15. EVALUATION DE L'ÉTAT D'OXYDATION DES PROTÉINES PAR MARQUAGE DES THIOLS TOTAUX ET OXYDÉS PAR NEM C ¹⁴	116
FIGURE 16. VISUALISATION DE L'ÉTAT REDOX DES THIOLS APRÈS MARQUAGE DES THIOLS RÉDUITS ET OXYDÉS PAR LE NEM-FLUORESCENT.	120
FIGURE 17. IDENTIFICATION DES PROTÉINES OXYDÉES PURIFIÉES PAR LA BIOTINE-HPDP ET COMPARAISON AVEC LES PROTÉINES OXYDÉES MARQUÉES PAR LE NEM C ¹⁴	125
FIGURE 18. IDENTIFICATION DES PROTÉINES OXYDÉES PURIFIÉES PAR LA MÉTHODE DE BIOTINE-HPDP À PARTIR D'UN EXTRAIT ÉGALISÉ (B) OU NON (A) D'UNE SOUCHE SAUVAGE.	128
FIGURE 19. VARIATION DE L'ÉTAT D'OXYDATION DES THIOLS EN ANAÉROBIE.	130
FIGURE 20. VARIATION DE L'OXYDATION DES THIOLS EN RÉPONSE AU PEROXYDE D'HYDROGÈNE.	132
FIGURE 21. VARIATION DE L'ÉTAT REDOX DES THIOLS EN RÉPONSE AU PEROXYDE D'HYDROGÈNE.	133
FIGURE 22. ALTÉRATION DE L'OXYDATION DES PROTÉINES DANS UNE SOUCHE INVALIDÉE POUR LA VOIE DES THIORÉDOXINES DE RÉDUCTION DES THIOLS CYTOPLASMIQUE.	135
FIGURE 23. COMPARAISON DE L'ALTÉRATION DE L'OXYDATION DES PROTÉINES ENTRE LA SOUCHE SAUVAGE (A, C ET E) ET LA SOUCHE INVALIDÉE POUR LA VOIE DES THIORÉDOXINES (B, D ET F).	138
FIGURE 24. IDENTIFICATION DES PROTÉINES OXYDÉE PURIFIÉES À PARTIR D'EXTRAITS ÉGALISÉS OU NON ISSUS D'UNE SOUCHE INVALIDÉE POUR LE GÈNE TRR1.	140
FIGURE 25. ETUDE DU NOMBRE DE PROTÉINES OXYDÉES IDENTIFIÉES DANS CHAQUE FRACTIONS NE _{SE} , E _{SE} , NE _E ET E _E DE LA $\Delta TRR1$	141
FIGURE 26. RÉPARTITION DES PROTÉINES OXYDÉES IDENTIFIÉES DANS LA $\Delta TRR1$ EN FONCTION DE LEUR LOCALISATION SUBCELLULAIRE (A) ET COMPARAISON AVEC LE PROTÉOME ENTIER DE <i>S.CEREVISIAE</i> (B).	142
FIGURE 27. RÉPARTITION DES PROTÉINES OXYDÉES IDENTIFIÉES DANS LA $\Delta TRR1$ EN FONCTION DE LEUR EXPRESSION.	143
FIGURE 28. RÉPARTITION DES PROTÉINES OXYDÉES IDENTIFIÉES DANS LA $\Delta TRR1$ EN FONCTION DE LEUR POINT ISOÉLECTRIQUE (PI).	144
FIGURE 29. RÉPARTITION DES PROTÉINES OXYDÉES IDENTIFIÉES DANS LA $\Delta TRR1$ EN FONCTION DE LEUR FONCTION CELLULAIRE.	146
FIGURE 30. ALTÉRATION DE L'OXYDATION DES PROTÉINES DANS UNE SOUCHE MUTÉE AU NIVEAU DU GÈNE <i>PRO2</i> ET INVALIDÉE POUR LES GÈNES <i>GSH1</i> ET <i>GLR1</i>	150
FIGURE 31. EVALUATION DE L'ÉTAT D'OXYDATION DE LA Tdh3-MYC DANS LA SOUCHE $\Delta GSH1PRO2-1\Delta GLR1$	152
FIGURE 32. VARIATION DE L'ÉTAT REDOX DES THIOLS D'UNE SOUCHE SAUVAGE OU DÉPOURVUE D'ADN MITOCHONDRIAL (RHO ⁰).	154

FIGURE 33. L'OXYDATION DE LA SOD1 DANS UNE SOUCHE SAUVAGE ET INVALIDÉE POUR LA VOIE DES THIORÉDOXINES.	172
FIGURE 34. L'OXYDATION DE LA CCS1 DANS UNE SOUCHE SAUVAGE ET INVALIDÉE POUR LA VOIE DES THIORÉDOXINES.	173
FIGURE 35. ETUDE DE L'ÉTAT D'OXYDATION DE LA CCS1.	174
FIGURE 36. CONTRÔLE DE LA SUREXPRESSION ET DE L'OXYDATION DE CCS1.	175
FIGURE 37. RECHERCHE DES PARTENAIRES REDOX DE CCS1.	176
FIGURE 38. EVALUATION DE L'ÉTAT D'OXYDATION <i>IN VIVO</i> DE SOD1-HIS.....	178
FIGURE 39. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ <i>IN VIVO</i> DE LA SOD1-HIS.....	180
FIGURE 40. RECHERCHE DE L'INTERACTION <i>IN VIVO</i> SOD1-CCS1 PAR EXTRACTION DES PROTÉINES TOTALES.	181
FIGURE 41. RECHERCHE DE L'INTERACTION <i>IN VIVO</i> SOD1-CCS1 PAR CO-PRÉCIPITATION.....	182
FIGURE 42. EFFET DE LA MUTATION DES CYSTÉINES DE CCS1 SUR LE COMPLEXE SOD1-CCS1.	185
FIGURE 43. CONTRÔLE DE L'EFFET DE LA MUTATION THERMOSENSIBLE D'ERV1 SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE.	187
FIGURE 44. MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES POUR L'EXPRESSION CONDITIONNELLE D'ERV1.	188
FIGURE 45. CONTRÔLE DE L'EXTINCTION DE L'EXPRESSION D'ERV1.....	190
FIGURE 46. VÉRIFICATION DE L'ÉTAT REDOX DE MIA40 EN FONCTION DE L'EXPRESSION CONDITIONNELLE D'ERV1.	192
FIGURE 47. VÉRIFICATION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES AFIN D'ANALYSER LA LOCALISATION DE SOD1 ET CCS1 DANS L'ESPACE INTERMEMBRANAIRE DE LA MITOCHONDRIE (EIM).	195
FIGURE 48. EFFET DE L'EXPRESSION CONDITIONNELLE D'ERV1 SUR LA LOCALISATION DE CCS1 DANS L'EIM... ..	197
FIGURE 49. EFFET DE L'EXPRESSION CONDITIONNELLE D'ERV1 SUR LA LOCALISATION DE SOD1 DANS L'EIM... ..	197
FIGURE 50. EFFET DE L'EXPRESSION CONDITIONNELLE D'ERV1 SUR L'ACTIVITÉ DE SOD1.....	199
FIGURE 51. ANALYSE DE L'ÉTAT REDOX DES FRACTIONS MITOCHONDRIALES ET CYTOPLASMIQUES APRÈS MARQUAGE DES THIOLS RÉDUITS ET OXYDÉS PAR LE NEM-FLUORESCENT D'UNE SOUCHE EXPRIMANT ERV1 SOUS UNE FORME SAUVAGE OU THERMOSENSIBLE.	201
FIGURE 52. RECHERCHE DES CYSTÉINES DE MIA40 EN INTERACTION AVEC ERV1.....	204

TABLE DES SCHEMAS

SCHÉMA 1. STRUCTURE DU DOMAINE «THIOREDOXIN FOLD».....	26
SCHÉMA 2. LES POTENTIELS REDOX DES DIFFERENTES THIOL-OXYDASES ET THIOL-TRANSFERASES.....	28
SCHÉMA 3. CHEMINEMENT DES ÉLECTRONS LE LONG DES DEUX VOIES DE RÉDUCTION DES THIOLS.....	31
SCHÉMA 4. MÉCANISME DE RÉDUCTION DES PONTS DISULFURES PAR LA THIORÉDOXINE.....	36
SCHÉMA 5. MÉCANISME DE RÉDUCTION DE LA THIORÉDOXINE PAR LA THIORÉDOXINE RÉDUCTASE CHEZ S.CEREVISIAE.....	37
SCHÉMA 6. MÉCANISME DE RÉDUCTION DU GSSH PAR LA GLUTATHION RÉDUCTASE CHEZ S.CEREVISIAE.....	39
SCHÉMA 7. MÉCANISME DE RÉDUCTION DES GRX DI-THIOL OXYDÉES PAR LE GSH.....	40
SCHÉMA 8. MÉCANISME DE RÉDUCTION DES PROTÉINES GLUTATHIONYLÉES PAR LES GRX MONO-THIOL.....	40
SCHÉMA 9. RÉACTIVITÉ DES INTERMÉDIAIRES RÉACTIFS DÉRIVÉS DE L'OXYGÈNE VIS-À-VIS DES COMPOSANTS CELLULAIRE.....	42
SCHÉMA 10. RÉDUCTION DES PEROXYDES PAR LES PEROXYDASES DÉPENDANTES DU GSH.....	43
SCHÉMA 11. SCHÉMA DE LA RÉDUCTION DES PEROXYDES PAR LES PEROXYREDOXINES (PRX) À 2 CYSTÉINES: EXEMPLE DE TSA1.....	44
SCHÉMA 12. MODÈLE SPÉCULATIF DE LA FONCTION DES GRX MONO-THIOL DANS L'ASSEMBLAGE DES CENTRES FE/S.....	57
SCHÉMA 13. LA REDONDANCE DES DEUX VOIES DE RÉDUCTION CHEZ <i>E.COLI</i>	59
SCHÉMA 14. LES MEMBRES DE LA FAMILLE DES FLAVINES SULFHYDRYLES OXYDASES ET LA FLAVINE OXYDASE ERO1.....	62
SCHÉMA 15. ILLUSTRATION DU RÔLE DU FAD DANS LA RÉGÉNÉRATION D'ERO1.....	66
SCHÉMA 16. MODÈLE DU MÉCANISME D'IMPORT DES PROTÉINES DE CLASSE 2 PAR LE RELAIS DISULFURE ERV1/MIA40.....	72
SCHÉMA 17. MÉCANISME DE FORMATION DES PONTS DISULFURE DANS LE PÉRIPLASME DE <i>E.COLI</i>	74
SCHÉMA 18. DESSIN EXPLICATIF DU PRINCIPE DES GELS DIAGONAUX.....	77
SCHÉMA 19. DESSIN EXPLICATIF DE LA MÉTHODE DE PURIFICATION DES PARTENAIRES DES THIORÉDOXINES.....	81
SCHÉMA 20. PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTES MÉTHODES UTILISÉES DANS CETTE ÉTUDE POUR ANALYSER L'ÉTAT REDOX DES THIOLS OU POUR PURIFIER LES PROTÉINES OXYDÉES.....	87
SCHÉMA 21. STRUCTURE MOLÉCULAIRE DE LA BIOTINE-HPDP.....	89
SCHÉMA 22. CRISTALLISATION DU COMPLEXE SOD1/CCS1.....	165
SCHÉMA 23. MODÈLE DE FORMATION DU PONT DISULFURE INTRAMOLÉCULAIRE DE SOD1.....	166
SCHÉMA 24. MODÈLE DE RÉTENTION DE SOD1 DANS L'EIM.....	167
SCHÉMA 25. HYPOTHÈSE DU MÉCANISME DE FORMATION DU PONT DISULFURE INTRAMOLÉCULAIRE DE SOD1.....	169
SCHÉMA 26. INTRODUCTION D'UNE MUTATION OU D'UNE ÉTIQUETTE PAR PCR EN DEUX ÉTAPES.....	215
SCHÉMA 27. SCHÉMA EXPLICATIF DU PRINCIPE D'IDENTIFICATION DES PROTÉINES PAR LA TECHNIQUE DU MALDI- TOF-MS.....	231
SCHÉMA 28. EXPLICATION DU PRINCIPE D'IDENTIFICATION DES PROTÉINES PAR LC-MS/MS.....	232

TABLEAUX

TABLEAU 1. IDENTIFICATION DES PROTEINES OXYDEES PAR MALDI-TOF	253
TABLEAU 2. IDENTIFICATION DES PROTEINES OXYDEES DANS LA SOUCHE Δ TRR1 PAR SPECTROMETRIE DE MASSE LC-MS/MS	256

LISTE DES ABREVIATIONS

AMS :	4-acetamido-4'-maleimidilstilbene-2,2'- disulfonic acid
Biotine-HPDP:	N-(6-(Biotininamido)Hexyl)-3'-(2'-Pyridylthio)Propionamide
dNTP:	déoxyribonucléotides
DTT :	Dithiothréitol
EIM:	Espace intermembranaire mitochondrial
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FMN :	Flavine mono nucléotide
Glr:	Glutathion-réductase
Gpx :	Glutathion-peroxydase
Grx :	Glutarédoxine
GSH :	Glutathion
IAM:	Iodoacétamide
IRO :	Intermédiaire Réactif de l'Oxygène
NADP :	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEM :	N-EthylMaléimide
NTP:	ribonucléotides
PAPS :	Phospho-adénosyl-phosphosulfate
PCR:	Polymerase chain reaction
RE:	Réticulum endoplasmique
RNR :	Ribonucléotide réductase
SDS-PAGE :	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Srx :	Sulfiredoxine
TCA:	TrichloroAcétique Acide
TCEP :	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
Tpx ou Prx :	Thiorédoxine peroxydase ou peroxyredoxines
Trr :	Thiorédoxine- réductase
Trx :	Thiorédoxine
Yap1 :	Yeast Activator Protein 1
1D:	monodimensionnel
2D:	bidimensionnel

AVANT PROPOS

«Quel bonheur que des systèmes permettent de domestiquer l'oxygène, de manière à ce que nos corps soient oxydés, mais seulement aux bons endroits»

Barton et Sawyer 1993

La vie a débuté sur Terre il y a un peu moins de quatre milliards d'années, restant au stade unicellulaire pendant près des trois-quarts de ce temps. La vie primitive était strictement anaérobie jusqu'à l'apparition des premières bactéries photosynthétiques. Celles-ci ont «appris» à convertir l'énergie solaire en énergie chimique, l'ATP, avec comme conséquence le dégagement d'oxygène moléculaire (O_2), une molécule ayant un important potentiel oxydant. Suite à la montée de la concentration d'oxygène dans l'atmosphère, les cellules ont du s'adapter à ce nouvel environnement oxydant en développant des compartiments spécialisés dans l'utilisation de l' O_2 , comme la mitochondrie, afin de «domestiquer» le pouvoir oxydant de cette molécule.

L'expression «métabolisme de l'oxygène» a été utilisée pour la première fois par Mason en 1957 (Mason, 1957) et englobe de nombreux processus métaboliques dans lesquels intervient l' O_2 . Le premier exemple de ce métabolisme est donné par le rôle de l' O_2 en tant qu'accepteur terminal des électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, permettant ainsi la synthèse d'énergie sous forme d'ATP. L' O_2 intervient également comme co-facteur dans plusieurs réactions enzymatiques, telle que la synthèse d'ergostérol, indispensable au maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire chez la levure. L' O_2 sert aussi de co-facteur dans la réduction des ribonucléotides en déoxyribonucléotides, nécessaires à la biosynthèse d'ADN. Le métabolisme de l' O_2 fait souvent intervenir le résidu cystéine. Par exemple, le repliement des protéines de la voie de sécrétion, de même que l'import mitochondrial d'une classe particulière de protéines, sont des phénomènes contrôlés par la formation de ponts disulfures, dépendante de l' O_2 . L'oxydation du résidu cystéine est contrôlée par un système de réduction composé de deux branches distinctes, appelées la voie des thiorédoxines (Trx) et la voie du glutathion (GSH). Ces deux voies utilisent la chimie redox du soufre de la cystéine pour réduire les cystéines oxydées, avec des électrons fournis par le NADPH.

Le métabolisme de l'oxygène conduit nécessairement à la formation d'espèces chimiques oxydantes, ayant une réactivité beaucoup plus importante que celle de l'O₂, et appelées intermédiaires réactifs de l'oxygène (IRO) ou «reactive oxygen species» (ROS), dans le langage anglo-saxon. Les ROS, dont les plus connus sont l'ion superoxyde (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle (OH[•]), sont produits par la réduction à un, deux ou trois électrons de l'oxygène. Les ROS, et en particulier l'OH[•], sont capables de provoquer l'oxydation de nombreux composants cellulaires. Leur production doit donc être étroitement contrôlée. L'élimination des ROS fait intervenir plusieurs systèmes antioxydants, comme les thiol-peroxydases utilisant la réactivité du soufre de la cystéine pour réduire l'H₂O₂, et les superoxydes dismutases utilisant le potentiel redox d'un métal de transition pour éliminer l'ion superoxyde. Les thiol-peroxydases fonctionnent grâce aux flux d'électrons, provenant des systèmes des Trx et du GSH.

Notre travail a consisté à étudier l'état d'oxydation des résidus cystéines de la cellule et les différents paramètres cellulaires régissant l'état redox du résidu cystéine, en particulier le rôle et la contribution respective des voies des Trx et du GSH dans le contrôle de cette oxydation, généralement appelé «contrôle de l'état redox des thiols». Le métabolisme redox des thiols fait intervenir des réactions le plus souvent très rapides, rendant difficile leur étude biochimique *in vivo*. Afin d'éviter cet écueil technique nous avons exploité la facilité des approches génétiques chez *S.cerevisiae*, et les avons couplés à une approche protéomique d'identification des thiols oxydés. Ce travail nous a permis d'identifier de nombreuses protéines cytoplasmiques portant un ou plusieurs résidus cystéine oxydés et d'établir une différence frappante entre les voies des Trx et du GSH dans le contrôle redox des thiols intracellulaires. Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique publié dans une revue internationale (Le Moan et al., 2006). Au cours de notre travail, nous nous sommes également intéressés à la superoxyde dismutase Sod1, une protéine cytoplasmique, que nous avons identifié comme oxydée constitutivement. Nous avons étudié le mécanisme d'oxydation de Sod1, et avons observé que celui-ci semble se dérouler dans l'espace intermembranaire mitochondrial et fait intervenir une oxydase spécifique des thiols.

Nous allons introduire notre travail par une revue détaillée des bases du métabolisme redox des thiols et des fonctions cellulaires qui lui sont associées.

Introduction

I. Les différents états redox du groupement thiol des résidus cystéines

Le résidu cystéine comporte un groupement thiol (-SH), dont l'atome de soufre peut se trouver sous 10 états d'oxydation différents. Il est donc sujet à de nombreuses modifications redox (pour revue voir (Jacob et al., 2003)).

De plus, le soufre est chimiquement très réactif. Cette propriété confère aux résidus cystéines la capacité d'être impliqués dans de nombreux mécanismes d'oxydoréduction, retrouvés dans différents processus biologiques (pour revue voir (Giles et al., 2003a)).

Nous allons tout d'abord décrire les différents paramètres déterminant la réactivité du résidu cystéine, puis nous en décrivons les différents états redox, en insistant sur ceux qui ont une pertinence pour notre étude, c'est-à-dire ceux dont l'existence dans la cellule, est suspectée ou prouvée.

A. Les paramètres de réactivité du résidu cystéine

Les résidus cystéines ne sont pas tous susceptibles d'être modifiés *in vivo*. La première condition nécessaire à la modification d'un thiol est son accessibilité au solvant. La deuxième condition est sa capacité à s'ioniser sous forme thiolate (S⁻) dans les conditions de pH intracellulaire. En effet, la forme thiolate est la seule forme douée de réactivité chimique suffisante vis-à-vis des électrophiles. La forme thiolate augmente également la nucléophilicité du résidu cystéine. La propriété d'ionisation du thiol du résidu cystéine est exprimée par son pKa, dont la valeur doit être inférieure ou égale au pH intracellulaire pour s'ioniser *in vivo* (6,5-7). Le pKa de la cystéine libre est de 8,5. Cependant, l'environnement en acide aminé du résidu cystéine au sein d'une protéine diminue la valeur du pKa, par stabilisation de la forme thiolate par un acide aminé chargé positivement, ou augmente cette valeur, par stabilisation de la forme protonée. Cette réactivité différentielle du résidu cystéine est une des bases moléculaires expliquant la spécificité des réactions dans lesquelles ce résidu intervient. Néanmoins, l'exposition au solvant et la propriété d'ionisation ne sont probablement pas les seuls paramètres déterminant la réactivité

du résidu cystéine. D'autres paramètres, encore mal définis, interviennent en fonction du type de réaction considéré.

B. Les réactions d'oxydation des résidus cystéines

1. La formation de l'acide sulfénique

Formation

Le soufre de la cystéine est, grâce à ses propriétés redox, capable de réduire les peroxydes ROOH (H₂O₂ ou peroxydes organiques). Cependant cette réduction des peroxydes ne peut intervenir que lorsque le groupement thiol du résidu cystéine est sous une forme réactive, à savoir sous forme thiolate (-S⁻), déprotonée. Lors de la réaction d'une cystéine avec l'H₂O₂, le thiolate établit une attaque nucléophile au niveau de la liaison peroxyde —O—O, conduisant au transfert d'un groupement -OH du peroxyde vers l'atome de soufre de la cystéine. Le résultat de cette réaction est l'oxydation du thiol sous forme d'acide sulfénique (-SOH) et la production d'eau, si l'espèce réduite est l'H₂O₂, ou si l'espèce réduite est un peroxyde organique, en l'alcool correspondant (réaction 1). Cette réaction est à la base de la réduction des peroxydes par les thiol-peroxydases.



Existence de l'acide sulfénique

Malgré la grande instabilité du Cys—SOH, il a été possible de montrer son existence *in vivo*, grâce à une méthode de détection spécifique des acides sulféniques (Saurin et al., 2004).

Devenir de l'acide sulfénique

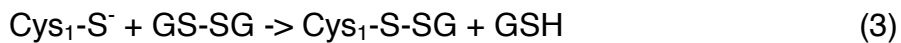
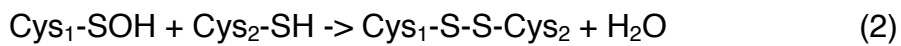
L'acide sulfénique peut ensuite former un pont disulfure ou un acide sulfinique ou sulfonique (voir ci-dessous).

2. La formation du disulfure

Formation

La forme acide sulfénique de la cystéine est particulièrement instable, car elle-même très réactive. Afin de se stabiliser, elle se condense avec un second groupement thiol de proximité, pour former un pont disulfure (-S-S-) (réaction 2). Le pont disulfure peut être intramoléculaire ou intermoléculaire. La formation d'un pont

disulfure entre le résidu cystéine d'une protéine et le GSH (Prot-S-SG) est appelée glutathionylation ou S-thiolation. Il existe plusieurs mécanismes de glutathionylation: (i) un échange di-thiol/disulfure entre une protéine et le GSSG (réaction 3), (ii) une réaction directe entre un acide sulfénique et le GSH (réaction 4), (iii) une réaction entre deux radicaux thiyls (réaction 5) ou (iv) une réaction entre un nitrosothiol et le GSH (réaction 6) (pour revue voir (Ghezzi, 2005)).

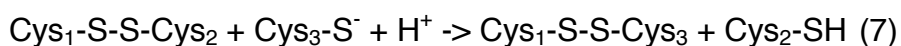


Existence des disulfures

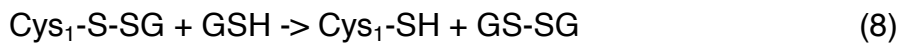
Nous verrons que de nombreuses protéines peuvent former des ponts disulfures *in vivo*, et notamment dans des compartiments cellulaires spécialisés dans cette catalyse. Quelques études effectuées chez les mammifères et chez la levure ont montré l'existence *in vivo* de nombreuses protéines cytoplasmiques sous forme de disulfure (Cumming et al., 2004), (Brennan et al., 2004) et glutathionylées (Shenton and Grant, 2003) (Fratelli et al., 2002). Cependant la prépondérance d'un des mécanismes dans la glutathionylation des protéines est inconnue *in vivo*.

Devenir des disulfures

Le pont disulfure est une forme d'oxydation stable, mais réversible selon un mécanisme d'échange di-thiol/disulfure. Le groupement thiolate d'une première protéine catalyse une réaction de substitution nucléophile sur le pont disulfure d'une seconde protéine, aboutissant à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre les deux protéines. Dans un second temps, un deuxième thiolate libre, venant ou non de la première protéine, attaque ce pont intermoléculaire, formant un nouveau pont disulfure entre les deux résidus cystéines responsables de l'attaque nucléophile, et libérant la seconde protéine sous une forme réduite (réaction 7). Nous verrons que les voies de réduction et les voies de formation des ponts disulfures utilisent ce mécanisme réactionnel d'échange di-thiol/disulfure.



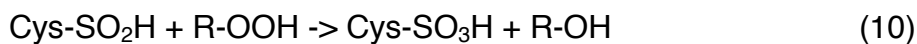
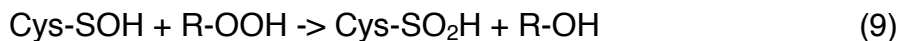
La glutathionylation est également réversible par un mécanisme appelé déglutathionylation (réaction 8). Cette réaction peut être directement catalysée par une molécule de GSH ou par l'intermédiaire des glutarédoxines mono-thiol (voir partie IV.A.2.b).



3. La formation des acides sulfiniques et sulfoniques

Formation

L'acide sulfénique formé par réaction d'un thiol et d'un peroxyde est également susceptible de réagir avec une autre molécule de peroxyde, produisant ainsi un acide sulfinique (-SO₂H) (réaction 9), puis un acide sulfonique (SO₃H) (réaction 10).



Existence des acides sulfiniques et sulfoniques

De par leur capacité à réduire les peroxydes, les thiol-péroxydases sont sujettes à ces modifications *in vivo* (Wagner et al., 2002).

Devenir des acides sulfiniques et sulfoniques

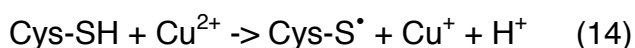
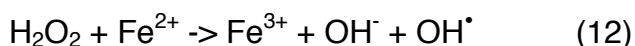
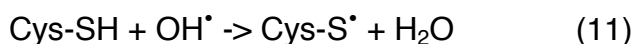
Ces deux dernières formes d'oxydation des cystéines sont, à l'exception de l'acide sulfinique des peroxyredoxines, irréversibles, et altèrent l'activité des protéines. Le laboratoire du Dr. S.G. Rhee a en effet montré que l'acide sulfinique formé au niveau de la cystéine catalytique des peroxyredoxines classiques à deux cystéines (2-Cys Prx), était réversible *in vivo* (Woo et al., 2003). Notre laboratoire a ensuite identifié l'enzyme responsable de cette réduction, baptisé sulfiredoxine (Biteau et al., 2003). La possibilité d'une réduction de l'acide sulfonique n'a jamais été évoquée.

4. La formation du thiyl

Formation

La formation du radical thiyl (-S[•]) est le résultat de l'arrachement d'un électron sur l'atome de soufre du groupement thiol. Ce radical peut être formé après réaction

d'un thiol avec un radical hydroxyle (OH[•]) (réaction 11). Cette réaction d'oxydation du résidu cystéine par l'OH[•] est directement dépendante de la réactivité de l'oxydant et non de la cystéine. L'OH[•] peut être produit par exemple lors de la réaction de Fenton (réaction 12), ou par radiolyse de l'eau. Le radical thiyl peut enfin être formé sur un résidu cystéine soit par fission homolytique d'un pont disulfure après radiolyse (réaction 13), soit par réaction d'un thiol avec un métal de transition, comme par exemple le cuivre (réaction 14).



Existence du thiyl

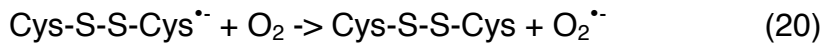
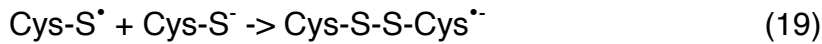
La formation d'un radical thiyl intervient dans le mécanisme catalytique de certains enzymes. Par exemple, la réduction des ribonucléotides (NTP) en 2'-déoxyribonucléotide (dNTP) par les ribonucléotides réductases (RNR) implique la formation d'un radical thiyl au sein du centre catalytique de l'enzyme. Le radical thiyl est formé par un transfert radicalaire, soit d'un radical tyrosyl (Tyr-O[•]) dans les RNR de classe I (réaction 15), soit d'un radical glyciyl dans les RNR de classe III (Gly[•]) (réaction 16), sur le groupement thiol (pour revue voir (Kolberg et al., 2004)).



Devenir du thiyl

Deux radicaux thiyls sont capables de s'assembler pour former un pont disulfure (réaction 17). Le radical thiyl peut également réagir avec l'oxygène pour former un acide sulfénique et de l'H₂O₂ (réaction 18) ou réagir avec un groupement thiolate pour former un radical anion disulfure (RSSR^{•-}) (réaction 19). Cette dernière espèce survient par exemple au cours du cycle catalytique de la RNR de classe I (Kolberg et al., 2004). Le radical anion disulfure RSSR^{•-} est un puissant réducteur. Il peut réagir soit avec l'oxygène, engendrant la formation d'ion superoxyde et d'un

pont disulfure (réaction 20), soit avec le groupement ribose d'un nucléotide dans le cas de la RNR de classe I (Réaction 21).



5. La formation du nitrosothiol

Formation

La nitrosylation d'une cystéine est l'oxydation de son groupement thiol en un groupement nitrosothiol (-SNO). La majorité des réactions de nitrosylation implique d'une part des résidus cystéines sous forme thiolate et d'autre part l'oxyde nitrique (NO^\bullet), une espèce radicalaire. Or, le NO^\bullet est peu réactif vis-à-vis des groupements non radicalaires, comme les groupements thiolates. Les réactions de nitrosylation nécessitent donc l'activation du NO^\bullet en un état d'oxydation supérieur, afin de réagir avec le groupement thiolate. Il existe différents mécanismes possibles d'activation du NO^\bullet , aboutissant à la formation de composés susceptibles de réagir ensuite avec un groupement thiolate, le plus connu étant le peroxyde nitrite (ONOO^-) issu de la réaction du NO^\bullet avec le superoxyde (O_2^-). L'oxyde nitrique étant une espèce radicalaire, il est également susceptible de réagir avec le radical thiyl, pour donner un nitrosothiol (réaction 22).

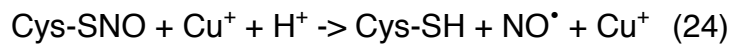


Existence du nitrosothiol

Les nitrosothiols sont des espèces très labiles, néanmoins leur existence *in vivo* a été prouvée (Jaffrey et al., 2001).

Devenir du nitrosothiol

Le nitrosothiol d'une cystéine peut être transféré sur un autre thiol par réaction de transnitrosylation, réagir avec un thiolate pour former un pont disulfure (réaction 23), ou avec l'ion Cu^+ entraînant la réduction du nitrosothiol (réaction 24).



6. Les modifications par les électrophiles

Les résidus cystéines, sous forme thiolate, sont des groupements nucléophiles, et peuvent donc réagir avec des composés électrophiles complexes tels que le N-éthylmaléimide (NEM) et l'iodoacétamide (IAM). La réaction de ces composés avec le thiolate entraîne alors la modification covalente et irréversible de la cystéine par formation d'un adduit sur le résidu cystéine (Cys-S-Electrophile). Nous verrons ultérieurement que ces modifications sont à la base de notre technique de marquage des thiols oxydés (voir partie résultats I.A.1).

II. Des systèmes d'échanges di-thiol/ disulfure permettent de réduire ou d'oxyder les résidus cystéines

Nous avons vu précédemment que le groupement thiol des cystéines peut exister *in vivo* sous une forme réduite (SH) ou oxydée (disulfure). Des systèmes cellulaires permettent de favoriser l'existence des résidus cystéines sous une forme réduite ou disulfure selon un mécanisme réactionnel appelé «échange di-thiol/disulfure».

A. Deux systèmes cellulaires catalysent les échanges di-thiol/disulfure

Chez tous les organismes, il existe deux types de systèmes cellulaires catalysant des réactions d'échange di-thiol/disulfure. Le premier système, localisé dans le cytoplasme des organismes procaryotes et eucaryotes, catalyse la réduction des ponts disulfures. Ce système comporte deux voies, à savoir la voie des thiorédoxines et la voie du glutathion. La voie des thiorédoxines comprend la thiorédoxine réductase et les thiorédoxines, également appelées thiol-transférases ou oxydoréductases des thiols. La voie du glutathion est composée de la glutathion réductase, du glutathion (GSH) et des glutarédoxines, ces dernières étant les thiol-transférases de cette voie. Le second système, localisé dans le réticulum endoplasmique (RE) des eucaryotes et dans le périplasme des bactéries, catalyse la formation des ponts disulfures. Cette activité est assurée dans le RE par les protéines Ero1 et Erv2, et les Protéine Disulfure Isomérase (PDI) (pour revue voir (Sevier and kaiser, 2006)), et par DsbA et DsbB dans le périplasme (pour revue voir (Messens and Collet, 2006)). Il existe également un autre système de formation des ponts disulfures dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (EIM), composé des protéines Erv1 et Mia40 (pour revue voir (Herrmann AND Köhl, 2006)).

Or, certains des composants de ces deux systèmes sont homologues. En effet, les thiol-transférases, thiorédoxines et glutarédoxines (pour revue voir (Pan and Bardwell, 2006)), et les thiol-oxydases ou thiol-disulfure isomérases, DsbA chez *E.coli* et PDI chez les eucaryotes, appartiennent à la même famille d'enzymes, à savoir la superfamille des thiorédoxines (pour revue voir (Gruber et al., 2006)). Les

différents membres de cette superfamille ne possèdent qu'une faible similarité de séquence primaire mais sont caractérisés par la présence d'un motif catalytique CXXC et d'un domaine structural très conservé et appelé «thioredoxin fold». Les membres de cette superfamille des thiorédoxines peuvent contenir un ou plusieurs domaines «thioredoxin fold». Ce domaine représente en fait une sous partie de la structure des thiorédoxines. Il est composé de plusieurs motifs: un motif $\beta\alpha\beta$ en N-terminal, relié par une boucle en hélice α à un autre motif $\beta\beta\alpha$ en C-terminal (voir schéma 4). Le centre catalytique CXXC est généralement situé au niveau de la boucle α_1 du premier motif, pour les thiol-oxydases, ou au niveau de la boucle α reliant les deux motifs, pour les thiorédoxines (Holmgren et al., 1975). Nous verrons ultérieurement que les propriétés catalytiques des différents membres de la superfamille dépendent non seulement de la localisation structurale des cystéines du site actif CXXC mais aussi de l'environnement en acides aminés de ce motif. Nous pouvons noter que le centre catalytique des protéines Ero1, Erv1 et Erv2 ne présente pas de succession de feuillets β et d'hélices α , caractéristique du domaine «thioredoxin fold», mais est majoritairement composé d'hélices α , au centre desquelles se situe le site CXXC (Gross et al., 2004), (Gross et al., 2002).

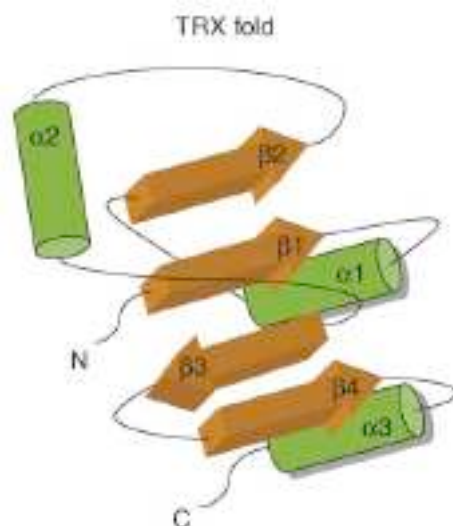


Schéma 1. Structure du domaine «thioredoxin fold».

Le domaine «thioredoxin fold» est caractérisé par une succession d'hélices α et de feuillets β . Schéma tiré de la revue (Gruber et al., 2006).

Nous allons maintenant envisager les mécanismes moléculaires conférant aux protéines de la superfamille des thiorédoxines leur spécificité catalytique de réductase ou d'oxydase.

B. Oxydases ou réductases?

Les différents membres de la superfamille des thiorédoxines catalysent des réactions d'échange di-thiol/disulfure grâce au motif CXXC, contenu dans leur site actif. Au cours de ces réactions, ce motif alterne donc entre une forme réduite di-thiol (-SH) et une forme oxydée disulfure (-S-S-). Dans le cas des oxydases, le motif CXXC joue le rôle d'un accepteur d'électrons et dans le cas des réductases ce motif est un donneur d'électrons. Deux paramètres principaux vont déterminer le sens du flux d'électrons (pour revue voir (Gilbert, 1990), (Gilbert, 1995)), c'est-à-dire la capacité des protéines à catalyser une réaction d'oxydation ou de réduction par échange di-thiol/disulfure. Avant de définir ces deux paramètres, nous devons tout d'abord introduire la notion de potentiel redox.

1. Le potentiel redox

Les réactions d'échange di-thiol/disulfure sont des réactions réversibles, impliquant un équilibre thermodynamique entre la réaction d'oxydation d'un di-thiol et la réaction de réduction d'un disulfure. Pour un couple redox donné, le potentiel redox décrit l'équilibre entre les formes réduites et oxydées et la proportion de chacune de ces deux formes dans des conditions particulières. Le potentiel redox d'un couple redox peut être approché expérimentalement par comparaison avec un couple de référence, le plus souvent celui du GSH (GSH/GSSG), par la mesure à l'équilibre, dans des conditions de pH et de température données, du rapport entre les formes di-thiol/disulfure de deux couples. Le potentiel redox est alors calculé grâce à l'équation de Nernst et exprimé en potentiel électrochimique dont l'unité est le Volt (pour revue voir (Schafer and Buettner, 2001)). Le potentiel redox permet donc de prédire le sens thermodynamique préférentiel de la réaction d'oxydoréduction, c'est-à-dire la propension d'une protéine à donner ou à acquérir des électrons. Un potentiel redox bas prédit l'activité de réductase d'une protéine, alors qu'un potentiel redox élevé prédit l'activité d'oxydase.

Les thiorédoxines, les glutarédoxines et le GSH possèdent respectivement un potentiel redox de -270 mV, de -233 à -198 mV et de -240 mV, reflétant leur propension à agir comme des réductases, tandis que le potentiel redox de DsbA et des PDI est respectivement de -124 mV et de -125 mV à -175 mV, et reflète leur propension à agir comme oxydase (voir schéma 5) (Aslund et al., 1997).

Les potentiels redox mesurés *in vitro* ne font que prédire le sens thermodynamique des réactions d'oxydoréduction avec d'autres couples redox, mais ne déterminent pas de façon absolue le comportement redox d'une protéine *in vivo*. Par exemple, DsbA, une thiol-oxydase et DsbC, une thiol-isomérase, ont un potentiel redox similaire (voir schéma 5) alors que ces protéines catalysent des réactions opposées dans un même compartiment cellulaire, à savoir le périplasma de la bactérie. Cette différence de réaction est liée à la connexion: entre DsbA et l'oxydase membranaire DsbB, elle-même oxydée activement par la quinone fournissant les équivalents oxydants venant de l'O₂ (Bader et al., 2000), et entre DsbC et la réductase membranaire DsbD, elle-même activement réduite par le système de la thiorédoxine, source d'équivalents réducteurs provenant du NADPH (Rietsch et al., 1997). Ainsi, l'activité d'oxydoréductase d'une protéine dépend donc de son interaction redox avec d'autres protéines. Le potentiel redox est alors une mesure qui reflète plutôt l'efficacité et le sens des réactions d'oxydoréduction. Par conséquent, le mécanisme catalytique préférentiel d'oxydation ou de réduction d'une protéine peut être différent de celui prédit par la mesure du potentiel redox.

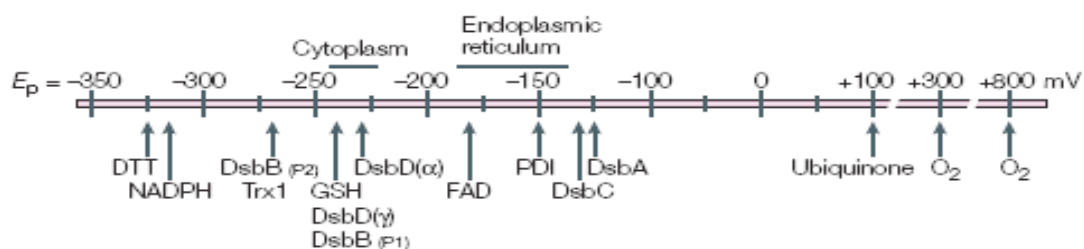


Schéma 2. Les potentiels redox des différentes thiol-oxydases et thiol-transférases.

Les potentiels redox sont mesurés à 25°C et à pH7. Les potentiels de +300 et +800 mV indiqués pour l'O₂ correspondent respectivement aux couples redox O₂/H₂O₂ et O₂/H₂O. Schéma tiré de la revue (Sevier and Kaiser, 2002).

2. Les paramètres régissant l'activité des thiol-transférases de la superfamille des thiorédoxines

a. Les propriétés redox du motif catalytique CXXC

Le comportement des différents membres de la superfamille des thiorédoxines est en grande partie lié aux propriétés redox de leur site actif CXXC.

La résolution de la structure tridimensionnelle de plusieurs membres de la superfamille des thiorédoxines, et en premier lieu celle de la thiorédoxine d'*E.coli*

(Holmgren et al., 1975) montre que le site CXXC est situé dans une excroissance de la protéine et que la cystéine N-terminale est exposée au solvant, alors que la cystéine C-terminale est plus enfouie au sein de la protéine. Cette différence de localisation structurale de chacune des deux cystéines du motif catalytique CXXC est un paramètre déterminant la réactivité préférentielle de la cystéine N-terminale des oxydoréductases avec leurs substrats.

Des études biochimiques ont montré que l'activité d'oxydoréductase est déterminée par la stabilité relative de la forme di-thiol (ou disulfure) du motif catalytique CXXC. La stabilisation de la forme di-thiol est déterminée par l'environnement électrostatique du motif CXXC. En effet, la présence de résidus chargés positivement à proximité du site catalytique CXXC diminuent le pKa de la cystéine N-terminale de ce motif, permettant ainsi de stabiliser ce résidu sous une forme thiolate ($-S^-$), et entraînant par conséquent une augmentation de la stabilité de la forme di-thiol à pH physiologique. Le pKa de la cystéine N-terminale des oxydases est généralement très bas (d'environ 3,5 pour DsbA) (Nelson and Creighton, 1994), expliquant ainsi leur capacité à transférer rapidement les ponts disulfures afin de retrouver un état réduit, énergétiquement plus favorable. Inversement, le pKa du résidu cystéine N-terminal des réductases est légèrement plus élevé (supérieur à 7 pour la thiorédoxine) (Chivers et al., 1997), en raison d'un environnement électrostatique du motif CXXC différent, favorisant la forme disulfure, énergétiquement plus favorable. Il existe donc une corrélation entre le pKa du résidu cystéine N-terminal du site CXXC et l'activité de réductase ou d'oxydase. Plus précisément, les deux acides aminés variables, situés entre les deux résidus cystéines du motif catalytique CXXC, déterminent le pKa de la cystéine N-terminale du motif CXXC (Grauschopf et al., 1995). En effet, la mutation ou le remplacement du site actif CXXC de la thiorédoxine d'*E.coli* par celui de DsbA, d'une glutarédoxine ou d'une PDI entraîne une diminution du pKa de la cystéine N-terminale de la thiorédoxine, conduisant à une diminution de son activité physiologique de réductase (Lundstrom et al., 1992) (Mossner et al., 1998) (Mossner et al., 1999). Inversement, le remplacement du motif CXXC de DsbA par celui de la thiorédoxine provoque une diminution de son activité d'oxydase (Huber-Wunderlich and Glockshuber, 1998). L'environnement des cystéines du motif CXXC au sein de la protéine détermine donc la valeur du pKa de la cystéine N-terminale et la valeur du potentiel redox de la

protéine, et explique en partie que les réductases et les oxydases catalysent des réactions opposées. Cependant, le mécanisme catalytique de ces protéines ne dépend pas que de la stabilité thermodynamique de leur forme di-thiol. Leur activité dépend également de l'environnement dans lequel elles se situent, et plus particulièrement de leur interaction avec les systèmes délivrant les équivalents oxydants et réducteurs.

b. Des systèmes assurant un flux opposé d'électrons

Le second paramètre permettant d'expliquer la distinction entre oxydases et réductases est le compartiment cellulaire dans lequel ces protéines fonctionnent, et plus précisément la nature des interactions redox entre les réductases/oxydases et leurs partenaires. Le cytoplasme contient généralement les réductases, alors que les oxydases sont situées dans le RE/périplasma. Il existe en effet dans chaque compartiment un système permettant aux réductases et aux oxydases de rester respectivement sous une forme réduite et oxydée, compatible avec leur activité catalytique. Ces systèmes catalysent des réactions opposées grâce à un transport opposé des électrons.

i. Les systèmes de réduction des ponts disulfures

Chez *S.cerevisiae*, deux systèmes cytoplasmiques majeurs assurent la réduction des protéines contenant des ponts disulfures, à partir d'électrons provenant du NADPH: la voie de la thiorédoxine, composée de la Thiorédoxine Réductase Trr1 et des deux Thiorédoxines Trx1 et Trx2, et la voie du glutathion, composée de la Glutathion Réductase Glr1, du glutathion GSH et des cinq glutarédoxines Grx1-5 (voir schéma 6).

Le gradient de potentiel redox le long de ces deux voies dirige le flux d'équivalents réducteurs (électrons), fourni par le NADPH, vers les thiol-transférases terminales, thiorédoxines et glutarédoxines, et le GSH. Le mouvement des électrons débute donc par leur transfert hydride du NADPH ayant le potentiel redox le plus bas (-315 mV) vers le groupement FAD (flavine adénine dinucléotide) de la Trr1 ou de la Glr1. Le FADH₂ formé va alors réduire la Trr1 et la Glr1, par un transfert de deux électrons sur leur centre catalytique. En aval de ce point, une cascade d'échanges di-thiol/disulfures entre les différents composants de ce système conduit à la réduction des substrats spécifiques de chacune de ces voies (voir schéma 6),

permettant ainsi de maintenir les thiols cytoplasmiques dans un état réduit. La voie du GSH diffère légèrement de celle des thiorédoxines, puisque le GSH est interposé entre la Glr1 et les Grx, ces dernières réduisant les substrats oxydés. Il faut également noter que parmi les cinq Grx, ce sont les Grx à motif di-thiol, Grx1 et Grx2 qui sont responsables des échanges di-thiol/disulfure, et non les Grx mono-thiol Grx3, 4 et 5 (voir paragraphe III.A.2b). Le NADPH est ensuite régénéré avec des électrons provenant de l'oxydation du glucose-6-phosphate dans la voie des pentoses phosphates.

Ces deux systèmes cytoplasmiques permettent donc de conserver le GSH sous une forme réduite, et de maintenir l'activité de réductase des thiol-transférases, grâce à un cheminement spécifique des équivalents réducteurs provenant du NADPH le long des différents composants des deux voies. De façon plus générale, ces systèmes régulent étroitement l'état redox des thiols cytoplasmiques (voir paragraphe III.B), puisque la balance entre leur oxydation, induite par les équivalents oxydants provenant de l'O₂, et leur réduction, catalysée par les systèmes des Trx/GSH, est contrôlée de façon thermodynamique (voir paragraphe II.B.2.a) et cinétique (voir paragraphe II.B.2.b) par les deux voies de réduction. Cette notion est communément appelée «contrôle de l'état redox des thiols».

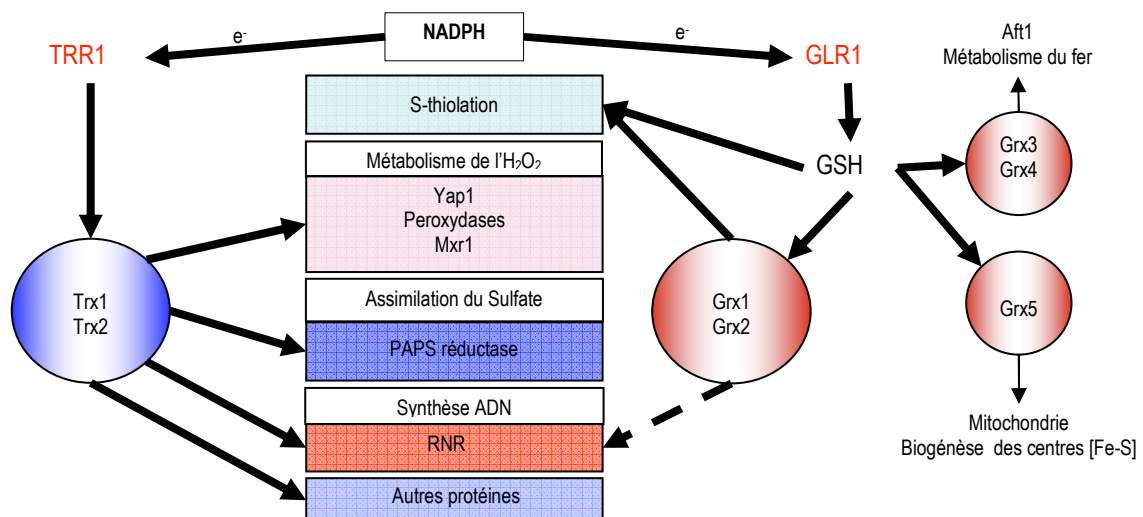


Schéma 3. Cheminement des électrons le long des deux voies de réduction des thiols.

Les flèches noires indiquent le flux d'électrons allant du NADPH ayant le plus faible potentiel redox vers les accepteurs terminaux, cibles des thiorédoxines et glutarédoxines (Toledano M., 2007).

Cette notion de contrôle de l'état redox des thiols grâce à un cheminement spécifique des équivalents réducteurs est parfaitement illustrée par une expérience chez *E.coli* du groupe de Beckwith, montrant que l'interruption du flux d'électrons par l'invalidation de la Trx provoque la formation d'un pont disulfure dans une protéine cytoplasmique (l'alcaline phosphatase AP), une situation plus communément appelée «stress disulfure» (Derman and Beckwith, 1991), (Derman et al., 1993). Cependant, ce stress disulfure n'est pas du à un défaut de la voie des Trx dans la réduction des ponts disulfures mais à l'accumulation des Trx sous une forme oxydée, qui deviennent alors des oxydases (Stewart et al., 1998). Cette expérience illustre bien que l'interruption du flux d'électrons ne permet plus de contrecarrer les équivalents oxydants produits lors de la vie aérobie et que le contrôle de l'état redox des thiols n'est indispensable qu'en présence d'O₂.

ii. Les systèmes de formation des ponts disulfures

La formation des ponts disulfures, indispensable à la stabilisation structurale, et à l'activité physiologique de certaines protéines, intervient dans des processus biologiques essentiels (voir paragraphe IV).

Les ponts disulfures sont catalysés par plusieurs systèmes d'oxydases spécialisées, localisés dans des compartiments cellulaires consacrés à cette fonction, à savoir Ero1 et Erv2 dans le RE (voir paragraphe IV.A), Erv1 dans l'EIM (voir paragraphe IV.C), et DsbB dans le périplasme des bactéries (voir paragraphe IV.D). Ces oxydases présentent certaines ressemblances au niveau de leur mécanisme catalytique. En effet, elles utilisent le pouvoir oxydant de l'oxygène moléculaire (O₂) pour catalyser l'oxydation de paires de cystéines sur leur substrat. Cette catalyse consiste en un transfert successif des électrons par des échanges di-thiol/disulfure impliquant différentes paires de cystéines redox. Dans le cas des flavines oxydases Ero1, Erv2 et Erv1, leur groupement FAD est impliqué dans le transfert des électrons. Cependant, ces oxydases ne catalysent pas directement l'oxydation de leurs substrats. Elles transfèrent en fait les équivalents oxydants de l'O₂ sur des protéines redox, relayant les oxydases et leurs substrats respectifs: la Pdi1 dans le RE, Mia40 dans l'EIM et DsbA dans le périplasme.

Chez les eucaryotes, ces oxydations sont vraisemblablement couplées à une production intracellulaire d'agents oxydants potentiellement toxiques (voir paragraphe IV.A.3). Ces voies d'oxydation sont alors séparées des voies de

réductions cytoplasmiques afin de maintenir le cytoplasme dans un état réduit, indispensable au bon fonctionnement cellulaire. Cette compartimentation des flux d'électrons allant dans des directions opposées permet aussi de maintenir l'activité des oxydase afin d'assurer la formation des ponts disulfures. Inversement, chez les bactéries, ces oxydations sont couplées à la chaîne respiratoire bactérienne, évitant ainsi la production d'agents oxydant toxiques.

iii. La compartimentation des flux d'électrons

La compartimentation des systèmes délivrant des flux opposés d'électrons, permet donc de maintenir le cytoplasme dans un état réduit et le RE/périplasma dans un état plus oxydé. La différence d'état redox entre ces deux compartiments cellulaires est d'ailleurs révélée par la mesure du potentiel redox de chaque compartiment. Le potentiel redox du RE est estimé entre -172 et -188 mV, tandis que le potentiel redox du cytoplasme correspond à -230 mV (Hwang et al., 1992). Cette différence de potentiel redox reflète bien le sens du transport d'électrons déterminant l'activité d'oxydases ou de réductases des protéines.

L'importance de préserver un environnement réduit pour la fonction des réductases a notamment été montrée dans le cas de la thiorédoxine d'*E.coli*. Un environnement plus oxydant va en effet favoriser l'oxydation de la thiorédoxine et modifier son activité catalytique physiologique. Par exemple, l'inactivation de la thiorédoxine réductase d'*E.coli* empêche le transfert des équivalents réducteurs sur la thiorédoxine. La thiorédoxine oxydée devient alors capable de former des ponts disulfures dans les protéines cytoplasmiques (Derman et al., 1993) (Stewart et al., 1998). D'une manière similaire, l'export de la thiorédoxine d'*E.coli* dans le périplasma d'une souche sauvage découple la thiorédoxine de la thiorédoxine réductase. La thiorédoxine oxydée devient alors capable de remplacer partiellement l'activité d'oxydase de DsbA d'une souche $\Delta dsbA$, présentant un défaut de formation des ponts disulfures dans les protéines périplasmiques (Debarbieux and Beckwith, 1998).

c. Le paramètre essentiel

Certaines études montrent que les caractéristiques chimiques du motif catalytique CXXC seraient un paramètre plus important que l'environnement cellulaire, pour déterminer l'activité catalytique des oxydases et des réductases. En effet, la thiorédoxine d'*E.coli* exportée dans le périplasma n'est capable de remplacer

totallement l'activité d'oxydase de DsbA, d'une souche $\Delta dsbA$, que lorsque son motif CXXC est remplacé par celui d'une PDI ou de DsbA (Jonda et al., 1999), (Debarbieux and Beckwith, 2000). De la même manière, la thiorédoxine d'*E.coli* exportée dans le RE de *S.cerevisiae* ne restaure les défauts d'une souche $\Delta pdi1$ que lorsque son motif CXXC est remplacé par celui d'une PDI (Chivers et al., 1996). Une des études les plus concluantes a montré que le remplacement du site actif CXXC de la thiorédoxine d'*E.coli* par celui de DsbA ou d'une PDI, permet de conserver l'interaction entre la thiorédoxine et la thiorédoxine réductase dans le cytoplasme, mais ne permet pas à la thiorédoxine d'assurer sa fonction de réductase (Mossner et al., 1999). La stabilisation de la forme thiolate de la cystéine N-terminale du motif CXXC semble donc un paramètre essentiel pour déterminer l'activité catalytique des différents membres de la superfamille des thiorédoxines. Néanmoins, les paramètres d'interaction redox entre une protéine et ses cibles restent à prendre en compte dans la détermination de la fonction biologique d'une protéine.

III. Les systèmes catalysant la réduction des résidus cystéines: les voies des thiorédoxines et du glutathion

A. Présentation des composants de la voie des thiorédoxines et du glutathion

1. La voie des thiorédoxines

La voie des thiorédoxines représente le premier système de contrôle de l'état redox des thiols. Il existe également un système thiorédoxine mitochondrial, composé d'une thiorédoxine, Trx3 et d'une thiorédoxine-réductase, Trr2 (Pedrajas et al., 1999) que nous ne détaillerons pas.

a. Les thiorédoxines

Les thiorédoxines (Trx) sont de petites protéines très conservées, d'environ une centaine d'acides aminés, identifiées initialement chez les bactéries, comme donneurs d'électrons de la ribonucléotide réductase RNR (Laurent et al., 1964). Le centre catalytique de la thiorédoxine contient le peptide invariant Trp-Cys₁-Gly-Pro-Cys₂. La différence de réactivité entre les deux résidus cystéines de ce peptide est à la base du mécanisme catalytique de la thiorédoxine (pour revue voir (Holmgren, 1995)). Schématiquement, la cystéine N-terminale du motif CXXC agit comme nucléophile, attaquant le pont disulfure du substrat. Cette réaction entraîne la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre la Trx et son substrat, et la réduction d'une des deux cystéines du substrat. La seconde cystéine de la Trx réagit ensuite avec le pont disulfure intermoléculaire formé, entraînant la réduction complète du substrat et la formation d'un pont disulfure intramoléculaire dans la Trx (voir schéma 7). Ce mécanisme réactionnel suppose que la cystéine la plus C-terminale soit également sous forme thiolate. Cette forme thiolate apparaîtrait lors du changement de conformation de la protéine, provoqué par formation du pont disulfure Trx/substrat. En effet, au cours de cette réaction, la seconde cystéine, enfouie au sein de la protéine, se rapproche de la première cystéine et devient exposée au solvant (Chivers and Raines, 1997).

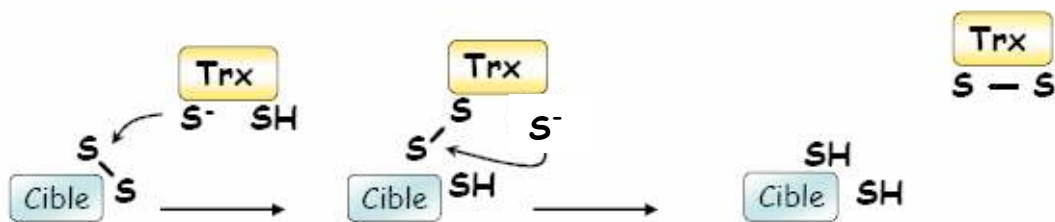


Schéma 4. Mécanisme de réduction des ponts disulfures par la thiorédoxine.

La réduction des ponts disulfures par les thiorédoxines repose sur la succession de deux étapes : la cystéine catalytique du site actif attaque le pont disulfure de la cible, ce qui entraîne la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre la thiorédoxine et son substrat. Puis, la cystéine résolutive du site actif attaque ce pont disulfure intermoléculaire, ce qui provoque l'oxydation de la thiorédoxine et la libération de sa cible sous une forme réduite.

b. La thiorédoxine réductase

La thiorédoxine réductase (Trr) a été également mise en évidence chez *E.coli*, comme facteur nécessaire à la synthèse des déoxyribonucléotides par la RNR (Moore et al., 1964). La Trr est une flavoprotéine dimérique contenant dans chaque monomère un centre redox di-thiol catalytique situé à proximité du groupement FAD et d'un domaine de liaison du NADPH (Williams, 1995). Nous pouvons noter que la Trr possède des similarités structurales et fonctionnelles avec la Glr, ces deux protéines appartenant à la famille des flavoenzymes «pyridine nucléotide disulfure réductase». La Trr catalyse le transfert des électrons fournis par le NADPH sur les Trx via son groupement FAD. Cette réaction aboutit d'une part à l'oxydation du motif di-thiol de la Trr sous forme d'un pont disulfure et d'autre part à la régénération de la forme active di-thiol des Trx (voir schéma 8). Comme nous l'avons expliqué, la réduction du disulfure de la Trr se déroule selon une cascade débutant par le transfert hydride du NADPH sur le FAD, puis le transfert de deux électrons du FADH₂ généré sur le centre redox. Cette réaction implique une rotation du domaine de liaison du NADPH vers le domaine de liaison du FAD afin de catalyser le transfert hydride. Cette modification de conformation permet alors d'exposer en surface de la Trr le motif di-thiol régénéré afin de catalyser la réaction d'échange di-thiol/disulfure avec la Trx. Le changement de conformation de la Trr provoque également la formation d'un thiolate sur le second résidu de son motif di-thiol, de façon similaire à ce que nous avons décrit pour la Trx (Williams, 1995).

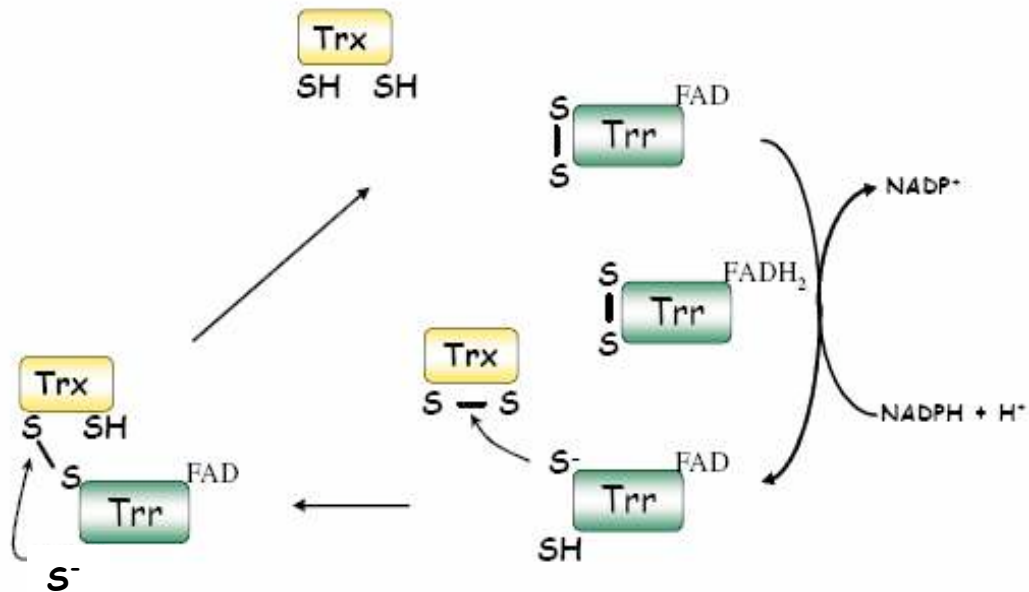


Schéma 5. Mécanisme de réduction de la thiorédoxine par la thiorédoxine réductase chez *S.cerevisiae*.

Le NADPH fourni les électrons pour permettent la réduction de la Trr1 *via* son groupement FAD. La Trr1 est donc recyclée sous sa forme réduite active afin d'assurer la réduction des thiorédoxines oxydées sous forme de pont disulfure intramoléculaire.

Ce mécanisme catalytique est conservé chez l'ensemble des procaryotes, la majorité des eucaryotes inférieurs et chez les plantes. Chez les autres espèces, la Trr possède un second centre redox localisé en C-terminal (pour revue voir (Williams et al., 2000)). Il s'agit d'un second di-thiol chez *P.falciparum* et d'un selenolate (Cys-Se) chez les eucaryotes supérieurs. Le mécanisme des Trr des eucaryotes supérieurs comprend une étape supplémentaire de transfert des électrons sur le second centre redox, et diffère donc de celui que nous avons vu précédemment. Le transfert des électrons débute donc du FADH₂ vers le premier centre redox catalytique, puis vers le second centre disulfure ou sélénysulfure (Cys-S-Se-Cys), qui à son tour transfère les électrons à la Trx. Le second centre redox est situé dans un domaine peptidique mobile, permettant à la manière d'une navette de transférer les électrons du premier centre redox sur les Trx (pour revue voir (Williams et al., 2000)). Nous verrons ultérieurement qu'un mécanisme similaire est retrouvé dans la famille des flavines sulfhydryles oxydases ERV/ALR (voir paragraphe IV).

2. La voie du glutathion GSH

La voie du glutathion représente le second système de contrôle de l'état redox des thiols.

a. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (γ -glutamate-cystéine-glycine) synthétisé par deux réactions successives. Tout d'abord la glutamylcystéine-synthétase (Gsh1) catalyse la condensation de la cystéine et du glutamate en position gamma, puis la glutathion synthétase (Gsh2) rajoute la glycine. La liaison γ -glutamyl du GSH est résistante à la protéolyse, le GSH est donc dégradé dans la vacuole par deux réactions successives impliquant la γ -glutamyltranspeptidase puis la L-cystéinyle-glycine-dipeptidase. Il existe également des transporteurs du GSH localisés d'une part au niveau de la membrane plasmique, afin d'importer du GSH exogène lorsque le soufre est insuffisant, et d'autre part au niveau de la vacuole (YCF1), afin d'éliminer les composés xénobiotiques toxiques liés au GSH (pour revue voir (Penninckx, 2002)).

Le GSH est présent dans la plupart des espèces à l'exception des bactéries anaérobiques strictes, suggérant une connexion entre la vie aérobie et la présence de GSH. Contrairement à *E.coli*, la présence de GSH est essentielle à la vie chez les eucaryotes. L'inactivation de *GSH1* entraîne une auxotrophie en GSH chez *S. cerevisiae* (Grant et al., 1996) et *S. pombe* (Sharma et al., 2000), et une létalité embryonnaire chez les mammifères (Shi et al., 2000).

Le GSH est caractérisé par deux propriétés biochimiques. Sa concentration de l'ordre du millimolaire en fait le groupement thiol le plus abondant dans la cellule et son potentiel redox relativement bas (-240mV) lui confère un fort pouvoir réducteur (Aslund et al., 1997). Ces deux caractéristiques, permettent de définir le GSH comme le «tampon redox» intracellulaire majeur. Le terme de «tampon» n'est cependant pas approprié car le GSH ne s'équilibre pas avec tous les couples redox intracellulaires.

Lorsque le GSH transfère ses électrons à un substrat, il s'oxyde sous la forme GSSG. La réduction de cette forme oxydée est assurée par le flavoenzyme Glr (Collinson and Dawes, 1995), selon un mécanisme similaire à celui que nous avons décrit pour la Trr (voir schéma 8), à savoir le transfert des électrons du NADPH sur le groupement FAD, puis sur le centre redox de la Glr, et enfin sur le GSSG (voir

schéma 9). La Glr permet ainsi de maintenir un rapport élevé de [GSH] / [GSSG] contribuant à garder le cytoplasme dans un état réduit (Hwang et al., 1992).

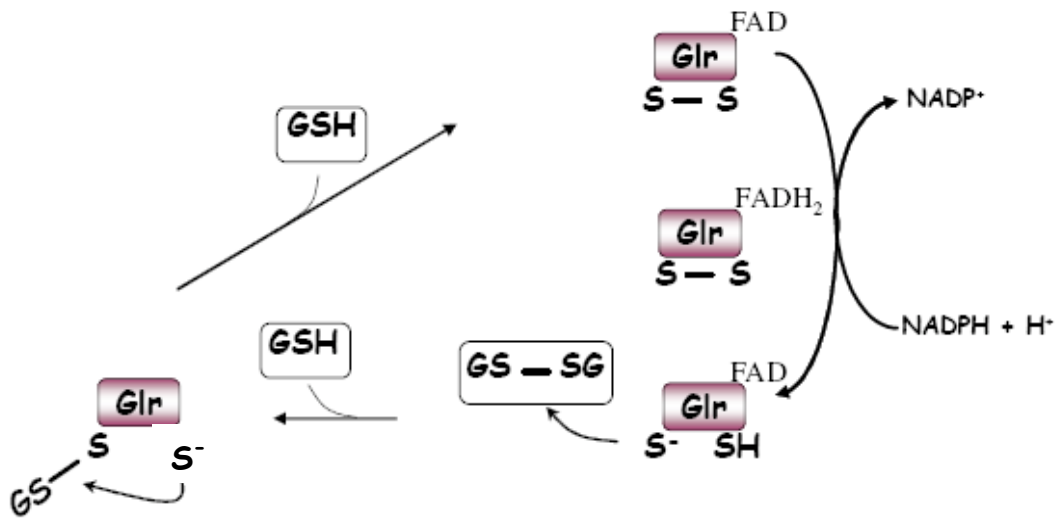


Schéma 6. Mécanisme de réduction du GSSG par la glutathion réductase chez *S.cerevisiae*.

La Glr1 utilise le pouvoir réducteur du NADPH, *via* son groupement FAD, d'une façon similaire à la Trr1. La forme réduite de la Glr1 peut ensuite réduire une molécule de GSSG en deux molécules de GSH.

b. Les glutarédoxines

La glutarédoxine (Grx) a été initialement découverte chez *E.coli* comme réductase de la RNR, dans une souche invalidée pour la thiorédoxine (Holmgren, 1976). Les Grx sont des réductases ayant une faible homologie de séquence primaire avec les Trx mais une structure similaire, caractérisée par un centre redox de type CXXC au sein du domaine «thioredoxin fold» (voir schéma 4). Les Grx possèdent en outre un domaine de liaison du GSH, également retrouvé dans les glutathion peroxydases (Gpx) des mammifères (Holmgren and Aslund, 1995). Les deux acides aminés variant du motif CXXC des Grx d'*E.coli* permettent de stabiliser la forme thiolate de la cystéine N-terminale: le résidu proline en première position permet de courber le centre redox, rapprochant le second résidu variant, un acide aminé aromatique, de la cystéine N-terminale, ce qui stabilise la forme thiolate de cette dernière. Un résidu arginine précédent le motif CXXC est également essentiel à la stabilisation du thiolate N-terminal (Foloppe and Nilsson, 2004).

S.cerevisiae, deux types distincts de Grx en fonction du nombre de cystéine. Les Grx à deux cystéines dites «di-thiol» (Grx1 et Grx2), ayant le motif Cys₁-Pro-Tyr-Cys₂ (Luikenhuis et al., 1998), et les Grx dites «mono-thiol» (Grx3, Grx4 et Grx5) ayant le motif PXCG/AFS/P (Rodriguez-Manzanaque et al., 1999). Les Grx di-thiol catalysent la réduction des ponts disulfures (Luikenhuis et al., 1998) selon un mécanisme similaire à celui des Trx (voir schéma 7). La forme oxydée des Grx est réduite par deux molécules de GSH (voir schéma 10). Les Grx mono-thiol ont une activité différente, elles réduisent préférentiellement les protéines glutathionylées (Prot-S-SG) par transfert de la molécule de GSH sur leur unique cystéine (Thomas et al., 1995), (Holmgren and Aslund, 1995) (voir schéma 11). Néanmoins, le GSH peut aussi assurer cette activité de déglutathionylation. Les Grx possèdent également une fonction importante, n'impliquant pas de mécanisme redox des thiols (voir paragraphe III.B.2.e). L'inactivation d'une seule des Grx ne provoque pas de phénotype, excepté dans le cas de la souche $\Delta grx5$, suggérant un rôle important de cette dernière (voir paragraphe III.B.2.e) (Rodriguez-Manzanaque et al., 1999).

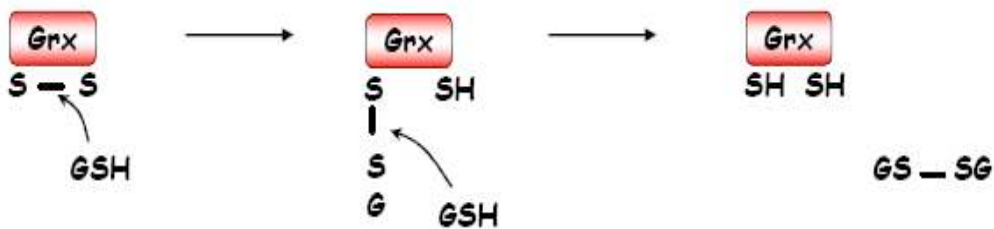


Schéma 7. Mécanisme de réduction des Grx di-thiol oxydés par le GSH.

Les glutarédoxines di-thiol oxydées sont réduites par deux molécules de GSH, ce qui produit une molécule de GSSG.

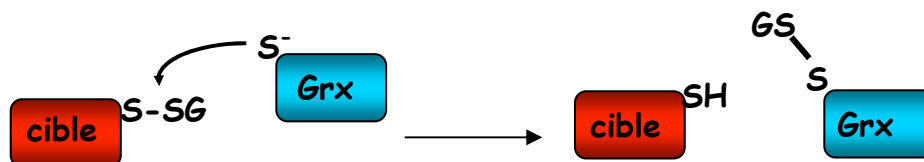


Schéma 8. Mécanisme de réduction des protéines glutathionylées par les Grx mono-thiol.

Après leur activité de déglutathionylation, les Grx mono-thiol sont réduites par une molécule de GSH, ce qui produit du GSSG.

B. Les fonctions cellulaires de la voie des thiorédoxines et du glutathion

1. La voie des thiorédoxines

a. Le rôle des thiorédoxines dans le métabolisme des peroxydes

Nous allons voir que certains substrats des thiorédoxines sont des enzymes participant à l'élimination des peroxydes. Ainsi, parce qu'elle est le donneur d'électrons des thiol-peroxydases Prx et Gpx-like, de Mxr1 et de Yap1, la voie des thiorédoxines a donc un rôle manifeste dans le catabolisme des peroxydes.

i. Le métabolisme des peroxydes

- La source cellulaire des peroxydes

Les cellules sont exposées de façon permanente aux oxydants endogènes produits au cours de respiration mitochondriale, par réduction incomplète de l' O_2 . Il s'agit des intermédiaires réactifs de l'oxygène (IRO) comprenant l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyle (OH^\bullet). Les IRO peuvent endommager les différents composants cellulaires en fonction de leur capacité de diffusion à travers les membranes et de leur réactivité (pour revue (Imlay, 2003) et (Toledano et al., 2003)). L' OH^\bullet est l'intermédiaire le plus nocif, car le plus réactif et le moins sélectif. Sa réactivité est telle qu'elle ne laisse pas le temps au radical de diffuser. Ainsi l' OH^\bullet réagit sur le lieu de sa production, au cours de la réaction de Fenton. Ce radical endommage l'ensemble des constituants cellulaires (ADN, protéines, lipides). L' O_2^- et l' H_2O_2 ont tous deux une réactivité plus faible et une spécificité plus importante que celle de l' OH^\bullet , ce qui diminue leur toxicité et leur permet de diffuser dans la cellule. Les centres métaux, tels que les centres Fer-Soufre, constituent la principale cible de l' O_2^- . L' H_2O_2 réagit presque exclusivement avec l'atome de soufre présent dans les résidus cystéines et méthionine (voir schéma 1).

- Les cibles des peroxydes

Les peroxydes peuvent oxyder non seulement les résidus cystéines (voir paragraphe I.B.1) mais aussi les méthionines, en méthionines sulfoxyde. Ces modifications, pouvant altérer la fonction des protéines, peuvent être délétères pour

la cellule. Afin de mitiger la toxicité des peroxydes, la cellule possède des systèmes «antioxydants», permettant de les éliminer.

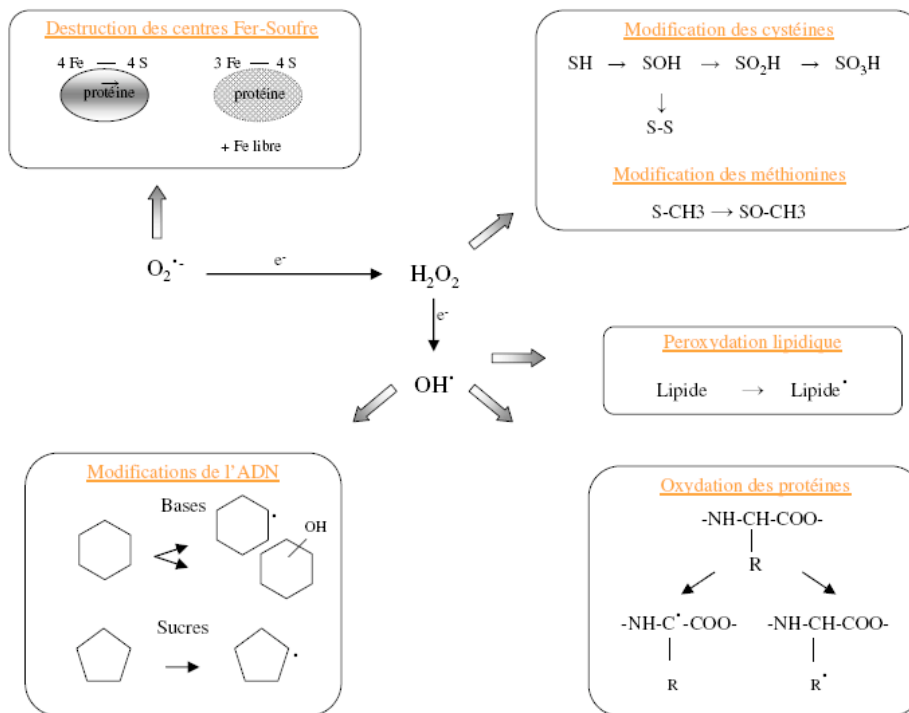


Schéma 9. Réactivité des intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène vis-à-vis des composants cellulaires.

L'OH• est le plus réactif des IRO. L'O₂^{•-} et l'H₂O₂ sont à l'inverse moins réactifs mais plus diffusibles. Schéma tiré de la revue (Toledano et al., 2003).

- L'élimination des peroxydes

Deux systèmes permettent de dégrader directement les peroxydes: les catalases et les thiol- et séléniothiol-peroxydases. Les catalases utilisent le fer de leur cofacteur hème pour dismuter l'H₂O₂ en oxygène O₂ et en eau H₂O. Les peroxydases utilisent les propriétés redox de la cystéine pour réduire l'H₂O₂ et peroxydes organiques en H₂O ou en l'alcool correspondant, respectivement. A la différence des catalases, les peroxydases ne sont pas recyclées par leur substrat. La réduction des peroxydes par ces enzymes entraîne la formation d'un pont disulfure qui sera ultérieurement réduit par la voie de la thiorédoxine ou du GSH.

Deux autres systèmes interviennent également dans l'élimination indirecte des peroxydes: la méthionine sulfoxyde réductase (MSR) et le facteur de transcription Yap1.

ii. Les thiorédoxines fournissent les électrons aux enzymes du catabolisme des peroxydes

- Les thiol- et séléniothiol-peroxydases

Les thiol-peroxydases comprennent les peroxyredoxines (Prx), des enzymes hautement conservées dans tous les règnes, et les glutathion-peroxydase «like» (Gpx-like) n'existant que chez les eucaryotes inférieurs, les invertébrés et les plantes. Les séléniothiol-peroxydases sont les glutathion-peroxydases (Gpx) n'existant que chez les eucaryotes supérieurs. Les Prx (Chae et al., 1994a), (Lee et al., 1999b), (Pedrajas et al., 2000), (pour revue voir (Rhee et al., 2005)) et les Gpx-like (Tanaka et al., 2005), (Delaunay et al., 2002), (Maiorino et al., 2007), (Sztajer et al., 2001), (Navrot et al., 2006), (Koh et al., 2007) utilisent la voie des thiorédoxines comme donneur d'électrons pour la réduction des peroxydes, alors que les Gpx utilisent le GSH (voir schéma 2). Ainsi la dénomination «Gpx» des Gpx-like est abusive puisque ces enzymes ne sont pas dépendantes du GSH. Le découplage des Gpx-like de la voie du GSH est dû à l'absence des acides aminés constituant deux domaines présents dans les Gpx: le site de liaison du GSH et le domaine d'interaction entre deux monomères.

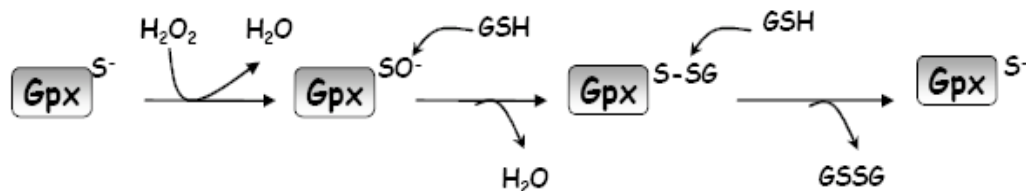


Schéma 10. Réduction des peroxydes par les peroxydases dépendantes du GSH.

La cystéine catalytique réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former un acide sulfénique, qui est ensuite attaqué par une molécule de glutathion GSH pour former un pont disulfure intermoléculaire (glutathionylation). Ce pont est ensuite réduit par une deuxième molécule de GSH, libérant ainsi du GSSG et recyclant la cystéine catalytique sous sa forme réduite.

Le mécanisme catalytique général des thiol-peroxydases comprend une étape de réduction des peroxydes par la cystéine catalytique, également appelée cystéine peroxydatique, qui s'oxyde sous la forme d'un acide sulfénique. Cet acide sulfénique

se condense ensuite avec une deuxième cystéine, dite résolutive d'une autre molécule de l'enzyme pour former un pont disulfure intermoléculaire (voir schéma 3). Ce mécanisme varie légèrement chez certaines Prx atypiques (pour revue voir (Hofmann et al., 2002)) et chez les enzymes Gpx-like. Chez ces dernières, la cystéine résolutive est donnée par la même molécule d'enzyme et sa condensation avec l'acide sulfénique de la cystéine catalytique conduit à un pont disulfure intramoléculaire (Delaunay et al., 2002), (Tanaka et al., 2005).

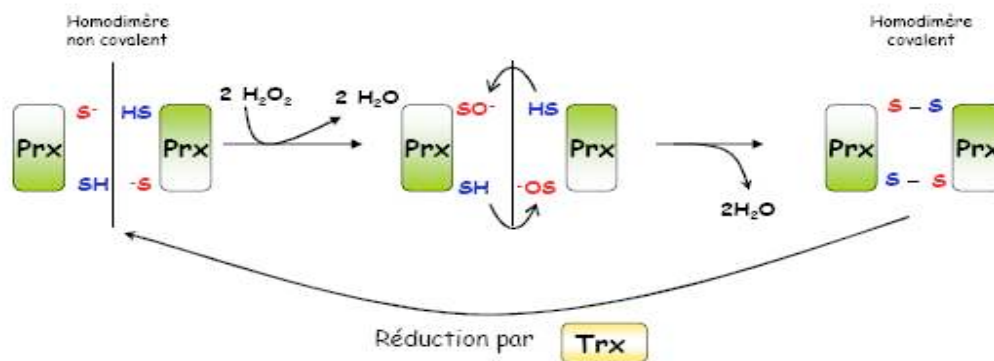


Schéma 11. Schéma de la réduction des peroxydes par les peroxyredoxines (Prx) à 2 cystéines: exemple de Tsa1.

La réaction de la cystéine catalytique (en rouge) de chaque monomère avec le peroxyde conduit à la réduction du peroxyde en eau et à l'oxydation de cette cystéine sous forme d'un acide sulfénique (-SOH). Cette forme oxydée se condense ensuite avec la cystéine résolutive (en bleu) d'un autre monomère de Tsa1 pour former un pont disulfure intermoléculaire (homodimère) qui sera réduit par les thiorédoxines par un échange di-thiol/disulfure (Chae et al., 1994b), (Chae et al., 1994a).

S.cerevisiae possède trois enzymes Gpx-like: Gpx1, Gpx2 et Gpx3 (Inoue et al., 1999). Parmi ceux-ci, Gpx3, rebaptisé Orp1 par le laboratoire pour «Oxidant Receptor Peroxidase» (Delaunay et al., 2002) a une fonction essentiellement régulatrice, en tant que récepteur des peroxydes en amont de Yap1, le régulateur de la réponse aux peroxydes. Ces trois enzymes ont une activité peroxydatique *in vitro* (Inoue et al., 1999). Cependant, le phénotype de tolérance aux peroxydes des souches invalidées pour l'un de ces trois gènes, indique que les Gpx-like n'ont pas un rôle important dans le catabolisme des peroxydes (Inoue et al., 1999). *S.cerevisiae* possède cinq Prx: Tsa1 et Tsa2, qui sont des Prx cytoplasmiques typiques à deux cystéines (Chae et al., 1994a) (Chae et al., 1994b); Ahp1 cytoplasmique (Jeong et al., 1999), (Lee et al., 1999b) et nTpx nucléaire (Cha et al.,

2003), qui sont des Prx atypiques à deux cystéines, car la position de leur cystéine résolutive n'est pas conservée; leur cycle catalytique est néanmoins similaire à celui des 2-Cys-Prx typiques (pour revue voir (Wood et al., 2002)); enfin mTpx est une Prx mitochondriale à une cystéine, dont on ne connaît pas encore le réducteur physiologique (Pedrajas et al., 2000). Alors que Tsa1 et Tsa2 réduisent préférentiellement l'H₂O₂ (Jeong et al., 1999) Ahp1 réduit préférentiellement les peroxydes organiques (Lee et al., 1999b). Tsa1 et Tsa2, comme toutes les 2-Cys Prx typiques ont la propriété d'être inactivées par leur substrat au cours du cycle catalytique par suroxydation de la cystéine catalytique sous forme d'un acide sulfinique (SO₂H) (pour revue voir (Rhee et al., 2005)). Cette forme inactive est réactivée par réduction par la sulfiredoxine (Srx1), un enzyme découvert au laboratoire (Biteau et al., 2003). Cette inactivation des 2-Cys Prx par leur substrat est envisagée comme une forme de régulation post-traductionnelle de l'enzyme, intervenant dans le contrôle de leur fonction de signalisation par l'H₂O₂ (Wood et al., 2003), (Rhee et al., 2005), (D'autreaux B., 2007). Les études phénotypiques de tolérance aux peroxydes ont montré que Tsa1 et Ahp1 sont les Prx les plus importantes dans le catabolisme de ces oxydants (Lee et al., 1999b), (Inoue et al., 1999).

- La méthionine sulfoxyde réductase

La méthionine sulfoxyde réductase (MSR) est l'enzyme responsable de la réduction des méthionines oxydées sous forme de méthionine sulfoxyde, en méthionine. Cette réaction est catalysée par la méthionine sulfoxyde réductase Mxr1 chez la levure (Moskovitz et al., 1997) et conduit à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire au sein de Mxr1, qui sera ensuite réduit par la thiorédoxine ((Gonzalez Porque et al., 1970), pour revue voir (Boschi-Muller et al., 2005)). La Mxr1 apparaît donc avant tout comme un enzyme de réparation des protéines contenant des méthionines oxydées. Cependant, l'oxydation réversible du résidu méthionine pourrait également représenter un mécanisme d'élimination catalytique des peroxydes (Levine et al., 1996), (Moskovitz et al., 1998). Cette idée est confortée par le phénotype d'hypersensibilité à l'H₂O₂ de la souche portant une inactivation de *MRX1* ($\Delta mxr1$) (Moskovitz et al., 1997).

L'oxydation du résidu méthionine semble également un déterminant du vieillissement cellulaire, comme le suggère l'augmentation de la durée de vie lors de

la surexpression de la méthionine sulfoxyde réductase chez la drosophile (Petropoulos and Friguet, 2005). Cependant ce phénotype n'a pas été recherché chez la levure.

- Le facteur de transcription Yap1

Le facteur de transcription Yap1 permet d'induire l'expression de la majorité des enzymes antioxydants, en réponse à l' H_2O_2 (Lee et al., 1999a), (Gasch et al., 2000), (Carmel-Harel et al., 2001) (revu par (Toledano et al., 2003)). Yap1 est activé par oxydation par l' H_2O_2 (pour revue voir (Toledano et al., 2004)). Cette oxydation contrôle la localisation subcellulaire de Yap1. En effet, lorsque Yap1 est sous forme réduite, il est essentiellement cytoplasmique, en raison de son export permanent hors du noyau par l'exportine Crm1. Après exposition des cellules à l' H_2O_2 , Yap1 s'oxyde sous forme d'un pont disulfure intramoléculaire (Delaunay et al., 2000), ce qui provoque un changement de conformation de la protéine, bloquant son l'export nucléaire par Crm1 et favorisant son accumulation dans ce compartiment, où il active ses gènes cibles, certains codant pour des protéines d'élimination des peroxydes.

L'oxydation de Yap1 est en fait indirecte. Elle fait intervenir l'enzyme Gpx-like Orp1/Gpx3 qui agit comme le récepteur des peroxydes en amont de Yap1 (Delaunay et al., 2002). Le modèle proposé au laboratoire suggère qu'en réduisant l' H_2O_2 , la cystéine catalytique d'Orp1 s'oxyde sous forme d'un acide sulfénique (pour revue voir (Toledano et al., 2004), qui réagit ensuite avec une des cystéines de Yap1 pour former un pont disulfure intermoléculaire. L'attaque de ce pont par une autre cystéine de Yap1 conduit à l'oxydation de Yap1 sous forme d'un pont disulfure intramoléculaire, qui sera ensuite réduit par les thiorédoxines (Delaunay et al., 2002). La présence de la protéine Ybp1 est nécessaire à la formation du pont disulfure entre Orp1 et Yap1 mais son rôle n'est pas encore élucidé (Veal et al., 2003).

iii. Les données génétiques sur la fonction des thiorédoxines dans le métabolisme des peroxydes

Le rôle manifeste des thiorédoxines dans le catabolisme des peroxydes est totalement confirmé par les phénotypes d'hypersensibilité à l' H_2O_2 des souches $\Delta trx1\Delta trx2$ et $\Delta trr1$ (Garrido and Grant, 2002), (données non publiées du laboratoire). La $\Delta trx2$ est également sensible à l' H_2O_2 , mais de façon moindre que le double mutant $\Delta trx1\Delta trx2$, alors que la $\Delta trx1$ ne l'est pas (Garrido and Grant, 2002), (données non publiées du laboratoire). Ceci suggère un rôle prédominant de Trx2

par rapport Trx1 dans cette fonction. Ces données sont accord avec les profils d'expression montrant que Trx2 est plus abondante que Trx1, et que Trx2, mais pas Trx1, est de surcroit fortement induite par l'H₂O₂ (Garrido and Grant, 2002). Le rôle prédominant de la Trx2 dans l'élimination des peroxydes est également conforté par l'absence de sensibilité à l'H₂O₂ de la souche $\Delta trx1\Delta grx1\Delta grx2$, invalidée pour la majorité des réductases (Garrido and Grant, 2002). Ceci indique aussi que Trx2 possède une activité qu'aucune autre réductase, comme Trx1, Grx1 ou Grx2, ne catalyse. De façon surprenante, la $\Delta trr1$ a un défaut de croissance bien supérieur à celui de la $\Delta trx1\Delta trx2$ (Trotter and Grant, 2003) (résultats non publiés du laboratoire), qui pourrait être lié à l'accumulation dans $\Delta trr1$ des Trx oxydées potentiellement toxique pour la cellule.

En plus de l'hypersensibilité à l'H₂O₂, la souche $\Delta trx1\Delta trx2$ présente une dérégulation de l'activité de Yap1 (Izawa et al., 1999) (Delaunay et al., 2000). Cependant, cet effet n'est pas visualisé en anaérobie, suggérant que l'induction des gènes antioxydants par Yap1 est indispensable à la vie aérobie de la souche $\Delta trx1\Delta trx2$ (Izawa et al., 1999), probablement toxique à cause l'accumulation de ponts disulfures dans la cellule. Dans cette souche, Yap1 est en fait constitutivement activé en l'absence d'H₂O₂ exogène. Cet effet est probablement du à défaut de réduction de Yap1 oxydé par l'H₂O₂. En effet, l'activation de Yap1 par oxydation par l'H₂O₂ est transitoire (données de Monceau L. thèse de troisième cycle), indiquant que Yap1 est inactivé par réduction. Les Trx sont en fait indispensables à la réponse à l'H₂O₂, d'une part en réduisant Orp1 (Gpx3) pour favoriser la transmission du signal H₂O₂ par Yap1/Orp1, et d'autre part en désactivant Yap1. De plus, l'expression de la voie des thiorédoxines, plus précisément de TRX2 et TRR1, est induite par Yap1 en réponse à l'H₂O₂ (Kuge and Jones, 1994), (Carmel-Harel et al., 2001), (Lee et al., 1999a), suggérant ainsi l'existence d'un rétrocontrôle de la voie des Trx par Yap1.

b. Les autres fonctions cellulaires des thiorédoxines

La thiorédoxine est le réducteur essentiel de la RNR et de la 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) réductase, des enzymes respectivement impliqués dans la synthèse d'ADN et dans l'assimilation du sulfate. Chez la bactérie, les glutarédoxines peuvent également assurer ces fonctions cellulaires (Prine et al., 1997). L'invalidation des Trx provoque par conséquent des défauts métaboliques importants de biosynthèse de l'ADN et d'assimilation du

sulfate, indiquant que la voie du GSH n'est pas capable d'assurer efficacement la réduction de la RNR et de la PAPS réductase.

i. Le métabolisme de l'ADN

La fonction des Trx dans ce métabolisme est confirmée par les phénotypes des défauts métaboliques de la $\Delta trx1\Delta trx2$. Hormis la tolérance à l' H_2O_2 (voir paragraphe ci-dessus), l'invalidation de *TRX1* ou de *TRX2* ne provoque pas de phénotype particulier, contrairement à la souche $\Delta trx1\Delta trx2$ (Muller, 1991), suggérant que Trx1 et Trx2 possèdent des activités redondantes. La souche $\Delta trx1\Delta trx2$ a un défaut de croissance en aérobie, caractérisé par un accroissement de la durée de la phase S et une diminution de la durée de la phase G1 (Muller, 1991), suggérant un défaut de réplication de l'ADN. Le laboratoire a récemment montré que ce phénotype était directement lié à un défaut de réduction de la RNR, responsable de la réduction des NTP en dNTP, nécessaires à la biosynthèse d'ADN. Le mécanisme de la RNR implique en effet la formation d'un pont disulfure catalytique au sein de l'enzyme à chaque NTP réduit. La diminution du stock de dNTP au cours de la phase S dans la souche $\Delta trx1\Delta trx2$ (Koc et al., 2006), (Camier et al., 2007a), et la mise en évidence d'une accumulation de la RNR sous une forme réduite dans ce mutant a démontré le rôle des thiorédoxines dans la réduction de la RNR (Camier et al., 2007a). La récupération du phénotype d'allongement de la phase S, suite à l'augmentation du pool des dNTPs et à la surexpression de la RNR sous une forme réduite dans la souche $\Delta trx1\Delta trx2$, confirme cette conclusion (Camier et al., 2007a). Le caractère essentiel de l'activité RNR pour la vie cellulaire et la viabilité de la souche $\Delta trx1\Delta trx2$, suggère l'existence d'un autre système de réduction de la RNR en l'absence des Trx. Il s'agit probablement des Grx di-thiol. Néanmoins, les Grx di-thiol ne catalysent pas la réduction de la RNR aussi efficacement que les Trx car la souche $\Delta trx1\Delta trx2$ conserve un allongement de la durée de la phase S (Muller, 1991). La létalité du quadruple mutant $\Delta trx1\Delta trx2\Delta grx1\Delta grx2$ et la restauration de la croissance de ce mutant par l'expression de l'une des quatre réductases di-thiols (Trx1, Trx2, Grx1 ou Grx2) conforte la redondance de l'activité cellulaire des Trx et Grx dans la réduction de la RNR, et indique que les Grx mono-thiols ne peuvent pas remplacer les réductases di-thiols (Draculic et al., 2000).

ii. Le métabolisme de l'assimilation du sulfate

La souche $\Delta trx1\Delta trx2$ est également auxotrophe pour les acides aminés soufrés cystéine et méthionine, impliquant la Trx dans l'assimilation du sulfate (Muller, 1991) (Muller, 1996). Cette assimilation fait intervenir l'enzyme PAPS réductase, responsable de la conversion des 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate en sulfite. Le cycle catalytique de cet enzyme comporte la formation d'un pont disulfure qui est ensuite réduit par les Trx. L'interaction entre les Trx et la PAPS réductase a été montrée par expérience de double-hybride (Vignols et al., 2005). Cependant, d'après la disparition de l'auxotrophie en méthionine de la souche $\Delta trx1\Delta trx2$, dans conditions minimisant la présence d'O₂, les Grx di-thiol pourraient se substituer aux Trx pour réduire la PAPS réductase (Draculic et al., 2000).

Il est intéressant de noter que la $\Delta trr1$ ne présente pas de défaut ni de synthèse d'ADN ni d'assimilation du sulfate, indiquant que cette souche mutante possède encore une activité thiorédoxine (données non publiées du laboratoire).

iii. Les autres fonctions cellulaires des Trx

Les Trx sembleraient avoir un rôle dans la protection contre le stress réducteur, induit par un agent réducteur (Trotter and Grant, 2002) (Rand and Grant, 2006), mais le mécanisme moléculaire sous-jacent n'a pas encore été élucidé. En réduisant la Mxr1 (voir paragraphe III.B.1a), les Trx auraient aussi un rôle dans le vieillissement cellulaire, en plus leur rôle dans le métabolisme de l'H₂O₂.

Les Trx ont également un rôle dans le développement des plantes, de par leur activité de régulation de la photosynthèse, pour les deux Trx chloroplastiques (TRX f et TRX m) (pour revue voir (Lemaire et al., 2007)), et de la germination, pour la Trx cytosolique (TRX h) (pour revue voir (Buchanan and Balmer, 2005)). Le séquençage des génomes des plantes a révélé l'existence de nombreuses autres thiorédoxines, telles que les TRX x et les TRX y, ayant un rôle dans la réduction des peroxydases.

2. La voie du GSH

a. Les données génétiques sur la fonction essentielle du GSH

Contrairement à l'invalidation de la voie entière des Trx ($\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$) (données non publiées du laboratoire), l'invalidation de *GSH1* est létale chez

S.cerevisiae (Grant et al., 1996) (Spector et al., 2001). Ces données indiquent que le GSH est indispensable à la vie cellulaire et que le GSH possède une fonction essentielle chez la levure qui n'est pas catalysée par la voie des Trx. De nombreuses études sont réalisées afin d'élucider la fonction essentielle du GSH, mais les raisons moléculaires de ce besoin vital de GSH n'ont pas encore été établies.

Seule l'addition de GSH exogène permet de récupérer la croissance du mutant $\Delta gsh1$ (Grant et al., 1996), (Spector et al., 2001). L'addition de dithiothréitol, un agent réducteur des disulfures, ou la surexpression des Trx ralentissent la vitesse de consommation du GSH exogène par la souche $\Delta gsh1$, mais ne sont pas capables de remplacer le GSH dans sa (es) fonction(s) essentielle(s) (Sharma et al., 2000), (Spector et al., 2001). Comme le GSH a une fonction essentielle que les Trx et les agents réducteurs sont incapables de remplacer, le rôle essentiel du GSH n'est donc lié ni à la réduction de la RNR, ni à la réduction de la PAPS réductase, puisque la voie de la thiorédoxine est le réducteur préférentiel ou exclusif de ces activités (Spector et al., 2001). La croissance en anaérobiose ne récupère pas non plus le besoin en GSH, indiquant que le défaut entraîné par l'absence de GSH n'est pas lié à un stress oxydant (Spector et al., 2001). Une recherche de supresseurs génétiques du phénotype létal de la souche $\Delta gsh1$, conduite au laboratoire, a identifié un seul locus, le gène *PRO2* codant un enzyme de la biosynthèse de la proline, dont certaines mutations rétablissent une synthèse très inefficace de GSH selon une nouvelle voie enzymatique (souche $\Delta gsh1PRO2-1$) (Spector et al., 2001). Ce résultat indique que la fonction essentielle du GSH n'est pas liée à son rôle de tampon redox puisque des quantités minimales de ce tripeptide sont suffisantes pour assurer une croissance sauvage de la levure. Ce crible suggère également qu'il n'existe pas de vrais supresseurs génétiques du défaut de GSH. De plus, l'invalidation de *GLR1*, augmente la proportion de GSSG (Muller, 1996), mais n'est pas létale (Collinson and Dawes, 1995), suggérant que de fortes concentrations de GSH ne sont pas indispensables à la vie cellulaire ou qu'un autre mécanisme de réduction du GSSG existe. Nous allons d'abord considérer les différentes fonctions du GSH, puis suggérerons quelques pistes menant à la fonction physiologique essentielle du GSH.

b. Le GSH intervient dans la détoxification cellulaire de plusieurs composés

i. L'élimination des composés toxiques

Le GSH intervient dans l'élimination de métabolites toxiques, comme le méthylglyoxal, de xénobiotiques (Xe) électrophiles, et de métaux lourds, comme le cadmium, par conjugaison directe avec ces derniers en présence de la glutathion-S-transférase (GST) (pour revue voir (Penninckx, 2002)). Les conjugués ainsi formés sont ensuite transférés dans la vacuole par le transporteur YCF1 «Yeast Cadmium Factor» où ils y sont stockés.

ii. L'élimination des peroxydes

Nous avons vu que la voie des Trx a un rôle majeur dans l'élimination des peroxydes. Qu'en est-il de la voie du GSH? Tout d'abord, le GSH ne permet pas d'éliminer la létalité de la souche $\Delta trx1\Delta trx2\Delta glr1$, alors que des conditions anaérobiques le permettent (Muller, 1996), suggérant probablement que les peroxydes dérivés de l'O₂ provoquent des oxydations non physiologiques, que le GSH ne peut pas réparer mais que la présence soit des Trx, soit de la Glr1 peut compenser. Le GSH ne peut en effet éliminer les peroxydes ni directement, vu sa faible réactivité vis-à-vis de ces composants (Winterbourn and Metodiewa, 1999), ni indirectement puisque la levure ne possède pas de Gpx dépendantes du GSH (voir paragraphe III.B.1a).

Néanmoins, le groupe de Grant suggère un rôle majeur du GSH dans l'élimination de l'H₂O₂, par l'intermédiaire des Grx di-thiol, qui présentent une activité de peroxydase (Collinson et al., 2002) et GSH-S-transférases *in vitro* (Collinson and Grant, 2003). En effet le double mutant $\Delta grx1\Delta grx2$ a un phénotype de sensibilité à l'H₂O₂ (Luikenhuis et al., 1998). Cependant ce phénotype est négligeable comparé à celui de la souche $\Delta trx1\Delta trx2$ (Garrido and Grant, 2002). De plus, la mesure du K_m des Grx di-thiol pour le substrat peroxyde est trop élevée (0,5 à 4 mM) (Collinson et al., 2002), (Collinson and Grant, 2003) pour entrevoir une fonction enzymatique *in vivo* aux concentrations intracellulaires d'H₂O₂ compatibles avec la vie.

Il est cependant envisageable que le GSH intervienne indirectement dans le métabolisme des peroxydes, de par sa capacité à transférer facilement ses électrons sur les résidus cystéines, par glutathionylation des résidus cystéines sous forme

d'acide sulfénique, induite par les peroxydes (voir paragraphe I.B). La glutathionylation des résidus cystéines par le GSH permet ainsi leur protection contre une éventuelle suroxydation.

c. Le GSH intervient dans la glutathionylation des protéines

i. Le GSH a un rôle de tampon redox par la glutathionylation des cystéines

Ce rôle du GSH en tant que tampon redox est notamment confirmé par une étude provenant de notre laboratoire, qui montre que la diminution de la concentration intracellulaire de GSH provoque une sensibilité à l' H_2O_2 en milieu liquide et non pas en milieu solide (Spector et al., 2001), (Izawa et al., 1995), (Stephen and Jamieson, 1996). La mesure de la tolérance à l' H_2O_2 en milieu liquide reflète la résistance intrinsèque des cellules à l' H_2O_2 alors que la mesure en milieu solide indique une adaptation des cellules à l' H_2O_2 . Ces résultats démontrent donc que le GSH interviendrait non pas au cours de l'adaptation à l' H_2O_2 , comme les peroxydases, mais en réponse à un stress aigu (Spector et al., 2001). La voie du GSH permet donc la survie cellulaire en présence d' H_2O_2 , probablement par glutathionylation des cystéines, alors que la voie des Trx intervient plus particulièrement dans le catabolisme de l' H_2O_2 .

L'activité de glutathionylation / déglutathionylation du GSH est notamment confirmée par l'existence de nombreuses protéines glutathionylées (Shenton and Grant, 2003) et l'augmentation des quantités de GSSG (Grant et al., 1998), en présence d' H_2O_2 (données non publiées de Dan Spector). L'augmentation de la concentration intracellulaire de GSSG dans la souche $\Delta\text{trx1}\Delta\text{trx2}$ (Muller, 1996) reflète probablement aussi une augmentation de la fonction de tampon redox du GSH, et la létalité de la souche $\Delta\text{trx1}\Delta\text{trx2}\Delta\text{glr1}$ en aérobie suggère que la fonction de tampon redox du GSH est indispensable en l'absence des Trx (Muller, 1996). Ces observations suggèrent également que les Trx peuvent participer à la réduction du GSSG, de façon directe ou indirecte et de façon conjointe avec la Glr1, ce qui est d'ailleurs possible d'après le potentiel redox des Trx (-270 mV), inférieur à celui du GSH (-240 mV) (Aslund et al., 1997). De plus, l'invalidation de la *GLR1* augmente la sensibilité à l' H_2O_2 de la souche $\Delta\text{gsh1}\text{PRO2-1}$, indiquant que la réduction du GSSG est importante pour la fonction de tampon redox du GSH (Spector et al., 2001). L'induction des gènes *GSH1* et *GLR1* par le facteur de transcription Yap1 en

réponse à l' H_2O_2 , reflète probablement la présence indispensable de la fonction de tampon redox du GSH dans ces conditions de stress oxydant (Gasch et al., 2000) (Lee et al., 1999a) (Wu and Moye-Rowley, 1994).

ii. Un exemple illustrant le rôle du GSH dans la glutathionylation

Des études ont montrés que de nombreux enzymes de la glycolyse peuvent être glutathionylés, comme la GAPDH/Tdh3 (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) (Shenton and Grant, 2003), (Fratelli et al., 2002). Chez *S.cerevisiae*, la Tdh3 est un exemple de protéine glutathionylée reflétant la fonction du GSH dans la protection des cystéines. La glutathionylation de la Tdh3 induite par la présence d' H_2O_2 provoque une extinction de son activité (Grant et al., 1999). Lorsque l' H_2O_2 est éliminé, l'activité de la Tdh3 est ensuite restaurée par une réaction de déglutathionylation, probablement catalysée par le GSH (Shenton et al., 2002). En l'absence de GSH, l' H_2O_2 provoque l'extinction irréversible de l'activité de la Tdh3, suggérant la présence d'une modification irréversible des thiols de la Tdh3 (Shenton and Grant, 2003). Le GSH semble donc avoir un rôle dans la protection des cystéines contre une modification irréversible. L'absence de déglutathionylation de la Tdh3 observée dans le mutant $\Delta grx5$ (Shenton et al., 2002) n'est probablement pas du à l'activité de déglutathionylation de Grx5, mais à la persistance de la liaison disulfure entre le GSH et les cystéines de la Tdh3, afin de protéger les thiols de Tdh3 d'une modification, pouvant résulter de l'augmentation du fer intracellulaire caractéristique de la souche $\Delta grx5$ (Rodriguez-Manzaneque et al., 2002). Les auteurs ont proposés que l'extinction de l'activité de la Tdh3 par glutathionylation bloque la voie de la glycolyse et permet d'augmenter le flux d'équivalents réducteurs produits par la voie des pentoses phosphates (Shenton and Grant, 2003).

Nous pouvons souligner qu'il est difficile d'estimer à quel point la fonction de tampon redox du GSH est essentielle. Néanmoins si cette activité était essentielle, elle serait probablement restaurée par l'addition de DTT, capable de réduire les acides sulféniques, ou des conditions anaérobiques, diminuant la présence des oxydants (Spector et al., 2001).

d. Le GSH intervient dans la voie de sécrétion

La glycosylation et le repliement structural des protéines permettent la maturation des protéines de la voie de sécrétion. Le repliement implique la formation de ponts disulfures catalysés par l'oxydase Ero1 et les PDI (voir paragraphe IV).

Bien avant la découverte d'Ero1 (voir schéma 15), l'oxydation des protéines de la voie de sécrétion était attribuée au GSSG, étant donné le rapport de [GSH] / [GSSG] dans le RE de 1/1 à 3/1, comparé à celui du cytoplasme de 30/1 à 100/1 (Hwang et al., 1992). Ce modèle supposait l'existence d'un transport préférentiel du GSSG du cytoplasme vers la lumière du RE ou d'une production enzymatique de GSSG dans le RE, afin de maintenir une forte concentration de GSSG (Hwang et al., 1992).

La découverte d'Ero1 (Frand and Kaiser, 1998) (Pollard et al., 1998), l'oxydant spécifique des protéines de la voie de sécrétion, a annulé ce modèle, et a en fait attribué au GSH non plus un rôle d'oxydant, mais celui d'un réducteur, qui entre en compétition avec Ero1 pour l'oxydation des thiols (Cuozzo and Kaiser, 1999). En effet, la diminution du GSH intracellulaire par invalidation de *GSH1* permet de restaurer la formation des ponts disulfure d'une souche défectueuse en activité Ero1 (Cuozzo and Kaiser, 1999). Réciproquement, la surexpression d'Ero1 provoque une augmentation du rapport [GSSG] / [GSH] dans le RE (Cuozzo and Kaiser, 1999). En plus de fortes concentration de GSSG (Hwang et al., 1992), la présence de protéines glutathionylées dans le RE (Bass et al., 2004) témoigne de l'activité de réduction du GSH.

Comme nous le verrons (voir paragraphe IV), chez *S.cerevisiae* l'activité d'Ero1 est en fait régulée par deux ponts disulfures intramoléculaires dont la formation est proportionnelle à l'état d'oxydation du RE. Ces ponts, formés lorsque le RE est très oxydé, provoquent l'inactivation d'Ero1 (Sevier et al., 2007), afin d'éviter la formation de ponts disulfures aberrants suite à la modification de l'état redox du RE.

Le rôle du GSH dans le RE est très complexe. En effet, il semble limiter l'état d'oxydation du RE, en luttant contre l'oxydation des thiols par Ero1 (Cuozzo and Kaiser, 1999), et paradoxalement, il semble jouer un rôle pro-oxydant en activant Ero1 par un mécanisme inconnu (Sevier et al., 2007). La réduction de la Pdi1 par le

GSH permettrait d'expliquer ces rôles opposés. Ainsi, le GSH favoriserait présence de quantités importantes de Pdi1 sous forme réduite, compatible avec son activité de réductase ou d'isomérase, ce qui provoque parallèlement l'augmentation de l'activité d'Ero1 (Sevier et al., 2007). La quantité de GSH dans le RE permettrait alors de réguler indirectement l'activité d'Ero1. En conclusion, le GSH serait indispensable au bon fonctionnement du contrôle homéostatique de formation des ponts disulfures par Ero1. Ceci suggère que la cellule doit réguler précisément le rapport [GSH] / [GSSG] afin de réaliser correctement la formation des ponts disulfures des protéines sécrétées.

Il existe donc une étroite connexion entre la voie d'oxydation Ero1/Pdi1 du RE et le GSH présent dans le cytoplasme. La relation entre ces deux compartiments suggère donc l'existence d'une régulation du transport de GSH à travers la membrane du RE, afin de fournir un flux continu d'équivalents réducteurs, ou d'une réduction du GSSG produit lors de ces réactions de réduction. L'existence d'une Glr dans le RE n'étant pas prouvée, le GSSG doit probablement être transporté par la voie de sécrétion dans la vacuole ou le milieu extracellulaire.

Chez les eucaryotes supérieurs, le rôle du GSH dans la maturation des protéines sécrétées semble légèrement différent. En effet, contrairement à la levure, la diminution de GSH provoque une augmentation de l'oxydation des protéines sécrétées (Molteni et al., 2004), sous forme de ponts disulfures, dont certains sont aberrants et peuvent conduire à l'agrégation des protéines et à l'activation de la voie UPR «Unfolded Protein Response» (pour revue voir (Sitia and Braakman, 2003)). Le GSH fournirait alors un pouvoir réducteur suffisant pour permettre la maturation correcte des protéines sécrétées. Dans ce cas, le GSH aurait un rôle de réducteur des ponts disulfures mal insérés dans les protéines sécrétées, afin de permettre un nouveau cycle d'oxydation de ces protéines par la voie Ero1/Pdi1.

e. Le GSH intervient dans l'élimination du fer

Plusieurs études ont récemment montré une connexion importante entre le GSH, et le métabolisme des centres Fe/S. Cette connexion pourrait fournir une explication à la fonction biologique essentielle du GSH. Notons que la fonction du GSH dans ce métabolisme est intimement liée aux Grx mono-thiol. Ces dernières deviennent également essentielles pour la viabilité cellulaire lorsqu'elles sont

absentes simultanément (Rodriguez-Manzanaque et al., 1999), et il semble raisonnable de penser que leur rôle essentiel concerne la même fonction biologique essentielle du GSH.

Une première étude s'appuie sur des données génétiques indiquant que l'absence de Grx5, localisée dans la matrice mitochondriale, conduit à un défaut dans la biosynthèse des centres Fe/S et une accumulation de fer intracellulaire, par activation anormale d'Aft1, un régulateur transcriptionnel contrôlant un régulon important pour l'assimilation du fer (Rodriguez-Manzanaque et al., 2002). Ces données suggèrent fortement une fonction importante de Grx5 dans l'assemblage des centres Fe/S dans la mitochondrie, d'autant plus que les phénotypes de $\Delta grx5$ sont améliorés par la surexpression de SSQ1 et ISA2 (Rodriguez-Manzanaque et al., 2002), deux gènes codant pour des protéines intervenant dans cet assemblage (pour revue voir (Lill et al., 2006)). La fonction moléculaire de Grx5 dans ce processus n'est pas encore élucidée mais, comme nous le verrons, Grx5 pourrait faciliter le transfert des centres Fe/S, assemblés par la machinerie Isu1/2, sur les protéines cibles. Il est surprenant de constater que la souche $\Delta gsh1$ présente, après réduction du pool de GSH exogène, des phénotypes extrêmement similaires à la $\Delta grx5$ (Sipos et al., 2002). Cependant, cet effet n'est dû, ni à l'altération de la biosynthèse des centres Fe/S, car les protéines mitochondriales à centre Fe/S sont fonctionnelles, ni à un stress oxydant, car l'anaérobiose ou l'addition d'agent réducteur n'améliorent pas le phénotype de la $\Delta gsh1$.

Il est intéressant de noter que la combinaison de l'inactivation des gènes *GRX2/GRX5* ou *GRX3/GRX4/GRX5* est létale (Rodriguez-Manzanaque et al., 1999), ce qui suggère que la Grx5 présente deux fonctions indépendantes essentielles: l'une redondante avec Grx2, dont la nature reste à élucider, et l'autre redondante avec Grx3 et Grx4, liée au métabolisme du fer (voir paragraphe suivant) (Molina et al., 2004).

Des données moléculaires très récentes permettraient de proposer une même fonction du GSH et des Grx mono-thiol dans le métabolisme des centres Fe/S. La Grx2 di-thiol des mammifères (Lillig et al., 2005), (Johansson et al., 2007) et la GrxC1 di-thiol du peuplier (Feng et al., 2006) s'assemblent chacune en dimères contenant un centre 2Fe/2S, lié par la cystéine catalytique de la Grx et par les cystéines de deux molécules de GSH. D'après les homologies de séquences

primaires, il très probable que Grx3, Grx4 et Grx5 incorporent aussi un centre Fe/S avec du GSH (Rouhier et al., 2007). Nous proposons un modèle qui tient compte de ces résultats récents (voir schéma 12). Ce modèle suggère que les Grx mono-thiol et le GSH assemblent des centres Fe/S dans la matrice mitochondriales, puis les transfèrent de la machinerie d'assemblage mitochondriales aux protéines mitochondriales cibles, en ce qui concerne Grx5, ou les exportent de la mitochondrie au cytoplasme pour insérer les centres Fe/S dans les protéines de ce compartiment (voir schéma 12).

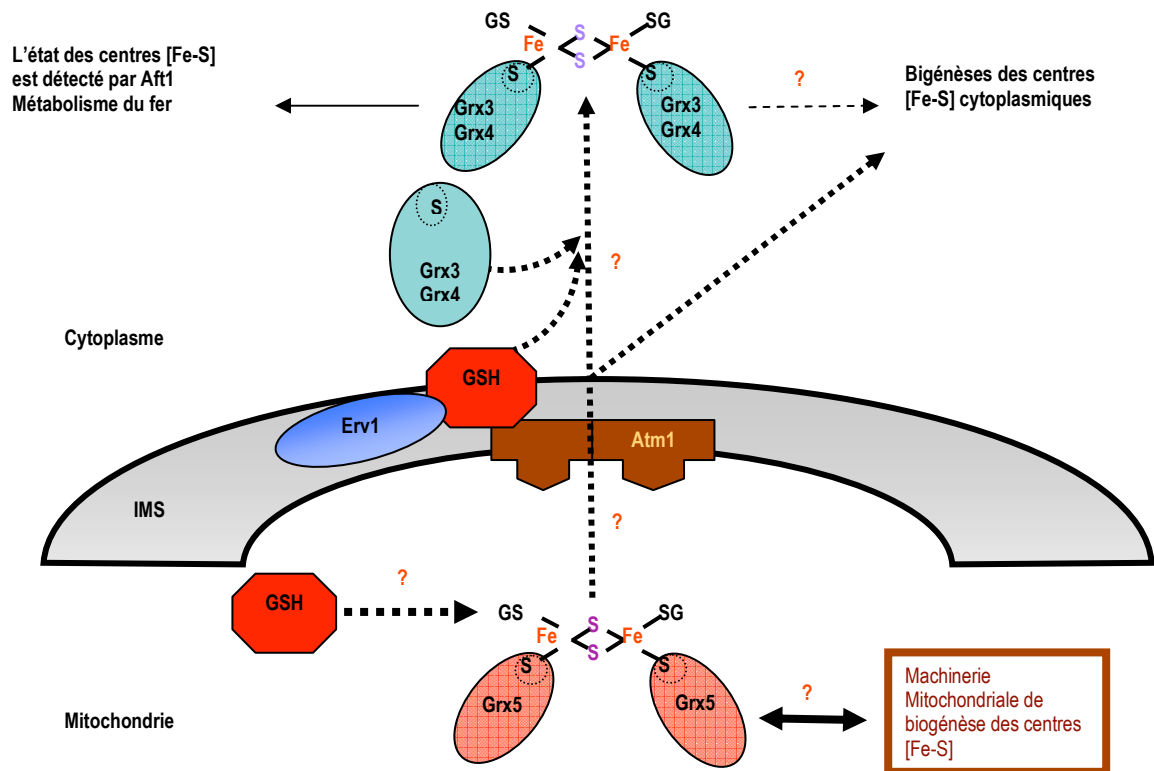


Schéma 12. Modèle spéculatif de la fonction des Grx mono-thiol dans l'assemblage des centres Fe/S.

La maturation des protéines cytosoliques à centre Fe/S dépend de l'export d'un composant inconnu provenant de la machinerie mitochondriale de biosynthèse des centres Fe/S. Cet export implique trois éléments essentiels: le transporteur Atm1 de la membrane mitochondriale interne, la flavine oxydase Erv1 de l'EIM, le GSH et un centre Fe/S. Ce composant inconnu est également essentiel à la régulation de l'homéostasie du fer *via* Aft1, et sa synthèse implique probablement une Grx mono-thiol contenant un centre Fe/S lié au GSH (Toledano M., 2007)

3. La redondance entre les deux voies de réduction existe-t-elle?

a. La spécialisation des deux voies de réduction

Chez *E.coli*, l'invalidation de l'une des deux voies de réduction ne provoque pas de phénotypes, indiquant que les voies des Trx et du GSH sont totalement redondantes (Prinz et al., 1997) (pour revue voir (Toledano M., 2007)). Inversement, l'invalidation de composants appartenant aux deux voies est létale. Ces observations sont dues à la présence d'enzymes éliminant les peroxydes indépendamment des voies de réduction GSH et Trx, et à la complémentarité fonctionnelle entre les Grx et Trx dans la réduction de la RNR, une protéine essentielle à la vie cellulaire (pour revue voir (Carmel-Harel and Storz, 2000) (voir schéma 13).

Inversement, chez *S.cerevisiae*, les voies des Trx et du GSH semblent plus spécialisées. Comme nous l'avons vu, cette spécialisation est confirmée par l'apparition de divers phénotypes liés à l'invalidation d'un ou plusieurs composants de l'une des deux voies de réduction (voir paragraphe III.B). Elle est aussi confirmée par la létalité des souches portant une inactivation des composants appartenant aux deux voies de réduction, comme la $\Delta trx1\Delta trx2\Delta glr1$ (Muller, 1996) et la $\Delta trr1\Delta glr1$ (Trotter and Grant, 2003) (données non publiées du laboratoire), à cause des fonctions distinctes et essentielles catalysées par les Trx et le GSH ou à cause de la réduction d'un substrat commun, ayant une fonction cellulaire essentielle. Des études biochimiques confirment aussi cette spécialisation. Par exemple, l'invalidation de TRR1 provoque une accumulation des Trx sous une forme oxydée (Trotter and Grant, 2003) alors que l'invalidation de GLR1 produit une augmentation de GSSG (Muller, 1996) et de l'oxydation des Grx (Trotter and Grant, 2003), suggérant ainsi l'indépendance des deux voies dans le maintien des réductases Trx et Grx sous une forme réduite et l'incapacité de transfert d'électrons entre les deux voies de réduction. Cependant, nous avons vu auparavant qu'il existe une certaine connexion entre la voie du GSH et des Trx au niveau de leurs substrats (voir paragraphe III.B).

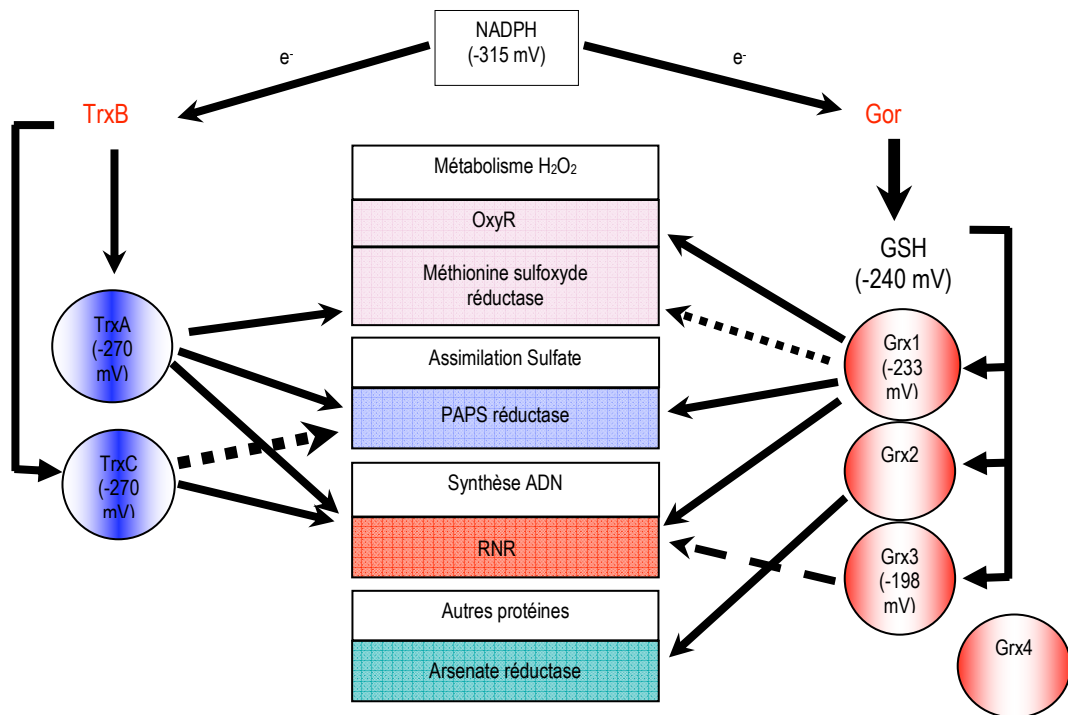


Schéma 13. La redondance des deux voies de réduction chez *E.coli*.

Les flèches noires indiquent le flux d'électrons provenant du NADPH. Les Trx et Grx ont plusieurs substrats communs *in vivo*. Les flèches en pointillées indiquent une potentielle réduction des cibles *in vitro* ou lors de la surexpression d'un composant. Ce schéma tiré de la revue (Toledano M., 2007) est modifié d'après la figure de (Prinz et al., 1997).

b. La spécificité des substrats des Trx et Grx

Les substrats respectifs des Grx et des Trx chez *S.cerevisiae* n'ont pas encore été clairement identifiés, par conséquent de nombreuses méthodes, que nous détaillerons ultérieurement (voir paragraphe V), sont développées afin d'identifier les partenaires de ces réductases. Cependant, les Trx et Grx de levure peuvent vraisemblablement se compléter dans la réduction de certains substrats, à savoir la RNR, la PAPS réductase (Draculic et al., 2000) et Yap1 (données non publiées du laboratoire). L'explication à cette complémentarité nous est essentiellement fournie par des données chez *E.coli* (pour revue voir (Ritz and Beckwith, 2001)). Ainsi, la mesure de l'affinité d'une réductase pour son substrat (reflétée par le K_m) combinée à l'analyse des phénotypes observés après l'inactivation d'une ou de plusieurs réductases a permis de définir les paramètres déterminant la complémentarité entre les Trx et Grx dans la réduction des substrats. Celle-ci semble clairement régie par le niveau d'expression et le potentiel redox des réductases, et par la différence d'affinité des Trx et Grx envers leurs substrats respectifs, en dépit de leur homologie

structurale. Par exemple, d'après le calcul du K_m , les Grx d'*E.coli* semblent être dix fois moins efficace que les Trx pour réduire la RNR (Holmgren, 1989). D'après le phénotype de létalité de la souche $\Delta trx1\Delta trx2\Delta grx1$ (Stewart et al., 1998), la Grx3 d'*E.coli* ne réduit pas la RNR *in vivo*, probablement à cause de son potentiel redox élevé de -198 mV, supérieur à celui de Grx1 (-233 mV) (Aslund et al., 1997). De façon similaire, l'augmentation du potentiel redox des Trx les empêche de donner leurs électrons à la PAPS réductase (Mossner et al., 1999). La surexpression de Trx2 ou de Grx1 permet de réduire respectivement la PAPS réductase (Lillig et al., 1999) ou la MSR à la place de leur réductases naturelles, à savoir Trx1/Grx1 pour la PAPS réductase et Trx1 pour la MSR. La Grx2 est incapable de réduire la RNR (Aslund et al., 1994), la PAPS réductase ou la MSR, néanmoins elle réduit *in vitro* un autre substrat: l'arsenate réductase (Shi et al., 1999). L'ensemble de ces résultats suggère alors une fonction distincte entre les Trx et Grx (voir schéma 13).

D'après certaines de ces données, l'invalidation d'un des composants des voies de réduction ou les conditions expérimentales de culture (agents oxydants, phase de croissance) peuvent provoquer l'augmentation de l'expression d'un autre composant, afin de compenser les défauts engendrés. Ce phénomène de compensation rend donc difficile l'analyse de la fonction *in vivo* des voies de réduction et peut conduire à de fausses interprétations quant à la contribution respective des Trx et du GSH dans le contrôle de l'état redox des thiols.

IV. Les systèmes catalysant l'oxydation des résidus cystéines: les voies Ero1/Pdi1 et Erv1/Mia40

Outre les enzymes dont le cycle fait intervenir un pont disulfure catalytique comme la RNR, l'oxydation catalytique des résidus cystéines intervient dans deux processus fondamentaux indispensables à la vie cellulaire: le repliement oxydatif des protéines dans le RE (voir schéma 15) et l'import dans l'EIM d'une classe particulière de protéines (voir schéma 16). Comme nous l'avons présenté auparavant (voir paragraphe II.B.2b), les voies de formation des ponts disulfures sont composées des flavines oxydases Ero1-Erv2 du RE et Erv1 l'EIM, qui transfèrent les équivalents oxydants provenant de l'O₂ sur des protéines relais (Pdi1 du RE et Mia40 de l'EIM), catalysant l'oxydation des résidus cystéines de leurs substrats respectifs. Cette catalyse fait intervenir le groupement FAD des oxydases et une succession d'échanges di-thiol/disulfure, non seulement entre les différents domaines catalytique de chaque composant mais aussi entre les différents composants.

A. Les flavines oxydases génèrent les équivalents oxydants

On distingue deux groupes de flavines oxydases: les flavines sulfhydryles oxydases (Erv1, Erv2) et la flavine oxydase Ero1 (voir schéma 14) (pour revue voir (Thorpe et al., 2002)).

1. Les membres de la famille des flavines sulfhydryles oxydases

La famille des flavines sulfhydryles oxydases est présente chez tous les eucaryotes et chez certains virus, mais inexistante chez les bactéries. Elle est caractérisée par deux domaines. Le premier domaine appelé ERV/ALR est très conservé au sein des différents membres de cette famille. Il est constitué d'un domaine de liaison du FAD, situé à proximité d'un centre catalytique CXXC, localisé dans une structure rigide. Ce premier domaine rappelle Trr1 et Glr1. Les flavines sulfhydryles oxydases possèdent un second motif di-thiol supplémentaire non conservé (CXC, CX₂C), localisé soit en N-terminal soit en C-terminal par rapport au

centre catalytique, et généralement situé dans une queue/boucle peptidique mobile. Les flavines sulphydryles oxydases peuvent être classées en différentes catégories.

a. Les protéines QSOX

La première catégorie comprend les QSOX «Quiescine Sulphydryle Oxydase» présentes chez les métazoaires. Elles ont un domaine supplémentaire semblable à celui des Trx (Raje and Thorpe, 2003). Elles sont localisées dans le RE, l'appareil de Golgi, la membrane plasmique et peuvent également être sécrétées. Ces protéines ont été initialement identifiées comme étant fortement exprimées dans des fibroblastes humains en stade de quiescence, provoqué par la privation de sérum, d'où leur dénomination de «quiescine». Les QSOX auraient un rôle dans l'oxydation des protéines sécrétées, d'après leur capacité à compléter la fonction d'Ero1 dans la formation des ponts disulfures (Chakravarthi et al., 2007).

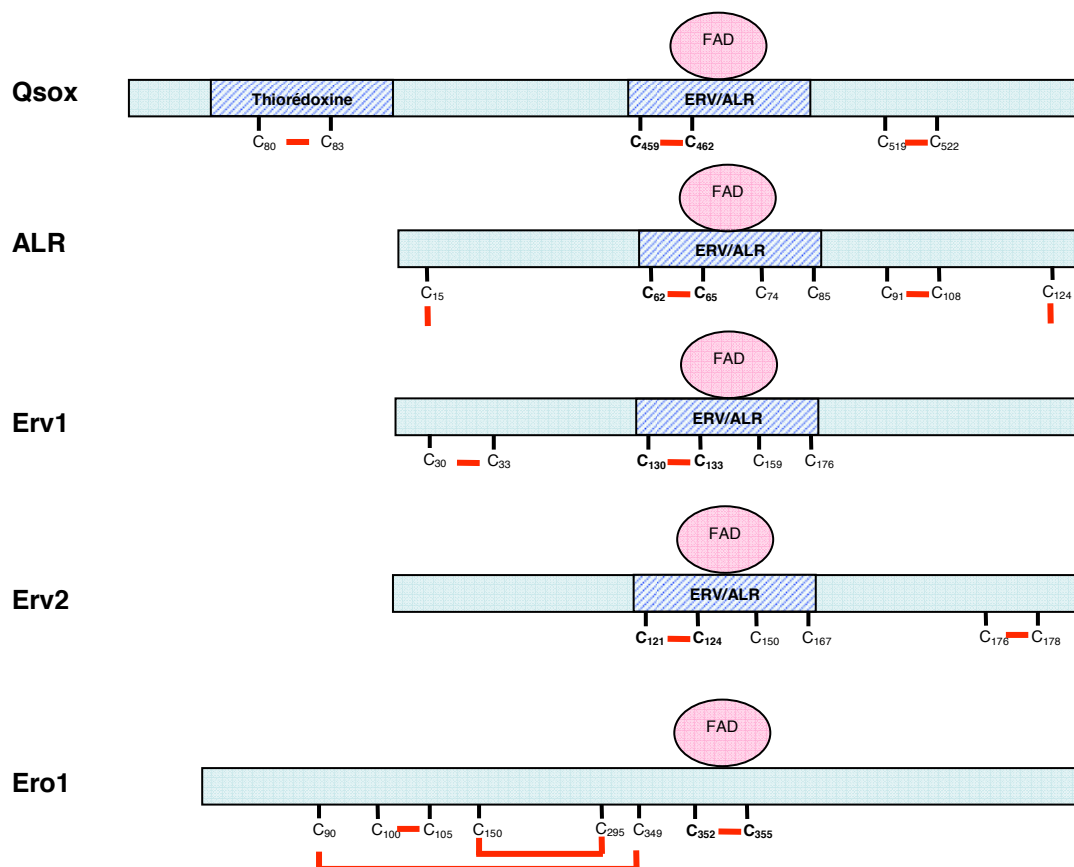


Schéma 14. Les membres de la famille des flavines sulphydryles oxydases et la flavine oxydase Ero1.

Les flavines oxydases ont un centre catalytique CXXC à proximité du FAD et un motif di-thiol supplémentaire, variant par sa localisation et l'espacement des résidus cystéines. Les ponts disulfures, dont l'existence est suspectée ou démontrée, sont indiqués en rouge, et les cystéines du centre catalytique sont représentées en gras.

b. Les protéines ERV/ALR

La seconde catégorie appelée ERV/ALR est composée de petites protéines considérées comme des versions écourtées des QSOX, de par l'absence du domaine Trx présent dans ces dernières. Cette catégorie comprend les protéines de levure Erv1, localisée dans l'EIM et Erv2 dans le RE, la protéine E10R du poxvirus et l'ALR des mammifères.

Les protéines Erv1 et Erv2 chez S.cerevisiae

Erv1 «Essential for Respiration and Vegetative growth» est localisée dans l'EIM et essentielle à la vie cellulaire. Son absence provoque des modifications morphologiques mitochondriales, allant jusqu'à la perte totale des mitochondries et aboutissant à la létalité (Lisowsky, 1994) (Becher et al., 1999). Nous verrons ultérieurement que ces phénotypes sont liés au rôle moléculaire d'Erv1 dans l'import de protéines mitochondriales (Mesecke et al., 2005) et dans l'export des centres Fe/S de la mitochondrie vers le cytoplasme (Lange et al., 2001). Ces observations montrent aussi que les mitochondries sont essentielles à la vie cellulaire, alors que l'altération de la chaîne respiratoire ou l'absence d'un génome mitochondrial ne provoque pas de létalité. Ce rôle essentiel serait en fait lié à la fonction d'assemblage des centres Fe/S prenant place dans cet organite (Lill et al., 2006).

Erv2 est un homologue structural d'Erv1 (Stein and Lisowsky, 1998), localisé dans le RE (Gerber et al., 2001). Erv2 n'est pas indispensable à la vie cellulaire (Stein and Lisowsky, 1998). Sa fonction exacte n'est pas connue, mais sa surexpression permet d'éliminer la létalité d'une souche dans laquelle Ero1 est défectueux (Sevier et al., 2001).

En plus des fonctions et des localisations cellulaires, Erv1 et Erv2 diffèrent également par la localisation du second motif di-thiol, situé à l'extrémité N-terminale pour Erv1 et C-terminale pour Erv2 (Stein and Lisowsky, 1998). Le motif di-thiol diffère lui-même, étant de type (CX₂C) dans le cas d'Erv1 et de type (CXC) dans le cas d'Erv2 (voir schéma 14). La mutation des cystéines de ce motif di-thiol ou du centre redox CXXC abolissent l'activité d'Erv1 (Lee et al., 2000), (Hofhaus et al., 2003) et d'Erv2 (Sevier et al., 2001), (Gross et al., 2002). Le mécanisme catalytique de ces protéines n'est pas encore clairement décrit. Néanmoins, Erv2 semble fonctionner en tant que dimère redox (Gross et al., 2002) (Vala et al., 2005).

La protéine E10R chez le virus

La protéine E10R du virus de la vaccine catalyse, dans le cytoplasme des cellules infectées, la formation des ponts disulfure au sein des protéines de la capsid, par une cascade d'échange di-thiol/disulfure, impliquant entre-autre une glutarédoxine codée par le virus (Senkevich et al., 2002). Contrairement aux autres protéines de la famille ERV/ALR, E10R ne possède pas de motif di-thiol supplémentaire, celui-ci étant fourni par une autre protéine adaptateur (Senkevich et al., 2002).

La protéine ALR chez l'homme

L'ALR «Augmenter of Liver Regeneration» a été initialement découverte pour sa capacité à stimuler la régénération des cellules du foie (pour revue voir (Pawlowski and Jura, 2006)). Elle est majoritairement localisée dans l'EIM des cellules hépatiques. L'ALR est également exprimée sous de nombreuses isoformes dans plusieurs tissus et compartiments cellulaires (cytoplasme, noyau, EIM). Contrairement aux autres membres de cette famille l'ALR possède aux deux extrémités N- et C-terminales des résidus cystéines formant un pont disulfure intermoléculaire entre deux monomères d'ALR (Farrell and Thorpe, 2005). L'ALR contient également un motif CX₁₆C formant un pont disulfure intramoléculaire, en plus du motif catalytique CXXC (Farrell and Thorpe, 2005). La fonction moléculaire d'ALR n'est pas encore identifiée, mais elle partage néanmoins une fonction commune avec Erv1, puisque l'ALR permet d'éliminer la létalité d'une souche défectueuse en activité Erv1 (Lange et al., 2001).

2. La flavine oxydase Ero1

Ero1 «Endoplasmic Reticulum Oxidase» est une protéine du RE très conservée chez les eucaryotes et essentielle à la viabilité cellulaire, en raison de sa fonction d'oxydase des protéines de la voie de sécrétion (Frard and Kaiser, 1998) (Pollard et al., 1998). Ero1 n'a aucune similarité de séquence peptidique avec la famille des sulfhydryles oxydases (ERV, QSOX, E10R, ALR) mais une similarité structurale importante, corrélant avec leur fonction similaire de flavines oxydases (Gross et al., 2004). Ero1 possède aussi un motif di-thiol de type CX₄C situé dans une boucle peptidique flexible en N-terminal du motif catalytique CXXC (voir schéma 14).

La structure tridimensionnelle d'Ero1 (Gross et al., 2004) et les études de la mutagenèse des résidus cystéines (Fränd and Kaiser, 2000), (Sevier and Kaiser, 2006) ont permis de proposer un modèle du mécanisme moléculaire d'Ero1. Le transfert des équivalents oxydants de l'O₂ par l'intermédiaire du FAD permet de générer un pont disulfure sur le motif CXXC. Ce pont disulfure est ensuite transmis au motif CX₄C, qui de par sa localisation sur un domaine flexible, fait la navette entre le centre catalytique CXXC et le substrat PDI. Les flavines sulfhydryles oxydases fonctionnent selon un mécanisme similaire à Ero1 (Gross et al., 2002), (Raje and Thorpe, 2003) (Farrell and Thorpe, 2005) (Hofhaus et al., 2003).

Récemment, une étude a montré que deux paires de cystéines supplémentaires (voir schéma 14) régulent négativement l'activité d'Ero1 (Sevier et al., 2007) en formant des liaisons disulfures permettant le rapprochement des motifs CXXC et CX₄C. Ces cystéines sont en fait oxydées en fonction de l'état d'oxydation du RE. Cette modification de conformation empêche le transfert des ponts disulfures entre Ero1/Pdi1 (Sevier et al., 2007). L'extinction de l'activité d'Ero1 permet alors de bloquer le flux d'équivalents oxydants générés par Ero1 (Gross et al., 2006), et de maintenir le RE dans un état redox compatible avec l'insertion correcte de ponts disulfures. En effet l'extinction d'Ero1 provoque l'accumulation de la Pdi1 sous une forme réduite (Fränd and Kaiser, 1999), compatible avec son activité de réductase ou d'isomérase (voir paragraphe IV.B.2), favorisant le réarrangement des ponts disulfures aberrants provoqués par des conditions trop oxydantes. La réduction des ponts disulfures régulateurs afin de réactiver Ero1, s'effectue par un mécanisme inconnu, mais nous pourrions supposer un rôle du GSH dans cette fonction, différent de celui que nous avons évoqué auparavant (voir paragraphe III.B.2.d). Ce mécanisme de régulation post-traductionnel de l'activité d'Ero1 constitue non seulement un exemple élégant de régulation de l'activité d'une protéine par oxydation des résidus cystéines, mais aussi un système de contrôle homéostatique de la formation correcte des ponts disulfures grâce à boucle de régulation négative de l'activité d'Ero1 (Sevier et al., 2007).

3. Le rôle du FAD dans la régénération de la forme oxydée active des flavine oxydases

L'activité d'oxydation des flavines oxydases provoque la réduction de leur centre CXXC. Elles nécessitent alors des équivalents oxydants pour la régénération de leur forme oxydée. Cette régénération est réalisée par transfert de deux électrons (sous forme de protons) du motif CXXC réduit sur le groupement FAD situé à proximité. Le FADH₂ formé transmet ensuite ces protons à l'O₂. Ces réactions aboutissent à la régénération du site actif CXXC sous une forme oxydée et à la production d'H₂O₂ (voir schéma 15). La production d'H₂O₂ qui témoigne de l'activité catalytique des flavines oxydases est observée *in vitro* avec Ero1 (Gross et al., 2006) et chez *C.elegans* dans des conditions où Ero1 est surexprimé (Harding et al., 2003). Ero1 et, par extension, les flavines oxydases sont donc potentiellement une source de stress oxydant, justifiant ainsi l'importance de réguler leur activité (voir paragraphe ci-dessus) afin de minimiser la production d'H₂O₂, pouvant conduire à un environnement trop oxydant, provoquant la formation de ponts disulfures aberrants.

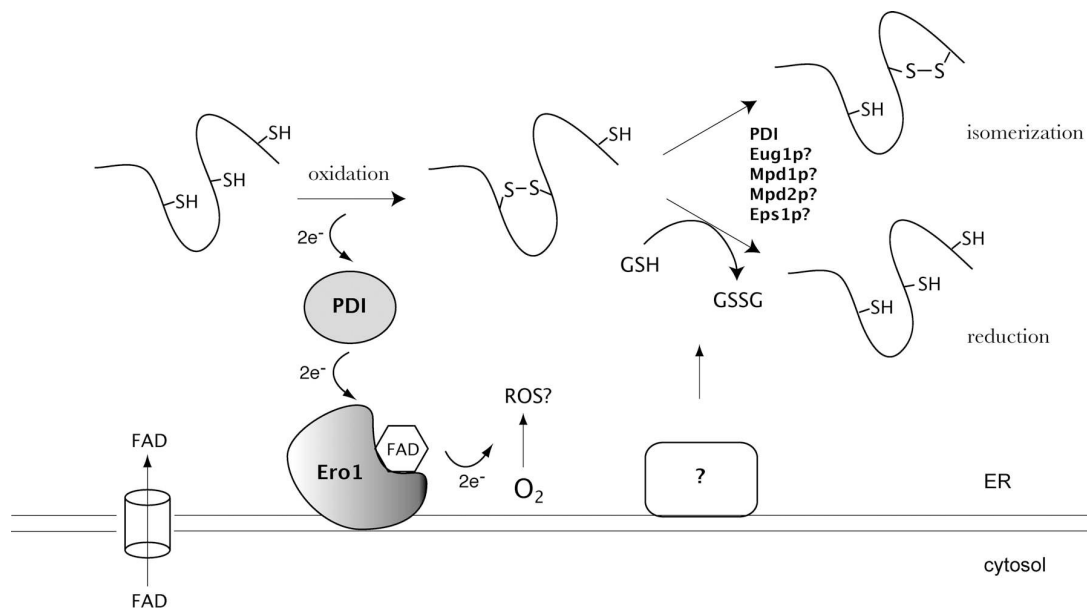


Schéma 15. Illustration du rôle du FAD dans la régénération d'Ero1.

La ré oxydation d'Ero1 par transfert des électrons de son groupement FAD sur l'O₂ permet de maintenir l'activité d'oxydase de Pdi1 afin de former les ponts disulfures dans les protéines sécrétées. Schéma tiré de la revue (Tu and Weissman, 2004).

Cependant, l'accepteur final des électrons n'est pas toujours l'O₂, que ce soit pour Ero1 ou les autres membres des flavines sulfhydryles oxydases. En effet, le groupement FAD de l'ALR transfère ses électrons 100 fois mieux au cytochrome c qu'à l'O₂ (Farrell and Thorpe, 2005). Ceci semble également être le cas pour Erv1 (Allen et al., 2005). De plus, contrairement à Erv2 (Sevier et al., 2001), le maintien de l'activité d'Ero1 en anaérobiose (Sevier et al., 2001) suggérerait soit que l'accepteur d'électrons d'Ero1 n'est pas l'O₂, soit qu'il existe un second accepteur d'électrons en anaérobiose. Le FAD pourrait éventuellement jouer ce rôle (Gross et al., 2006), d'autant plus que le FAD libre intracellulaire semble moduler l'activité d'Ero1 (Tu et al., 2000), (Tu and Weissman, 2002).

4. Bases moléculaire de la spécificité des substrats des flavines oxydases

La présence de deux enzymes d'activité similaire dans le RE, à savoir Ero1 et Erv2, pourrait être expliquée par leur différence de spécificité vis-à-vis de leurs substrats respectifs. Le motif di-thiol localisé dans le domaine non-structuré et flexible des flavines oxydases semble déterminer leur spécificité d'interaction avec leurs substrats. Cette région peptidique mobile permet en fait non seulement le transfert des équivalents oxydant du centre catalytique aux substrats, mais aussi de restreindre l'accès des substrats au site catalytique, afin d'empêcher des réactions d'oxydations non spécifiques. Cette hypothèse a été confirmée par des analyses de l'effet de la mutation du motif di-thiol d'Ero1 (Sevier and Kaiser, 2006) et d'Erv2 (Vala et al., 2005) (Vitu et al., 2006). Notons qu'un mécanisme similaire semble exister pour les Trr et Glr des eucaryotes supérieurs (pour revue voir (Williams et al., 2000)): le motif di-thiol mobile des Trr restreint l'accès au site actif aux petites molécules comme le GSSG, afin de réduire préférentiellement des thiorédoxines, et inversement, le motif di-thiol des Glr doit permettre de sélectionner préférentiellement le GSSG (pour revue voir (Williams et al., 2000)).

B. Les protéines relais des flavines oxydases

Les flavines oxydases Erv1 et Ero1/Erv2 oxydent leur substrats par l'intermédiaire de protéines «relais» Mia40 et Pdi1, respectivement.

1. Mia40 la protéine relais d'Erv1

Mia40 «Mitochondrial intermembrane space Import and Assembly» est une protéine localisée dans l'EIM, hautement conservée chez les eucaryotes et indispensable à la vie chez *S.cerevisiae* (Chacinska et al., 2004), (Naoe et al., 2004). Mia40 est synthétisée dans le cytoplasme sous forme d'un précurseur immature, puis transportée dans l'EIM grâce à une séquence N-terminale d'adressage à la mitochondrie. Chez l'homme, la drosophile et *C.elegans*, Mia40 est ensuite libérée sous une forme soluble dans l'EIM, tandis que chez la levure, Mia40 reste ancrée à la membrane interne mitochondriale. Cependant, l'invalidation de la séquence d'ancrage N-terminale chez *S.cerevisiae* ne semble altérer ni l'activité, ni la localisation de Mia40 (Naoe et al., 2004).

Mia40 possède 3 paires de résidus cystéines très conservées constituant un motif N-terminal CXC et un double motif C-terminal CX₉C. Ce double motif est également présent dans Cox17 ((Arnesano et al., 2005)), un chaperon responsable de l'insertion du cuivre dans la cytochrome c oxydase. Ces résidus sont majoritairement sous forme de pont disulfure (Mesecke et al., 2005), mais sont aussi capables de coordonner le zinc et le cuivre (Terziyska et al., 2005), indiquant une activité potentielle de métallo-chaperon. Les résidus cystéines de Mia40 sont d'une part indispensables à son activité catalytique d'oxydase (Naoe et al., 2004) et à la stabilisation de la structure de la protéine (Hofmann et al., 2005) vraisemblablement par des liaisons disulfure ou une coordination des métaux. Après avoir inséré des disulfure ou des cofacteurs métalliques dans les petites protéines pour leur import mitochondrial, Mia40 est à nouveau oxydée par Erv1 (voir schéma 16) (Mesecke et al., 2005), (Rissler et al., 2005).

2. Pdi1 la protéine relais d'Ero1

Les PDI «Protéine Disulfure Isomérase» sont essentiellement des protéines solubles localisées dans la lumière du RE grâce à une séquence peptidique HDEL signalant leur rétention. Ces protéines appartiennent à la superfamille des thiorédoxines, dont nous avons parlé précédemment (voir paragraphe II.A). Les PDI sont capables de catalyser *in vitro* l'oxydation de nombreux substrats d'où son nom de disulfure transférase ou disulfure isomérase. Le potentiel redox élevé (-180 mV) des PDI (Aslund et al., 1997) en fait l'une des oxydases les plus efficaces de la

superfamille des thiorédoxines et leur concentration de l'ordre du millimolaire, l'une des protéines les plus abondantes du RE (pour revue voir (Wilkinson and Gilbert, 2004)).

a. La Pdi1

La Pdi1 de *S.cerevisiae* est une protéine indispensable à la vie cellulaire (Tachibana and Stevens, 1992). Chez la levure et les mammifères, la Pdi1 est organisée en 4 domaines: 2 domaines catalytiques de type «a» contenant chacun un motif CXXC localisé dans une structure «thioredoxin fold» ($\beta\alpha\beta\text{-}\alpha\text{-}\beta\beta\alpha$), et deux domaines non catalytiques de type «b» ne comportant pas de motif CXXC mais présentant une structure «thioredoxin fold» (pour revue voir (Gruber et al., 2006)).

Les PDI catalysent des réactions d'oxydation, de réduction et d'isomérisation. L'activité préférentielle de la Pdi1 *in vivo* est encore controversée, malgré une étude suggérant qu'elle agit essentiellement en tant que thiol-oxydase (Solovyov et al., 2004). Comme nous l'avons vu auparavant, les caractéristiques de pKa et de localisation structurale des résidus cystéines du motif CXXC vont déterminer l'activité préférentielle de réductase ou d'oxydase des PDI (voir paragraphe II.B.2.a). Par exemple, Pdi1 est majoritairement présente sous une forme oxydée (Fränd and Kaiser, 1999), indiquant son rôle préférentiel d'oxydase. Nous verrons ultérieurement que notre étude nous a permis de confirmer cette donnée (voir partie résultats).

L'activité d'oxydase de la Pdi1 aboutit à l'oxydation de ses substrats sous forme de ponts disulfures et à la réduction de la Pdi1. Pdi1 a alors deux «choix». Le premier est d'être ré-oxydée par Ero1 (Fränd and Kaiser, 1999) (Tu et al., 2000). Dans ce cas, la Pdi1 est semblable à une navette transportant les ponts disulfures générés par Ero1 membranaire, vers la lumière du RE pour les introduire dans les protéines solubles de la voie de sécrétion (voir schéma 15). Le second est d'isomériser les ponts disulfures aberrants en catalysant la réduction des ponts disulfures puis la reformation de nouveaux, afin d'assurer une structure tridimensionnelle thermodynamiquement stable (pour revue voir (Wilkinson and Gilbert, 2004)). Pdi1 catalyse donc des réactions de réduction et d'oxydation itératives s'arrêtant lorsque le substrat acquiert une forme suffisamment stable pour résister à la réduction par la Pdi1.

La Pdi1 a également un rôle de chaperon indépendant de son activité redox, consistant à empêcher l'agrégation des protéines par interaction non covalente (revue (Wilkinson and Gilbert, 2004)).

b. Les homologues de la Pdi1 dans le RE

Il existe 4 homologues de la Pdi1 chez la levure *S.cerevisiae*: Mpd1, Mpd2, Eps1, Eug1 (voir schéma 15), qui contrairement à Pdi1, ne sont pas essentiels (Norgaard et al., 2001). Cependant, la surexpression de l'un de ces 4 homologues restaure le phénotype sauvage de la souche $\Delta pdi1$, indiquant un certain degré de redondance fonctionnelle entre les différentes PDI. Ces homologues pourraient assister Pdi1 dans l'isomérisation des protéines (Xiao et al., 2004). D'après son interaction avec Ero1, Mpd2 pourrait aussi avoir une activité d'oxydase, semblable à la Pdi1 (Frand and Kaiser, 1999). Ero1 semble sélectionner les substrats qu'il oxyde (Pdi1 et Mpd2), ce qui permettrait par exemple aux autres PDI d'agir en tant que réductases et non pas qu'oxydases.

C. Le relais disulfure Erv1/Mia40 de l'EIM

Erv1 est impliqué dans deux fonctions mitochondriales distinctes: l'import des protéines dans l'EIM en collaboration avec l'oxydase Mia40 (Mesecke et al., 2005), (Rissler et al., 2005), et l'export de la mitochondrie des centres Fer/S, pour la maturation des protéines cytoplasmiques à centres Fe/S (Lange et al., 2001). Ces deux fonctions cellulaires pourraient être liées à une même fonction moléculaire d'Erv1.

1. Le relais redox Erv1-Mia40 pour l'import des protéines dans l'EIM (schéma 16)

La majorité des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire, synthétisées dans le cytosol, puis importées dans la mitochondrie selon différents mécanismes (pour revue voir (Herrmann and Hell, 2005)). Ces protéines sont toutes transférées du cytoplasme à l'EIM à travers le canal TOM (Translocase Outer Membrane). La plupart des protéines mitochondriales possèdent une pré-séquence N-terminale de localisation permettant leur reconnaissance par des récepteurs en surface de la mitochondrie et la translocation à travers le canal TOM. Ces protéines sont ensuite dirigées en fonction d'autres signaux d'adressage soit à

travers le pore TIM 23 (Translocase Inner Membrane) pour être transférées dans la matrice mitochondriale, soit à travers le pore TIM 22 pour être insérées dans la membrane interne mitochondriale.

Contrairement à ces deux dernières catégories de protéines, la plupart des protéines de l'EIM ne possèdent pas de pré-séquence N-terminale, et sont importées selon un mécanisme ne nécessitant ni ATP, ni potentiel membranaire, soulevant ainsi la question de leur adressage à la mitochondrie. Parmi celles-ci, une des sous-classes à laquelle nous nous sommes intéressés, les protéines de classe 2 (revue (Herrmann and Hell, 2005)), possèdent trois caractéristiques: outre l'absence de pré-séquence N-terminale, elles ont une faible masse moléculaire (6-10 kDa), et possèdent des résidus cystéines conservés capables de lier des métaux ou de former des ponts disulfures. Cox17 et le Cytochrome C1, des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale sont des protéines cette classe. Les protéines de cette classe comprennent aussi les petites protéines Tim, qui permettent la translocation des protéines du canal TOM à TIM 22, en protégeant leur domaine peptidique hydrophobe de l'environnement hydrophile de l'EIM pour leur insertion ultérieure dans la membrane interne mitochondriale (Koehler, 2004). Afin d'assurer cette fonction, les petites Tim s'associent entre elles, à savoir Tim 9 avec Tim 10 et Tim 8 avec Tim 13. Sod1 et Erv1 appartiennent aussi à cette classe malgré leur plus grande taille (Mesecke et al., 2005), (Terziyska et al., 2007). Récemment d'autres protéines de poids moléculaire supérieur à 10kDa ont été identifiées comme substrats de la voie Erv1/Mia40 (Gabriel et al., 2007). La voie Erv1-Mia40 constitue le système d'import de ces protéines dans l'IMS (pour revue voir (Tokatlidis, 2005)).

Les protéines de classe 2 ne peuvent diffuser à travers le pore TOM que sous leur forme d'apoprotéine réduite, ce qui permet le dépliement de la chaîne polypeptidique et facilite le passage à travers le pore. Après translocation dans l'EIM, ces protéines interagissent avec les protéines Erv1/Mia40, capables d'insérer des ponts disulfures ou des cofacteurs métalliques sur les résidus cystéines. La formation des ponts disulfures est catalysée par une cascade de réactions d'échange di-thiol/disulfure, permettant de transférer successivement les équivalents oxydants générés par Erv1, *via* le FAD, sur Mia40, puis sur ses substrats respectifs (voir schéma 16).

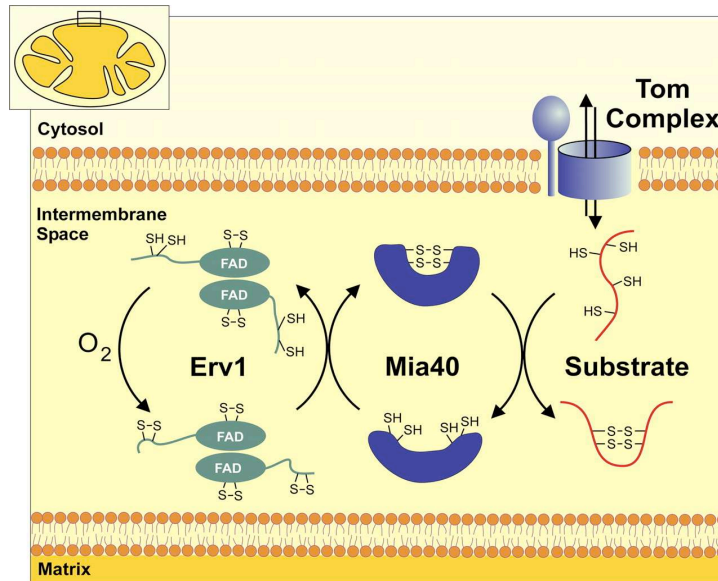


Schéma 16. Modèle du mécanisme d'import des protéines de classe 2 par le relais disulfure Erv1/Mia40.

Après leur import dans l'EIM, certaines protéines de classe 2 sont prises en charge par la voie Erv1/Mia40, qui catalyse l'insertion de disulfures et/ou de cofacteurs métalliques sur leurs paires de cystéines. Cette maturation provoque la rétention des protéines dans l'EIM, un phénomène appelé «folding trap». Schéma tiré de la revue (Herrmann and Kohl, 2007).

Ce mécanisme de maturation appelé «folding trap» permet aux protéines d'acquérir une structure tridimensionnelle native, qui les empêche de ressortir de l'EIM (pour revue voir (Herrmann and Kohl, 2007)). L'export des protéines de l'EIM vers le cytoplasme n'a jamais été démontré dans des conditions physiologiques. Néanmoins, la biogénèse des centres Fe/S fait nécessairement appel à un mécanisme d'export de la mitochondrie vers le cytoplasme (voir paragraphe III.B.2.e).

2. Le rôle d'Erv1 dans le métabolisme des centres Fe/S (schéma 12)

Les données de génétique indiquent que la maturation des protéines cytoplasmiques à centres Fe/S nécessite l'export d'un facteur encore inconnu, provenant de la machinerie d'assemblage de centres Fe/S mitochondriale, vers le cytoplasme, à travers le transporteur Atm1, une protéine de structure de type ATP-cassette de la membrane interne mitochondriale (pour revue voir (Lill et al., 2006). Cet export nécessite aussi du GSH (Sipos et al., 2002), Grx3 et/ou Grx4 (voir schéma 12), et Erv1 (Lange et al., 2001). Aucune donnée mécanistique ne relie pour

l'instant Erv1 à cette fonction. Cependant, étant donné son rôle dans l'import et la maturation des petites protéines Tim, elles-mêmes nécessaires à l'insertion de certaines protéines dans la membrane interne de la mitochondrie, on peut imaginer qu'un défaut d'Erv1 puisse provoquer un défaut d'import des composants indispensables à la maturation des centres Fe/S cytoplasmiques. Nous pourrions également supposer qu'Erv1 catalyse l'oxydation du composant exporté par Atm1, avant d'être transporté dans le cytoplasme. L'identification des protéines de l'EIM dont l'import dépend de la voie Erv1/Mia40 présente donc un grand intérêt dans la compréhension de la biosynthèse des centres Fe/S des protéines cytoplasmiques (voir partie résultats).

D. Similarités avec la voie Dsb du périplasma des bactéries

Chez la bactérie, la voie de formation des ponts disulfures la mieux caractérisée est celle des Dsb «Disulfide Bond Formation» du périplasma. Les protéines DsbA et DsbB catalysent la formation des ponts disulfure alors que les protéines DsbC et DsbD sont impliquées dans la réduction et l'isomérisation des disulfures (voir schéma 17) (pour revue voir (Messens and Collet, 2006)). Ero1/Erv2 peuvent donc être assimilés à DsbB (Sevier et al., 2005) et Pdi1 à DsbA et DsbC. Ainsi chez les eucaryotes la même protéine, PDI, a une fonction d'oxydase, de réductase et d'isomérase alors que chez la bactérie ces fonctions sont dissociées entre l'oxydase DsbA et la réductase DsbC. DsbB situé dans la membrane périplasmique ré-oxyde DsbA à partir d'équivalents oxydants provenant de la quinone de la chaîne respiratoire bactérienne, qui les transmet alors aux cytochromes puis à l'O₂ (Kobayashi et al., 1997) (Bader et al., 1999), (Bader et al., 2000). DsbD, également dans la membrane périplasmique, réduit DsbC avec des électrons fournis par la thiorédoxine cytoplasmique (Rietsch et al., 1997), (Collet et al., 2002). Le mécanisme de transfert des électrons à travers la membrane périplasmique, à savoir de la thiorédoxine sur la DsbD, n'est pas clairement défini. Le périplasma comme le RE est donc un compartiment dans lequel deux systèmes catalysant des réactions opposées coexistent, à savoir la réduction/isomérisation et l'oxydation. L'absence de réactions croisées entre ces deux voies est principalement expliquée par deux facteurs. Le premier est la différence entre les structures tertiaires et quaternaires de DsbA et DsbC (Bader et al., 2001), imposant des

interactions spécifiques avec des substrats différents: DsbA interagit préférentiellement avec des substrats réduits et non conformés et DsbC avec des substrats oxydés et mal conformés. Le mécanisme de reconnaissance des substrats de la Pdi1 qui possède les fonctions d'oxydase, de réductase et d'isomérase reste donc à expliquer. Le second facteur est du à la présence des deux protéines membranaires, l'oxydase DsbB et de la réductase DsbD, qui agissent respectivement en amont de DsbA et DsbC afin d'assurer le cheminement des électrons vers ces derniers et de maintenir leur activité catalytique.

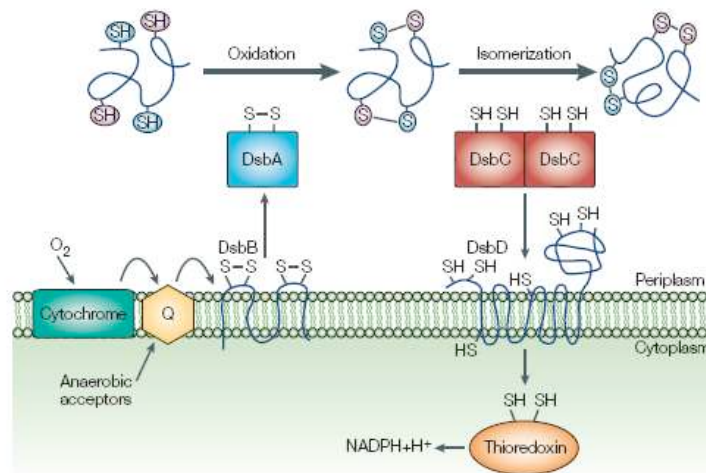


Schéma 17. Mécanisme de formation des ponts disulfure dans le périplasm de *E.coli*.

Les équivalents oxydants fournis par l'O₂ sont successivement transférés aux substrats périplasmiques par l'intermédiaires des échanges di-thiol/disulfure, catalysés par DsbA/DsbB. Le réarrangement des ponts disulfures est assuré par DsbC/DsbD grâce aux équivalents réducteurs fournis par la thiorédoxine cytoplasmique. Schéma tiré de la revue (Sevier and Kaiser, 2002).

Il est intéressant de noter que le périplasm des bactéries est équivalent à l'EIM des eucaryotes, d'après la théorie de l'endosymbiose. Erv1 peut donc être assimilé à la protéine DsbB et Mia40 à DsbA.

V. Les méthodes d'identification des protéines oxydées

A. Pourquoi développer des méthodes d'identification des protéines oxydées?

Les IRO peuvent modifier les protéines au niveau de différents acides aminés, par hydroxylation des résidus phénylalanine, tryptophane, tyrosine et arginine, carbonylation des acides aminés aliphatiques (arginine, thréonine, proline et lysine), ou oxydation des acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) (pour revue voir (Toledano et al., 2003)). Ces modifications peuvent provoquer une agrégation ou une fragmentation des protéines. Parmi toutes ces modifications, l'oxydation du groupement thiol des résidus cystéines revêt une double importance. De par sa réversibilité, l'oxydation du résidu cystéine est importante dans de nombreuses réactions redox au cœur de processus enzymatiques et dans la signalisation cellulaire. Cependant, de part sa toxicité, l'oxydation du résidu cystéine représente aussi un stigmate des dommages induits par les IRO. L'identification des protéines oxydées est donc importante. Ainsi, depuis quelques années, nous observons l'émergence et le développement de différentes méthodes de détection des résidus cystéine modifiés par oxydation. Nous allons maintenant passer en revue ces méthodes.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux méthodes d'identification des protéines contenant des thiols réactifs capables de s'oxyder sous forme de ponts disulfures ou d'acide sulfénique (pour revue voir (Eaton, 2006)). Nous présenterons également quelques méthodes permettant d'identifier les protéines cibles des Trx et Grx (pour revue voir (Stroher and Dietz, 2006)). D'autres méthodes, que nous ne détaillerons pas, permettent d'estimer l'état redox global de la cellule à l'aide de sondes fluorescentes, dont l'intensité d'émission varie proportionnellement à l'état d'oxydation de la cellule (Ostergaard et al., 2004).

B. Les méthodes globales d'identification des protéines oxydées

1. La détection et l'identification des protéines sous forme de disulfure par les électrophorèses diagonales

Cette méthode consiste à séparer les protéines sur un gel SDS-PAGE par deux migrations électrophorétiques successives, réalisées dans des conditions réductrices ou non. Pour cela, les protéines sont déposées sur un premier gel SDS-PAGE en l'absence de réducteurs afin de préserver les protéines oxydées. Après électrophorèse, une piste de ce gel est alors découpée puis déposée sur un second gel SDS-PAGE en présence d'agents réducteurs (voir schéma 18). Les protéines sont ensuite révélées par coloration. Cette méthode permet donc de distinguer trois catégories de protéines. La première concerne les protéines situées au dessus de la diagonale du gel. Ce profil de migration indique la présence de ponts disulfures intramoléculaires au sein des protéines. En effet, la formation d'un pont disulfure entre deux résidus cystéines structurellement éloignés provoque une compaction de la protéine qui migre alors plus rapidement en première dimension qu'en seconde. Inversement, la deuxième catégorie est constituée par les protéines situées au dessous de la diagonale du gel. Cette migration révèle la présence de ponts disulfures intermoléculaires entre les protéines. En effet, les protéines liées par un pont disulfure forment des complexes migrant plus lentement en première dimension qu'en seconde. Enfin, la troisième catégorie concerne les protéines formant la diagonale du gel. Leur migration indique l'absence de ponts disulfures. Les protéines d'intérêt peuvent ensuite être découpées dans le gel et identifiées par analyse en spectrométrie de masse. Cette méthode a par exemple permis d'identifier des protéines cytoplasmiques formant des ponts disulfures en présence ou non d'agents oxydants (Cumming et al., 2004), (Brennan et al., 2004).

Toutefois, cette méthode ne permet pas de distinguer les protéines glutathionylées (-Cys-S-S-G) ou les protéines ayant un pont disulfure intramoléculaire entre deux résidus cystéines structurellement proches ne provoquant pas de compaction de la protéine. De plus, cette méthode essentiellement qualitative ne permet pas de quantification de l'état redox des thiols.

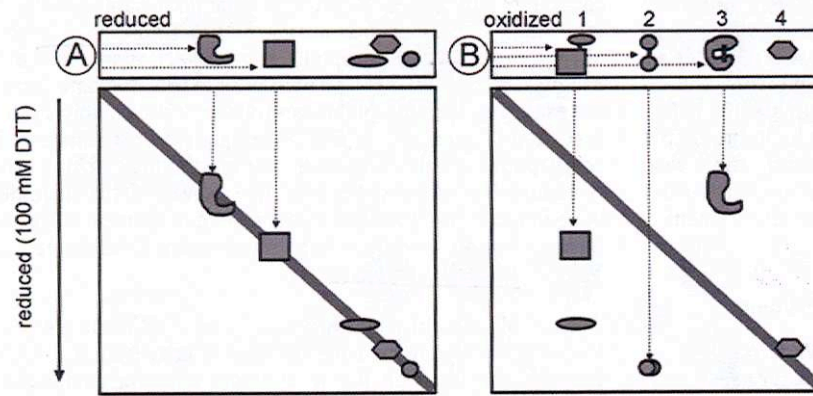


Schéma 18. Dessin explicatif du principe des gels diagonaux.

A et B représentent la première migration électrophorétique dans des conditions non réductrices. La seconde migration électrophorétique est ensuite réalisée dans des conditions réductrices. Schéma tiré de la revue (Stroher and Dietz, 2006).

2. La détection et l'identification des protéines glutathionylées

Le GSH est un tripeptide synthétisé par deux réactions enzymatiques successives (voir paragraphe III.A.2.a). Par conséquent, l'incubation des cellules en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique et de cystéine S^{35} ne conduit qu'au marquage du GSH. Les cellules peuvent ensuite être exposées à différents agents oxydants induisant potentiellement une glutathionylation des protéines. Les protéines radiomarquées ou non sont ensuite extraites, soumises à une électrophorèse bidimensionnelle en conditions non réductrices et révélées par coloration et autoradiographie. La découpe des spots d'intérêt dans le gel permet ensuite l'identification des protéines par analyse en spectrométrie de masse. Cette méthode a notamment permis d'identifier de nombreuses protéines formant un pont disulfure intermoléculaire avec le GSH en présence ou non d'agents oxydants (Shenton and Grant, 2003), (Fratelli et al., 2002).

De façon similaire, l'incubation des cellules en présence de glutathion oxydé couplé à une molécule de biotine (Biot-GS-SG-Biot) permet de détecter les protéines capables de réaliser une réaction d'échange di-thiol/disulfure avec le Biot-GS-SG-Biot (Brennan et al., 2006). Les protéines ayant réagi avec cette molécule sont donc glutathionylées et biotinylées. Ces protéines peuvent ensuite être soit détectées après un western blot par chimiluminescence avec un anticorps streptavidine lié à

une peroxydase, soit purifiées par affinité avec la streptavidine sépharose permettant l'identification ultérieure des protéines glutathionylées.

Cette méthode ne permet d'analyser que les protéines capables d'être glutathionylées, et ne nous renseigne pas sur l'état redox de la totalité des thiols cellulaires.

3. La détection et l'identification de toutes les formes oxydées

Nous avons choisi d'utiliser cette méthode globale pour notre analyse de l'état d'oxydation des protéines. Nous détaillerons donc cette technique plus précisément dans la partie «résultats», toutefois nous allons en résumer les principales étapes. Cette méthode est essentiellement basée sur le marquage sélectif des groupements thiols oxydés des protéines. Pour cela, la première étape consiste à bloquer les résidus cystéines libres par un agent alkylant des thiols indétectable afin d'empêcher une modification ultérieure de leur état redox. Les résidus cystéines oxydés sont ensuite réduits pour être ultérieurement marqués par un réactif des thiols détectables, tel qu'un agent alkylant couplé soit à une molécule fluorescente ou radioactive, soit à une molécule de biotine, afin de quantifier et/ou d'identifier respectivement les protéines oxydées. Les protéines marquées peuvent ensuite être soumises à une électrophorèse diagonale, mono- ou bidimensionnelle puis identifiées après coloration par spectrométrie de masse. En fonction de l'agent réducteur utilisé cette méthode nous permet soit de détecter tous les thiols oxydés, soit un sous ensemble spécifique des thiols oxydés.

a. Détection d'un ensemble spécifique de thiols oxydés

La réduction des thiols oxydés avec de l'acide ascorbique permet d'identifier les protéines nitrosylées (-S-NO) (Jaffrey et al., 2001). L'arsenite permet quant à lui de réduire les acides sulféniques (Saurin et al., 2004). Après la réduction spécifique des thiols oxydés, les protéines sont marquées par des molécules biotinylées comme la Biotine-maléimide (Saurin et al., 2004) ou la Biotine-HPDP (Jaffrey and Snyder, 2001) (Jaffrey et al., 2001), permettant leur purification et leur identification ultérieure.

b. Détection de l'ensemble des thiols oxydés

L'utilisation de réducteurs à large spectre comme le DTT et le β -mercaptoéthanol nous permet de détecter les cystéines engagées dans un pont disulfure, qu'il soit intra- ou intermoléculaire, ou liées avec une molécule de glutathion, ou existant sous la forme d'un acide sulfénique (voir paragraphe I.B). Les thiols oxydés ainsi libérés sont alors accessibles pour être marqués par différents réactifs. Par exemple, nous avons utilisé dans notre étude un agent alkylant radiomarqué le NEM C¹⁴ (Le Moan et al., 2006) tandis que Leichert et Jakob ont préféré l'IAM C¹⁴ (Leichert and Jakob, 2004). D'autres auteurs ont utilisé l'iodoacétamidofluorescéine (IAF) une molécule fluorescente couplée à l'IAM (Baty et al., 2005) (Minard et al., 2007). La Biotine-HPDP (Le Moan et al., 2006) ou la Biotine-cystéine (Eaton et al., 2002) sont également utilisés pour marquer les thiols oxydés afin de purifier et d'identifier ultérieurement les protéines oxydées.

c. Limites de ces méthodes globales

Ces méthodes ne différencient évidemment pas les ponts disulfures intra- et intermoléculaires. Elles sont généralement restreintes aux protéines abondantes, un problème que nous évoquerons dans la partie «résultats». De plus, nous verrons que les marqueurs des thiols ne sont pas toujours spécifiques des résidus cystéines (voir résultats). Néanmoins, ces méthodes d'analyse permettent de quantifier la variation de l'état d'oxydation des thiols dans différentes conditions expérimentales (Leichert and Jakob, 2004), (Le Moan et al., 2006).

C. Les méthodes d'identification des cibles des thiol-transférases

Des approches ont été développées afin d'identifier les substrats des thiol-transférases, thiorédoxines et glutarédoxines. Deux principales stratégies sont utilisées pour atteindre cet objectif:

1. Par réduction des extraits de protéines avec une thiorédoxine ou glutarédoxine

La réduction des extraits de protéines par une glutarédoxine (Lind et al., 2002) ou par une thiorédoxine (Yano et al., 2001), (Maeda et al., 2004) permet d'identifier les cibles spécifiques de ces thiol-transférases. Les thiols des protéines ainsi rendus accessibles peuvent ensuite être marqués par des molécules fluorescentes comme le monobromobimane (Yano et al., 2001) ou le maléimide-Cy5 (Maeda et al., 2004). Les protéines sont alors soumises à une électrophorèse puis colorées pour être ultérieurement identifiées par spectrométrie de masse.

Cette méthode permet de déterminer *in vitro* les cibles des thiols-transférases, ce qui ne signifie pas que ces interactions ont lieu *in vivo*.

2. Par utilisation de versions modifiées des thiorédoxines et glutarédoxines

L'identification des cibles des Trx et Grx est basée sur la réactivité différentielle entre leur cystéine catalytique et leur cystéine résolutive (voir paragraphe II.A), au cours de l'échange di-thiol/disulfure avec leurs substrats (voir paragraphe I.B). D'après ce mécanisme catalytique, la mutation de la seconde cystéine résolutive du site actif des Trx/Grx empêche la résolution du pont disulfure intermoléculaire, formé avec leurs substrats, en intramoléculaire. La version mutée des Trx/Grx permet donc de les stabiliser en interaction avec leurs substrats. Les Trx/Grx mutées sont ensuite couplées à une colonne d'affinité, afin de purifier ultérieurement leurs cibles. L'élution des protéines en interaction avec les Trx/Grx est ensuite réalisée par réduction du pont disulfure intermoléculaire (voir schéma 19) (Verdoucq et al., 1999), (Balmer et al., 2003) (Rouhier et al., 2005). Cette méthode de purification capture spécifiquement les partenaires des Trx/Grx, indépendamment de leur abondance, ce qui permet d'identifier des cibles même faiblement exprimées.

Une autre méthode consiste à purifier les cibles des thiol-transférases uniquement par immuno-affinité, ceci grâce à une version étiquetée de Trx/Grx. Par exemple, l'expression chez *E.coli* de la thiorédoxine fusionnée à une étiquette TAP (Tandem Affinity Purification) composée d'un motif protéine A et d'un peptide calmoduline permet de purifier ses partenaires par deux étapes successives (Kumar et al., 2004). Cette méthode de purification séquentielle permet de réduire les

interactions non spécifiques. Néanmoins, les protéines purifiées par cette méthode ne sont pas forcément en interaction redox avec la thiorédoxine.

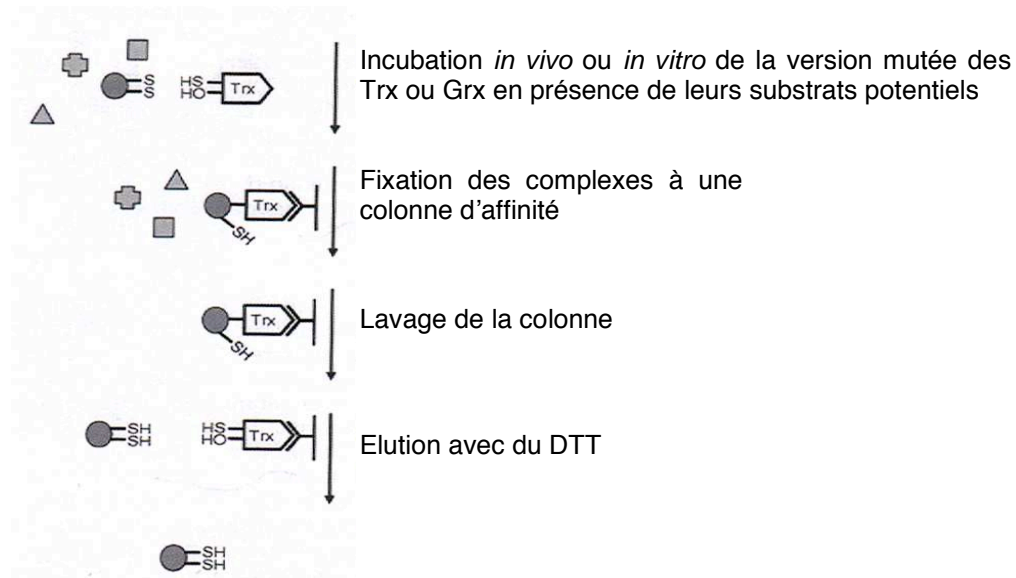


Schéma 19. Dessin explicatif de la méthode de purification des partenaires des thiorédoxines.

La mutation de la cystéine résolvative du site actif des Trx/Grx permet de les stabiliser en interaction avec leurs partenaires. Schéma tiré de la revue (Stroher and Dietz, 2006).

D.L'émergence de nouvelles méthodes de quantifications de l'état redox des thiols

Nous avons remarqué le développement récent d'une nouvelle méthode de protéomique permettant de quantifier précisément les protéines oxydées. Cette méthode est appelée 2D-DIGE pour «Two dimensional difference gel electrophoresis» (pour revue voir (Marouga et al., 2005)). En effet, la production et la commercialisation de différents marqueurs fluorescents des thiols ayant des longueurs d'onde d'émission distinctes ont contribué à l'apparition de cette méthode. Ces marqueurs permettent le double ou le triple marquage des échantillons de protéines. Par exemple, les protéines réduites peuvent être marquées avec un agent fluorescent, les protéines oxydées avec un second agent fluorescent de longueur d'onde d'émission différente, et enfin le marquage des résidus lysines avec un dernier agent fluorescent permet de contrôler la quantité de protéines totales, ceci pouvant être réalisé dans deux conditions expérimentales différentes. Les protéines marquées subissent ensuite une électrophorèse bidimensionnelle et sont révélées par fluorimétrie, qui permet la mesure des signaux fluorescents émis par les

cystéines et les lysines marquées. Cette méthode permet donc de quantifier précisément la variation de l'état redox des thiols, entre deux conditions expérimentales différentes. Cette technique a par exemple été appliquée à l'analyse de la variation de l'oxydation des résidus cystéines en présence d'agents oxydants (Chan et al., 2005) ou à l'étude de l'état d'oxydation des thiols mitochondriaux en réponse à différents agents oxydants (Hurd et al., 2007).

Remarque

Ces méthodes d'analyse globale apparues il y a de cela quelques années sont en constante évolution afin de remédier à leur inconvénient majeur, à savoir leur restriction aux protéines abondantes. L'amélioration de la spécificité de détection des marqueurs des thiols et l'augmentation de l'abondance des protéines faiblement exprimées nous permettra d'identifier de nouvelles protéines régulées de façon redox.

VI. Présentation du projet de thèse

Au cours de cette introduction, nous avons pu voir que de nombreux processus biologiques fondamentaux reposent sur l'oxydation de certains résidus cystéines. Mon projet de thèse a consisté à mettre en place des méthodes d'analyse globale de l'état d'oxydation des protéines chez *S.cerevisiae*, afin d'identifier de nouvelles protéines régulées de façon redox et d'étudier la contribution de la voie des thiorédoxines et du GSH dans le contrôle de l'état redox des thiols. Néanmoins, avant de procéder à ces études, il a tout d'abord fallu s'assurer que ces méthodes nous permettaient de détecter et d'identifier uniquement des protéines contenant des résidus cystéines oxydés. Nous allons donc introduire ce travail par la mise en place expérimentale des différentes techniques d'identification et de quantification des thiols oxydés à l'échelle du protéome. Nous présenterons ensuite les résultats issus de notre étude sur la variation de l'état redox des thiols dans différentes conditions physiologiques ou de stress oxydant.

Au cours de ce travail, nous avons identifié une protéine cytoplasmique oxydée constitutivement: la superoxyde dismutase Sod1. Cette protéine est également localisée dans l'EIM, dans lequel la voie Erv1/Mia40 oxyde les protéines importées dans ce compartiment, de façon similaire à la voie Ero1/Pdi1 du réticulum endoplasmique. Le mécanisme d'oxydation de Sod1 étant peu connu *in vivo* et difficilement concevable dans un environnement cytoplasmique, nous avons supposé que le relais disulfure Erv1/Mia40 intervient dans l'oxydation de Sod1. Nous présenterons tout d'abord ce travail par la mise en place des outils génétiques et moléculaires indispensables à l'étude de la contribution de la voie Erv1/Mia40 dans l'oxydation de Sod1, avant d'exposer nos résultats préliminaires.

Résultats

I. Résultats et discussion 1: étude de l'état redox du résidu cystéine

L'objectif principal de ce travail a été de développer une technique permettant d'identifier spécifiquement les protéines contenant des résidus cystéines oxydés. La capacité à distinguer spécifiquement une protéine oxydée dans l'ensemble du protéome de la levure étant techniquement difficile, nous avons tout d'abord réalisé des contrôles expérimentaux indispensables à la mise en place et à la validation des différentes méthodes. Une fois cet objectif atteint, ces approches protéomiques très puissantes nous ont permis d'identifier de nombreuses protéines oxydées, d'analyser la variation de l'oxydation de certaines de ces protéines en anaérobie et en présence d'agents oxydants et d'étudier la contribution des voies des thiorédoxines et du glutathion dans le contrôle de l'état redox des thiols.

A. Les techniques de marquage des thiols oxydés

Le développement de méthodes d'identification et de quantification des thiols oxydés à l'échelle du protéome nécessite de tenir compte d'un certain nombre de paramètres théoriques et expérimentaux visant à neutraliser la réactivité chimique des résidus cystéines avant de marquer spécifiquement ces résidus.

1. Aspects théoriques et expérimentaux

a. Aspects théoriques de la réactivité des résidus cystéines

Les cystéines sont des acides aminés contenant un groupement thiol (-SH) potentiellement très réactif, lié à la présence de son atome de soufre. Cette caractéristique chimique confère à la cystéine la capacité: (i) de participer à des réactions d'oxydoréduction (pour revue voir (Jacob et al., 2003)), (ii) de coordonner différents métaux (pour revue voir (Giles et al., 2003b)), (iii) de réagir ou d'être modifiée par des agents électrophiles (voir introduction I.B). Cette réactivité peut entraîner une modification non spécifique de l'état redox des cystéines au cours de l'expérience, rendant impossible l'évaluation de leur état d'oxydation *in vivo*. En effet, au moment de la lyse cellulaire, les résidus cystéines normalement présents dans le

cytoplasme, considéré comme un environnement réducteur, sont soudainement exposés à l'oxygène ambiant (O_2) et susceptibles de s'oxyder. Inversement, durant l'extraction des protéines, les systèmes de réductases des thiols peuvent réduire certains résidus cystéines, existant à l'état oxydé *in vivo*. L'étude de l'oxydation des thiols *in vivo* impose donc d'atténuer la réactivité intrinsèque des thiols.

La réactivité des résidus cystéines est régie par la valeur de leur pKa

Le résidu cystéine n'est pas toujours réactif (voir introduction I.A) (pour revue voir (Gilbert, 1990)). En effet, cet acide aminé ne participe aux réactions d'oxydoréduction que lorsqu'il est présent sous sa forme déprotonée de thiolate ($-S^-$). L'état de protonation du thiol dépend du pH du milieu et du pKa du résidu cystéine. Lorsque le pH de la solution est inférieur au pKa de la cystéine, le groupement thiol est sous sa forme protonée, et inversement, le thiol est sous une forme déprotonée lorsque le pH est supérieur au pKa. Le pKa d'une cystéine libre est de 8,3, ce qui ne permet pas l'existence de la forme déprotonée dans des conditions de pH physiologique (pH 6,5-7). Cependant, cette valeur peut varier de 4 à 10 en fonction de l'environnement en acides aminés. Ainsi, la présence d'acides aminés basiques à proximité de la cystéine au sein d'une protéine stabilise la forme thiolate de ce résidu et diminue la valeur de son pKa (voir introduction II.B.2.a).

b. Contrôle de la réactivité des résidus cystéines par abaissement du pH

Afin d'atténuer la réactivité des résidus cystéines, nous avons établi un protocole de récolte et de lyse des cellules à pH très acide ($pH < 1$), utilisant l'acide trichloroacétique (TCA). Le TCA est ajouté au milieu de culture pour arrêter les réactions d'oxydoréduction. Les cellules sont ensuite lysées en présence de TCA, et les protéines sont ainsi précipitées. Dans ces conditions, tous les résidus cystéines sont en principe sous leur forme protonée non-réactive, ne permettant ni l'oxydation des thiols réduits, ni la réduction des thiols oxydés. Le contrôle de la réactivité des thiols à pH acide est une étape essentielle et commune à toutes les méthodes d'analyse de l'état redox des résidus cystéines que nous avons utilisées (pour revue voir (Le Moan N., 2007)) (voir schéma 20). La solubilisation ultérieure des protéines ainsi précipitées n'est pas toujours totale et certaines peuvent malheureusement être perdues.

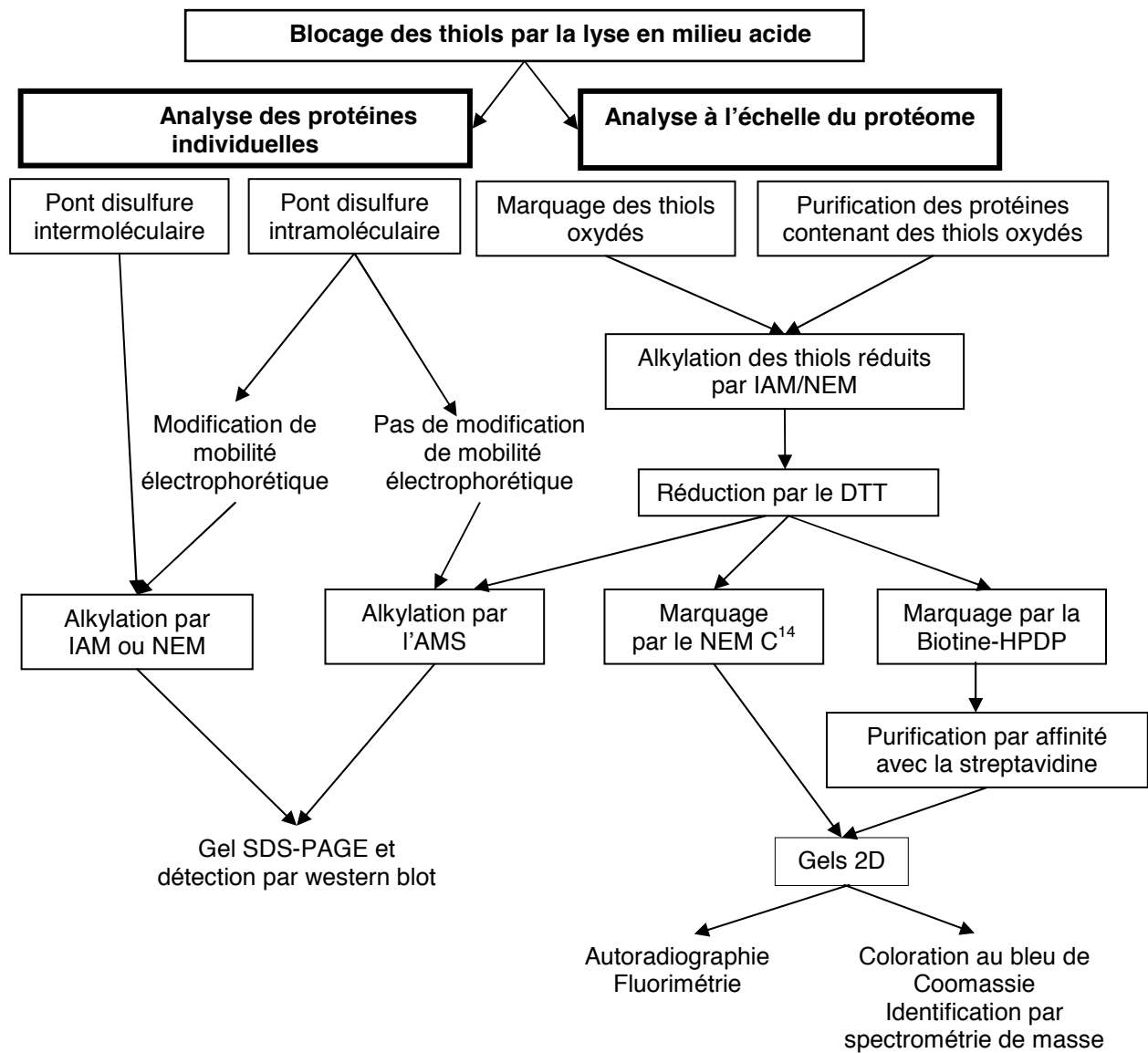


Schéma 20. Présentation des différentes méthodes utilisées dans cette étude pour analyser l'état redox des thiols ou pour purifier les protéines oxydées.

Schéma tiré de la revue (Le Moan N., 2007)

c. Description générale de la méthode de marquage des thiols oxydés

Il s'agit d'une méthode de marquage différentiel des thiols réduits et oxydés (voir schéma 20). Après avoir abrogé la protonation des résidus cystéines en milieu acide, les thiols existant à l'état réduit *in vivo* sont bloqués de façon covalente et irréversible par alkylation par l'iodoacétamide (IAM) ou le N-éthylmaléimide (NEM). Les thiols oxydés (non alkylés) sont alors marqués spécifiquement, après leur réduction par le dithiothréitol (DTT). Cette méthode détecte donc tous les thiols

oxydés réductibles par le DTT, c'est-à-dire les cystéines engagées dans un pont disulfure, qu'il soit intra- ou intermoléculaire, liées à une molécule de glutathion (formes glutathionylées, S-thiolation), ou existant sous la forme d'un acide sulfénique (voir introduction I.B). Au cours de la description de notre travail, nous emploierons le terme de marquage des «thiols oxydés» faisant référence aux «thiols réductibles».

Le NEM et l'IAM sont tous deux des alkylants des thiols, mais la spécificité de l'IAM pour les thiols semble supérieure à celle du NEM, sans être absolue, d'après notre expérience. Ces réactifs forment également des adduits avec d'autres acides aminés, tels que la lysine et l'arginine, produisant, comme nous le verrons plus loin, un marquage non spécifique dont il est difficile de s'affranchir (voir figures 3 et 4). Par ailleurs, la liaison de l'un ou l'autre de ces réactifs, aux thiols réduits, se fait sur la forme thiolate, c'est-à-dire dans des conditions alcalines, afin de déprotoner les thiols, et dénaturantes, afin d'accéder à la totalité des thiols libres. La valeur du pH détermine aussi la cinétique de réaction du NEM (Shaw et al., 2003). Cette réaction est 1000 fois plus rapide avec les thiols qu'avec les amines à pH=7, et diminue à pH > 7. Pour un pH > 8, il se produit une hydrolyse du groupement maléimide du NEM, ce qui réduit son efficacité. La réactivité du NEM et de l'IAM est également affectée par la température. Nous verrons ultérieurement qu'en modulant les paramètres pH et température, nous avons optimisé la spécificité de marquage des thiols par ces agents alkylants (voir figure 9).

Nous avons utilisé différents marqueurs des thiols dérivés du NEM. Le NEM radioactif marqué par le carbone¹⁴ (NEM C¹⁴) est détecté par autoradiographie. Il existe également des NEM fluorescents, NEM-680 et NEM-780, détectés par fluorimétrie. L'AMS (acide 4-acétamido-4'-maleimidylstilbène-2,2'-disulfonique, sel de disodium) est aussi un dérivé du NEM (0,2 kDa) sur lequel est greffé une molécule d'un poids moléculaire de 0,3 kDa. Le marquage des thiols par l'AMS provoque une modification du poids moléculaire de la protéine, proportionnel au nombre de thiols libres fixés par l'AMS, ce qui engendre sur un gel SDS-PAGE une différence de migration électrophorétique entre la forme oxydée et réduite d'une protéine. Cette méthode de marquage nécessite de disposer d'un anticorps dirigé contre la protéine ou sa version étiquetée, pour déterminer par western blot le nombre et l'état d'oxydation des résidus cystéines, en fonction du poids moléculaire apparent de la protéine. Nous avons également utilisé la Biotine-HPDP (N-(6-(Biotininamido)Hexyl)-

3'-(2'-Pyridylthio) Propionamide). Cette molécule permet, par sa moitié HPDP, la formation d'un pont disulfure avec les groupements thiolates (voir schéma 21), et par sa moitié biotine, la purification ultérieure des protéines ainsi marquées.

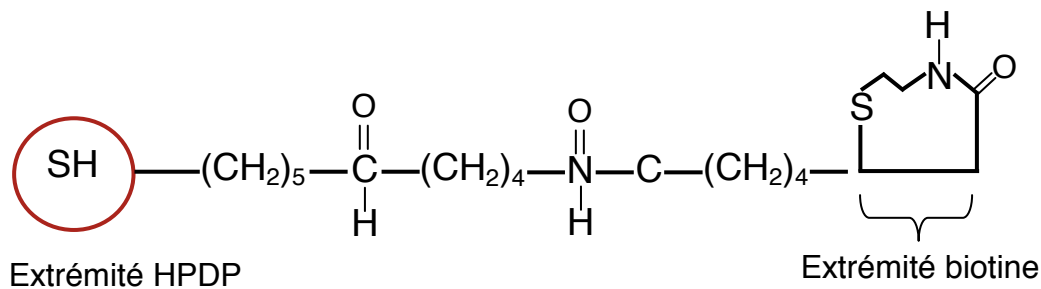


Schéma 21. Structure moléculaire de la Biotine-HPDP.

L'extrémité HPDP permet de former une liaison disulfure avec un groupement thiol libre et l'extrémité biotine permet la purification Schéma tiré de la publication (Le Moan et al., 2006)

d. Importance d'un marquage saturant des thiols

En toute rigueur, il faut bloquer la totalité des thiols réduits afin d'éviter de les marquer ultérieurement, et il faut également marquer la totalité des thiols oxydés afin de pouvoir quantifier l'état redox des protéines. Il est donc fondamental d'adapter la quantité d'agent alkylant au nombre de résidus cystéines présents dans un lysat cellulaire. Nous avons estimé le nombre de cystéines d'un lysat de la façon suivante: le poids moléculaire moyen d'un acide aminé est de 110 Da, ce qui équivaut à 110 g/mole. Ainsi, 100 μg d'un extrait de protéines contiennent (100 $\mu\text{g}/110 \text{ g/mole}$) $\sim 1.10^{-6}$ moles d'acides aminés. La proportion moyenne des cystéines étant estimée à 2,47% des acides aminés (Shaw et al., 2003), il existe donc $(2,47.10^{-2} \times 1.10^{-6}) \sim 25$ nanomoles de cystéines dans 100 μg de protéines. Nous avons établi expérimentalement la concentration de NEM ou d'IAM à 50 mM pour le blocage initial des thiols réduits (voir figure 3). Cette concentration permet d'obtenir un rapport molaire alkylant / résidu cystéine d'environ 200, un excès permettant théoriquement de saturer largement la totalité des thiols.

2. Etude de l'état d'oxydation des résidus cystéines de deux protéines modèles

Nous avons d'abord vérifié que le marquage différentiel des thiols oxydés par l'AMS était réalisable sur une protéine dont l'état d'oxydation était connu *in vivo*. Puis, nous avons testé le marquage par le NEM C¹⁴ sur une protéine purifiée et oxydée *in vitro*, dans l'idée d'appliquer cette méthode à l'échelle protéomique.

a. Mesure *in vivo* de l'état redox de la thiorédoxine de levure par l'AMS

La thiorédoxine est une thiol-transférase possédant deux résidus cystéines catalytiques. La première étape du cycle catalytique est un échange di-thiol/disulfure avec le substrat oxydé conduisant à l'oxydation de la thiorédoxine (cys-S-S-cys) et à la réduction du substrat (voir introduction III.A.1a et schéma 7). La seconde étape est la régénération de la forme réduite de la thiorédoxine (-SH) par la thiorédoxine réductase 1 (Trr1) (voir introduction III.A.1b et schéma 8). Les thiorédoxines sont donc sous forme réduite dans le cytoplasme d'une cellule sauvage car la Trr1 assure de façon continue leur réduction (figure 1, supérieure). Par contre, elles s'accumulent sous leur forme oxydée lorsqu'on invalide le gène TRR1 ($\Delta trr1$) et que l'on traite les cellules au peroxyde d'hydrogène (figure 1, inférieure). Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'AMS confère un incrément de masse de 0,5 kDa par résidu cystéine alkylé, c'est-à-dire réduit. Les 2 cystéines de la forme réduite de la thiorédoxine sont donc alkylées par deux molécules d'AMS, ce qui provoque un retard de migration de 1 kDa en gel SDS-PAGE non réduit. Inversement, les thiols des thiorédoxines engagés dans un pont disulfure seront inaccessibles à l'AMS. La possibilité de distinguer une forme oxydée, d'une forme réduite des thiorédoxines va donc nous permettre de tester notre méthode de marquage différentiel des thiols.

Analyse de l'état redox des thiols de la Trx2 par l'AMS (figure 1)

La souche sauvage et la souche invalidée pour le gène TRR1 sont transformées par un plasmide porteur de la Trx2 étiquetée par la Protéine A. La souche $\Delta trr1$ est traitée par le peroxyde d'hydrogène, alors que la souche sauvage ne l'est pas. Les protéines sont extraites et solubilisées selon la légende de la figure 1. Elles sont ensuite déposées sur un gel SDS-PAGE non réduit et révélées par western blot avec un anticorps dirigé contre l'étiquette de la thiorédoxine. Dans la

souche sauvage (figure 1, gel du haut), les 2 thiols de la Trx2 sont réduits. Leur alkylation par l'AMS provoque donc un retard de migration de la protéine de 1kDa (piste 2), non observé dans le contrôle IAM (piste 1). Une migration identique est observée lorsque les thiols sont réduits par le DTT avant l'alkylation par l'AMS (piste 3). Par contre, l'addition d'IAM avant la réduction et l'alkylation des thiols libres par l'AMS empêche la liaison de ce dernier et élimine le retard de migration de la Trx2 (pistes 4 et 5). La concentration d'IAM utilisée (50 mM) est donc suffisante pour le blocage des thiols libres de la Trx2. Dans la $\Delta trr1$ (figure 1, gel du bas), les thiols de la Trx2 sont oxydés, inaccessibles à l'alkylation par l'IAM et l'AMS (pistes 1, 2 et 5). Si la Trx2 est réduite par le DTT avant l'addition d'AMS, on observe le retard de migration de 1 kDa (pistes 3 et 4). La concentration d'AMS utilisée permet donc d'alkyler la totalité des thiols oxydés de la Trx2 après leur réduction.

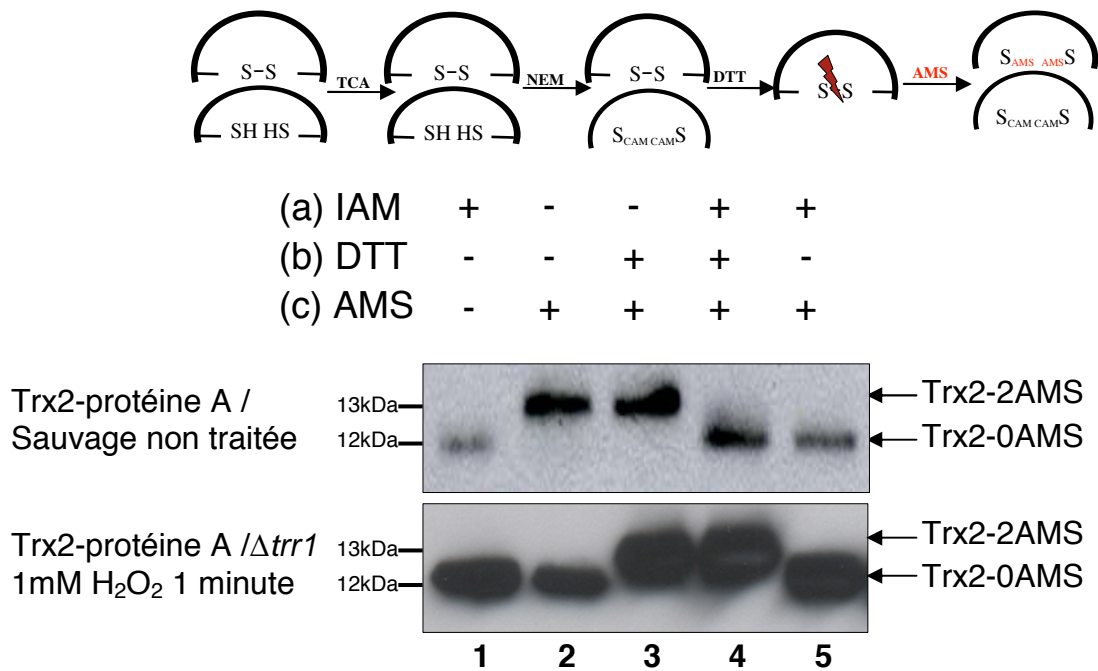


Figure 1. Evaluation de l'état redox de la Thiorédoxine 2 (Trx2) par marquage des thiols par l'AMS.

Des cellules sauvage ou invalidées pour le gène TRR1 sont transformées par un plasmide exprimant Trx2-protéineA, cultivées dans 10 ml de milieu jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,4-0,6 puis traitées ($\Delta trr1$) ou non (sauvage) avec 1mM de peroxyde d'hydrogène pendant 1 minute. Les protéines sont ensuite extraites en milieu acide et successivement solubilisées en tampon dénaturant TES (Tris 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%) contenant 50 mM d'IAM, 20 mM DTT et 15 mM AMS, lorsque ceux-ci sont indiqués. Les protéines sont alors déposées en l'absence de réducteurs sur un gel SDS-PAGE et révélées après un western blot par l'anticorps anti-protéineA dirigé contre l'étiquette de la Trx2.

b. Mesure de l'état redox *in vitro* de la peroxydase Tsa1 par le NEM C¹⁴

Nous avons ensuite testé le marquage des thiols oxydés de la peroxydase Tsa1 par le NEM C¹⁴ avant d'appliquer cette méthode à l'échelle du protéome. Tsa1 est une peroxydase catalysant la réduction des peroxydes grâce aux électrons provenant des thiorédoxines et du NADPH (voir introduction III.A.1 et schéma 3). Son centre catalytique comprend deux cystéines, l'une catalytique et l'autre résolutive. Après réduction des peroxydes, deux monomères de Tsa1 forment un pont disulfure intermoléculaire. Cependant, le substrat peut suroxyder la cystéine catalytique de Tsa1 sous forme d'un acide sulfinique (-SO₂H). Cette forme suroxydée n'est pas réduite par le DTT (Biteau et al., 2003).

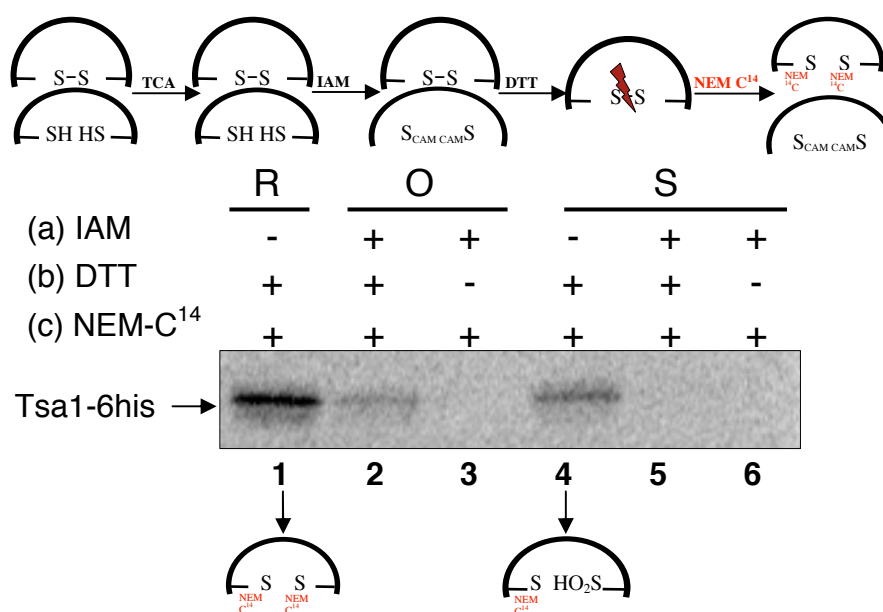


Figure 2. Evaluation de l'état redox de Tsa1 par marquage des thiols par le NEM C¹⁴.

La purification de Tsa1-6his et l'obtention des formes réduites, oxydées et suroxydées *in vitro* sont décrites dans la partie «Méthodes». 3 µg de Tsa1 sont ensuite successivement solubilisés dans le tampon dénaturant TES contenant 1,5 mM d'IAM, 0,6 mM de DTT et 4 µM de NEM C¹⁴, lorsque ceux-ci sont indiqués. Tsa1 est ensuite déposée sur un gel SDS-PAGE en l'absence de réducteurs puis révélée par autoradiographie avec le Phosphorimager. Les lettres R, O et S signifient respectivement Réduit, Oxydé et Suroxydé.

Marquage des différentes formes oxydées de Tsa1 par le NEM C¹⁴ (figure 2)

Nous avons produit *in vitro* les différentes formes redox de Tsa1-6his purifiée, (réduite, oxydée sous forme de pont disulfure intermoléculaire et suroxydée) et marqué ces formes par le NEM C¹⁴ (figure 2 et légende). Les protéines marquées ont ensuite été déposées sur un gel SDS-PAGE non réduit et révélées par autoradiographie.

Sur la protéine réduite, lorsque la première étape de blocage des thiols libres par l'IAM est omise, les deux cystéines de Tsa1 sont marquées par le NEM C¹⁴ (piste 1). Par contre, sur la protéine suroxydée, seule la cystéine résolutive est marquée par le NEM C¹⁴, conduisant à une diminution du signal de 50% (piste 4). Lorsque l'IAM bloque les thiols libres en première étape, le marquage par le NEM C¹⁴ de la forme suroxydée de Tsa1 disparaît complètement (piste 5). En présence d'IAM, le marquage de la forme oxydée persiste mais le signal est inférieur à celui observé pour la forme réduite (piste 2). Ceci signifie qu'une partie des thiols de la forme oxydée de Tsa1 sont bloqués par l'IAM avant d'être marqués par le NEM C¹⁴, indiquant ainsi que tous les thiols ne sont pas sous forme de pont disulfure intermoléculaire. La méthode de marquage différentiel des thiols par le NEM C¹⁴ ne détecte donc que la forme oxydée de Tsa1. Enfin, aucun signal n'est détecté lorsque les thiols oxydés ne sont pas réduits avant d'être marqués par le NEM C¹⁴ (pistes 3 et 6), prouvant ainsi l'absence de fixation non spécifique du NEM C¹⁴.

Conclusion

La méthode d'analyse par western blot (figure 1) est tout à fait satisfaisante, mais ne peut s'appliquer à l'étude simultanée de plusieurs protéines. La substitution de l'AMS par le NEM C¹⁴ nous a permis de marquer spécifiquement les thiols d'une autre protéine modèle (figure 2). Ces premières données expérimentales témoignent du bon déroulement de la méthode de marquage différentiel des thiols oxydés et nous permet ainsi d'accéder à l'analyse des résidus cystéines oxydés à l'échelle du protéome.

3. Etude de l'état d'oxydation des résidus cystéines à l'échelle du protéome

Grâce aux différents marqueurs que nous possédons (NEM C¹⁴, NEM fluorescents, biotine-HPDP) et suite à nos expériences préliminaires sur protéine isolée, nous nous sommes attachés à la détection des thiols oxydés à l'échelle du protéome de *S.cerevisiae*.

a. Marquage des thiols oxydés et totaux par le NEM C¹⁴

i. Marquage des thiols oxydés d'un extrait de protéines (figures 3 et 4)

Les protéines d'une souche sauvage en phase de croissance exponentielle sont extraites selon la méthode de lyse en milieu acide. Elles sont ensuite solubilisées successivement dans un tampon dénaturant contenant de l'IAM et/ou du NEM, du DTT puis du NEM C¹⁴ lorsque ceux-ci sont indiqués (figure 3a, b, c, d). L'électrophorèse monodimensionnelle (figure 3) se fait en présence de SDS, tandis que l'urée est présente dans le tampon de solubilisation pour l'électrophorèse bidimensionnelle (figure 4). Les protéines sont soumises à une migration dans des conditions non réductrices et révélées par autoradiographie.

Le marquage des thiols oxydés par le NEM C¹⁴ (figure 3, piste 1) est important, suggérant la présence de nombreuses protéines oxydées dans une cellule au repos. Ce signal correspond réellement à des protéines oxydées *in vivo* car lorsque les thiols oxydés ne sont pas réduits par le DTT avant d'être marqués par le NEM C¹⁴ (piste 2), le signal radioactif diminue drastiquement, sans disparaître complètement. Ce marquage résiduel peut être attribué au blocage incomplet des thiols libres par l'IAM lors de la première étape du marquage. Nous avons donc augmenté la concentration en agents alkylants, sans succès (données non illustrées). Ce marquage résiduel peut alors résulter d'une fixation non spécifique du NEM C¹⁴, qui n'était pourtant pas visualisée sur la protéine Tsa1 dans les mêmes conditions expérimentales (figure 2). Afin d'atténuer ce signal non spécifique, nous avons donc testé l'efficacité de blocage relative de différents agents alkylants envers les thiols libres en neutralisant ceux-ci par du NEM (pistes 3 et 4) ou par un mélange de NEM et d'IAM (pistes 5 et 6). Malgré cela, un marquage résiduel persiste en l'absence de réduction par le DTT (pistes 4 et 6). Ce marquage non spécifique que

nous appellerons «bruit de fond» est donc probablement lié à la fixation non spécifique du NEM C¹⁴ sur d'autres acides aminés.

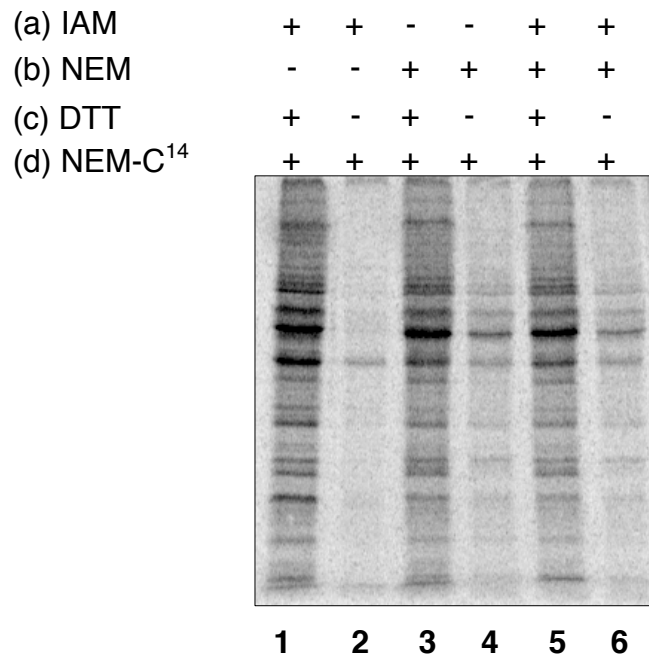


Figure 3. Evaluation de la spécificité de marquage des thiols oxydés par le NEM C¹⁴ en gel monodimensionnel.

Les protéines extraites en milieu acide à partir de 20 mL de culture d'une souche sauvage sont successivement solubilisées dans un tampon TES contenant 50 mM d'IAM et/ou de NEM, 20 mM de DTT et 0,13 mM de NEM C¹⁴ (0,5 μ ci) lorsque ceux-ci sont indiqués. Les protéines radiomarquées sont ensuite déposées en l'absence de réducteurs sur un gel SDS-PAGE et révélées par autoradiographie avec le Phosphorimager. Le marquage non spécifique des thiols oxydés est visualisé lorsque le DTT est omis (pistes 2, 4 et 6).

Afin de visualiser chaque protéine au sein de l'extrait (impossible en monodimensionnel puisque plusieurs protéines peuvent posséder un poids moléculaire identique), nous avons soumis les protéines marquées par le NEM C¹⁴ à une électrophorèse bidimensionnelle (2D) (figure 4). Les protéines ont été traitées de façon similaire aux extraits déposés dans les pistes 1 et 2 de la figure 3, en présence d'urée. Le profil 2D des protéines oxydées marquées est présenté dans la figure 4A. Lorsque l'étape de réduction des thiols oxydés par le DTT avant le marquage par le NEM C¹⁴ n'est pas effectuée (figure 4B), nous observons également un marquage non spécifique.

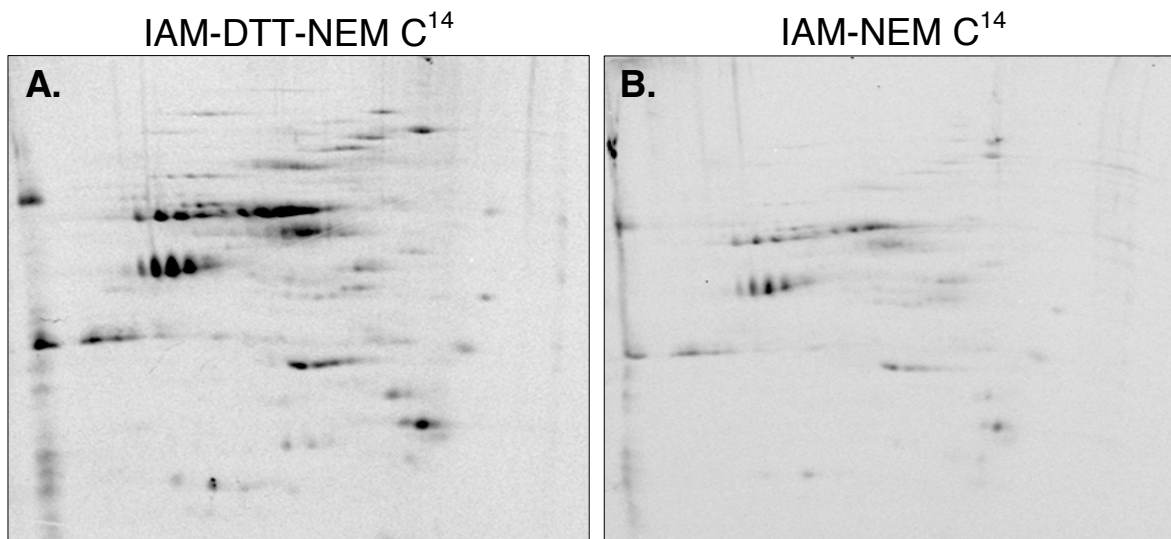


Figure 4. Evaluation de la spécificité de marquage des thiols oxydés par le NEM C¹⁴ en gel bidimensionnels.

Les protéines extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage sont successivement solubilisées dans un tampon dénaturant UCTE (8M Urée, 4% Chaps, 25 mM Tris-Cl pH 8,8, 10 mM EDTA) contenant 50 mM d'IAM, 20 mM de DTT (A) ou non (B) et 2 mM de NEM C¹⁴ (37,5 μ Ci). 100 μ g de protéines radiomarquées sont ensuite soumises à une électrophorèse bidimensionnelle en conditions non réductrices et révélées par autoradiographie avec le Phosphorimager.

ii. Marquage des thiols totaux (réduits et oxydés) (figure 5 et 6)

Afin de quantifier l'oxydation de chaque protéine, nous devons également marquer la totalité des thiols cellulaires par le NEM C¹⁴. La méthode de calcul que nous avons développé pour déterminer la proportion de protéine sous forme oxydée sera expliquée dans le paragraphe 5.a. Le marquage des thiols totaux par le NEM C¹⁴ s'effectue après un traitement initial au DTT des protéines extraites à partir d'une souche sauvage. Nous avons tout d'abord comparé le marquage des thiols totaux à celui des thiols oxydés en électrophorèse monodimensionnelle (figure 5).

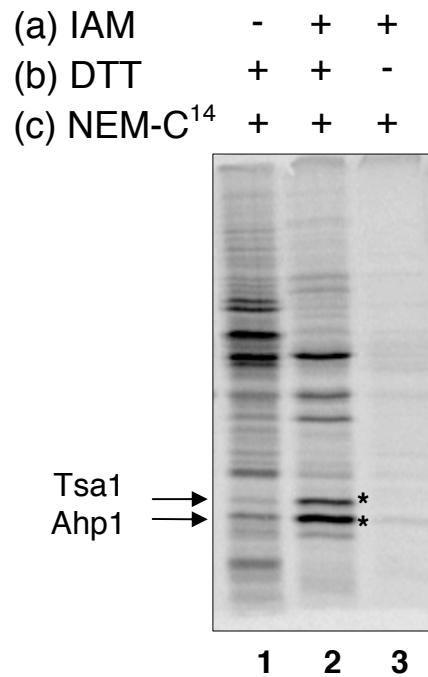


Figure 5. Evaluation de la saturation de la totalité des thiols par le NEM C¹⁴ par comparaison avec le marquage des thiols oxydés.

Les protéines extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage sont successivement solubilisées dans un tampon TES contenant 50 mM d'IAM, 20 mM de DTT et 0,13 mM de NEM C¹⁴ (0,5 μ ci) (voir NOTE¹) lorsque ceux-ci sont indiqués. Les protéines radiomarquées sont ensuite déposées en l'absence de réducteurs sur un gel SDS-PAGE et révélées par autoradiographie avec le Phosphorimager. La saturation des thiols réduits est contrôlée par omission de l'IAM (piste 1). Les étoiles indiquent l'emplacement de Tsa1 et d'Ahp1.

Le signal lié au marquage de la totalité des thiols d'une protéine par le NEM C¹⁴ (piste 1) est nécessairement supérieur, voir égal à celui des thiols oxydés (piste 2). Cependant, cette expérience montre que le marquage des thiols oxydés des peroxydases Tsa1 et Ahp1 (figure 5, flèches) est clairement plus élevé que celui des thiols totaux. Nous en concluons donc que la concentration de NEM C¹⁴ est insuffisante pour saturer la totalité des thiols. Dans cette expérience le rapport molaire NEM C¹⁴ / résidu cystéine est de $\sim 0,5$ indiquant l'insuffisance de NEM C¹⁴ devant le nombre de résidus cystéines libres que nous avons estimé (voir paragraphe A.1.d). Nous avons donc augmenté la quantité de NEM C¹⁴ afin de se placer dans des conditions où le rapport molaire NEM C¹⁴ / résidu cystéine est de ~ 18 (gel 2D, figure 6).

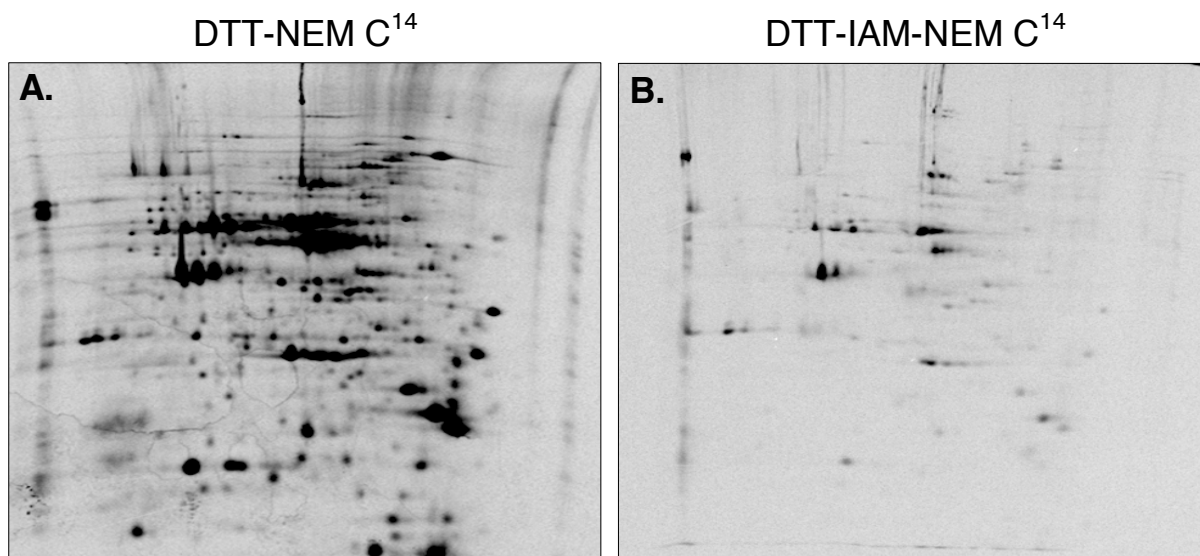


Figure 6. Evaluation de la saturation de la totalité des thiols par le NEM C¹⁴ par blocage préliminaire avec de l'IAM.

Les protéines extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage sont successivement solubilisées dans un tampon dénaturant UCTE contenant 20 mM de DTT, 2 mM d'IAM (B) ou non (A) et 2 mM (37,5 μ Ci) (voir NOTE¹) de NEM C¹⁴. 100 μ g de protéines radiomarquées sont ensuite soumises à une électrophorèse bidimensionnelle en condition non réductrices et révélées par autoradiographie avec le Phosphorimager.

Le marquage des thiols totaux par une quantité de NEM C¹⁴ plus importante est présenté en figure 6A. Comme contrôle de la saturation des thiols totaux (figure 6B), le marquage par le NEM C¹⁴ est précédé d'un blocage des thiols par l'IAM, de concentration équivalente à celle du NEM C¹⁴, définie par le rapport molaire ci-dessus. Nous observons que malgré le blocage par l'IAM, certaines protéines sont encore marquées par le NEM C¹⁴. Si nous remplaçons l'IAM par du NEM, ce marquage augmente encore pour des raisons inexplicables (données non illustrées). Ces résultats indiquent que la concentration en NEM C¹⁴ est encore potentiellement insuffisante pour marquer la totalité des thiols, ou qu'il existe bien un marquage non spécifique sur d'autres acides aminés, comme celui que nous avons déjà visualisé (figures 3 et 4). Afin de s'assurer du marquage complet des thiols totaux par le NEM C¹⁴, nous aurions du utiliser une concentration supérieure en NEM C¹⁴. Cependant, il faut savoir que l'utilisation d'une concentration de NEM C¹⁴ supérieure à 2 mM nous oblige à diluer de façon importante l'échantillon (plus de 15%) et ceci entraîne une diminution de la solubilisation des protéines. Néanmoins, la concentration de NEM C¹⁴, déterminée en fonction du rapport molaire NEM C¹⁴ / résidu cystéine de 18, doit garantir au mieux la saturation des thiols.

NOTE¹: les marquages des thiols par le NEM C¹⁴ ont été effectués à partir d'une solution de 250 $\mu\text{Ci/mL}$ (pour les expériences présentées en gel 1D) ou à partir d'une solution de 0,5 mCi/mL (pour les expériences présentées en gel 2D) ayant toutes les deux une activité spécifique de 37,5 mCi/mmoles.

iii. Limites de la méthode de marquage par le NEM C¹⁴

Le marquage des thiols (oxydés ou totaux) par le NEM C¹⁴ est accompagné d'un bruit de fond non spécifique également observé lorsque le marquage est réalisé avec l'IAM C¹⁴ (Leichert and Jakob, 2004) ou avec des agents alkylant fluorescents tels que l'IAM (Baty et al., 2002) et le NEM fluorescent (voir paragraphe suivant).

Cette méthode nécessite une étape de fixation des gels bidimensionnels, pouvant occasionner une perte de protéines, ainsi qu'une longue période d'exposition des gels (trois semaines) avant la détection du signal radioactif par autoradiographie. Nous nous sommes donc tournés récemment vers une nouvelle méthode de marquage différentiel des thiols pour tenter d'éviter les inconvénients expérimentaux liés au NEM C¹⁴.

b. Marquage des thiols oxydés et réduits par le NEM fluorescent

De nouveaux marqueurs fluorescents des thiols, très récemment commercialisés, présentent l'avantage d'être détectés immédiatement *in situ* (dans le gel). Nous avons utilisé deux de ces produits: le NEM-680 (rouge) et le NEM-780 (vert), qui émettent des signaux infrarouges à deux longueurs d'ondes distinctes, détectées par fluorimétrie sur l'appareil Odyssey[®]. Nous avons retenu le NEM-680 pour marquer les thiols réduits et le NEM-780 pour marquer les thiols oxydés (voir NOTE²). L'utilisation combinée de ces deux réactifs présente l'avantage de marquer simultanément les thiols réduits et oxydés au sein d'un même extrait de protéines.

Afin de garantir la saturation des thiols au cours du marquage différentiel par les alkylants fluorescents, nous avons dilué ces marqueurs d'un facteur $\sim x.10^3$ avec de l'IAM. Cette dilution permet surtout de diminuer le risque de fixation multiple du fluorophore sur les thiols d'une même protéine, qui se traduit par l'apparition de spots dédoublés en gel 2D (Chan et al., 2005). En effet, le NEM fluorescent provoque un retard de migration sur un gel SDS-PAGE d'environ 0,7 kDa par résidu cystéine fixé et modifie l'incrément de poids moléculaire d'une protéine en fonction du nombre de thiols marqués. Pour diluer ces marqueurs fluorescents, nous avons choisi l'IAM à la place du NEM, ce dernier produisant systématiquement et de façon énigmatique un

NOTE²: Notre choix à été déterminé par la possibilité de combiner le marquage des protéines oxydées par le NEM-780 (vert) à leur révélation par coloration au bleu de Coomassie qui émet un signal à 680 nanomètres (rouge). La superposition des deux signaux dans le gel (jaune) facilite le découpage du spot afin de réaliser une identification par spectrométrie de masse.

marquage non spécifique important (données non illustrées). Nous avons également défini la concentration optimale de NEM-680 et de NEM-780, utilisée pour marquer les thiols réduits et oxydés, à 0,1 mM, correspondant à un rapport molaire NEM fluorescent / résidu cystéine de 0,8. Différentes conditions expérimentales de marquage par le NEM fluorescent ont été testées sur un extrait de protéines issu d'une souche sauvage en phase de croissance exponentielle.

i. La concentration d'IAM (figure 7)

Afin de déterminer la concentration optimale d'IAM pour diluer le NEM fluorescent sans altérer son rôle de traceur, les protéines extraites sont solubilisées en tampon dénaturant contenant du NEM-680 et différentes concentrations d'IAM pour le marquage des thiols réduits (figure 7A). Pour le marquage des thiols oxydés, les protéines sont successivement reprises en tampon dénaturant contenant de l'IAM, du DTT et du NEM-780 en présence d'IAM (figure 7B). Après migration sur gel non réduit, les protéines sont visualisées par fluorimétrie à 680 ou 780 nanomètres. Lorsque le rapport molaire IAM / NEM fluorescent augmente, nous observons une diminution du signal fluorescent, émis par le NEM-680 (figure 7A) et le NEM-780 (figure 7B). Il existe deux façons d'expliquer cette diminution. Tout d'abord, la concentration de NEM fluorescent utilisée pour alkyler les thiols n'est pas totalement saturante et il se produit une diminution voir une extinction du marquage, lorsque l'IAM croissant sature les sites de fixation du NEM fluorescent. Avec le NEM-680, l'addition de 50 mM d'IAM, soit un rapport molaire IAM / NEM fluorescent de 500, ne provoque pas de diminution du signal fluorescent (figure 7A, pistes 1 et 2). L'augmentation de ce rapport à 5000 (figure 7A, piste 5) ne provoque pas d'extinction complète du signal fluorescent. Ceci est surprenant car, pour une quantité identique de protéines, un rapport molaire IAM / NEM C¹⁴ de 1 utilisé dans l'expérience de saturation des thiols libres (figure 6B) provoquait une diminution drastique du signal radioactif. Avec le NEM-780, nous observons de la même manière que l'augmentation du rapport molaire IAM / NEM fluorescent de 100 à 2000 provoque peu d'effet (figure 7B, pistes 1-3 et 5). L'absence d'extinction du signal à 680 et 780 nanomètres indique qu'il existe plus de (0,2 mL X 500 mM) (figure 7A)

100 μ moles de résidus cystéines libres et (0,2 mL X 200 mM) (figure 7B) 40 μ moles de cystéines oxydées, alors que 100 μ g d'extrait ne contiennent qu'1 μ mole d'acides aminés. Il est donc peu probable que la diminution du signal fluorescent ne soit due qu'à la sous saturation du NEM fluorescent. La seconde explication plus probable est que l'IAM et le NEM fluorescent possèdent une différence d'affinité envers les thiols, avec un avantage pour le NEM fluorescent, puisque l'IAM ne remplace le NEM fluorescent sur ses sites de fixation qu'à de très fortes concentrations.

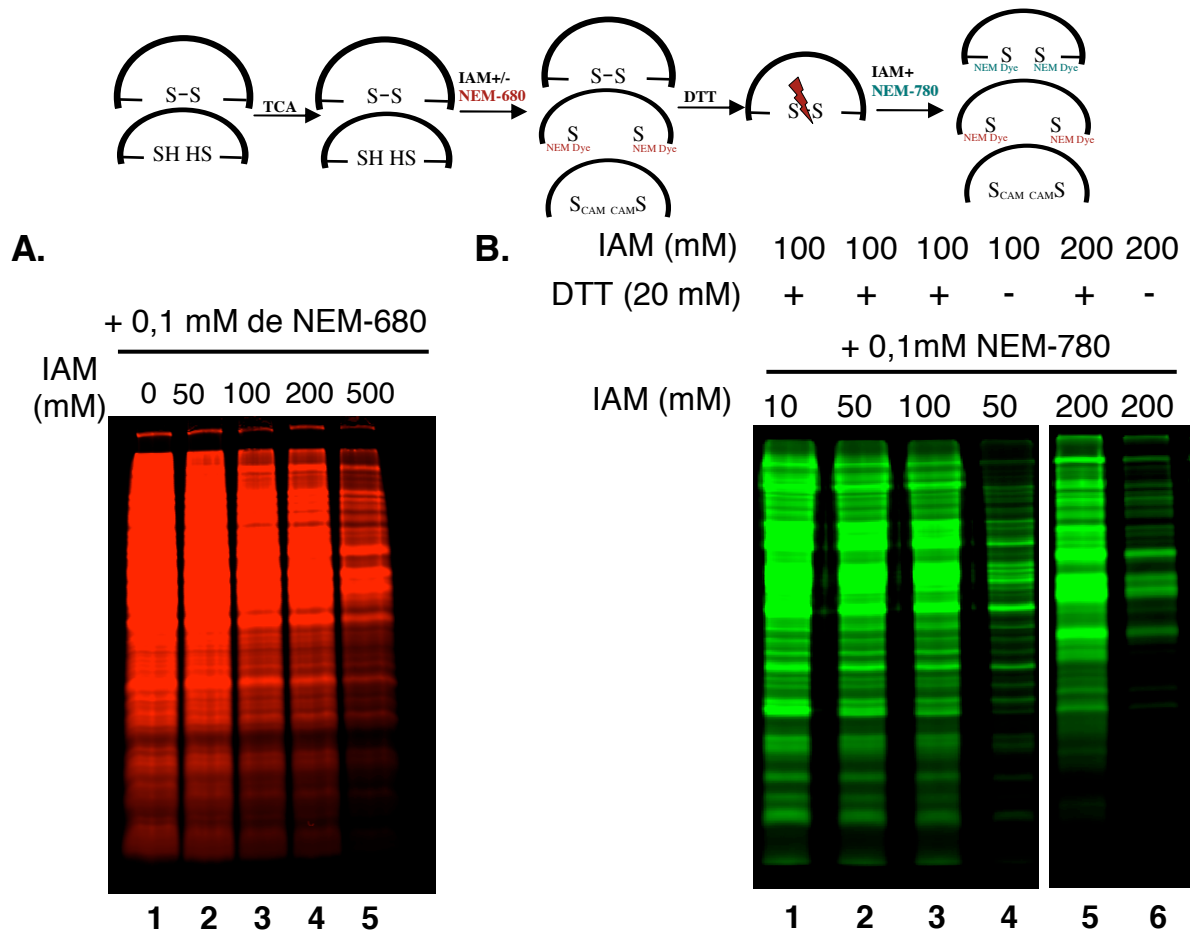


Figure 7. Recherche de la concentration optimale d'IAM pour diluer le NEM fluorescent.

Les protéines extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage sont successivement solubilisées dans un tampon dénaturant UCTE contenant soit 0,1 mM de NEM-680 en présence des concentrations d'IAM indiquées (A), soit 100 ou 200 mM d'IAM, 20 mM de DTT ou non et 0,1 mM de NEM-780 en présence des concentrations d'IAM indiquées (B). 1 μ g de protéines marquées est ensuite déposé en l'absence de réducteurs sur un gel SDS-PAGE et détecté par fluorimétrie avec l'Odyssey®.

Nous avons choisi une concentration optimale de 200 mM d'IAM pour diluer les deux fluorophores. Cette quantité permet de s'assurer de la saturation des thiols et d'obtenir un marquage sans compromettre la détection du signal fluorescent. Dans ces conditions, nous avons pu estimer la quantité de signal correspondant à un marquage non spécifique des thiols oxydés (figure 8). Les protéines d'une souche sauvage sont extraites en milieu acide et sont successivement solubilisées en présence de NEM-680 dans l'IAM, puis de DTT et enfin de NEM-780 dans l'IAM. Après migration sur un gel non réduit, les protéines sont détectées simultanément à 680 et 780 nanomètres (vert+rouge=jaune). Nous observons un signal jaune en l'absence de réduction des thiols oxydés par le DTT (piste 2), correspondant à un marquage non spécifique du NEM-780. Afin d'améliorer la spécificité de marquage des thiols oxydés par le NEM-780, nous avons modifié le pH et la température, susceptibles de moduler cette spécificité.

IAM (200 mM) + NEM-680
DTT (20 mM) + -
IAM (200 mM) + NEM-780

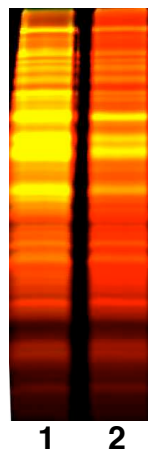


Figure 8. Evaluation du marquage non spécifique des thiols oxydés par superposition du marquage par le NEM fluorescent des thiols réduits et oxydés.

Les protéines extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage sont successivement solubilisées dans un tampon dénaturant UCTE contenant 200 mM d'IAM en présence de 0,1 mM de NEM-680, 20 mM de DTT ou non et 200 mM d'IAM en présence de 0,1 mM de NEM-780. 1 μ g de protéines marquées est ensuite déposé en l'absence de réducteurs sur un gel SDS-PAGE et détecté simultanément par fluorimétrie avec l'Odyssey® dans les deux longueurs d'onde d'émission du NEM fluorescent.

ii. Le pH et la température (figure9)

Le pH de la solution de marquage doit être ajusté afin de favoriser la fixation spécifique des thiols par le NEM fluorescent (pH 6 à 7) (voir paragraphe A.1.c) et de générer la forme déprotonée des thiols réagissant avec l'alkylant (pH 7 à 9) (voir paragraphe A.1.a). A pH 7,5, il se produit une diminution du signal non spécifique (figure 9A, pistes 2 et 6). Un abaissement de la température de 30°C à 4°C lors du marquage des thiols oxydés par le NEM-780 réduit également ce marquage non spécifique (figure 9B, pistes 4-7). L'ensemble de ces résultats nous a permis de mettre en place un protocole optimisé de marquage différentiel des thiols oxydés et réduits par le NEM fluorescent, celui-ci consiste en une première étape de blocage des thiols libres par le NEM-680 en présence de 200 mM d'IAM à pH9, à 30°C, suivi d'une étape de marquage des thiols oxydés par le NEM-780 en présence de 200 mM d'IAM à pH 7,5 et à 4°C, après leur réduction par le DTT.

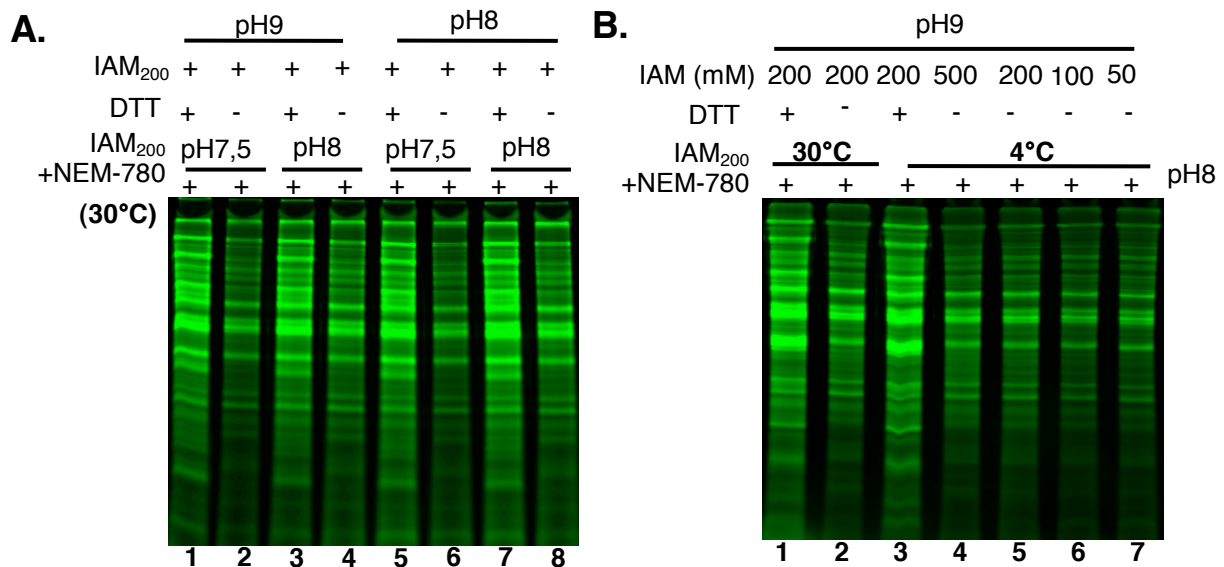


Figure 9. Recherche des conditions optimales de pH et de température pour le marquage des thiols oxydés par le NEM-780.

Les protéines extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage sont successivement solubilisées dans un tampon dénaturant UCTE contenant les concentrations d'IAM indiquées à pH 8 ou 9, 20 mM de DTT lorsque celui-ci est indiqué et 200 mM d'IAM en présence de 0,1 mM de NEM-780 à pH 7,5 ou 8 à 30°C (A), ou à pH 8 à 30°C ou à 4°C (B). 1 µg de protéines marquées est ensuite déposé en l'absence de réducteurs sur un gel SDS-PAGE et détecté par fluorimétrie avec l'Odyssey® à 780 nanomètres.

iii. Application de cette méthode de marquage sur la protéine Tsa1 purifiée (figure 10)

Comme nous l'avons fait avec le NEM C¹⁴, nous avons généré *in vitro* une forme réduite et une forme oxydée de la protéine purifiée Tsa1 (voir figure 2). Nous avons vérifié que le marquage successif des thiols réduits, par le NEM-680, et des thiols oxydés, par le NEM-780, des deux formes redox de Tsa1 produit un signal rouge pour la forme réduite et vert pour la forme oxydée, en se plaçant dans les conditions expérimentales définies ci-dessus. Nous observons effectivement que les signaux fluorescents détectés simultanément à 680 et 780 nanomètres par l'Odyssey[®] correspondent à un marquage rouge pour la forme réduite de Tsa1 et vert pour sa forme oxydée (figure 10). La formation d'un doublet de thiols oxydés après migration sur gel SDS-PAGE non réduit (figure 10, piste 2) peut être expliqué de deux façons différentes. Premièrement, les deux résidus cystéines oxydés de Tsa1 peuvent être marqués par une à deux molécules de NEM-780, entraînant un retard de migration sur gel d'environ 0,7 kDa par résidu cystéine fixé. Cependant ce doublet n'est pas observé après le marquage des thiols réduits (figure 10, piste 1), indiquant qu'une seule molécule de NEM-680 se lie à Tsa1. Cette différence de réactivité des deux marqueurs fluorescents envers les thiols d'une même protéine signifie potentiellement que le NEM-780 possède une affinité supérieure au NEM-680. Deuxièmement, la différence d'interaction du SDS avec les protéines marquées par le NEM-680 ou le NEM-780 peut conduire à une migration aberrante (Chan et al., 2005).

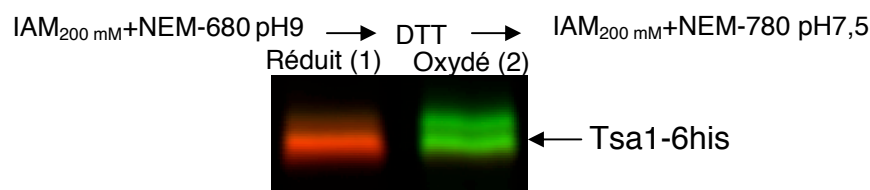


Figure 10. Etude de l'état redox de Tsa1 après marquage des thiols réduits et oxydés par le NEM fluorescent.

La purification de Tsa1-6his et l'obtention des formes réduites et oxydées *in vitro* sont réalisés de façon identique à la figure 2. 3 μ g de Tsa1 sont ensuite successivement solubilisés dans un tampon dénaturant UCTE contenant 6 mM d'IAM en présence de 3 μ M de NEM-680 à pH9 et à 30°C, 0,6 mM de DTT et 6 mM d'IAM en présence de de 3 μ M NEM-780 à pH 7,5 et à 4°C. 1 μ g de Tsa1 marquée est ensuite déposé en l'absence de réducteurs sur un gel SDS-PAGE et détecté simultanément par fluorimétrie avec l'Odyssey[®] dans les deux longueurs d'onde d'émission du NEM fluorescent.

iv. Conclusion

Incontestablement, cette nouvelle méthode de marquage différentiel nous permet de discriminer spécifiquement les thiols réduits et les thiols oxydés d'une protéine. De plus, nous utilisons 20 nanomoles de NEM fluorescent au lieu des 400 nanomoles de NEM C¹⁴ dans les précédentes expériences (figures 4 et 6) et le NEM fluorescent détecte plus rapidement de très faibles quantités de protéines marquées (0,01 μg contre 10 μg pour le NEM C¹⁴). Les alkylants fluorescents possèdent donc une sensibilité de marquage des thiols supérieure à celle du NEM C¹⁴.

c. Marquage des thiols oxydés par la Biotine-HPDP et purification des protéines contenant des thiols oxydés

Le marquage différentiel des thiols *in vivo* par le NEM C¹⁴ nous a permis d'estimer la proportion de thiols oxydés (figure 4) et réduits (figure 6) dans une souche sauvage en phase de croissance exponentielle. La comparaison des deux profils expérimentaux a révélé que les protéines oxydées sont nombreuses, et, pour certaines, assez peu abondantes. Afin d'identifier de façon exhaustive ces protéines oxydées, nous avons entrepris de les enrichir par une méthode de purification par affinité. Pour cela, nous avons réalisé le marquage différentiel des thiols par la Biotine-HPDP dont les propriétés permettent de lier spécifiquement les protéines contenant des thiols oxydés (-S-S-; -S-GS; -SOH), après leur réduction par le DTT. En effet, la Biotine-HPDP se lie aux cystéines grâce à sa partie HPDP qui forme une liaison covalente et réversible avec un thiol par l'intermédiaire d'un pont disulfure (voir schéma 21). Grâce à l'extrémité biotine de ce réactif, la purification des protéines marquées se fait par chromatographie d'affinité sur résine de streptavidine. La Biotine-HPDP a été également utilisée par le groupe de Snyder pour marquer les nitrosothiols (-S-NO) et purifier les protéines nitrosylées (Jaffrey and Snyder, 2001).

i. Marquage différentiel des thiols par la Biotine-HPDP

Les protéines provenant d'une souche sauvage en phase de croissance exponentielle sont extraites en milieu acide puis successivement solubilisées en présence d'IAM, de DTT et de Biotine-HPDP. Les thiols ayant fixé la Biotine-HPDP seront appelés «protéines biotinylées». Les protéines sont ensuite précipitées afin d'éliminer l'excès de réactif et sont solubilisées dans un nouveau tampon avant d'être déposées sur un gel SDS-PAGE non réduit. La détection se fait par

chimiluminescence après western blot, grâce à la streptavidine couplée à une peroxydase HRP (figure 11A, piste 1). Les protéines biotinylées sont également purifiées par la streptavidine immobilisée sur une résine de sépharose. Au cours des différentes étapes de la purification, des échantillons sont déposés sur un gel non réduit (figure 11A, pistes 2-8). Les protéines purifiées sont ensuite décrochées de la résine par la réduction du pont disulfure formé entre la Biotine-HPDP et le thiol (figure 11A, piste 9). Ces protéines éluées sont alors révélées par une coloration au bleu de Coomassie après électrophorèse monodimensionnelle «1D» (figure 11B, piste 1) ou bidimensionnelle «2D» (figure 12A).

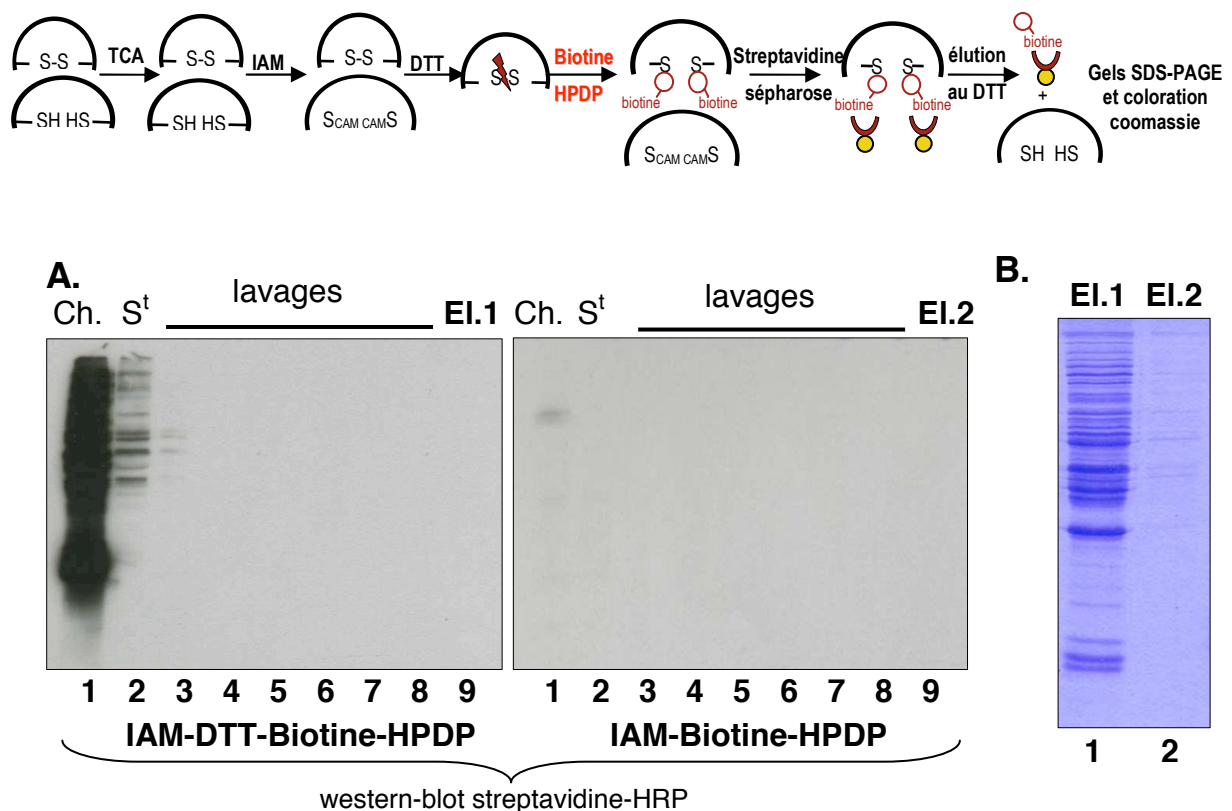


Figure 11. Contrôle des conditions de purification des protéines marquées par la Biotine-HPDP (A), et de la purification spécifique des protéines oxydées marquées par la Biotine-HPDP (B).

Les protéines issues de 300 ml de culture d'une souche sauvage à DO₆₀₀ 0,4 sont extraites en milieu acide puis successivement solubilisées en tampon UCTE contenant 50 mM d'IAM, 20 mM de DTT ou non et 0,5 mM de Biotine-HPDP. 3 mg de protéines marquées sont ensuite incubés en présence de 300 µl de streptavidine sépharose. La résine est lavée 6 fois et les protéines sont ensuite éluées (EI.) par 20 mM de DTT. (A) Dépôt des extraits biotinylés avant (Ch: charge), après (S^t: surnageant) contact avec la résine et après différents lavages de la résine, sur un gel SDS-PAGE en l'absence de réducteurs. Les protéines sont alors détectées après un western blot avec l'anticorps streptavidine-HRP. (B) Les protéines purifiées sont déposées sur un gel SDS-PAGE et révélées par coloration au bleu de Coomassie.

ii. Contrôle des différentes étapes de purification des protéines contenant des thiols marqués par la Biotine-HPDP

Nous avons d'abord testé l'efficacité de fixation des protéines biotinyllées sur la résine. Pour cela, celles ci ont été déposées sur un gel SDS-PAGE non réduit, avant (figure 11A, piste 1) et après contact avec la résine de streptavidine (figure 11A, piste 2). Le surnageant de la résine (piste 2) ne contient que très peu de protéines biotinyllées, démontrant l'efficacité d'interaction des protéines marquées par la Biotine-HPDP avec la streptavidine. Nous avons ensuite vérifié que les différents lavages de la résine, ne perturbent pas l'interaction des protéines biotinyllées avec la streptavidine. En effet, ces fractions ne contiennent pas de protéines biotinyllées (figure 11A, pistes 3-8), signifiant que ces dernières demeurent fixées durant les lavages successifs de la résine. Nous avons enfin vérifié que la réduction du pont disulfure formé entre le thiol et la Biotine-HPDP permet d'éluer la totalité des protéines biotinyllées fixées à la résine. Pour cela, après notre élution au DTT, nous vérifions qu'aucune protéine biotinyllée n'est restée accrochée en chauffant la résine à 95°C pendant 5 minutes dans du tampon Laemmli 3X contenant un réducteur (non illustré). Après ce traitement, aucune protéine biotinyllée n'est détectée, indiquant l'excellente efficacité de l'élution. Les protéines éluées sont ensuite révélées par une coloration au bleu de Coomassie après migration sur un gel 1D (figure 11B, piste 1) ou 2D (figure 12A). Lorsque l'on supprime le DTT du tampon d'élution, les protéines restent accrochées à la résine et ne sont pas purifiées (figure 12D).

iii. Spécificité de marquage par la Biotine-HPDP et de purification des protéines marquées

Nous avons également testé la spécificité de fixation de la Biotine-HPDP sur les thiols. Pour cela, nous avons marqué une protéine modèle, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Tdh3 ou GAPDH), dans laquelle nous avons muté ou non les résidus cystéines. Le marquage différentiel et la purification des thiols marqués par la Biotine-HPDP ont été réalisés dans une souche invalidée pour TDH3 et transformée par un plasmide exprimant la protéine Tdh3-Myc sauvage ou mutée sur les deux cystéines (figure 12E). La Tdh3 dépourvue de cystéines n'est plus purifiée par cette méthode (flèches), prouvant à la fois la haute spécificité de fixation de la Biotine-HPDP sur les thiols et la purification spécifique des protéines ne contenant que des thiols marqués par la Biotine-HPDP. Nous avons aussi vérifié que l'absence de Biotine-HPDP ne permet pas de purifier de protéines. Si les thiols sont

marqués par de l'IAM, au lieu de la Biotine HPDP et que les protéines marquées sont ensuite purifiées, nous n'observons plus aucune protéine purifiée (figure 12B).

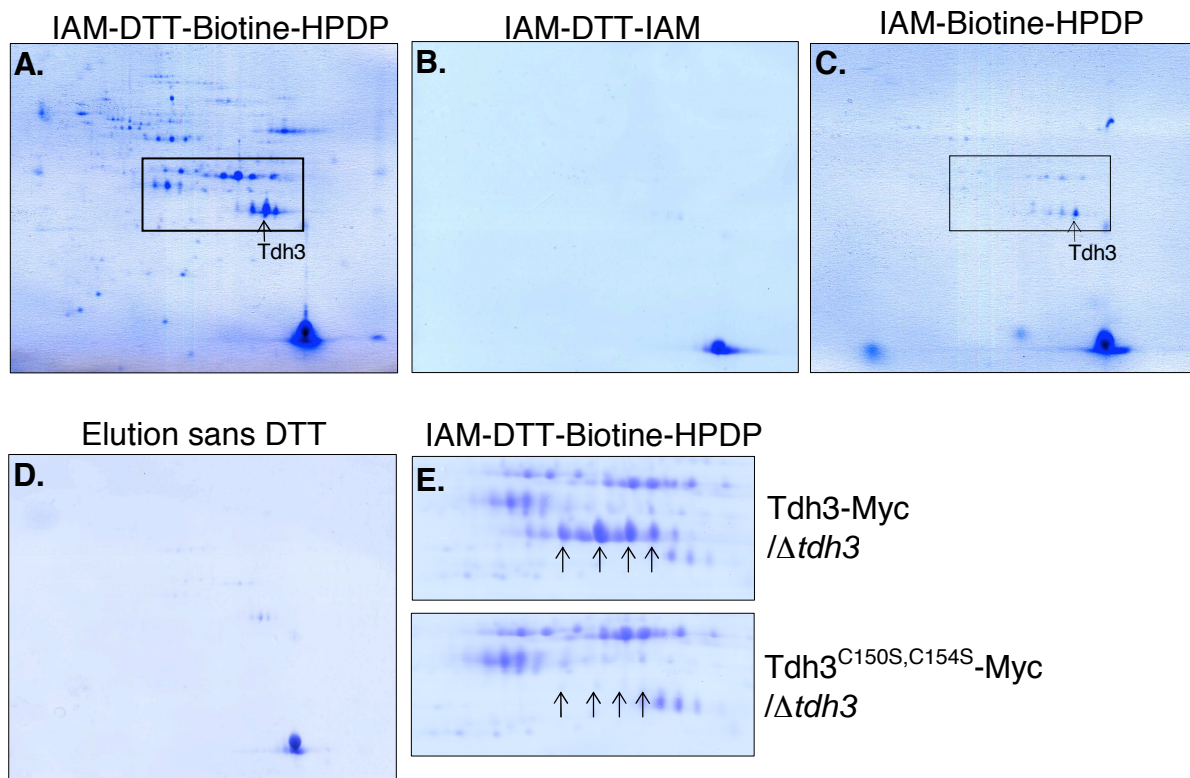


Figure 12. Contrôles du marquage spécifique des thiols par la Biotine-HPDP et de la spécificité de purification des protéines oxydées après marquage à la Biotine-HPDP.

A-E Le marquage des thiols oxydés par la Biotine-HPDP, et la purification des protéines oxydées sont réalisés de façon similaire à la figure 11. Les protéines sont ensuite soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par coloration au bleu de Coomassie. 3 mg (A, C et E) ou 5 mg (B et C) de protéines sont incubées en présence de streptavidine sépharose. (A) Profil expérimental des protéines oxydées en gel bidimensionnel. (B) La Biotine-HPDP est substituée par de l'IAM. (C) L'étape de réduction des thiols oxydés avant marquage à la Biotine-HPDP n'est pas réalisée. (D) L'éluion des protéines biotinyllées est effectuée sans DTT. (E) Le marquage et la purification des protéines oxydées sont réalisés dans une souche invalidée pour le gène TDH3 et transformée par un plasmide exprimant la protéine Tdh3-Myc ou Tdh3-Myc contenant les deux cystéines mutées. Cette portion de gel correspond à l'encadré en A.

iv. Spécificité de marquage des thiols oxydés et de purification des protéines oxydées

Nous avons ensuite vérifié que la Biotine-HPDP ne permet de marquer et de purifier uniquement des protéines contenant des thiols oxydés. Pour cela, la réduction des thiols oxydés par le DTT avant le marquage par la Biotine-HPDP est omise. Après un western blot révélé par la streptavidine-HRP, (figure 11A, de droite, piste 1), nous observons un très faible signal chimiluminescent, indiquant que seuls les thiols oxydés libérés par le DTT sont accessibles à la Biotine-HPDP. On notera également que les thiols libres sont complètement saturés par l'IAM, rendant impossible leur marquage par la Biotine-HPDP. Ce résultat confirme à nouveau la spécificité de fixation de la Biotine-HPDP sur les thiols, contrairement aux autres marqueurs des thiols utilisés précédemment (NEM C¹⁴, NEM fluorescent), pouvant potentiellement se fixer à d'autres acides aminés. Cette méthode nous permet donc de marquer uniquement les protéines oxydées rendues accessibles par le DTT.

Enfin, nous avons vérifié que seules des protéines oxydées sont purifiées par cette méthode. Pour cela, les protéines ne sont pas réduites par le DTT avant d'être marquées par la Biotine-HPDP et incubées avec la résine. Les protéines sont ensuite éluées et révélées par une coloration au bleu de Coomassie après migration sur un gel 1D (figure 11B, piste 2) ou 2D (figure 12C). Dans ces conditions, nous observons un léger bruit de fond, qui ne correspond pas à des protéines oxydées, car elles n'ont pas été réduites par le DTT avant d'être marquées par la Biotine-HPDP. Comme nous avons déjà démontré la saturation des thiols libres et la spécificité de marquage des thiols par la Biotine-HPDP, la purification de protéines non oxydées ne peut résulter que de leur interaction non spécifique avec la résine de streptavidine sépharose. Nous notons qu'un des contaminants, correspondant à la protéine glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH ou Tdh3, encadré figure 12C) est également purifié lorsque les thiols oxydés sont réduits par le DTT avant d'être marqués par la Biotine-HPDP (encadré figure 12A).

v. Limites de la méthode de purification par la Biotine-HPDP

Nous verrons au chapitre B que les protéines identifiées grâce à la méthode de purification des thiols oxydés par la Biotine-HPDP sont essentiellement des protéines abondantes. D'autres protéines telles que Yap1, Gpx3 (Delaunay et al., 2002) ou Srx1 (Biteau et al., 2003) connues pour être oxydées et faiblement

exprimées n'apparaissent pas dans ces identifications, alors que les protéines abondantes et connues pour être oxydées comme la Tdh3 sont identifiées (Shenton and Grant, 2003). Les approches de protéomique développées par d'autres auteurs pour l'analyse des thiols oxydés conduisent aux mêmes résultats, à savoir que ces méthodes globales sont restreintes aux protéines abondantes. Ces analyses excluent donc certaines protéines d'intérêt, faiblement exprimées à l'échelle du protéome, comme les facteurs de transcription et les protéines localisées dans des compartiments intracellulaires où se déroulent des événements d'oxydation, tels que l'espace intermembranaire de la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. La plupart des études protéomiques soulèvent la limite de ces analyses globales et l'importance de développer de nouvelles méthodes d'identification permettant d'accéder aux protéines faiblement exprimées. Parmi ces protéines peu abondantes nous avons entrepris d'enrichir les protéines oxydées, grâce à une méthode d'égalisation couplée à notre méthode de purification par la Biotine-HPDP.

4. La méthode d'égalisation

Nous avons voulu d'une part enrichir les protéines faiblement exprimées pour les raisons expliquées dans le paragraphe précédent, et d'autre part identifier parmi ces protéines peu abondantes, celles possédant des résidus cystéines oxydés. L'enrichissement des protéines peu abondantes a été réalisé grâce au développement récent d'une méthode dite «d'égalisation» mise au point par la société CIPHERGEN (Guerrier et al., 2006), permettant d'obtenir une quantité identique de protéines faiblement et fortement exprimées. L'association de cette méthode d'égalisation avec notre méthode de purification des protéines oxydées après marquage des thiols par la Biotine-HPDP nous a permis d'identifier de nouvelles protéines oxydées.

a. Modification de la méthode d'extraction des protéines en milieu acide

La méthode d'égalisation est basée sur la différence d'affinité des protéines pour un substrat donné en milieu non dénaturant. L'égalisation des protéines en milieu natif est donc incompatible avec notre méthode de blocage de la réactivité intrinsèque des thiols en milieu acide. En effet, le TCA précipite les protéines (voir paragraphe A.1.b) et les dénature, compromettant ainsi la réalisation de l'égalisation.

Nous avons du trouver une autre méthode de blocage de la réactivité des thiols durant la lyse cellulaire, compatible avec l'égalisation puis le marquage des thiols oxydés par la biotine-HPDP. Notre choix s'est porté sur l'ajout d'IAM au tampon non dénaturant d'extraction des protéines. Cependant, le repliement des protéines en milieu natif peut rendre inaccessible certains thiols à l'IAM, nous conduisant à réaliser après l'égalisation une seconde étape d'alkylation des thiols par l'IAM en milieu dénaturant, afin de s'assurer de la saturation des thiols libres. Le marquage différentiel des thiols par la Biotine-HPDP est ensuite réalisé comme décrit précédemment.

La méthode d'égalisation nécessite une quantité importante de protéines que nous avons fixée à 600 mg (soit 10 litres de culture à DO=2). Pour une telle quantité de protéines, nous avons utilisé une concentration maximale d'IAM correspondant à un rapport molaire IAM / résidu cystéine estimé à ~0,7. Ce rapport est loin de celui utilisé précédemment (200) (voir paragraphe A.1.d), mais à plus forte concentration l'IAM se solubilise mal. Nous avons considéré que cette quantité d'IAM devait suffire à bloquer les thiols réactifs généralement exposés en surface des protéines et accessibles au solvant (voir introduction I.A).

b. Principe de la méthode d'égalisation (figure 13)

Le principe de cette méthode est schématisé en figure 13A. Un extrait brut de protéines est incubé en présence d'une librairie d'hexapeptides synthétisée aléatoirement et fixée sur une phase solide. La synthèse combinatoire de la librairie d'hexapeptides est réalisée avec les 20 acides aminés et correspond en théorie à 20^6 , soit 64 millions de possibilités de combiner différemment ces acides aminés. Environ 50 picomoles d'hexapeptides sont fixés sur des billes de 65 μm de diamètre. En fonction de la partie N-terminale des peptides, ces billes sont appelées «billes-E» (extrémité amine non modifiée) ou «billes-SE» (succinylation de l'extrémité amine en carboxyle). Les protéines vont se fixer à un peptide partenaire porté par les billes-E ou SE en fonction de leur affinité respective. Après avoir récolté le surnageant des billes, un lavage de la résine est ensuite effectué pour éliminer l'excès des protéines abondantes non fixées, puis les protéines fixées sur les billes égalisatrices sont éluées par un tampon dénaturant. Deux fractions de protéines sont ainsi obtenues après égalisation: le surnageant de la résine (non égalisé NE) et la fraction égalisée (E). Les protéines sont ensuite révélées par coloration au bleu de Coomassie après

une électrophorèse monodimensionnelle ou bidimensionnelle (figure 13B). La comparaison des deux fractions met clairement en évidence l'apparition de nouvelles protéines ainsi que la diminution des protéines abondantes, prouvant la très bonne efficacité de la technique d'égalisation en termes d'enrichissement des protéines faiblement exprimées.

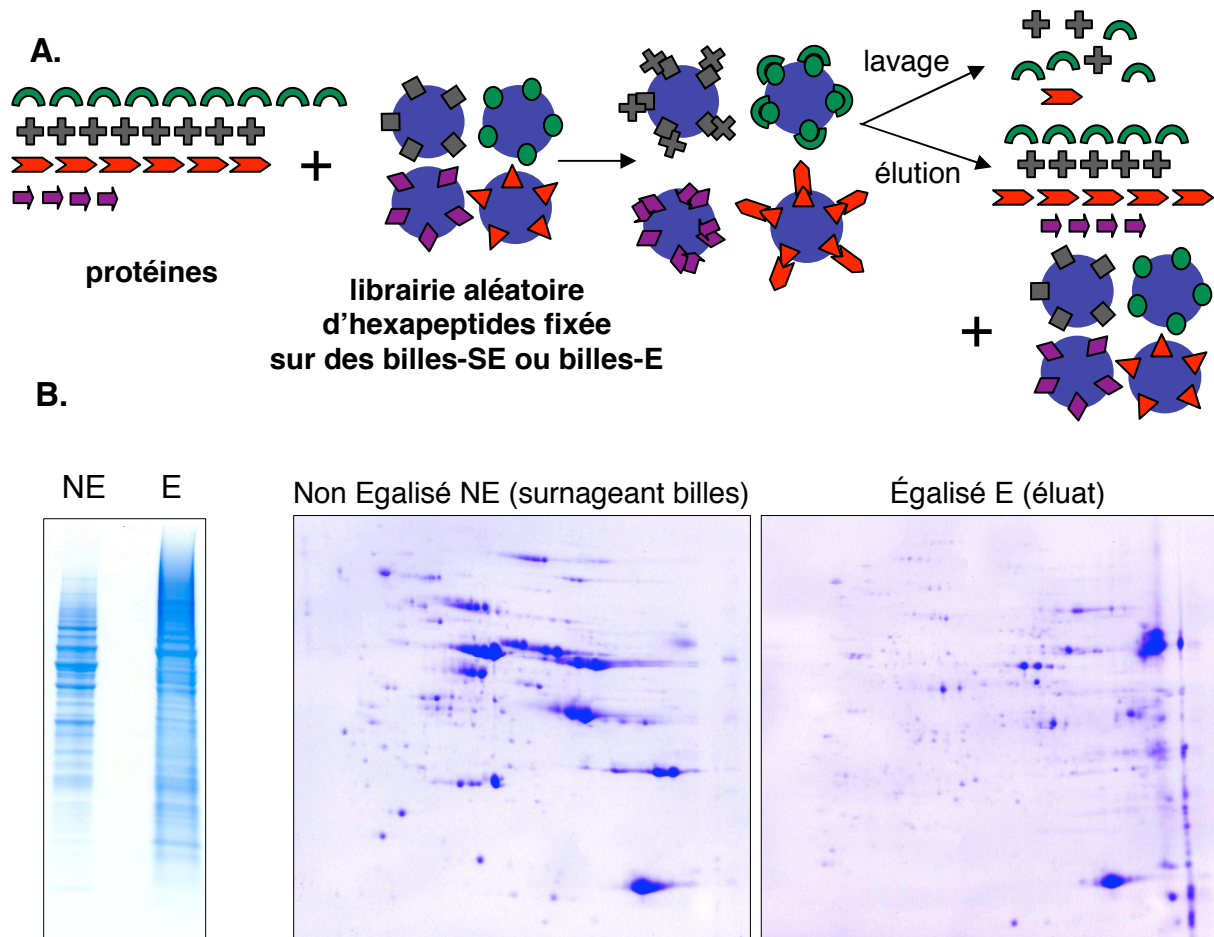


Figure 13. Evaluation de l'efficacité de l'enrichissement des protéines peu abondantes par la méthode d'égalisation.

(A) Description schématique de la méthode d'égalisation. (B) Les cellules d'une souche sauvage cultivée dans 10L de milieu jusqu'à atteindre une DO_{600} de 2, sont lysées dans un tampon non dénaturant en présence de 1M d'IAM, selon la technique décrite dans la partie «Méthodes». Les 600mg de protéines extraites sont ensuite incubées en présence des «billes-E». Le surnageant des billes est récolté, puis les billes sont lavées pour éliminer les protéines abondantes n'ayant pas trouvées de partenaires, et éluées pour purifier les protéines faiblement abondantes. Les protéines du surnageant des billes et les protéines éluées sont soumises à une électrophorèse soit monodimensionnelle, soit bidimensionnelle et révélées par coloration au bleu de Coomassie.

c. Purification des protéines oxydées de l'égalisat (figure 14)

Après l'égalisation, nous avons procédé au marquage puis à la purification des protéines oxydées par la méthode utilisant la Biotine-HPDP. Afin de s'assurer que la modification des conditions expérimentales décrites ci-dessus ne perturbe pas la méthode, nous avons réalisé des contrôles similaires à ceux présentés dans la figure 11. Nous avons d'abord vérifié que la concentration d'IAM utilisée conduit à saturer les thiols libres, nous permettant ainsi de marquer spécifiquement les thiols oxydés, libérés par le DTT. Si l'on supprime la réduction par le DTT avant le marquage par la Biotine-HPDP, aucune protéine biotinylée n'est détectée (figure 14A, pistes 3-4 et 7-8), prouvant ainsi que le blocage des thiols libres par l'IAM est total. Nous avons ensuite vérifié la fixation des protéines biotinylées égalisées ou non sur la résine de streptavidine sépharose. Une très faible quantité de protéines biotinylées est détectée dans le surnageant de la résine, prouvant ainsi que les protéines biotinylées se fixent efficacement à la streptavidine-sépharose (figure 11A, pistes 2 et 6). Enfin, nous avons testé la spécificité de purification des protéines oxydées issues des deux fractions égalisées ou non. Pour cela, les protéines purifiées à partir d'extraits réduits ou non par le DTT avant le marquage par la Biotine-HPDP, sont déposées sur un gel SDS-PAGE et révélées par coloration au bleu de Coomassie (figure 11B). Nous observons la présence de quelques contaminants en l'absence de DTT (figure 11B, pistes 2 et 4), provenant probablement d'une interaction non spécifique de la résine avec des protéines non marquées par la Biotine-HPDP, comme nous l'avons observé précédemment (voir figure 11B).

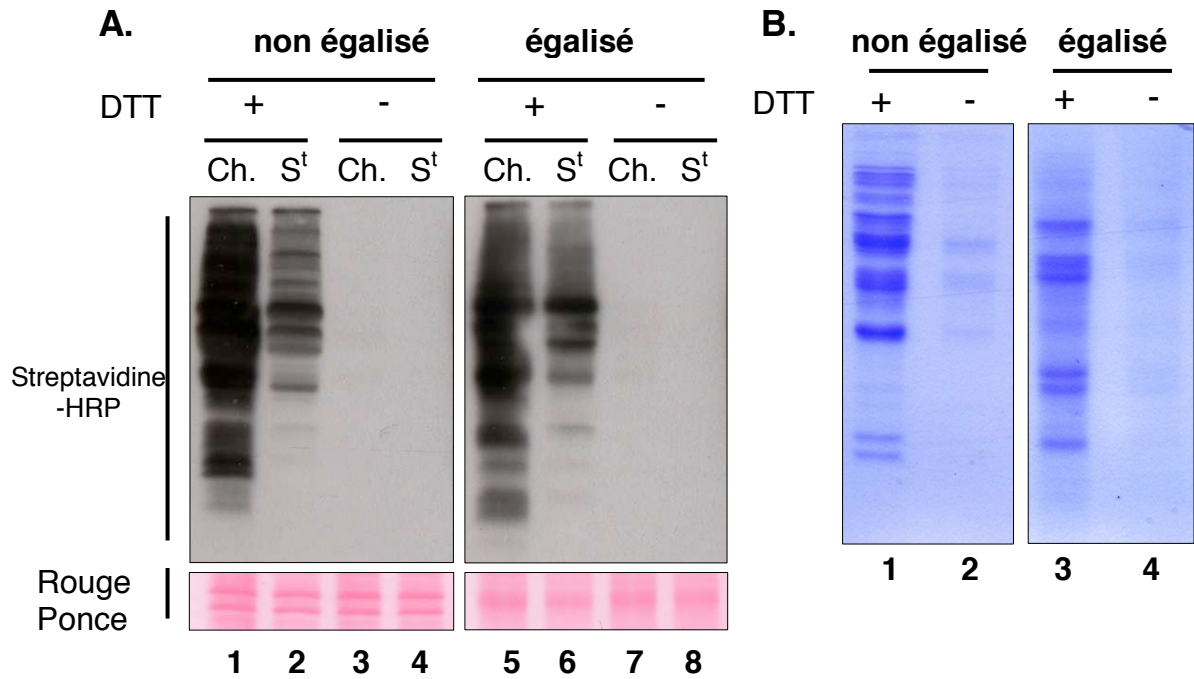


Figure 14. Contrôle de la purification des protéines oxydées marquées par la Biotine-HPDP après égalisation.

Dix milligrammes de protéines égalisées (E) ou non (NE) dans la figure 13 sont successivement solubilisées en tampon UCTE contenant 200 mM d'IAM, 20 mM de DTT ou non et 0,5 mM de Biotine-HPDP. 5 mg de protéines biotinylées sont ensuite incubées en présence de 500 μ L de streptavidine sépharose puis éluées en présence de DTT. (A) Les protéines égalisées ou non et marquées par la Biotine-HPDP sont déposées avant (Ch: charge) et après (S^t: surnageant) contact avec la résine sur un gel SDS-PAGE non réduit et révélées après un western blot avec la streptavidine-HRP. Le contrôle de la quantité de protéines déposées est réalisé par une coloration au rouge Ponceau. (B) Les protéines éluées sont déposées sur un gel SDS-PAGE et révélées par coloration au bleu de Coomassie.

5. Les méthodes de quantification de l'état redox des thiols

La méthode de purification des protéines oxydées par la Biotine-HPDP ne permet pas d'estimer l'état d'oxydation *in vivo* des protéines. Pour quantifier l'oxydation de chaque protéine, nous avons combiné cette analyse essentiellement qualitative avec les méthodes de marquage des thiols oxydés par le NEM C¹⁴ ou le NEM fluorescent, à partir desquelles nous avons proposé une méthode de calcul de l'état redox des protéines.

a. Le NEM C¹⁴

Le marquage des thiols totaux et oxydés par le NEM C¹⁴ a été réalisé selon le protocole décrit précédemment (voir figures 4 et 6, paragraphe A.3.a). Les signaux ont été détectés par autoradiographie et quantifiés grâce au logiciel ImageQuant du Phosphorimager après une période d'exposition identique des gels (figure 15 A, B) (voir NOTE³). Nous observons que le marquage des thiols totaux (figure 15B) par le NEM C¹⁴ produit un signal nettement supérieur à celui des thiols oxydés (figure 15A). La quantification de ces signaux radioactifs nous a permis de calculer un indice d'oxydation pour chaque protéine (voir tableau 1).

i. Définition de l'indice d'oxydation des protéines

Nous avons déterminé un indice d'oxydation des protéines (I_{ox}) reposant sur la différence des signaux émis entre les thiols totaux (S_{tot}) et les thiols oxydés (S_{ox}) (figure 15C). La valeur S_{tot} représente la quantité totale de protéine en fonction du nombre de thiols présents dans la protéine, tandis que la valeur S_{ox} reflète non seulement la quantité de protéine sous forme oxydée, mais aussi le nombre de thiols oxydés par protéine, celui-ci n'étant pas toujours égal au nombre total de cystéines par protéine. Compte tenu de toutes ces variables, nous avons ajouté deux paramètres permettant de calculer plus précisément l'indice d'oxydation des protéines: le nombre total de cystéines par protéine (N^{cys}) et le nombre de thiols oxydés (N^{ox}) par protéine, que nous avons défini arbitrairement à 1 ($N^{ox}=1$). L'indice d'oxydation correspond donc à la formule $I_{ox}=(S_{ox}/N^{ox})/(S_{tot}/N^{cys})$ et doit normalement être compris entre 0 et 1. Bien entendu, cet indice d'oxydation peut être supérieur à 1 lorsque le nombre de thiols oxydés par protéine est lui-même supérieur à 1, indiquant que le N^{ox} peut être sous estimé ($N^{ox}=1$) dans notre calcul du I_{ox} .

Marquage radioactif des thiols oxydés (S_{ox}) Marquage radioactif des thiols réduits totaux (S_{tot})

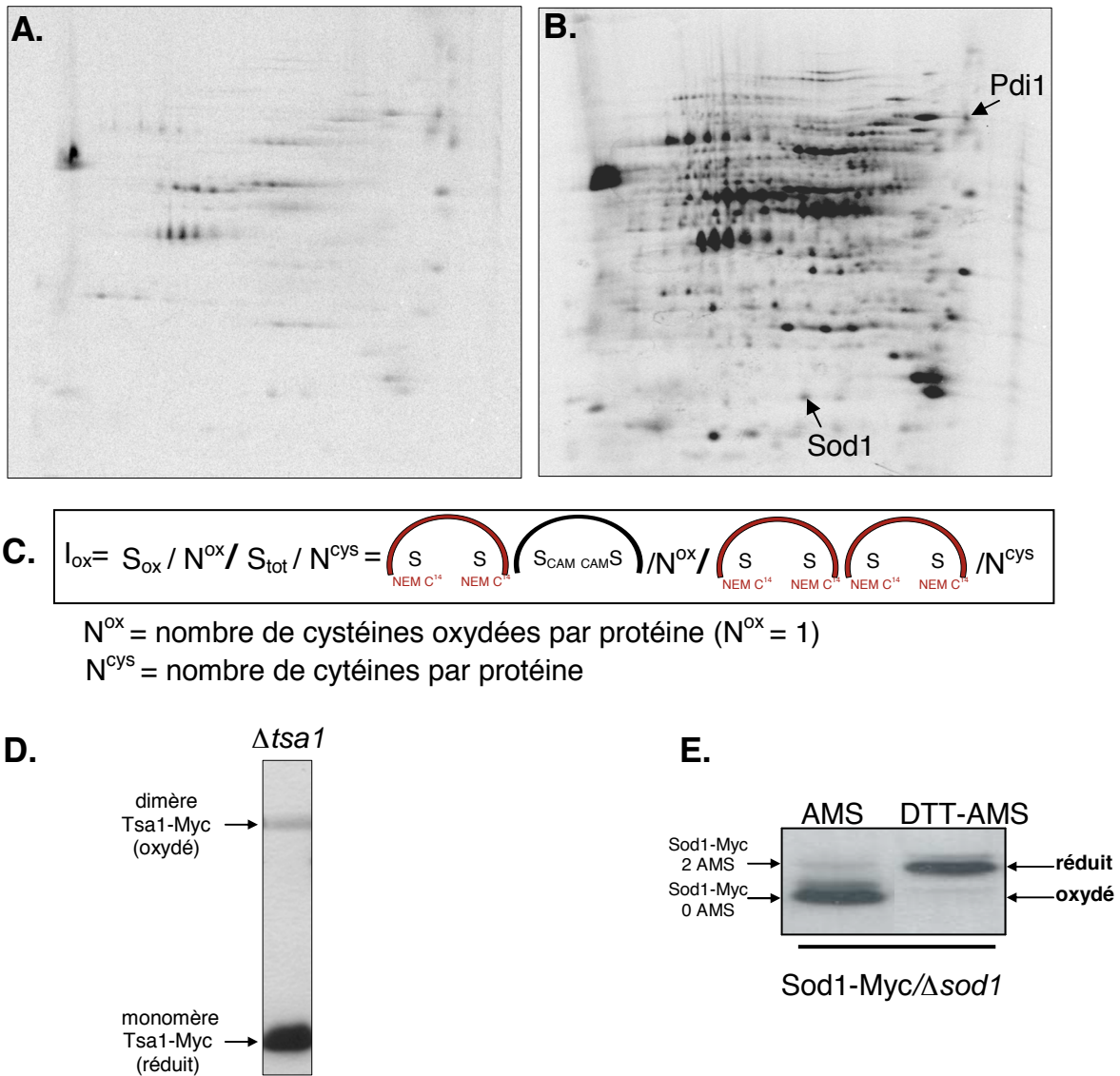


Figure 15. Evaluation de l'état d'oxydation des protéines par marquage des thiols totaux et oxydés par NEM C¹⁴.

(A) Marquage des thiols oxydés par le NEM C¹⁴ (voir figure 4). (B) Marquage des thiols totaux par le NEM C¹⁴ (voir figure 6). (C) Définition de l'indice d'oxydation des protéines (I_{ox}). (D-E) Les protéines sont extraites en milieu acide à partir des souches invalidées pour *TSA1* ou *SOD1* et transformées respectivement par Tsa1-Myc et Sod1-Myc. Les protéines sont ensuite solubilisées en tampon dénaturant TES contenant soit 50 mM de NEM (D) soit 15 mM d'AMS (E), puis déposées sur un gel SDS-PAGE contenant (E) ou non (D) du β -mercaptoéthanol, et révélées après un western blot avec l'anticorps anti-Myc dirigé contre les étiquettes des deux protéines.

NOTE³: le signal S_{ox} observé dans la figure 15A est inférieur au signal obtenu dans la figure 4A car nous avons dû écourter la durée d'exposition des gels bidimensionnels avant autoradiographie pour ne pas obtenir de saturation du signal S_{tot} .

ii. Calcul de l'indice d'oxydation des protéines

Nous n'avons pas réussi à calculer un I_{ox} pour toutes les protéines oxydées car le signal S_{ox} obtenu est très diffus pour certaines protéines (voir tableau 1). Toutefois, la majorité des protéines, pour lesquelles nous avons pu calculer cet indice, possède un I_{ox} compris entre 0,1 et 0,4, excepté certaines dont l'indice est supérieur à 1, pour les raisons que nous avons indiquées ci-dessus. Par exemple, la Pdi1 «Protéine Disulfure Isomérase» est une oxydase du réticulum endoplasmique contenant quatre cystéines oxydées ($N^{ox}=4$) (Frand and Kaiser, 1999), (Xiao et al., 2004), ce qui explique son indice d'oxydation supérieur à 1 ($I_{ox}= 2,98$). De même, la Sod1 «Superoxyde Dismutase» est une protéine oxydée contenant deux cystéines sous forme d'un pont disulfure intramoléculaire ($N^{ox}=2$) (Furukawa et al., 2004), ce qui corrèle avec son indice d'oxydation de 1,22. Bien que l' I_{ox} ne fournisse qu'une valeur approximative de l'état d'oxydation des protéines (N^{ox} inconnu dans la plupart des cas), il reflète bel et bien cet état d'oxydation *in vivo*, puisque des protéines comme la Sod1 ou la Pdi1, connues pour être majoritairement sous forme oxydée dans la cellule, possèdent un I_{ox} élevé.

iii. Vérification de la corrélation entre la valeur I_{ox} calculée et la quantification de l'état redox de Tsa1 et Sod1 en western blot

Nous savons que ces protéines contiennent deux thiols sous forme d'un pont disulfure intermoléculaire pour Tsa1 (voir introduction III.B.1a) et intramoléculaire pour Sod1 (voir ci-dessus). Il était intéressant de vérifier que l' I_{ox} calculé pour ces protéines avec $N^{ox}=1$ reflétait bien leur état redox visualisé en western blot. Ceci nous a en particulier permis de tester le biais du calcul de l' I_{ox} . Les deux protéines sont extraites en milieu acide à partir des souches $\Delta tsa1$ et $\Delta sod1$, transformées respectivement par Tsa1-Myc ou Sod1-Myc. Les protéines sont ensuite solubilisées en tampon dénaturant contenant du NEM pour Tsa1, de l'AMS pour Sod1 et déposées sur un gel SDS-PAGE non réduit pour Tsa1 et réduit pour Sod1. Après un western blot révélé par l'anticorps anti-Myc, l'état d'oxydation des deux protéines est quantifié à l'aide du logiciel Image Quant. La proportion de la forme oxydée dimérique de Tsa1 est estimée à 12% (figure 15D) et la forme oxydée inaccessible à l'AMS de Sod1 à 95% (figure 15E). Ces valeurs sont différentes de l' I_{ox} calculé de 0,22 pour un $N^{ox}=2$ pour la Tsa1 et de 0,61 pour un $N^{ox}=2$ pour la Sod1, indiquant la valeur approximative de cet indice d'oxydation des protéines.

iv. Comparaison avec le calcul de l'état d'oxydation des protéines réalisé par d'autres auteurs

Leichert et Jakob (Leichert and Jakob, 2004) ont développé une méthode de quantification des thiols oxydés chez *E.coli*, permettant de calculer d'une façon plus appropriée cet indice d'oxydation. Pour cela, ils effectuent une extraction des protéines et un marquage différentiel des thiols oxydés par de l'IAM C¹⁴, selon des méthodes similaires à celles que nous avons utilisées. Les protéines marquées sont ensuite soumises à une électrophorèse bidimensionnelle suivie d'une coloration au bleu de Coomassie et d'une autoradiographie. Les auteurs déterminent alors un indice d'oxydation correspondant au rapport entre le signal radioactif émis par la protéine oxydée marquée et le signal correspondant à la quantité de cette protéine, mesurée au bleu de Coomassie. Cet indice reflète donc une «activité spécifique» des protéines oxydées. De plus, les auteurs s'affranchissent du signal non spécifique produit par l'IAM C¹⁴ en déterminant une valeur seuil arbitraire en deçà de laquelle le signal obtenu est non significatif (Leichert and Jakob, 2004).

Nous n'avons pas pu appliquer cette méthode de quantification à notre étude de l'état d'oxydation des thiols pour trois raisons: (i) la coloration au bleu de Coomassie provoque une forte diminution du signal car nous utilisons une quantité d'agent alkylant radiomarké inférieure (2 mM de NEM C¹⁴ contre 100 mM d'IAM C¹⁴), ceci impose une augmentation des temps d'exposition des gels bidimensionnels avant autoradiographie; (ii) nous ne pouvons pas utiliser une quantité identique d'agent alkylant radiomarké car la concentration de notre solution initiale de NEM C¹⁴ est de 13,3 mM; (iii) l'IAM C¹⁴ n'est pas un produit disponible commercialement.

v. Limites de la méthode de quantification par le NEM C¹⁴

L'inconvénient principal de notre méthode de quantification, est que le marquage par le NEM C¹⁴ des thiols totaux est réalisé indépendamment du marquage des thiols oxydés, rendant ainsi difficile la comparaison des signaux radioactifs des gels bidimensionnels de deux expériences distinctes. Nous avons pu voir également que le calcul du rapport des signaux radioactifs émis par les thiols oxydés (S_{ox}) et les thiols totaux (S_{tot}) établit un indice d'oxydation approximatif, résultant probablement non seulement de cette variation expérimentale intrinsèque, mais aussi du marquage non spécifique caractéristique du NEM C¹⁴ (voir figures 4 et

6). Nous avons donc cherché à améliorer la quantification de l'état d'oxydation des thiols en exploitant notre méthode de marquage des thiols réduits et oxydés par le NEM fluorescent.

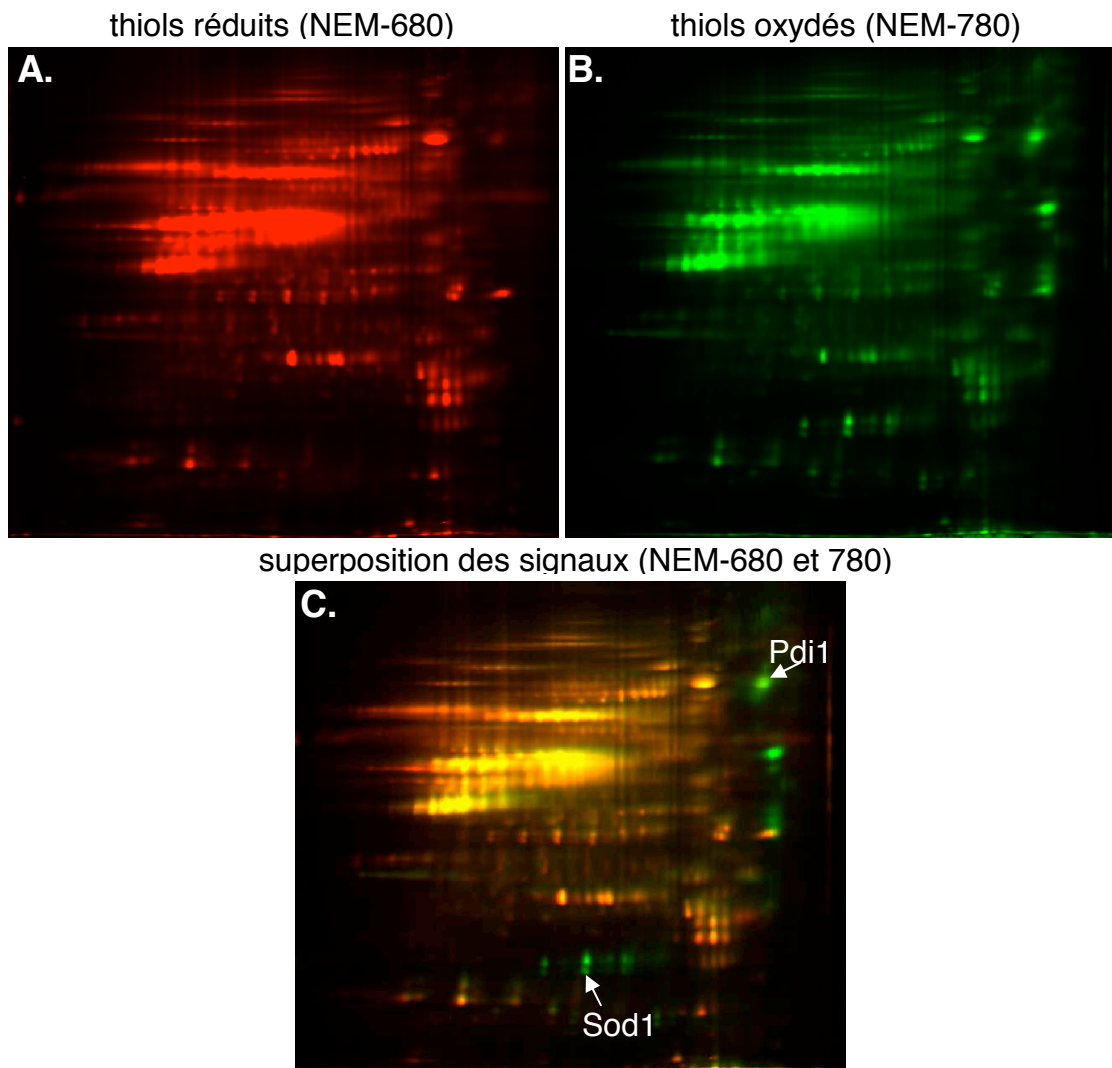
b. Le NEM fluorescent

La méthode de marquage des thiols réduits par le NEM-680 (rouge) puis des thiols oxydés par le NEM-780 (vert) permettant de visualiser l'état redox des thiols au sein d'un même extrait de protéines, est décrite dans le paragraphe A.3.b (figures 7-10). Le principal avantage de cette méthode est la détection simultanée des signaux émis par les deux fluorophores, ce qui permet de comparer précisément le marquage des thiols réduits et oxydés dans une seule et même expérience.

i. Quantification de l'état d'oxydation des protéines

Après une électrophorèse bidimensionnelle, les protéines marquées par le NEM-680 puis par le NEM-780 peuvent être détectées séparément (figure 16 A et B) ou simultanément (figure 16C). Nous distinguons donc trois catégories de protéines en fonction de la couleur du signal émis: rouge pour les protéines réduites, vert pour les protéines oxydées et jaune pour les protéines sous les deux formes. Le marquage vert de certaines protéines de la figure 16C (flèches) indique leur présence sous une forme majoritairement oxydée dans une souche sauvage en phase de croissance exponentielle. Ces observations correspondent bien à celles que nous avons faites après marquage des thiols oxydés et totaux par le NEM C¹⁴ (Le Moan et al., 2006). De plus, Sod1 et Pdi1 apparaissent en vert, confirmant ainsi les indices d'oxydation élevés déterminés par la méthode de quantification précédente (voir paragraphe A.5.a).

La fluorescence émise par le NEM 680 et 780 est mesurée simultanément par l'Odyssey[®], qui détermine un rapport d'intensité de chaque signal en fonction du nombre de pixels détectés sur une surface définie. Cette valeur nous permet d'apprécier l'état redox d'une protéine, c'est-à-dire si elle est majoritairement présente sous une forme oxydée ou réduite. Cette méthode nous permet également de calculer précisément la variation de l'état redox des thiols (ΔI_{ox}), définie par le rapport entre les signaux émis à 680 et 780 nanomètres dans deux conditions de culture ou de traitement différents (figure 16D).



D.
$$\Delta I_{ox} = S_V^1 / S_R^1 / S_V^2 / S_R^2$$

“S”: signal fluorescent vert (V) ou rouge (R)
1 et 2 étant deux conditions expérimentales différentes

Figure 16. Visualisation de l'état redox des thiols après marquage des thiols réduits et oxydés par le NEM-fluorescent.

Le marquage des thiols réduits et oxydés par le NEM fluorescent est réalisé de façon identique à la figure 10 sur des protéines extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage. 5 μ g de protéines marquées sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle dans des conditions non réductrices et révélées par fluorimétrie avec l'Odyssey® à 680 nanomètres (A), à 780 nanomètres (B) ou simultanément (C). (D) La variation de l'état redox des protéines est défini par le ΔI_{ox} .

ii. Comparaison avec d'autres méthodes de quantification des thiols oxydés

Dans leur étude, Baty et Winterbourn (Baty et al., 2005) ont marqué les résidus cystéines oxydés avec de l'iodoacétamide-fluorescéine (IAF) selon une méthode similaire à la notre. L'IAF produit un signal non spécifique assez similaire à celui que nous obtenons avec le NEM fluorescent (Baty et al., 2002). Les auteurs quantifient l'oxydation des thiols à l'aide d'un logiciel PDQuest™ capable d'aligner les images des différents gels bidimensionnels. Les protéines dont l'intensité de marquage par l'IAF augmente ou diminue dans 3 expériences indépendantes sont considérées comme modifiées dans leur état d'oxydation (Baty et al., 2005). Cependant, l'utilisation d'un seul fluorophore pour marquer les protéines oxydées ne permet pas de quantifier précisément la variation de l'état redox des thiols.

iii. Limites de notre méthode de quantification par le NEM fluorescent

Contrairement à la méthode NEM C¹⁴, notre méthode de marquage des thiols par le NEM-fluorescent ne permet pas de déterminer précisément le nombre de thiols oxydés et réduits au sein d'une protéine, pour trois raisons: (i) l'IAM possède une affinité différente du NEM fluorescent pour les thiols (voir paragraphe A.3.b, et figure 7); (ii) nous avons pu observer que l'affinité du NEM-680 envers les thiols d'une protéine n'est pas identique à celle du NEM-780 (figure 10); (iii) l'appareil Odyssey® propose une valeur d'intensité du signal fluorescent émis différente entre le NEM-680 et le NEM-780 pour une concentration identique (donnée non illustrée). Cette méthode permet néanmoins de comparer de façon très précise la variation de l'état redox des protéines (ΔI_{ox}) dans des conditions strictement identiques de marquage et de migration des protéines.

Nous désirons améliorer ultérieurement cette méthode de quantification de l'état redox des thiols grâce à un contrôle interne de la quantité de protéines, obtenu par marquage par un autre fluorophore d'un acide aminé de référence, autre que le résidu cystéine (Chan et al., 2005).

B. Identification des protéines oxydées

La méthode de marquage des thiols par la Biotine-HPDP décrite précédemment permet de purifier les protéines contenant des résidus cystéines oxydés. Les protéines purifiées sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie des gels SDS-PAGE mono- ou bidimensionnels, puis identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight - Mass Spectrometry) et/ou par LC-MS/MS (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry tandem analysis).

1. Identification des protéines oxydées dans une souche sauvage non traitée

Les protéines oxydées d'une souche sauvage en phase de croissance exponentielle sont marquées par la Biotine-HPDP puis purifiées selon la méthode décrite auparavant (voir paragraphe A.3.c et figure 12). Le gel bidimensionnel des protéines purifiées, colorées au bleu de Coomassie, et identifiées par analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF est présenté en figure 17A. Lorsque nous comparons ce protéome des protéines oxydées avec celui obtenu après marquage par le NEM C¹⁴ (figure 17B), nous observons une distribution très similaire. Cette redondance du marquage prouve la grande spécificité des deux méthodes de détection des thiols oxydés.

Les deux protéomes contiennent environ 200 spots de protéines dont 64 ont été identifiées de façon certaine par une analyse en MALDI-TOF-MS. La majorité de ces protéines est localisée dans le cytoplasme (57/64). Toutefois, quelques protéines appartenant à d'autres compartiments cellulaires sont également identifiées: la Pdi1 du réticulum endoplasmique, Prx1, Mdh1, Por1, Hsp60, Ilv5 localisées dans la mitochondrie et Pep4 contenue dans la vacuole (voir tableau 1). Nous avons pu observer que ces protéines disparaissent du protéome oxydé lorsque la purification est réalisée sur des extraits cytosoliques purs, isolés par centrifugation différentielle à partir d'un lysat de sphéroplastés (non illustré).

Le principal constat est que les protéines oxydées sont nombreuses dans une cellule au repos et appartiennent à plusieurs voies métaboliques: antioxydants, oxydoréductases, chaperons, enzymes du métabolisme énergétique et des carbohydrates, enzymes de la voie de biosynthèse des acides aminés, facteurs

intervenant dans la traduction des protéines (voir tableau 1). La plupart de ces protéines a également été retrouvée sous une forme oxydée dans d'autres organismes, notamment chez *E.coli* (Leichert and Jakob, 2004) et les mammifères (Cumming et al., 2004), (Brennan et al., 2004), (Fratelli et al., 2002), (Baty et al., 2005), nous confortant ainsi dans la spécificité de détection des protéines oxydées. La présence de protéines oxydées dans le cytoplasme d'une cellule au repos est néanmoins surprenante, de par la présence des voies de réduction des thiols oxydés, assurant un flux continu d'équivalents réducteurs (voir introduction).

Parmi les protéines que nous avons identifiées, le mécanisme d'oxydation de quelques unes est particulièrement bien documenté, mais pour la plupart, il n'existe pas de référence dans la littérature. Les protéines retrouvées sous une forme oxydée dans d'autres analyses sont indiquées dans le tableau 1. Nous avons également répertorié dans le tableau 1 les protéines contenant dans leur site actif catalytique ou de coordination des métaux, un ou plusieurs thiols susceptibles de s'oxyder.

La première catégorie de protéines possédant des thiols oxydés dans une cellule au repos est représentée par les protéines «redox». Par exemple, les peroxydases Tsa1 et Ahp1 sont oxydées en l'absence de tout traitement. Ces enzymes possèdent une cystéine qui catalyse la réduction des peroxydes (voir introduction III.B.1a), comme nous l'avons décrit précédemment pour Tsa1. Leur oxydation partielle reflète donc la présence de leur activité permanente, impliquant l'existence de peroxyde endogène au sein de la cellule. Dans les mêmes conditions de culture, la Trr1 (voir introduction III.A) et la Pdi1 (voir introduction IV.B) (Fränd and Kaiser, 1999) sont oxydées, corrélant ainsi avec leur activité respective de thiol-réductase et de thiol-oxydase, y compris en absence de stress. Le mécanisme d'oxydation des thiols est différent pour la Sod1 puisque qu'elle possède un pont disulfure intramoléculaire essentiel à son activité de dismutation de l'anion superoxyde O_2^- (Furukawa et al., 2004).

Les enzymes du métabolisme des carbohydrates identifiées dans notre analyse représentent la majorité du protéome oxydé, et sont assez systématiquement retrouvées dans ce type d'études. L'oxydation de ces protéines implique probablement, dans leur site catalytique ou de coordination des métaux, une cystéine réactive à la présence d'espèces dérivées de l'oxygène.

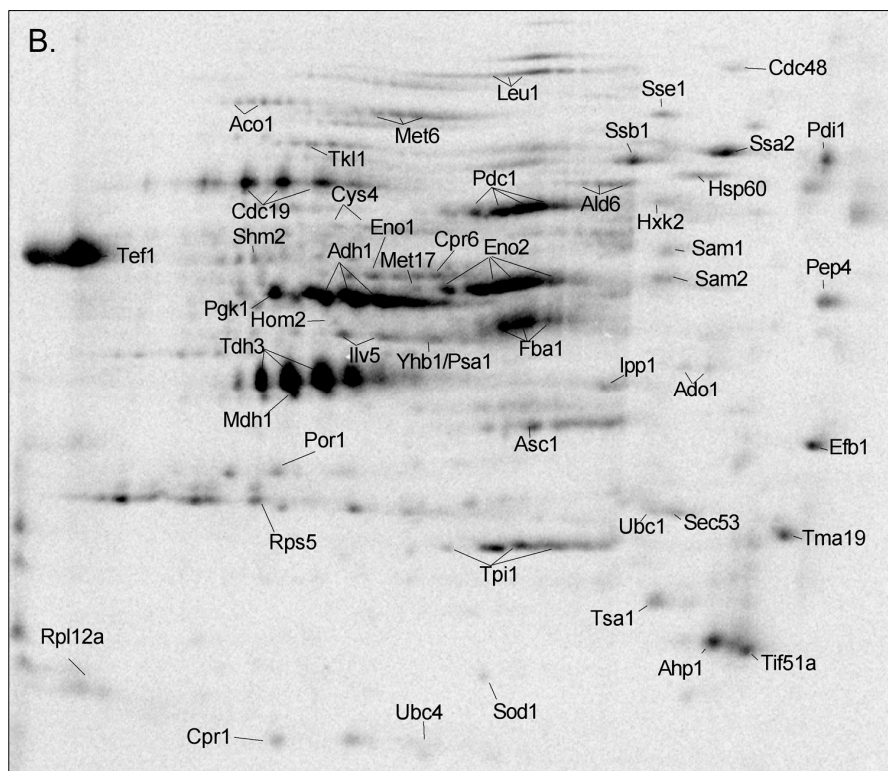
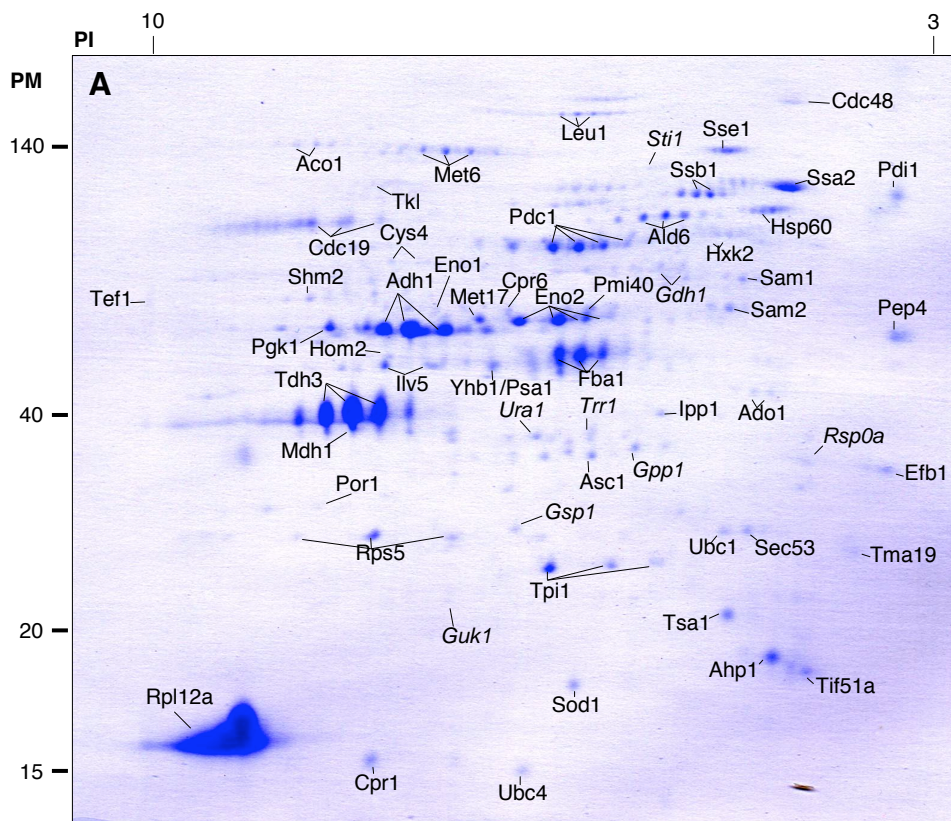


Figure 17. Identification des protéines oxydées purifiées par la Biotine-HPDP et comparaison avec les protéines oxydées marquées par le NEM C¹⁴.

(A) Les protéines purifiées de la figure 12A sont identifiées par analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF et répertoriées dans le tableau 1. (B) Les protéines oxydées sont marquées par le NEM C¹⁴ comme indiqué dans la figure 4.

Par exemple, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH ou Tdh3) est un enzyme de la glycolyse identifié comme étant oxydé dans notre étude ainsi que par d'autres auteurs (Baty et al., 2005), (Brennan et al., 2004), (Cumming et al., 2004), (Shenton and Grant, 2003), (Leichert and Jakob, 2004). Cette protéine possède dans son centre catalytique un résidu cystéine très réactif, capable de s'oxyder *in vivo* sous différentes formes: nitrosylée, suroxydée, pont disulfure intermoléculaire avec le GSH (glutathionylation) ou avec elle même. La glutathionylation de la Tdh3 en présence d'agents oxydants permet de réguler la glycolyse en augmentant la production de NADPH par la voie des pentoses-phosphates (Shenton and Grant, 2003). L'absence de GSH peut conduire à la suroxydation de la cystéine, provoquant l'inactivation de Tdh3 (Shenton and Grant, 2003). La suroxydation de la GAPDH a d'ailleurs été décrite chez les mammifères (Woo et al., 2005). La nitrosylation de la GAPDH provoque sa liaison avec l'ubiquitine ligase Siah1, conduisant à sa translocation nucléaire puis à l'apoptose (Hara et al., 2005). La GAPDH peut aussi se complexer avec elle-même et former des agrégats liés entre eux par des ponts disulfures intermoléculaires que l'on retrouve dans la maladie neurodégénérative d'Alzheimer (Cumming and Schubert, 2005). Certaines protéines intervenant dans la traduction ont également été décrites comme étant oxydées *in vivo* (Cumming et al., 2004) ou glutathionylées (Shenton and Grant, 2003), (Fratelli et al., 2002), ces formes d'oxydation étant éventuellement capables d'inhiber la synthèse protéique. Les chaperons appartenant à la famille des HSP70 sont aussi capables de former des ponts disulfure intra/intermoléculaires (Brennan et al., 2004), (Cumming et al., 2004) ou d'être glutathionylés (Fratelli et al., 2002), (Shenton and Grant, 2003). Les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine ont également été détectées sous forme glutathionylée (Fratelli et al., 2002) et peuvent être régulées de façon redox (Obin et al., 1998).

Conclusion

La majorité des protéines oxydées que nous avons identifiées dans cette étude sont également retrouvées dans d'autres analyses similaires effectuées chez différents organismes, indiquant d'une part, la reproductibilité des résultats et d'autre part, la conservation des mécanismes d'oxydation entre les différentes espèces. Cependant, la signification physiologique de l'oxydation d'un bon nombre de ces protéines reste à élucider. Les protéines que nous avons identifiées comme

appartenant à différentes classes fonctionnelles sont très fortement exprimées à l'échelle du protéome, et nous n'avons aucune information pour les protéines de faible abondance. Ceci justifie pleinement l'étape d'égalisation des protéines avant leur purification.

2. Identification des protéines oxydées après égalisation

Nous avons effectué la purification des protéines oxydées à partir d'une souche sauvage égalisée ou non (figure 18). Les protéines extraites en milieu natif sont incubées avec les billes-E et les protéines du surnageant des billes sont récoltées (extrait non égalisé); les protéines ayant fixé les billes-E sont ensuite éluées (extrait égalisé). Les protéines oxydées de ces deux fractions sont alors marquées par la Biotine-HPDP, purifiées sur résine de streptavidine et soumises à une électrophorèse bidimensionnelle révélée par coloration au bleu de Coomassie (figure 18A et B).

Les nouvelles protéines oxydées apparaissant dans l'extrait égalisé sont excisées pour être identifiées en spectrométrie de masse MALDI-TOF. La comparaison des deux gels montre clairement l'efficacité de la méthode d'égalisation: les massifs de protéines oxydées abondantes diminuent fortement (Tdh3, Fba1, Pdc1, Eno2, Met6 et Aco1) et une quantité de nouvelles protéines oxydées apparait. Nous avons ainsi pu identifier 18 nouvelles protéines oxydées que nous avons répertoriées dans le tableau 1 et annotées en rouge sur le gel (figure 18B). Ces dernières se répartissent dans les principales catégories fonctionnelles décrites précédemment. Malheureusement, 14 autres protéines n'ont pas pu être identifiées formellement (spots entourés, figure 18B). Nous avons donc réussi à identifier dans une souche sauvage 18 protéines oxydées sur les 32 nouveaux spots, en plus des 59 que nous avons déjà identifiées (Le Moan et al., 2006). Cette expérience montre bien la puissance de la méthode d'égalisation, c'est à dire l'efficacité de l'enrichissement des protéines faiblement abondantes.

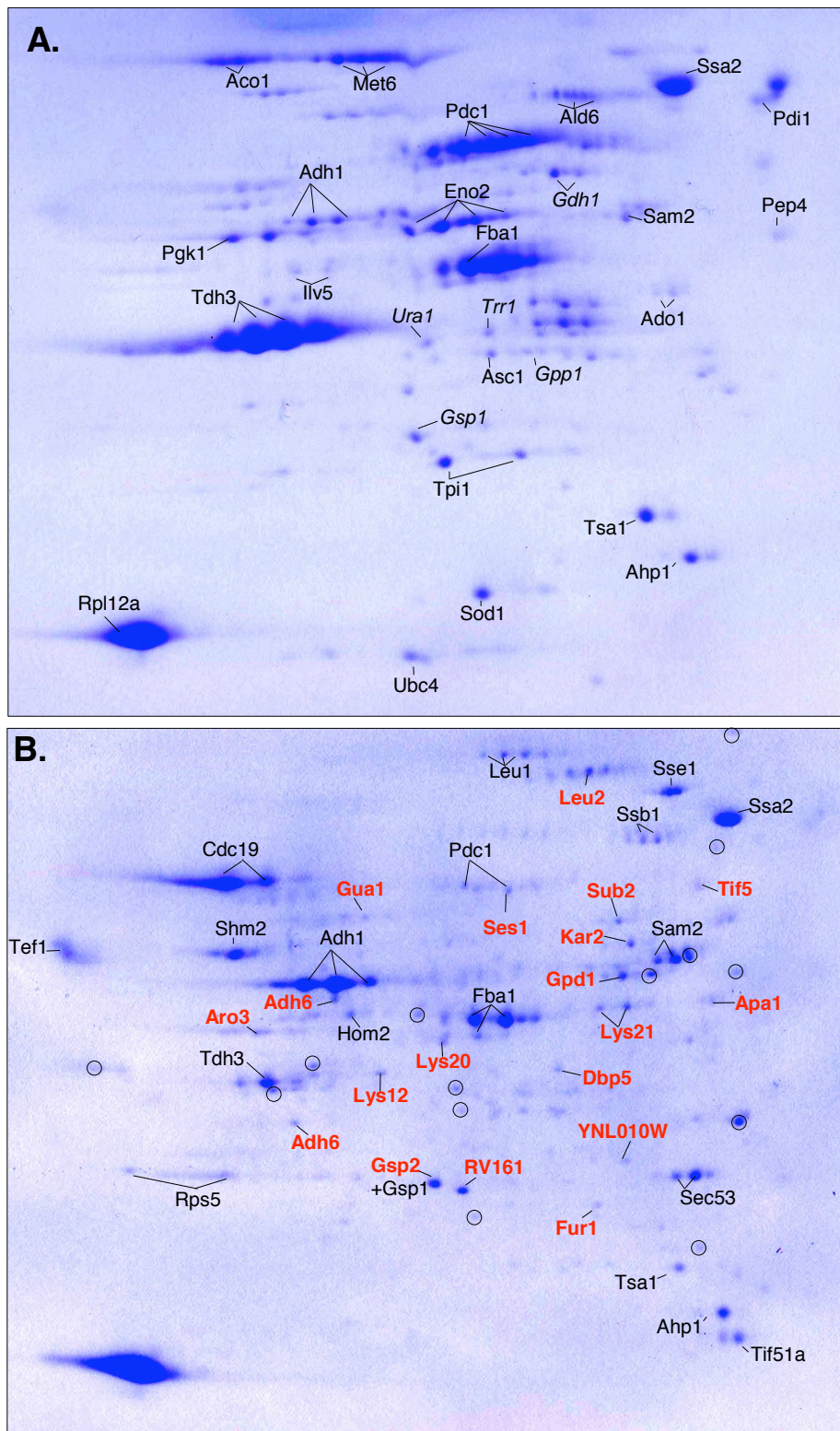


Figure 18. Identification des protéines oxydées purifiées par la méthode de Biotine-HPDP à partir d'un extrait égalisé (B) ou non (A) d'une souche sauvage.

Les protéines oxydées purifiées à partir d'extrait égalisés ou non comme indiqué dans la figure 14 sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par coloration au bleu de Coomassie. Les protéines identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF sont indiquées en rouge dans la figure B et dans le tableau 1. Les protéines dont l'identification a échoué sont encadrées en B.

C. Etude de l'altération de l'état redox du résidu cystéine

1. Croissance en conditions anaérobiques

Le métabolisme aérobie est caractérisé par l'utilisation de l'oxygène moléculaire (O_2) comme accepteur final des électrons de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale, afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP. Or, la réduction incomplète de l' O_2 lors de la respiration produit, entre autres, de l' H_2O_2 susceptible de modifier l'état redox des groupements thiols des protéines. Nous avons étudié la contribution de l' O_2 dans l'oxydation des thiols en marquant les thiols oxydés par le NEM C^{14} en présence (aérobie) et en absence d'oxygène moléculaire (anaérobie).

Les cellules en phase de croissance exponentielle sont cultivées pendant 8 heures en aérobie ou en anaérobie. Nous ajoutons le TCA dans le milieu de culture (blocage de la réactivité des thiols) en respectant les conditions anaérobiques. Les protéines sont ensuite extraites et les thiols oxydés sont marqués par le NEM C^{14} . Après électrophorèse bidimensionnelle, les protéines sont révélées par autoradiographie (figure 19). L'absence d' O_2 provoque une diminution drastique de l'intensité du signal radioactif, signifiant que l'oxydation des thiols dépend essentiellement de l'oxygène moléculaire. La disparition incomplète du signal peut être attribuée soit à des conditions anaérobiques partielles, soit à un mécanisme d'oxydation des thiols indépendant de l' O_2 . Nous soupçonnons plutôt une anaérobie partielle, car l'oxydation de la Sod1 persiste (flèche), indiquant la présence d'anion superoxyde (substrat de Sod1) et par conséquent d' O_2 . En effet, en anaérobie Sod1 est réduite et inactive (Furukawa et al., 2004), (Brown et al., 2004). Il est possible que 8 heures d'anaérobie ne suffisent pas à abolir l'expression de la Sod1 et l'accroissement de la durée de l'anaérobie (supérieure à 48 heures) provoquerait probablement l'extinction complète de son signal, signe d'une anaérobie stricte.

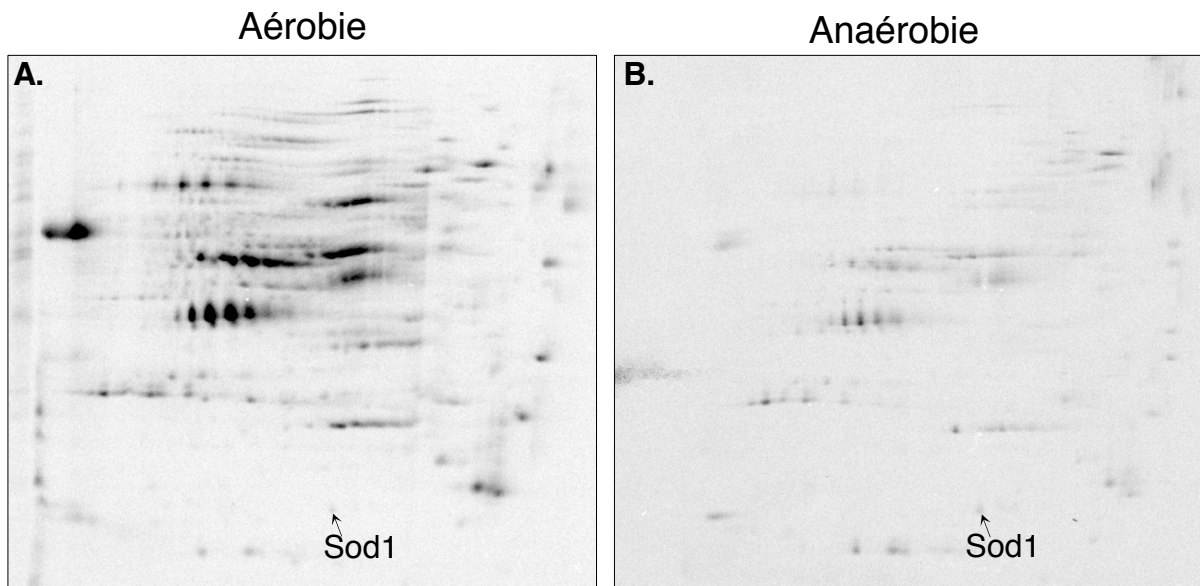


Figure 19. Variation de l'état d'oxydation des thiols en anaérobiose.

Les protéines sont extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage cultivée en aérobie (A) ou 8 heures en anaérobiose (B). Après marquage des thiols oxydés par le NEM C¹⁴, 100 µg de protéines sont soumises à une migration bidimensionnelle et révélées par autoradiographie avec le Phosphorimager après 1 mois d'exposition.

Nous remarquons également que l'absence d'O₂ provoque une diminution de l'oxydation des peroxydases Tsa1 et Ahp1, en adéquation avec leur activité de réduction de l'H₂O₂ (voir introduction III.B.1a). Le signal de la Pdi1 est également diminué en anaérobiose car l'oxydation de cette protéine (Frand and Kaiser, 1999) est catalysée par la sulfhydryle oxydase Ero1 dont l'activité dépend de l'O₂ (Tu and Weissman, 2002), (voir introduction IV.A.2 et 3). L'oxydation de nombreuses autres protéines diminue aussi en anaérobiose, alors que le mécanisme d'oxydation de leurs thiols reste inexpliqué.

Ce résultat nous amène à nous interroger sur les mécanismes d'oxydation des protéines: sont-elles oxydées par l'H₂O₂ dérivé de l'oxygène moléculaire ou directement par les équivalents oxydants de l'O₂? Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'effet d'un traitement H₂O₂ sur les cellules.

2. Effet d'un traitement au peroxyde d'hydrogène

Nous savons que les cystéines sont des résidus très réactifs et que le groupement thiol sous forme déprotonée thiolate (-S⁻) peut réagir directement avec l'H₂O₂ pour former un acide sulfénique (-SOH), sulfonique (SO₂H) ou sulfonique (SO₃H) (voir introduction I.B). Nous avons cherché à identifier les protéines

contenant des thiols réactifs à l' H_2O_2 . Pour cela, une souche sauvage en phase de croissance exponentielle est exposée (figures 20B et D, 21B) ou non (figures 20A et 21A) à l' H_2O_2 avant d'ajouter le TCA dans le milieu de culture. Après extraction des protéines, les thiols oxydés sont marqués soit par du NEM C^{14} (figure 20), soit par du NEM fluorescent (figure 21). Les protéines sont alors soumises à une électrophorèse monodimensionnelle (figure 20D) ou bidimensionnelle (figures 20A et B et 21).

A première vue, l'oxydation des thiols semble peu altérée en réponse à 1 mM de peroxyde d'hydrogène pendant 1 minute (comparer les figures 20A et B). Cependant, la quantification de la variation de l'oxydation des protéines, en présence ou en l'absence d' H_2O_2 à l'aide de l'indice d'oxydation I_{ox} , nous permet de montrer une modification significative de l'état d'oxydation de certaines protéines. Cette modification ne résulte pas d'une variation de leur expression puisque la durée d'exposition à l' H_2O_2 (1 minute) ne le permet pas (Godon et al., 1998).

Quand cela était possible, nous avons calculé un I_{ox} en présence et en absence de peroxyde, puis le rapport des indices d'oxydation [$I_{\text{ox}(\text{H}_2\text{O}_2)}/I_{\text{ox}(\text{non traité})}$] nous a permis de quantifier la variation de l'oxydation des thiols en présence d' H_2O_2 (tableau 1). La plupart des protéines possèdent un rapport compris entre 0,8 et 2, excepté sept protéines (Ahp1, Tdh3, Ald6, Cdc19, Pdc1, Cys4 et Ipp1) dont le rapport est supérieur à 2 (figure 20C). Cinq autres protéines possèdent un rapport d' I_{ox} inférieur à 0,6 (Ubc1, Ubc4, Efb1, Sec53 et Tma19) (tableau 1). Cette diminution du rapport résulte probablement de la formation d'acide sulfinique ou sulfonique sur certains résidus cystéines, les rendant ainsi inaccessibles au marquage par le NEM C^{14} . De façon surprenante, le rapport des I_{ox} de la peroxydase Tsa1 oxydée sous forme de disulfure par son substrat H_2O_2 n'augmente que d'un facteur 1,8. Ce rapport peu élevé s'explique par l'apparition d'une forme de Tsa1 suroxydée ($-\text{SO}_2\text{H}$) plus acide (voir figure 20C encadré 6), non prise en compte dans le calcul du I_{ox} . Nous pouvons également préciser que la détection de la suroxydation de la cystéine catalytique dans le protéome oxydé implique que la cystéine résolvative d'un premier monomère de Tsa1 forme probablement un pont disulfure intermoléculaire avec la cystéine d'un autre monomère de Tsa1.

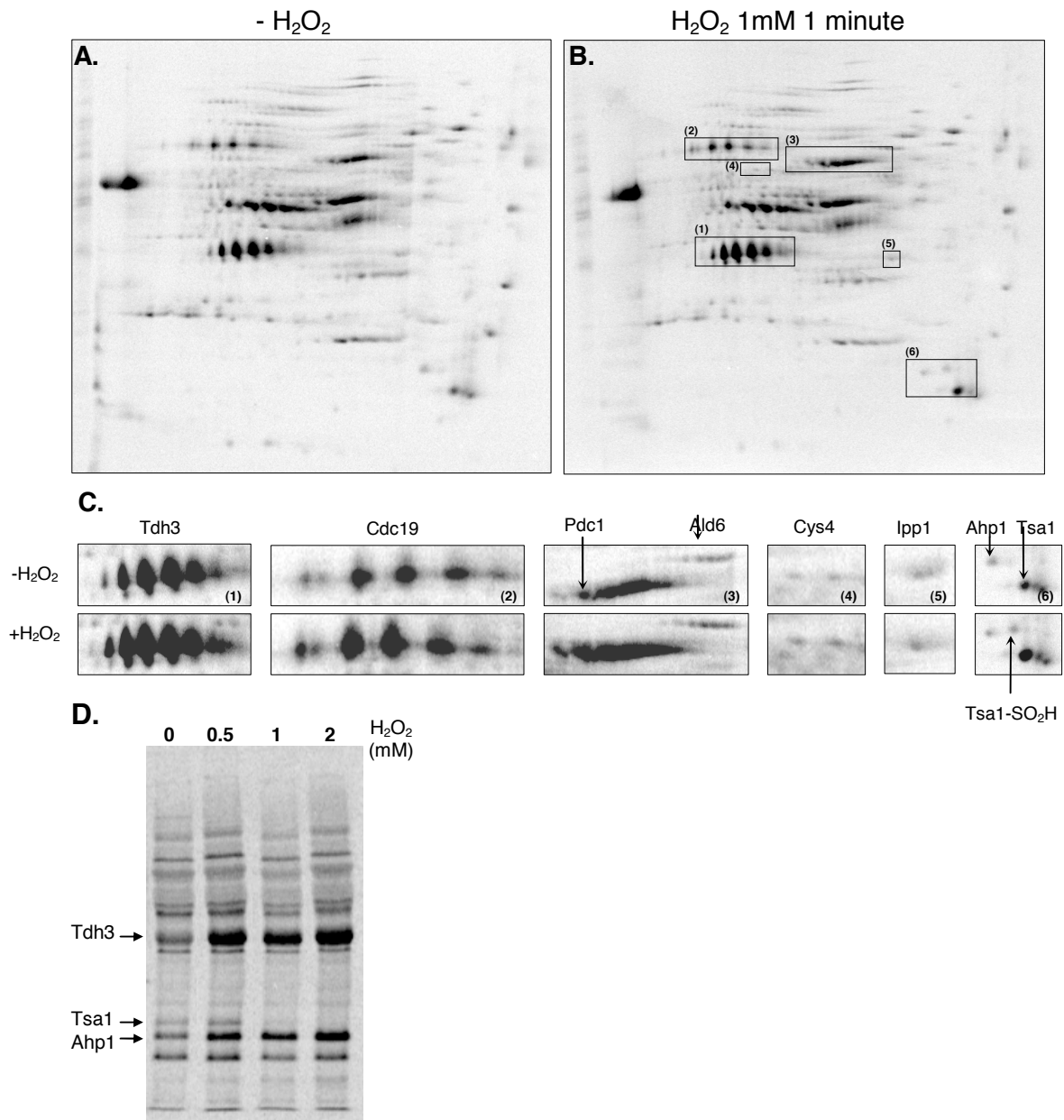


Figure 20. Variation de l'oxydation des thiols en réponse au peroxyde d'hydrogène.

Les protéines sont extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage non traitée (A), traitée avec 1mM de peroxyde d'hydrogène pendant 1 minute (B), traitée avec les concentrations d' H_2O_2 indiquées pendant 1 minute (D). Les protéines oxydées sont marquées par le NEM C^{14} puis 100 μg de protéines sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle (A-B) ou 20 μg de protéines sont déposées sur un gel SDS-PAGE en l'absence de réducteurs (D). Les protéines marquées sont ensuite révélées par autoradiographie avec le Phosphorimager. Un agrandissement des encadrés du gel B est présenté en C.

Nous avons également analysé la variation de l'oxydation des protéines en réponse à différentes concentrations d'H₂O₂ appliquées pendant 1 minute (figure 20D). L'ensemble du protéome semble inchangé à l'exception de trois protéines dont l'oxydation augmente en fonction de la concentration en H₂O₂ (Tdh3, Ahp1 et Tsa1) ou disparaît aux fortes doses de peroxyde d'hydrogène (Tsa1). Cette fois, le marquage de Tsa1 par le NEM C¹⁴ disparaît complètement à de très fortes doses d'H₂O₂ (2mM) (figure 20D), probablement à cause l'apparition d'une modification de ses cystéines sous une forme oxydée non réductible par le DTT, donc non marquée. Parallèlement, nous avons aussi réalisé le marquage des thiols réduits et oxydés par le NEM fluorescent après un traitement d'H₂O₂ (figure 21). Nous confirmons avec cette méthode l'augmentation importante de l'oxydation de Tdh3, Tsa1 et Ahp1, émettant un signal vert, et la disparition de Tsa1, du à sa suroxydation. En plus des peroxydases, la Tdh3 apparait donc comme une protéine très réactive à l'H₂O₂, mais la signification physiologique de cette réactivité reste inexpliquée.

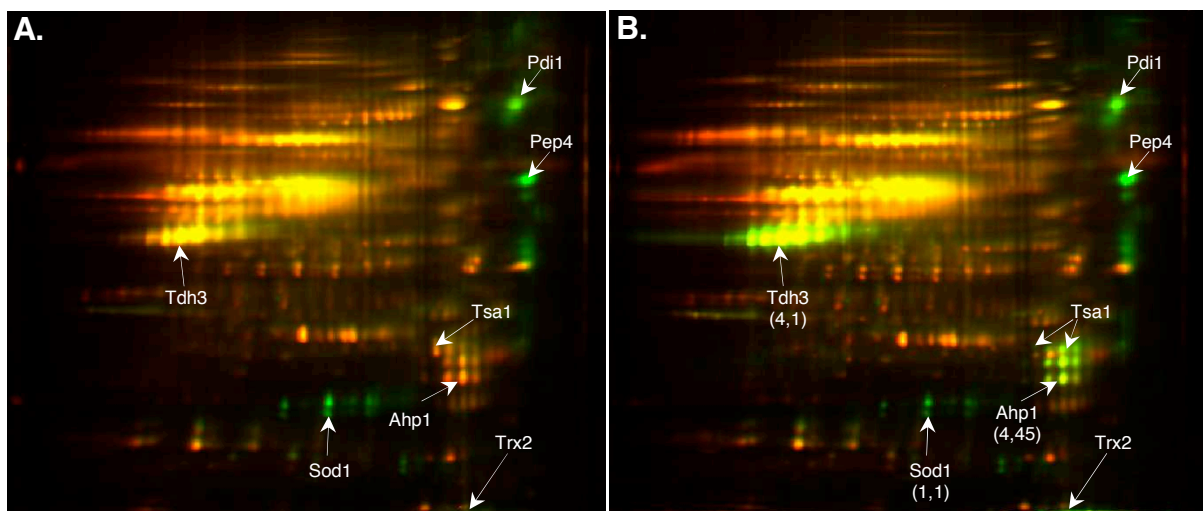


Figure 21. Variation de l'état redox des thiols en réponse au peroxyde d'hydrogène.

Les protéines sont extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage (A) non traitée, (B) traitée avec 1mM de peroxyde d'hydrogène pendant 2 minutes. Les protéines réduites et oxydées sont marquées de façon différentielle par le NEM fluorescent puis 5µg de protéines sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par fluorimétrie avec l'Odyssey®. Les ΔI_{ox} ($[S_V/S_R]^{traité} / [S_V/S_R]^{non\ traité}$) mesurés avec l'Odyssey sont indiqués entre parenthèses pour Tdh3, Ahp1 et Sod1.

Conclusion

Notre étude montre que le peroxyde d'hydrogène ne provoque pas de phénomène appelé «stress disulfure» (Derman et al., 1993), correspondant à des oxydations aberrantes des protéines. Au contraire, l'H₂O₂ produit une augmentation de l'oxydation d'un ensemble spécifique de protéines déjà oxydées en l'absence de traitement. Cette oxydation spécifique des protéines par l'H₂O₂ a également été observée par d'autres auteurs chez *E.coli* (Leichert and Jakob, 2004), *S.cerevisiae* (Shenton and Grant, 2003) (Minard et al., 2007), ou les mammifères (Baty et al., 2005), (Cumming et al., 2004) (tableau 1). Sachant que l'intégralité du protéome oxydé est affectée en anaérobie tandis que l'H₂O₂ ne provoque l'oxydation que d'un ensemble restreint de protéines, ceci suggère que tous les résidus cystéines ne possèdent pas la même réactivité vis-à-vis des peroxydes et que l'oxydation des thiols n'est pas exclusivement réalisée par des peroxydes.

3. Effet de l'absence d'une des deux voies cytoplasmiques de réduction des thiols

Comme je l'ai dit dans l'introduction, deux systèmes majeurs assurent la réduction des protéines cytoplasmiques contenant des cystéines oxydées: la voie des thiorédoxines et la voie du glutathion (voir introduction III et schéma 6). Afin d'évaluer *in vivo* la contribution respective des voies des thiorédoxines et du glutathion dans la réduction des thiols cytoplasmiques, nous avons invalidé l'une et l'autre de ces deux voies et analysé les conséquences de ces mutations sur le protéome oxydé.

a. Invalidation de la voie des thiorédoxines

Cette voie de réduction est composée de la Thiorédoxine Réductase à FAD (Trr1), et des deux Thiorédoxines (Trx1 et Trx2).

i. $\Delta trr1 \Delta trx1 \Delta trx2$

Il faut donc réaliser une triple invalidation pour éliminer l'intégralité de ce système de réduction $\Delta trr1 \Delta trx1 \Delta trx2$. Les protéines de cette souche sont extraites en milieu acide et les thiols oxydés sont marqués soit par le NEM C¹⁴ (figure 22), soit par la Biotine-HPDP, pour leur purification ultérieure (figure 23). Après une électrophorèse 2D, les protéines marquées sont révélées par autoradiographie (figure 22), et les protéines purifiées sont détectées par coloration au bleu de

Coomassie (figure 23). Dans la souche sauvage et $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$, nous observons une répartition similaire entre les protéines oxydées marquées par le NEM C¹⁴ et les protéines purifiées par la Biotine-HPDP (figures 22-23 A et B et figures 23C et D). Cependant, dans les faibles poids moléculaires des gels correspondant à la souche sauvage et $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$, deux phénomènes distincts se produisent très nettement: de nouvelles protéines oxydées apparaissent suite à l'invalidation de la voie des thiorédoxines, et certaines protéines oxydées de la souche sauvage augmentent en intensité dans la souche mutante (Sod1, Tsa1, Pep4, Pdi1 et Ahp1).

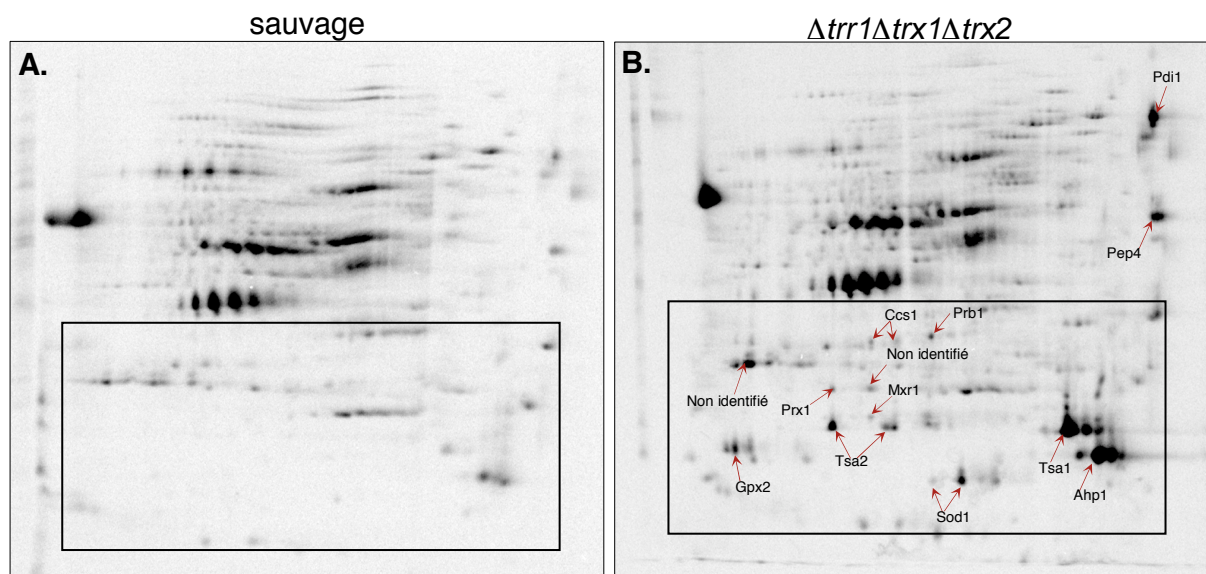


Figure 22. Altération de l'oxydation des protéines dans une souche invalidée pour la voie des thiorédoxines de réduction des thiols cytoplasmique.

Les protéines sont extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage (A) ou invalidée pour les gènes *TRR1*, *TRX1* et *TRX2* (B). Les protéines oxydées sont alors marquées par le NEM C¹⁴, puis 100 μ g de protéines sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par autoradiographie avec le Phosphorimager. Les flèches rouges indiquent les protéines dont le signal radioactif détecté augmente.

Les nouvelles protéines oxydées

Nous avons pu identifier les protéines apparaissant dans la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ comme étant Tsa2, Prx1, Gpx2, Mxr1 (Méthionine Sulfoxyde Réductase) et Ccs1 (Copper Chaperone for Sod1) (figures 22 et 23). Les protéines Tsa2, Prx1 et Gpx2 sont des peroxydases qui réduisent les peroxydes selon un mécanisme similaire à celui de la Tsa1 (voir introduction III.B.1a). La protéine Mxr1 possède une cystéine catalytique, qui en réduisant les méthionines sulfoxydes (Met-

SO), s'oxyde en acide sulfénique qui se condense ultérieurement avec une autre cystéine au sein de Mxr1 pour former un pont disulfure intramoléculaire (revu par (Boschi-Muller et al., 2005)). La protéine Ccs1 forme un pont disulfure intermoléculaire avec son substrat, la Sod1, pour catalyser le transfert du cuivre et la formation du pont disulfure intramoléculaire de Sod1 (Furukawa et al., 2004). Récemment, nous avons identifié une autre protéase vacuolaire en plus de Pep4: Prb1, dont l'apparition dans le mutant $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ est inexpliquée.

Variation de l'expression des protéines

L'augmentation de l'intensité de marquage des thiols de certaines protéines (Sod1, Tsa1, Pep4, Pdi1 et Ahp1), ainsi que l'apparition de nouvelles protéines oxydées (Tsa2, Prx1, Gpx2, Mxr1, Ccs1 et Prb1) peuvent être attribuées, en plus d'une augmentation de leur oxydation, à une modification de leur expression. Afin de déceler d'éventuelles différences d'expression, les protéines extraites en milieu acide à partir des deux souches sont solubilisées dans un tampon dénaturant contenant de l'IAM, soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par coloration au bleu de Coomassie (figure 23E et F). Dans ces extraits totaux, nous observons que l'expression de Tsa1, Tsa2, Ahp1, Sod1, Prx1 et Gpx2 augmente dans la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ (figure 23F, flèches jaunes). Par conséquent, la majorité des protéines oxydées dont le signal radioactif augmente dans la souche mutante est plus fortement exprimée, excepté Mxr1, Ccs1, Prb1, Pep4 et Pdi1. Cette augmentation de l'expression est due à l'activation constitutive du facteur de transcription Yap1, caractéristique de la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ (Delaunay et al., 2000), (Izawa et al., 1999), (Carmel-Harel et al., 2001), conduisant à l'induction ininterrompue de ses gènes cibles. Les protéines Tsa1, Tsa2, Ahp1, Sod1, Prx1 et Gpx2 sont des protéines dont l'induction dépend directement de Yap1 (Lee et al., 1999a).

Quantification de l'oxydation des protéines

Le marquage différentiel des thiols oxydés par le NEM C^{14} nous permet encore une fois de quantifier la variation de l'oxydation des protéines entre la souche sauvage et la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$, à l'aide de l'indice d'oxydation I_{ox} . Nous avons donc calculé le rapport des I_{ox} obtenus dans chacune des deux souches [$I_{ox(\Delta trr1,\Delta trx1,\Delta trx2)}/I_{ox(sauvage)}$] quand cela était possible et répertorié ces valeurs dans le tableau 1. Or, à cause des paramètres S_{tot} et N^{cys} , le calcul de l' I_{ox} tient compte de la

quantité totale de protéines, c'est-à-dire de leur expression. Ainsi, le rapport des I_{ox} varie de façon modérée pour les protéines Tsa1, Ahp1 et Sod1, plus fortement exprimées dans la souche mutante, alors que leur état d'oxydation semble plus important que ce que reflète le rapport des I_{ox} .

Variation de l'oxydation des protéines

Malgré l'augmentation de l'expression de certaines protéines, l'augmentation de l'intensité du marquage des thiols ainsi que l'apparition de nouvelles protéines oxydées dans la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ peuvent être attribuées à une augmentation de leur oxydation. En effet, les cinq peroxydases Ahp1, Tsa1, Tsa2, Prx1, Gpx2 et la Mxr1 nécessitent la présence d'une voie des thiorédoxines intacte pour fournir les électrons indispensables à leur réduction (voir introduction III.B.1). L'absence des thiorédoxines conduit logiquement à une augmentation de leur oxydation. Nous remarquons également que le point isoélectrique de certaines protéines oxydées est modifié (Tsa1, Tsa2, Ahp1, Sod1, Ccs1) ce qui se traduit par l'apparition d'isoformes plus acides ou basiques, correspondant probablement à des modifications post-traductionnelles covalentes ou à des modifications de l'état redox des thiols.

Conclusion

De la même manière que l'addition d' H_2O_2 sur une souche sauvage, l'invalidation de la voie des thiorédoxines ne provoque pas de formation de ponts disulfures illégitimes (Derman et al., 1993), mais conduit plutôt à une accumulation très sélective de protéines oxydées. Cependant, les nouvelles protéines oxydées identifiées dans la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ n'ont pas été détectées après le traitement à l' H_2O_2 , démontrant ainsi l'efficacité de cette voie dans la réduction des thiols oxydés. Nous pouvons donc dire que la voie des thiorédoxines joue un rôle primordial dans le métabolisme du peroxyde d'hydrogène, en éliminant indirectement les peroxydes, par la réduction des peroxydases, de Mxr1 et de Yap1.

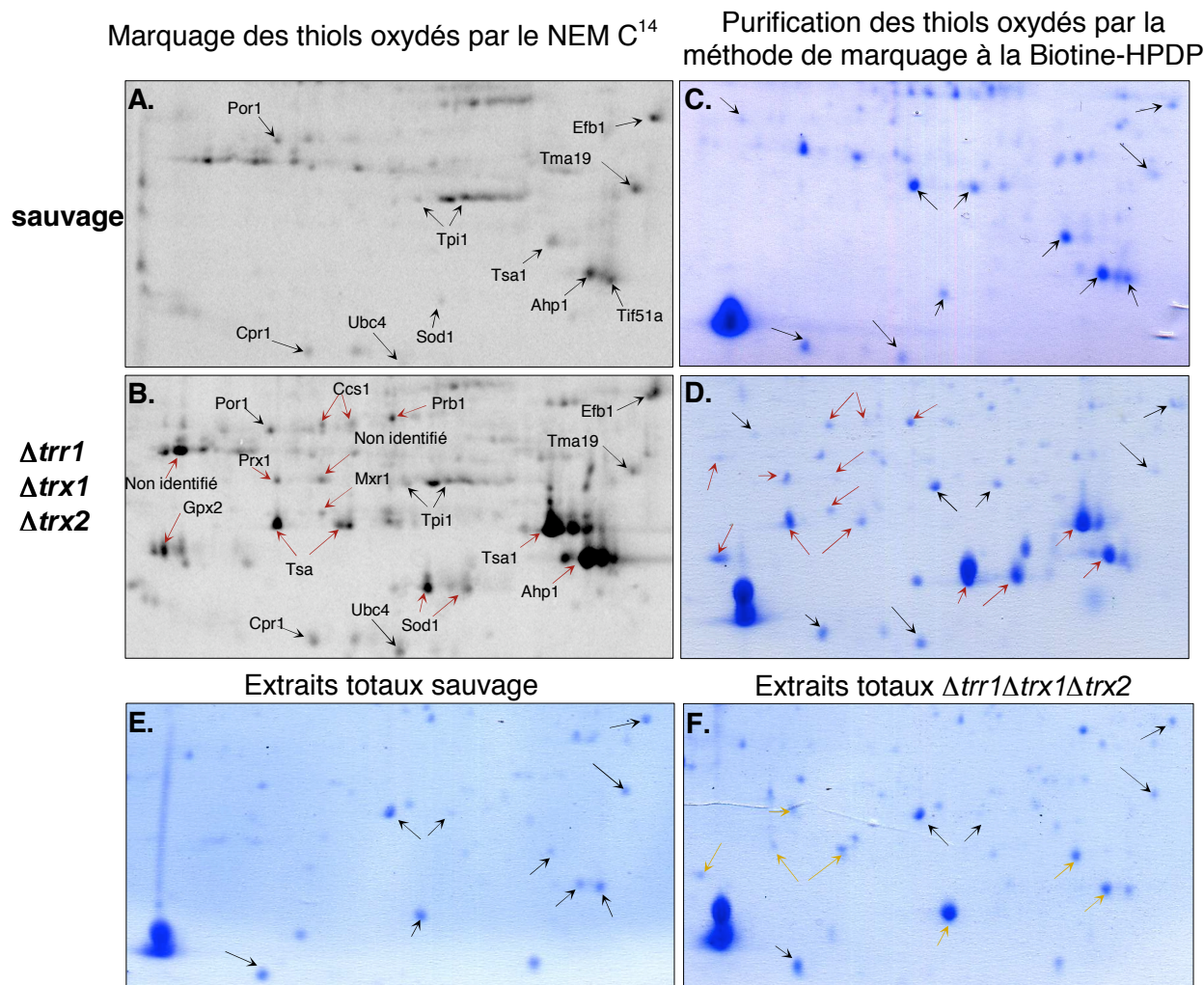


Figure 23. Comparaison de l'altération de l'oxydation des protéines entre la souche sauvage (A, C et E) et la souche invalidée pour la voie des thiorédoxines (B, D et F).

Les protéines extraites en milieu acide à partir de ces deux souches sont soit solubilisées en tampon dénaturant contenant de l'IAM (E-F), soit soumises au marquage des thiols oxydés par le NEM C¹⁴ (A-B) ou par la Biotine-HPDP (C-D), suivi de leur purification. Les protéines sont ensuite soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par autoradiographie (A-B) ou par coloration au bleu de Coomassie (C-F). Ces agrandissements correspondent aux encadrés de la figure 22.

ii. $\Delta trr1$

Nous avons également décidé d'analyser la souche $\Delta trr1$ qui présente un défaut de croissance et une sensibilité aux peroxydes, supérieurs à ceux de la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ (Trotter and Grant, 2003) (données non publiées du laboratoire), et susceptibles de nous fournir plus d'informations sur la participation de cette voie dans la réduction des thiols. Nous avons tout d'abord voulu savoir si la purification des protéines oxydées à partir d'extraits égalisés nous permettait

d'obtenir des différences significatives entre la souche sauvage et la souche $\Delta trr1$. Les protéines oxydées purifiées à partir d'extraits égalisés (E) ou non (NE), issus des deux souches sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle, révélées par coloration au bleu de Coomassie et détectées par l'Odyssey[®] (figure 24A). Nous observons l'apparition de nombreuses protéines oxydées dans la $\Delta trr1$, absentes chez la sauvage. Pour identifier ces nouvelles protéines, nous avons modifié certaines étapes de notre précédent protocole expérimental afin de réaliser une analyse plus exhaustive. Premièrement, nous avons utilisé deux types de billes égalisatrices afin d'élargir le spectre de protéines égalisées et deuxièmement, nous avons remplacé l'analyse MALDI-TOF-MS par la LC-MS/MS, afin d'identifier directement le mélange complexe des protéines purifiées par la Biotine-HPDP à partir d'un gel 1D.

Les protéines extraites de la souche $\Delta trr1$ sont incubées en présence de billes-E ou SE et le surnageant des billes, appelé «NE_e et NE_{se}» est conservé; les protéines fixées au billes, appelées «E_e et E_{se}» sont ensuite éluées. Les protéines oxydées de ces quatre fractions NE_{se}, E_{se}, NE_e, E_e sont purifiées par la Biotine-HPDP, reprises dans un tampon dénaturant contenant du NEM et déposées sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (figure 24B).

L'identification des protéines par analyse LC-MS/MS a été réalisée à Bordeaux par l'équipe de S. Claverol: les fractions NE_{se}, E_{se}, NE_e, E_e que nous leur avons envoyées ont été déposées sur un gel SDS-PAGE 12% et révélées par une coloration au bleu Colloïdal. Chaque piste du gel a été découpée en 16 bandes pour l'analyse en LC-MS/MS. Ils ont pu ainsi identifier 600 protéines oxydées dans la souche $\Delta trr1$ (voir tableau 2). Parmi ces 600 protéines, 17 sont considérées identiques, et ce sont donc finalement 583 protéines oxydées qui ont été identifiées dans la souche $\Delta trr1$. Ce nombre de protéines est proche de celui que nous visualisons sur les gels 2D (voir figure 24A), cependant la méthode d'analyse MALDI-TOF ne nous a jamais permis d'obtenir un tel rendement de protéines identifiées. Nous avons organisé ces protéines selon différents critères afin de faciliter notre analyse: leur présence ou non après égalisation, leur localisation subcellulaire, leur abondance, leur point isoélectrique et leur appartenance à différentes classes métaboliques. Comme certaines protéines sont localisées dans plusieurs compartiments cellulaires et présentent dans différentes voies métaboliques, le

nombre total de protéines peut être supérieur à 583. Nous avons ensuite comparé ces données avec nos précédentes identifications.

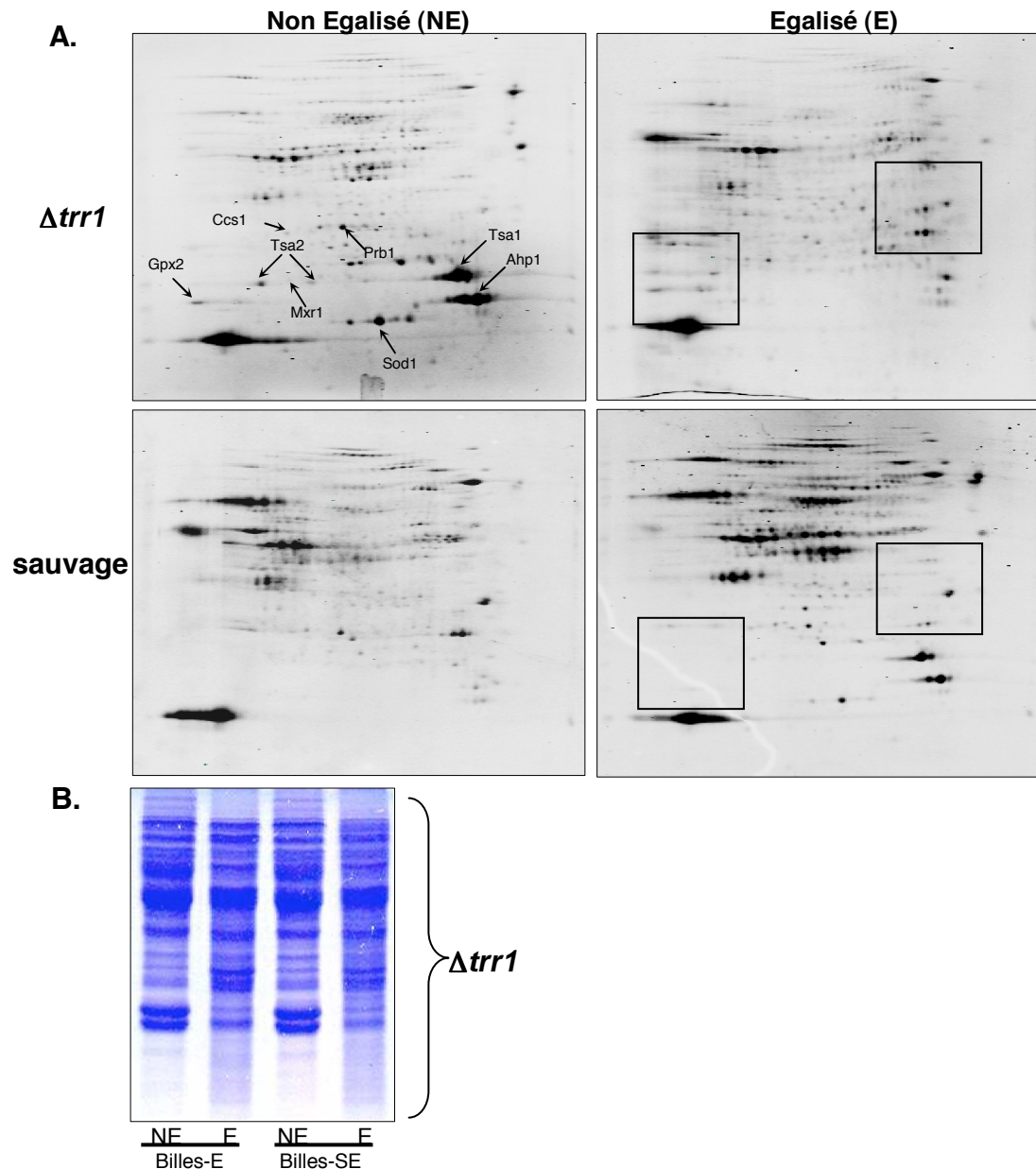


Figure 24. Identification des protéines oxydées purifiées à partir d'extraits égalisés ou non issus d'une souche invalidée pour le gène TRR1.

Les protéines extraites à partir d'une souche sauvage ou $\Delta trr1$ sont égalisées (E) ou non (NE) sur des billes-E ou SE, marquées par la Biotine-HPDP, purifiées, soumises à une électrophorèse bidimensionnelle (A) ou monodimensionnelle (B), et révélées par coloration au bleu de Coomassie suivie d'une détection par l'Odyssey® (A) ou non (B). (A) Comparaison des profils des protéines oxydées purifiées, après égalisation ou non sur des billes-E, entre une souche sauvage et $\Delta trr1$. (B) Les protéines oxydées purifiées à partir de la $\Delta trr1$ sont identifiées par spectrométrie de masse LC-MS/MS après découpe de 16 bandes par piste de chaque fraction NE_{se}, E_{se}, NE_e, E_e déposée sur un gel SDS-PAGE 12%. Les protéines identifiées sont répertoriées dans le tableau 2.

Nombre de protéines retrouvées dans les différentes fractions

Lorsque l'on compare le nombre de protéines oxydées identifiées à partir des différentes fractions NE_{se} , E_{se} , NE_e , E_e , on remarque que les extraits égalisés E_{se} et E_e contiennent respectivement 308 et 332 protéines dont 246 sont communes, indiquant une meilleure efficacité d'égalisation des billes-E (figure 25A). Parmi ces 246 protéines, 165 sont présentes dans les extraits non égalisés NE_{se} et NE_e (figure 25B), signifiant que 81 protéines sont exclusivement identifiées dans les fractions E. Parmi ces 81 protéines, 5 ont été identifiées dans nos précédentes analyses, et ce sont donc 76 nouvelles protéines qui sont identifiées grâce à l'égalisation. Les fractions NE_{se} et NE_e contiennent respectivement 388 et 405 protéines dont 337 sont communes (figure 25A). Ces fractions provenant de la même souche devraient être strictement identiques. Or, sur les 388 protéines de la fraction NE_{se} , 51 ne sont pas présentes dans le NE_e , et inversement sur les 405 protéines du NE_e , 68 ne sont pas retrouvées dans le NE_{se} . Ceci indique une différence de purification par la biotine-HPDP des protéines oxydées entre le NE_{se} et le NE_e . De plus, sur les 337 protéines communes aux fractions NE, 165 sont également identifiées dans les fractions E (figure 25B), indiquant que 172 protéines sont exclusivement identifiées dans le NE. Parmi ces 172 protéines, 52 ont été trouvées dans nos précédentes analyses, signifiant ainsi que nous avons identifié 120 nouvelles protéines dans le NE grâce à la méthode d'analyse LC-MS/MS, en plus des 165 communes avec les fractions E.

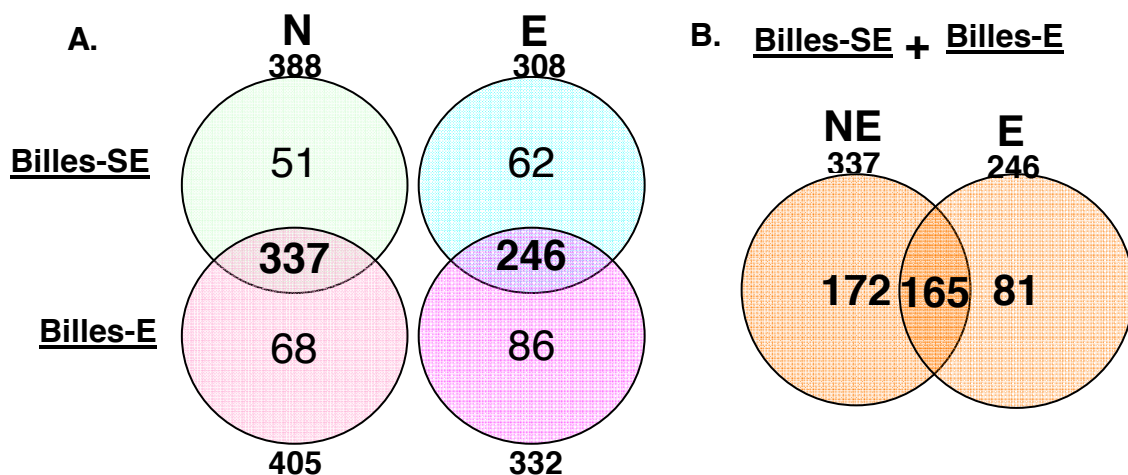


Figure 25. Etude du nombre de protéines oxydées identifiées dans chaque fractions NE_{se} , E_{se} , NE_e et E_e de la $\Delta trr1$.

Nombre de protéines identifiées exclusivement ou communément dans chaque fractions (A) ou dans les fractions NE et E (B). Le nombre de protéines n'atteint pas 600 car il existe 17 protéines identifiées comme étant similaires.

Localisation subcellulaire des protéines oxydées dans la $\Delta trr1$

La majorité des protéines oxydées identifiées sont localisées dans le cytoplasme (figure 26A), pareillement à notre précédente analyse (Le Moan et al., 2006). Si l'on compare la localisation de ces protéines oxydées avec la localisation de l'ensemble des protéines non oxydées de *S.cerevisiae* (Kumar et al., 2002) (figure 26B), on observe que les protéines sont localisées de façon similaire dans les compartiments intracellulaires, à l'exception des protéines nucléaires, sous-représentées dans notre protéome oxydé.

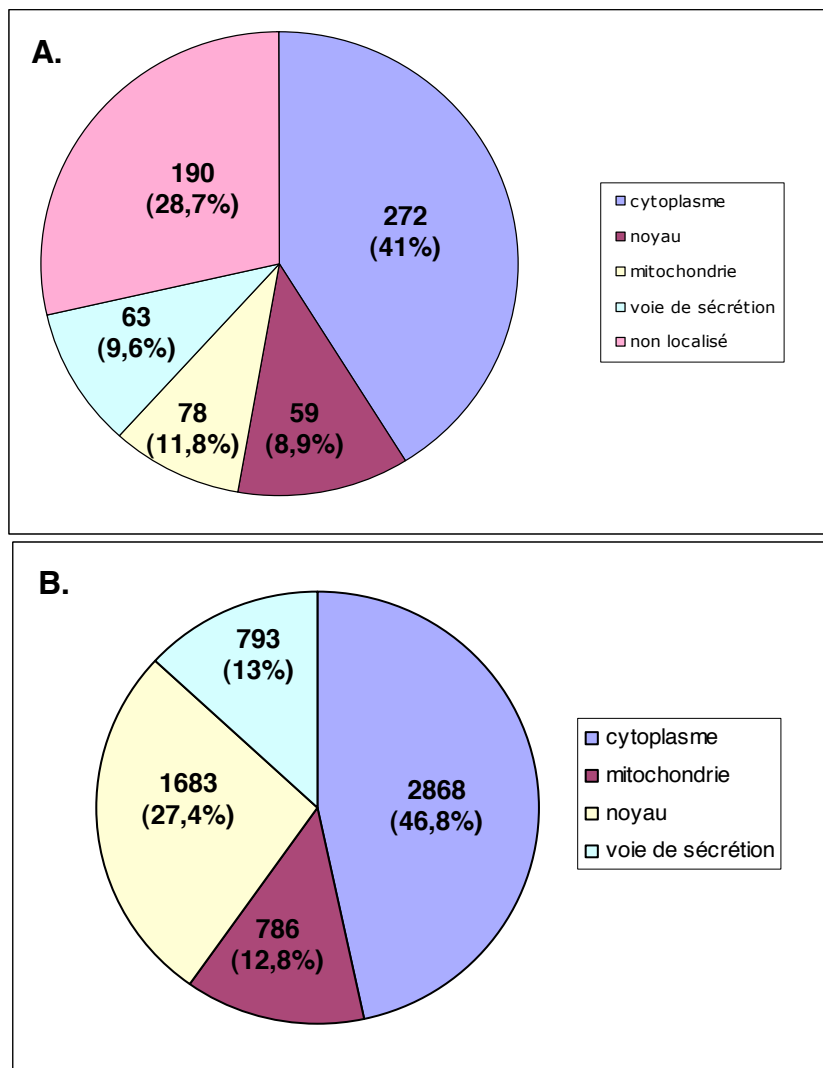


Figure 26. Répartition des protéines oxydées identifiées dans la $\Delta trr1$ en fonction de leur localisation subcellulaire (A) et comparaison avec le protéome entier de *S.cerevisiae* (B).

(A) Le nombre de protéines totales est supérieur à 583 car certaines protéines possèdent une double localisation. (B) Détermination de la localisation subcellulaire de 2744 protéines par immuno-localisation de protéines étiquetées puis extrapolation pour les 6100 protéines de *S. cerevisiae* (Kumar et al., 2002).

Comparaison de l'expression des protéines oxydées entre les extraits E et NE

Environ la moitié des protéines oxydées identifiées a une expression inférieure à 10200 molécules par cellule et la majorité n'est pas exprimée à plus de 51700 molécules par cellules (figure 27A). Nous observons également que les fractions égalisées E_e et E_{se} ne contiennent pas plus de protéines oxydées faiblement exprimées que les fractions NE_e et NE_{se} (figure 27B). Pourtant l'enrichissement des protéines faiblement exprimées entre les fractions E et NE était visualisé avant purification des protéines par la biotine-HPDP (voir figure 13B). Dans cette expérience, l'absence d'enrichissement des protéines peu abondantes entre E et NE indique que la purification des protéines oxydées enrichit à nouveau les protéines abondantes.

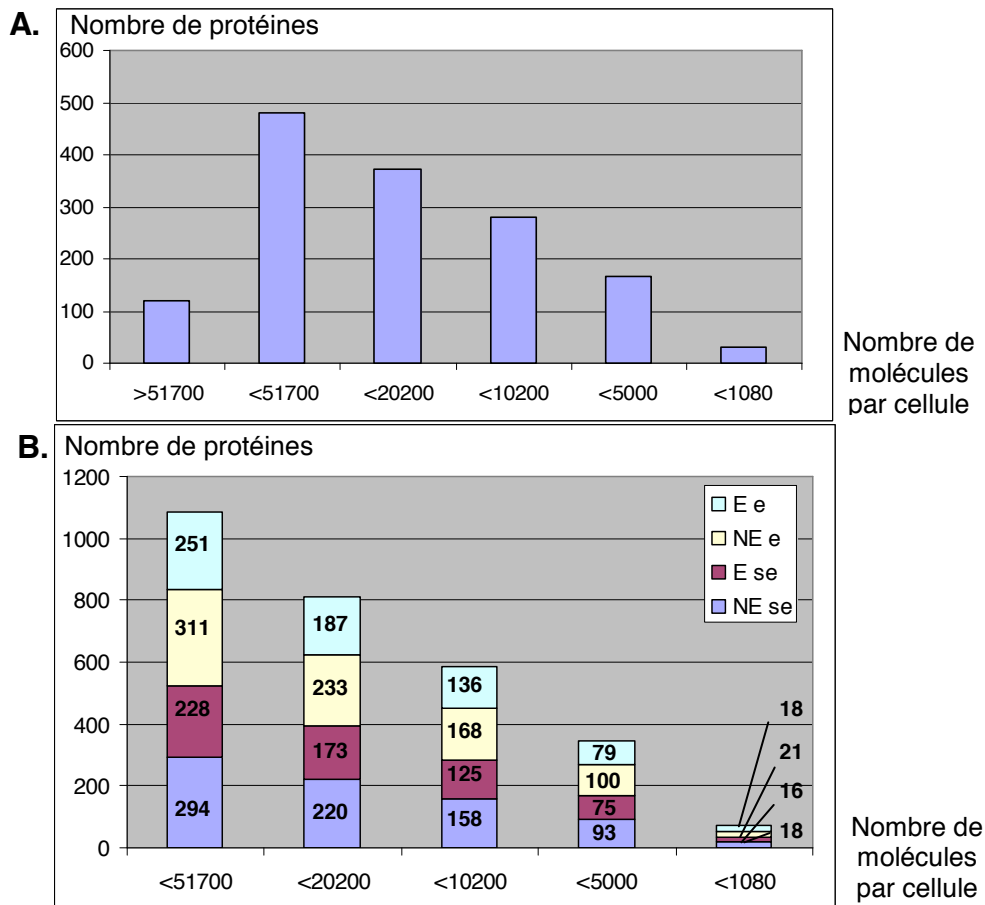


Figure 27. Répartition des protéines oxydées identifiées dans la $\Delta trr1$ en fonction de leur expression.

(A) Nombre de protéines identifiées en fonction de leur expression. (B) Nombre de protéines présentes dans chaque fraction en fonction de leur expression. L'expression de chaque protéine est déterminée à partir de la banque de données SGD «Saccharomyces Genome Database» (Ghaemmaghami et al., 2003).

Comparaison du point isoélectrique (PI) des protéines entre les extraits E_{se} et E_e

La majorité des protéines oxydées identifiées possède un point isoélectrique (PI) inférieur à 7,01 (figure 28A). D'autre part, les fractions NE contiennent plus de protéines ayant un $PI < 7,01$, alors que les fractions E contiennent plus de protéines ayant un $PI > 7,01$ (figure 28B), indiquant que l'égalisation augmente la proportion de protéines basiques. De plus, les fractions E_e contiennent plus de protéines acides ($PI < 5,01$) que les fractions E_{se} , ce qui est moins le cas des protéines basiques ($PI > 9,03$) (figure 28B). Cette dernière donnée corrèle avec les observations de Luc Guerrier (CIPHERGEN) à propos de l'affinité préférentielle des billes-E pour les protéines plus acides.

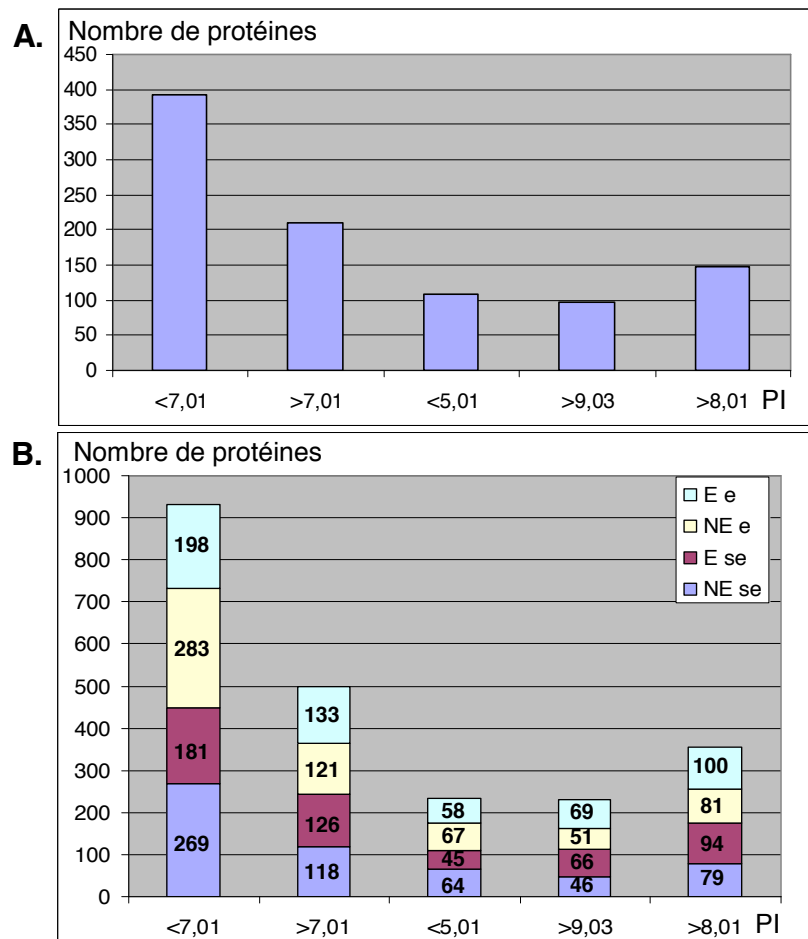


Figure 28. Répartition des protéines oxydées identifiées dans la $\Delta trr1$ en fonction de leur point isoélectrique (PI).

(A) Nombre de protéines identifiées en fonction de leur PI acide ou basique. (B) Nombre de protéines présentes dans chaque fraction en fonction de leur PI. La valeur théorique du PI en fonction de la composition en acides aminés des protéines est indiquée d'après les données de la banque SGD.

Analyse de l'appartenance des protéines oxydées aux différents métabolismes cellulaires

Les protéines oxydées identifiées appartiennent majoritairement au métabolisme des carbohydrates, des acides aminés, de la traduction et du trafic intracellulaire (figure 29). Nous avons observé une répartition similaire dans notre précédente analyse (Le Moan et al., 2006), sauf pour les protéines participant au trafic intracellulaire, localisées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. L'identification de ces dernières résulte probablement de leur enrichissement après égalisation et/ou de la modification de notre protocole d'extraction, compatible avec la lyse des organites du trafic intracellulaire (voir paragraphe B.3). Cette expérience nous a également permis d'identifier des protéines oxydées impliquées dans d'autres métabolismes cellulaires non représentés dans notre précédente étude, comme par exemple les protéines de la transcription, du métabolisme de l'AND et du cytosquelette. Dans cette dernière classe métabolique, l'actine a d'ailleurs été décrite comme potentiellement oxydée (Farah and Amberg, 2007). Nous pouvons également souligner la présence dans une souche $\Delta trr1$ d'un nombre non négligeable de protéines répondant à différents types de stress, en particulier le stress oxydant. Nous comparerons ultérieurement ces identifications avec celle d'une souche sauvage traitée dans les mêmes conditions, afin de mieux comprendre la participation de la voie des thiorédoxines dans la réduction des thiols.

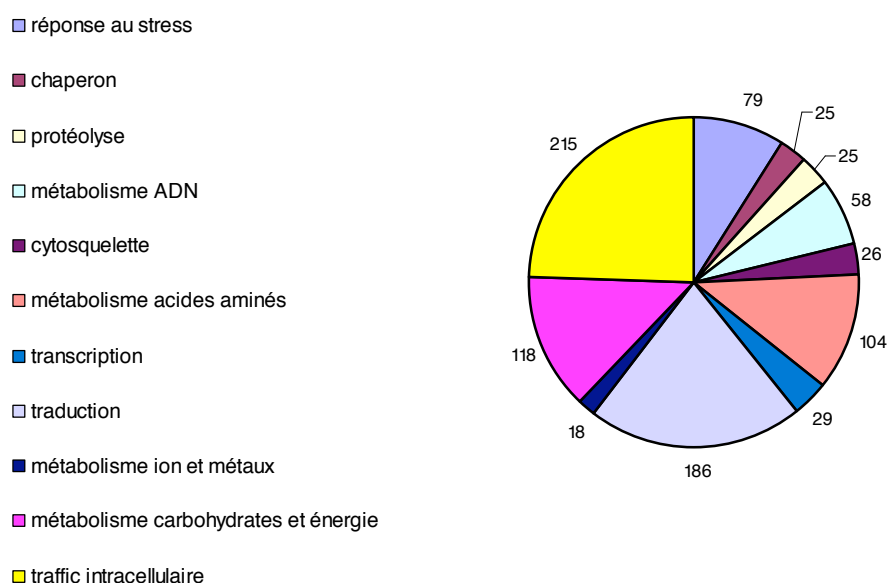


Figure 29. Répartition des protéines oxydées identifiées dans la $\Delta trr1$ en fonction de leur fonction cellulaire.

Nombre de protéines identifiées dans chaque classe métabolique. Le nombre de protéines totales est supérieur à 600 car certaines protéines possèdent une double fonction. De nombreuses protéines oxydées identifiées dans la $\Delta trr1$ participent à l'élimination des oxydants (Peroxydases: Tsa1, Tsa2, Ahp1, Prx1, Ccp1, Gpx2, Gpx3/Orp1; Thiol-transférases: Grx1, Trx2; Réductase: Glr1; Superoxyde dismutase: Sod1, Sod2; Catalase: Ctt1; Sulfiredoxine: Srx1) ou à la formation de ponts disulfures (Flavine oxydase: Ero1 et thiol-oxydase: Pdi1)

Comparaison des protéines impliquées dans des mécanismes redox avec nos précédentes analyses

De manière non surprenante, nous avons identifié dans la souche $\Delta trr1$ beaucoup de protéines oxydées impliquées dans le métabolisme du peroxyde d'hydrogène, comme la catalase Ctt1, la sulfiredoxine Srx1, les peroxydases dépendantes des thiorédoxines (Gpx2 et Gpx3/Orp1, Tsa1, Tsa2, Ahp1, Prx1, Ccp1) et les réductases (Trx2, Grx1 et Glr1). Certaines de ses protéines, comme Ctt1, Srx1, Ccp1, Gpx3/Orp1, Grx2 et Glr1 n'avaient pas été identifiées dans la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$, assez proche de la $\Delta trr1$ (voir paragraphe C.3.a et figures 22 et 23). Cette observation est probablement liée à la meilleure sensibilité de la méthode LC-MS/MS ou reflète une différence entre les souches $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ et $\Delta trr1$. Afin de confirmer cette dernière hypothèse, nous devons analyser le mutant $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ dans les mêmes conditions que $\Delta trr1$. L'accumulation des peroxydases sous une

forme oxydée est provoquée par l'absence de la Trr1, fournissant les électrons indispensables à la réduction des thiorédoxines, qui réduisent à leur tour les peroxydases (voir introduction III). L'oxydation de Srx1 est provoquée par la réduction de l'acide sulfinique de Tsa1 (Biteau et al., 2003). L'oxydation de Glr1 résulte probablement de sa fonction de réductase des thiols en l'absence de la Trr1, suggérant une redondance partielle des voies de réduction. Nous avons aussi identifié des protéines impliquées dans le métabolisme d'élimination du superoxyde comme les superoxydes dismutases Sod1 et Sod2, Sod1 ayant déjà été identifiée comme oxydée dans la souche sauvage et $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ (Le Moan et al., 2006). La présence de Sod1 est consistante avec le pont disulfure intramoléculaire nécessaire à son activité (Furukawa et al., 2004), alors que l'oxydation de la Sod2 reste inexplicée. Nous observons également les protéines oxydées Ero1 et Pdi1 (Frant and Kaiser, 1999) dont l'identification est compatible avec leur fonction de catalyse des ponts disulfure au sein des protéines sécrétées, Pdi1 étant également identifiée dans nos précédentes analyses (Le Moan et al., 2006).

Comparaison de l'ensemble des protéines oxydées avec les précédentes identifications

Nous avons indiqué en rouge dans le tableau 2 les protéines communes aux deux analyses de spectrométrie de masse, c'est-à-dire les protéines oxydées trouvées dans les souches, sauvage et $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$, non égalisées (Le Moan et al., 2006) (paragraphe B.2 et C.3.a, et figures 17, 22 et 23) et celles identifiées dans la $\Delta trr1$. Sur les 64 protéines identifiées dans le premier crible, 7 ne sont pas retrouvées dans la souche $\Delta trr1$ (Mxr1, Ald6, Gpp1, Tif51A, Ubc1, Ubc4, Por1). Nous pouvons expliquer l'absence de Mxr1 dans la $\Delta trr1$ par sa réduction potentielle par les thiorédoxines, même si celles-ci sont principalement sous une forme oxydée dans cette souche mutante. En effet, d'après l'absence d'auxotrophie en méthionine et cystéine, la $\Delta trr1$ possède toujours une activité thiorédoxine (données non publiées du laboratoire). Cinq autres protéines (Tdh3, Guk1, Hsp60, Tsa1 et Mdh1) n'apparaissent pas dans les fractions NE de la $\Delta trr1$ et sont identifiées dans les fractions E. Ceci est surprenant dans le cas de la Tdh3 et de Tsa1, deux protéines très abondantes. Si l'on compare ensuite les protéines oxydées identifiées dans la $\Delta trr1$ avec celles identifiées dans la souche sauvage égalisée (paragraphe B.3 et figure 18) (protéines communes inscrites en bleu dans le tableau 2), on remarque

que sur les 18 protéines identifiées, une seule n'est pas retrouvée dans la souche $\Delta trr1$ (Leu2). Enfin, Srx1, que nous n'avions pas trouvée dans notre première analyse MALDI-TOF, est l'exemple de protéine que nous nous attendions à identifier par l'égalisation. En effet, Srx1 est faiblement exprimée, de PI basique et uniquement présente dans la fraction E_{se} , prouvant ainsi l'efficacité de l'égalisation et l'affinité préférentielle des billes-SE pour les protéines basiques.

Conclusion

Cette nouvelle stratégie d'identification appliquée à la $\Delta trr1$ nous a permis d'identifier 526 nouvelles protéines oxydées, probablement régulées par des mécanismes d'oxydoréduction. Parmi les 526, 76 protéines sont exclusivement retrouvées dans les extraits E, et 57 avaient été identifiées dans notre première analyse. Il est assez surprenant d'identifier un si grand nombre de protéines oxydées dans une cellule qui n'en exprime qu'environ 3000, d'autant que la majorité de ces protéines sont localisées dans le cytoplasme, considéré comme un environnement réducteur (voir introduction). Les protéines identifiées ne sont donc probablement pas toutes oxydées. En effet, certaines ont été identifiées par spectrométrie de masse sur la base d'un ou deux peptides seulement. Lorsque nous retirons ces protéines de l'analyse, nous n'obtenons plus que 336 protéines identifiées sur la base de plus de 2 peptides, ce qui semble plus raisonnable. Nous devons également vérifier que toutes ces protéines contiennent des thiols afin de nous assurer de la spécificité de leur purification, et confirmer nos conclusions ainsi que l'ensemble de ces résultats avec des expériences supplémentaires. Pour cela, nous analyserons de la même manière les protéines oxydées d'une souche sauvage et d'une souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$.

b. Invalidation de la voie du glutathion

Ce système est composé de la Glutathion Réductase à FAD (Glr1), des glutarédoxines (Grx) et du glutathion (GSH). Le GSH assure une fonction de «tampon redox» (voir introduction III.B.2.a) en se liant aux protéines par une réaction de glutathionylation (voir introduction III.B.2.c). L'absence de GSH engendre un défaut de protection des résidus cystéine, pouvant conduire à la suroxydation des thiols et à l'inactivation de la protéine. En effet, certaines activités enzymatiques sont

inhibées en l'absence de GSH (Shenton and Grant, 2003), probablement à cause d'une suroxydation de leurs thiols.

i. L'oxydation des thiols par le GSSG

Nous avons analysé la variation de l'oxydation des protéines suite à une modification du rapport [GSH] / [GSSG] intracellulaire. Les protéines d'une souche sauvage, exposée pendant 5 minutes au diamide (1mM), un agent oxydant augmentant la proportion de GSSG, sont extraites en milieu acide puis marquées par le NEM fluorescent. Dans ces conditions, nous n'observons aucune variation du profil du protéome oxydé (données non illustrées). Ce résultat est en désaccord avec certains travaux réalisés chez les mammifères (Cumming et al., 2004), (Brennan et al., 2004) et montrant que le GSSG provoque une augmentation de l'oxydation des protéines, probablement par un mécanisme d'échange di-thiol/disulfure avec le GSSG (voir introduction I.B). Néanmoins, nos données suggèrent l'existence potentielle et préférentielle d'un mécanisme de S-thiolation par réaction directe du GSH avec les acides sulféniques et non par échange di-thiol/disulfure du GSSG avec les protéines. Ce mécanisme préférentiel de glutathionylation est également confirmé par une autre étude portant sur l'actine (Dalle-Donne et al., 2003).

ii. Analyse du rôle du glutathion à l'échelle du protéome

Un ancien thésard du laboratoire a recherché des supprimeurs génétiques au phénotype de létalité du gène *GSH1* (Spector et al., 2001), afin de mieux comprendre la fonction essentielle du GSH. Il a ainsi identifié une mutation dans un gène codant pour un enzyme de la voie de biosynthèse de la proline (*PRO2*) capable de produire de faibles quantités de GSH (0,5% par rapport à la souche sauvage) et permettant la survie de la souche $\Delta gsh1$ en l'absence de GSH exogène (Spector et al., 2001). Nous avons utilisé cette souche ($\Delta gsh1PRO2-1$) pour analyser l'effet de la diminution des quantités de GSH intracellulaire sur le profil des protéines oxydées. Les protéines de ce mutant $\Delta gsh1PRO2-1$ portant en plus l'inactivation de *GLR1* ($\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$) sont extraites en milieu acide, marquées par le NEM C¹⁴ et soumises à une électrophorèse bidimensionnelle, révélée par autoradiographie (figure 30).

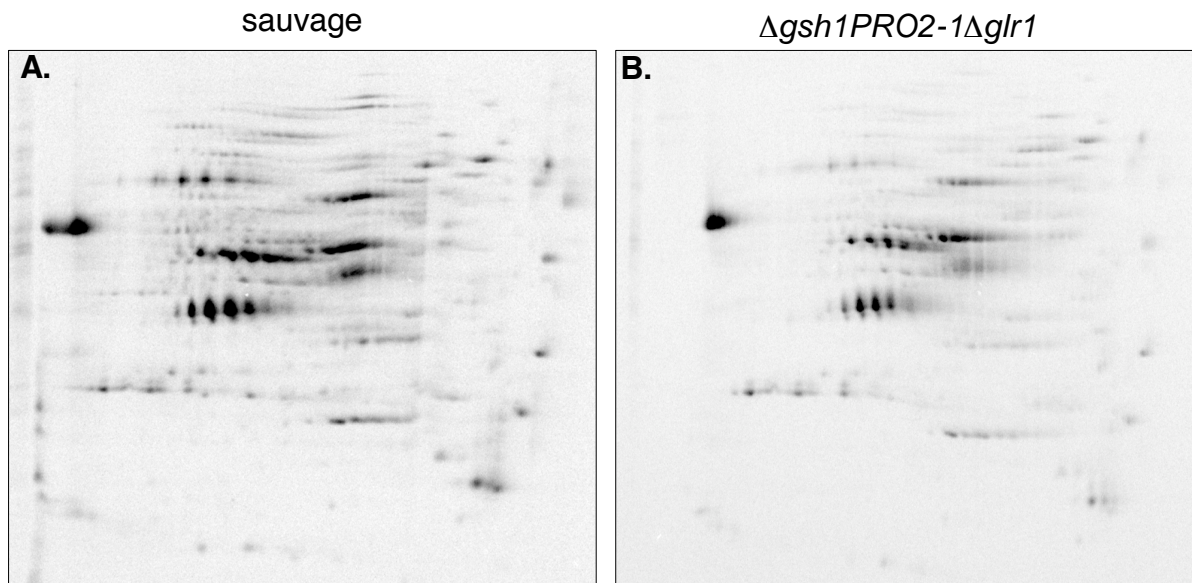


Figure 30. Altération de l'oxydation des protéines dans une souche mutée au niveau du gène *PRO2* et invalidée pour les gènes *GSH1* et *GLR1*.

Les protéines sont extraites en milieu acide à partir d'une souche sauvage (A) ou $\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$ (B). Les protéines oxydées sont alors marquées par le NEM C^{14} puis 100 μg (A) ou 500 μg (B) de protéines sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par autoradiographie avec le Phosphorimager.

Nous observons de façon inattendue que la diminution du GSH intracellulaire provoque une baisse globale de l'intensité du marquage radioactif, comparé au profil de la souche sauvage. Deux explications peuvent être proposées. La première est que l'augmentation de l'induction des antioxydants peut diminuer la concentration intracellulaire en IRO et potentiellement diminuer l'oxydation des protéines. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modification de l'expression des protéines (non illustré). La seconde explication est que la baisse de la concentration intracellulaire de GSH diminue les réactions de glutathionylation. Le GSH n'étant plus présent pour assurer sa fonction de protection des thiols, il se produit une suroxydation des acides sulféniques qui échappent au marquage par le NEM C^{14} . Curieusement, l'ensemble du protéome oxydé est concerné par cette diminution du signal radioactif, suggérant que la majorité des protéines oxydées sont des protéines glutathionylées. Ce résultat est consistant avec les données de Grant (Shenton and Grant, 2003) montrant que les protéines de la glycolyse, majoritairement présentes dans les protéomes oxydés, sont glutathionylées. Cependant, la diminution de l'oxydation des peroxydases Tsa1 et Ahp1 dont la S-thiolation n'a jamais été décrite chez la levure n'est pas expliquée.

Afin d'étudier l'éventuelle diminution des réactions de glutathionylation dans la souche $\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$, les protéines de la souche sauvage et mutante sont extraites en milieu acide et solubilisées dans un tampon dénaturant contenant de l'IAM. Les protéines sont ensuite soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par western blot avec un anticorps dirigé contre les protéines formant un pont disulfure mixte avec le GSH (Prot-S-SG). Cette expérience ne nous a pas permis de révéler de diminution de la glutathionylation des protéines dans la souche mutante (non illustré). Nous avons ensuite étudié la suroxydation des protéines dans la souche $\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$, caractérisée par l'apparition d'isoformes plus acides des protéines. Les protéines des souches mutante et sauvage sont extraites en milieu acide et marquées soit par la méthionine S^{35} , soit par le NEM fluorescent, ou les thiols totaux sont marqués par le NEM C^{14} . Après électrophorèse bidimensionnelle, les protéines sont révélées par autoradiographie ou fluorimétrie. Les trois protéomes oxydés obtenus à partir de la souche mutante n'ont révélé aucune modification du point isoélectrique des protéines par rapport au protéome oxydé de la souche sauvage (non illustré).

iii. Analyse du rôle du glutathion sur une protéine modèle

Nos différentes hypothèses n'ayant pu être vérifiées à l'échelle du protéome, nous avons étudié la suroxydation de la Tdh3 connue pour être glutathionylée et dont le marquage par le NEM C^{14} diminue dans la souche $\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$. Nous avons réalisé d'une part le profil électrophorétique bidimensionnel de la Tdh3 et d'autre part le marquage des deux thiols de la Tdh3 par l'AMS après leur réduction par le DTT (figure 31) (cette dernière stratégie a notamment été utilisée pour étudier la suroxydation de Tsa1 (Biteau et al., 2003)). Les protéines, des souches sauvage et $\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$ transformées par un plasmide exprimant la protéine Tdh3-Myc, sont extraites en milieu acide, solubilisées dans un tampon dénaturant contenant soit de l'IAM pour une électrophorèse bidimensionnelle (figure 31A) soit du DTT puis de l'AMS pour une électrophorèse monodimensionnelle (figure 31B). Les protéines sont révélées par western blot avec l'anticorps anti-Myc. Nous n'observons aucune différence entre la souche sauvage et mutante que ce soit pour la valeur du point isoélectrique de la Tdh3 sur gel bidimensionnel (figure 31A) ou le retard de migration de la Tdh3 provoqué par l'AMS sur gel monodimensionnel (figure 31B). Nous n'avons donc pas mis en évidence de suroxydation de cette protéine.

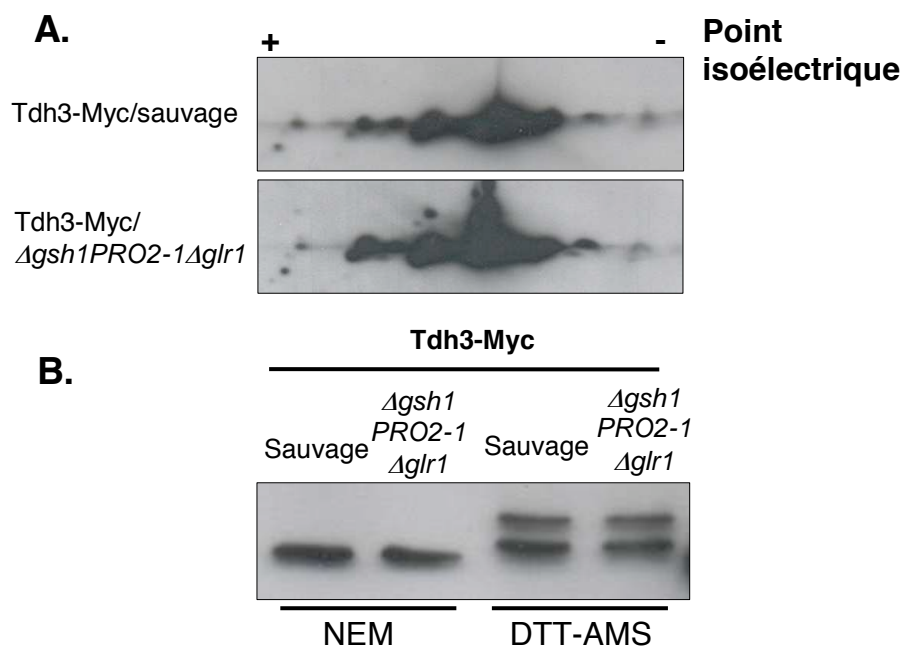


Figure 31. Evaluation de l'état d'oxydation de la Tdh3-Myc dans la souche $\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$.

Des cellules sauvages ou $\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$ sont transformées par le plasmide exprimant Tdh3-Myc et cultivées dans 10 mL de milieu jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,4. Les protéines sont ensuite extraites en milieu acide puis solubilisées dans un tampon soit UCTE contenant 50 mM d'IAM (A), soit TES contenant 50 mM de NEM ou 20 mM de DTT suivi de 15 mM d'AMS (B). Les protéines sont ensuite soumises à une électrophorèse bidimensionnelle (A), ou monodimensionnelle (B) puis révélées après un western blot avec l'anticorps anti-Myc dirigé contre l'étiquette de Tdh3.

iv. Conclusions

Aucune des expériences à l'échelle protéomique ou individuelle ne nous a permis de détecter d'une part la diminution des réactions de glutathionylation et d'autre part l'augmentation de la suroxydation des protéines, lorsque la quantité de GSH intracellulaire est diminuée. Il est donc probable que ces modifications ne concernent qu'une très faible proportion de chaque protéine, ne nous permettant pas de les visualiser avec les expériences effectuées. Ces données suggèrent également qu'une dégradation potentielle des protéines suroxydées peut se produire lorsque la concentration de GSH intracellulaire est insuffisante, provoquant ainsi une diminution du marquage par le NEM C^{14} des protéines oxydées. Alors que l'inactivation de la voie des thiorédoxines provoque un effet très différent de la diminution du GSH, nous pouvons conclure à une fonction très contrastée entre les deux voies cytoplasmiques de réduction des thiols: la voie des thiorédoxines semble jouer un rôle prépondérant dans le métabolisme de l' H_2O_2 tandis que le GSH paraît assurer une fonction de

«tampon redox», consistant à protéger les thiols des protéines d'une éventuelle modification irréversible.

4. En l'absence de chaîne respiratoire mitochondriale fonctionnelle (Rho⁰)

Il est évident que les espèces dérivées de l'O₂ contribuent de façon non négligeable à l'oxydation des protéines (figure 19). Ces espèces sont théoriquement produites lors de la respiration mitochondriale. Il était intéressant d'évaluer l'oxydation des protéines dans une souche n'ayant pas de chaîne respiratoire fonctionnelle (Rho⁰). Après extraction des protéines de cette souche, les thiols réduits et oxydés sont marqués par du NEM fluorescent. Les protéines sont alors soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par fluorimétrie (figure 32). Nous n'observons pas de modification du profil d'oxydation des protéines entre une souche sauvage et Rho⁰. Cependant, le marquage des thiols réduits augmente, reflétant une induction des protéines, et plus particulièrement de celles de la glycolyse (Tdh3, Fba1, Tpi1, Eno2, Adh1). Cette induction résulte probablement de la nécessité d'accroître la production d'ATP par la voie de la glycolyse, et non plus par la phosphorylation oxydative mitochondriale, afin de répondre aux besoins énergétiques de la cellule.

La persistance de l'oxydation des protéines dans la souche Rho⁰ est surprenante et soulève la question de l'origine des équivalents oxydants. Les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale ne seraient donc pas la principale source de production des IRO. Il existe en effet d'autres voies métaboliques utilisant l'O₂, dont la réduction peut conduire à la production d'IRO (pour revue voir (Rosenfeld and Beauvoit, 2003)). Par exemple, l'acyl-CoA oxydase catalysant la β -oxydation des acides gras dans les peroxysomes produit de l'H₂O₂, en transférant deux électrons sur l'O₂ via son groupement FAD. Selon un mécanisme similaire, les flavines oxydases Ero1 (Gross et al., 2006), Erv1 et Erv2 produisent également de l'H₂O₂ (pour revue voir (Thorpe et al., 2002)). La Sod1 génère également de l'H₂O₂ à partir du superoxyde (Pelmenschikov and Siegbahn, 2005).

Inversement, nous pourrions analyser la variation de l'état redox des thiols non pas suite à l'inactivation de la chaîne respiratoire, mais en réponse à

l'augmentation de la respiration mitochondriale (phase de croissance stationnaire ou culture sur un substrat non fermentescible).

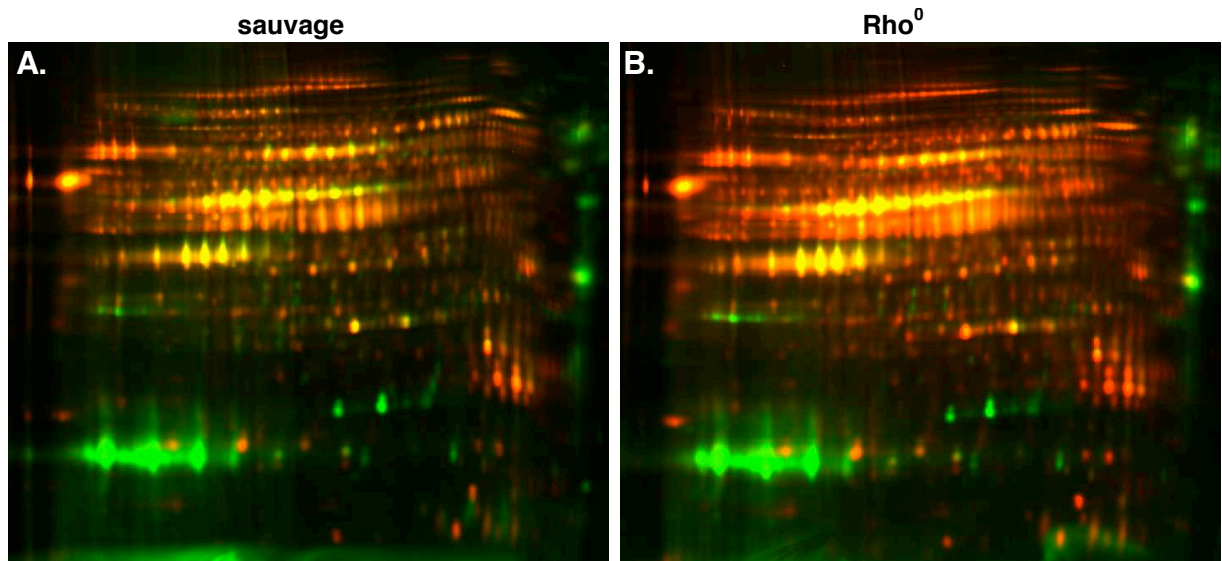


Figure 32. Variation de l'état redox des thiols d'une souche sauvage ou dépourvue d'ADN mitochondrial (Rho⁰).

Les souches sauvage (A) et Rho⁰ (B) sont cultivées en présence de glucose jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,5. Les protéines sont ensuite extraites en milieu acide, puis les thiols réduits et oxydés sont marqués par le NEM fluorescent. Les protéines sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par fluorimétrie.

D.Discussion

La signification physiologique de l'oxydation des thiols

Malgré l'existence de systèmes de réduction assurant un flux continu d'équivalents réducteurs dans le cytoplasme, de nombreuses protéines sont oxydées dans ce compartiment. Nous avons vu que l'oxydation de certaines protéines est liée soit à leur fonction cellulaire: d'élimination des peroxydes, pour les peroxydases Tsa1, Tsa2, Ahp1, Gpx2, Gpx3, Ccp1 et Prx1; de réduction du sulfinique pour Srx1; de thiol-oxydase pour Pdi1 et Ero1, de thiol-réductase pour Trr1 et Glr1, ou de thiol-transférase pour Grx1 et Trx2. Ces oxydations sont aussi liées au cycle catalytique d'enzyme pour Mxr1, ou encore à la stabilisation structurale indispensable à leur activité catalytique pour Sod1. Cependant, pour la plupart des protéines identifiées, la signification physiologique de leur oxydation reste indéterminée. S'agit-il d'un mécanisme spécifique de régulation de la fonction des protéines, d'une étape du cycle catalytique s'il s'agit d'enzyme, d'une stabilisation structurale, ou bien de modifications non physiologiques? Dans ce dernier cas, l'oxydation pourrait par exemple refléter une marque du vieillissement cellulaire, de façon similaire aux carbonylations (Aguilaniu et al., 2003). Malheureusement, notre étude globale ne permet pas de répondre à ces questions. Une étude individuelle des protéines présentant des motifs cystéines impliqués dans des réactions redox, induites au cours d'un stress oxydant ou encore suspectées d'être des régulateurs transcriptionnels nous permettra de répondre à certaines de ces questions.

Les mécanismes d'oxydation des thiols

Nous avons vu que les résidus cystéines peuvent se trouver sous différents états redox (voir introduction I.B), dont la plupart peuvent être visualisés grâce à notre méthode globale d'identification des thiols oxydés (sulfénique, disulfure intra- et intermoléculaire avec le GSH ou non). Nous avons aussi vu que certaines de ces modifications redox sont induites *in vivo* par les peroxydes, par glutathionylation, par des échanges di-thiol/disulfures ou par les équivalents oxydants de l'O₂ *via* un groupement flavine. Pour la majorité des protéines oxydées identifiées dans notre étude, le mécanisme et les espèces responsables des oxydations est indéterminé, excepté pour les peroxydases et Mxr1 (voir introduction III.B.1a), les thiol-réductases et thiol-transférases (voir introduction III) et les thiol-oxydases (voir introduction IV). Néanmoins, la diminution globale des protéines oxydées en anaérobie (voir figure

20) suggère que l'O₂ et ses espèces dérivées (superoxyde, radical hydroxyle et peroxyde d'hydrogène) sont capables d'oxyder les thiols. Certaines protéines contiennent en effet des cystéines réactives et/ou accessibles pouvant potentiellement s'oxyder en présence d'O₂ (voir tableau 1), telles que Tdh3, Ald6, Pdc1, Pmi4 et Ubc4 ayant des cystéines impliquées dans une catalyse enzymatique ou Ccs1, Sod1, Ctt1, Yhb1, Aco1 et Leu1 contenant des cystéines qui coordonnent des métaux. Cependant, le mécanisme moléculaire à la base de ces oxydations est énigmatique pour la plupart des protéines oxydées. S'agit-il d'une oxydation directe des thiols par l'O₂ ou par les espèces dérivées de l'O₂ comme l'H₂O₂? Nous pouvons également nous demander si l'anaérobie stricte provoquerait une extinction complète de l'oxydation des protéines, dans le cas contraire, ces oxydations seraient indépendantes de l'O₂. Dans cette hypothèse, l'oxydation des thiols résulterait probablement d'une réaction avec un métal de transition, provoquant la formation d'un thiyl, capable de former un disulfure avec un autre thiyl ou un thiolate (voir introduction).

L'H₂O₂ oxyde spécifiquement les thiols

Contrairement à l'O₂, l'H₂O₂ oxyde spécifiquement les thiols d'un sous ensemble de protéines (voir figures 21 et 22), indiquant que l'oxydation des thiols du à l'O₂ n'est pas exclusivement réalisée par l'H₂O₂. Dans ce cas quelles seraient les espèces capables d'induire une modification des thiols qui soit réductible, c'est-à-dire visible avec notre méthode d'identification des thiols oxydés? Par exemple, le radical hydroxyle issu de la radiolyse de l'eau peut former un radical thiyl qui peut ensuite former un acide sulfénique en réagissant avec l'O₂, ou former un disulfure (voir ci-dessus).

La spécificité de l'oxydation par l'H₂O₂ révèle aussi que non seulement tous les thiols protéiques ne sont pas réactifs envers l'H₂O₂, mais aussi que l'oxydation des thiols par l'H₂O₂ reflète des phénomènes de régulation et/ou de signalisation hautement spécifiques. En effet, on distingue surtout deux catégories de voies métaboliques auxquelles appartiennent les protéines dont l'oxydation augmente en H₂O₂ et qui sont reliées au métabolisme de l'H₂O₂: les antioxydants de part leur activité d'élimination des peroxydes, et les enzymes de la glycolyse dont l'inhibition par oxydation augmente le flux d'équivalents réducteurs, activant ainsi les antioxydants (Shenton and Grant, 2003). Cependant, nous pourrions supposer que

l'incubation prolongée des cellules en présence d'une concentration élevée et constante d' H_2O_2 (afin de saturer les systèmes d'élimination de l' H_2O_2), conduite à l'augmentation de l'oxydation des thiols de la plupart des protéines. Cette observation suggérerait que les systèmes d'élimination de l' H_2O_2 agiraient en tant que «récepteurs de l' H_2O_2 » et seraient indispensables au maintien de l'état redox des thiols. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser une souche dépourvue des enzymes appartenant au métabolisme de l' H_2O_2 , c'est-à-dire invalidée pour les 8 thiol-peroxydases et la méthionine sulfoxyde réductase.

Le contrôle de l'état redox des thiols par la voie des Trx et du GSH

Le contrôle de l'état redox des thiols est réalisé grâce à un cheminement spécifique des équivalents réducteurs le long des voies de réduction, jusqu'aux effecteurs terminaux Trx et GSH/Grx (voir introduction III.B). Cependant, de façon surprenante, l'interruption ($\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$) ou la diminution ($\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$) de ce flux d'électrons ne provoque pas d'augmentation de l'oxydation de la majorité des protéines, probablement à cause d'un phénomène de compensation survenant suite à l'invalidation d'un des composants des deux voies, ce qui rend difficile notre conclusion quant à la contribution respective des Trx et du GSH dans le contrôle de l'état redox des thiols. L'absence des composants des deux voies de réduction provoquerait éventuellement une augmentation de l'oxydation des protéines déjà oxydées par l' O_2 dans une cellule au repos, suggérant ainsi que les voies des Trx et GSH se complémente partiellement pour la réduction de certains substrats, d'autant plus que certaines des protéines identifiées dans notre étude ont été décrites comme substrats des thiorédoxines dans d'autres analyses (Leichert and Jakob, 2004) (Yamazaki et al., 2004). Ceci indiquerait également que les thiorédoxines et glutarédoxines sont indispensables à la vie aérobie.

L'invalidation de la voie des thiorédoxines n'a vraisemblablement pas d'effet sur la majorité des protéines oxydées, excepté pour les protéines dépendantes des thiorédoxines pour leur activité catalytique, à savoir les peroxydases et la méthionine sulfoxyde réductase (voir figure 23). Ces dernières n'étant pas oxydées en réponse à l' H_2O_2 démontre non seulement l'efficacité des peroxydases et de la Mxr1 dans l'élimination de l' H_2O_2 , mais aussi celle des thiorédoxines à régénérer leur forme active. Cette observation suggère aussi que la voie des thiorédoxines intervient préférentiellement dans l'élimination indirecte des peroxydes et non pas dans la

réduction des autres protéines oxydées par l'O₂ (voir paragraphe ci-dessus) suggérant une différence de spécificité entre les substrats des thiorédoxines et des glutarédoxines. Malgré des défauts phénotypiques plus accentués que la $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$, la $\Delta trr1$ contient moins de protéines oxydées, et ne présente pas de phénomène de stress disulfure (accumulation d'oxydations non physiologiques), semblable à celui décrit chez la bactérie (Derman et al., 1993) (Stewart et al., 1998). Cette observation soulève ainsi la question de l'existence de ce phénomène chez la levure, d'autant plus que le stress disulfure en l'absence d'une des voies de contrôle de l'état redox des thiols n'a jamais été clairement démontrée *in vivo*. Néanmoins, afin de tester son existence, nous devons analyser des mutants des deux voies de réduction. L'invalidation simultanée des deux voies provoquerait potentiellement un second effet (voir paragraphe ci-dessus), à savoir l'augmentation du nombre de protéines oxydées, signe d'un stress disulfure. Ceci suggérerait la présence indispensable de la voie des Trx et du GSH pour la vie aérobie, en luttant contre les équivalents oxydants de l'O₂.

De façon surprenante, la diminution des quantités intracellulaires de GSH ne provoque non pas une augmentation, mais une diminution de l'oxydation des protéines (voir figure 31), de façon très contrastée à l'invalidation de la voie des thiorédoxines, suggérant l'absence de redondance entre ces deux voies et la spécialisation de leurs fonctions cellulaires. Nous avons attribué cet effet à la fonction du GSH en tant que tampon redox intracellulaire majeur, consistant à protéger les cystéines par glutathionylation. Nous avons aussi suggéré dans l'introduction que le GSH pourrait avoir un rôle dans la réduction de la Pdi1 (voir introduction III.B.2.d). Cependant, l'augmentation de l'oxydation de Pdi1 n'est pas visualisée suite à la diminution du GSH intracellulaire, alors que l'H₂O₂ provoque une diminution d'un facteur deux de la forme oxydée de Pdi1, reflétant ainsi l'existence d'un mécanisme d'inactivation d'Ero1 (Sevier et al., 2007) conduisant à l'accumulation de Pdi1 sous une forme réduite.

L'identification de nouvelles protéines redox grâce à l'égalisation

Notre méthode d'égalisation combinée à la purification des protéines oxydées, nous a permis d'identifier de nombreuses protéines oxydées, et plus particulièrement 300 nouvelles dans la $\Delta trr1$ (voir résultats I.C.3.a) appartenant à diverses voies métaboliques. Avec cette approche, nous souhaitons comparer l'effet de l'invalidation

partielle ou entière de la voie des thiorédoxines ($\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ et $\Delta trr1$) sur l'oxydation des protéines. Cette étude nous renseignera sur les protéines qui utilisent ce système pour leur réduction et nous aidera à identifier de nouvelles protéines dont les thiols sont impliqués dans des mécanismes de régulation redox ou dans un cycle catalytique enzymatique. Cette étude comparative nous informera éventuellement sur la nature des substrats des thiorédoxines, sachant que la $\Delta trr1$ contient encore une activité thiorédoxine (données non publiées du laboratoire) et que les phénomènes de complémentation sont potentiellement moins importants entre $\Delta trr1$ et $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ qu'entre une souche sauvage et $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$. La comparaison de ces données avec une souche sauvage pourrait aussi nous renseigner sur l'existence d'une complémentation partielle entre les thiorédoxines et glutarédoxines pour la réduction de certains substrats.

II. Résultats et discussion 2: étude du mécanisme d'oxydation de la Sod1

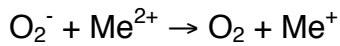
Au cours de notre étude du protéome oxydé, nous avons identifié Sod1 «Superoxyde Dismutase» une protéine cytoplasmique contenant un pont disulfure permanent, indispensable à son activité catalytique de dégradation de l'anion superoxyde (O_2^-), formé par la réduction à un électron de l'oxygène moléculaire (O_2) lors de la phosphorylation oxydative mitochondriale. La formation de ce pont disulfure est catalysée par son chaperon Ccs1 «Copper Chaperone for Sod1». Cependant, le mécanisme d'oxydation de Sod1 demeure peu connu *in vivo*, et le lieu de formation du pont disulfure est difficilement concevable dans un environnement cytoplasmique, contenant deux voies de réduction maintenant les thiols sous forme réduite (voir introduction), comme le sous-entend l'hypothèse actuelle. Le mécanisme moléculaire d'oxydation de la Sod1 par Ccs1 reste donc à élucider *in vivo*.

Nous présenterons tout d'abord ce travail par une brève revue de la littérature sur laquelle nous nous sommes basés pour élaborer notre hypothèse du mécanisme d'oxydation de Sod1. Nous décrirons ensuite la mise en place des outils génétiques et moléculaires afin d'étudier la formation du pont disulfure de Sod1. Enfin, nous exposerons les résultats préliminaires de cette étude.

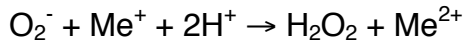
A. La Superoxyde Dismutase 1 (Sod1)

1. Mécanisme enzymatique des superoxyde dismutases (Pelmenschikov and Siegbahn, 2005)

S.cerevisiae possède deux types de superoxyde dismutases (SOD) qui diffèrent par la nature du métal coordonné au sein de leur centre catalytique et par leur localisation subcellulaire. La Sod1 est une protéine à cuivre/zinc (Cu/Zn-Sod1), localisée essentiellement dans le cytoplasme. Le mécanisme d'acquisition du cuivre de Sod1 est relativement bien décrit alors que l'acquisition du zinc demeure non élucidée. La Sod2 est une protéine à manganèse (Mn-Sod2), de la matrice mitochondriale. Les SOD permettent la conversion de deux radicaux O_2^- en H_2O_2 et O_2 par un mécanisme de dismutation qui nécessite la présence d'un métal de transition au sein de leur centre catalytique. Le métal est d'abord réduit par une première molécule d' O_2^- , libérant de l' O_2 .



Le métal est ensuite oxydé par une deuxième molécule d' O_2^- , permettant ainsi sa régénération sous forme de Me^{2+} et la libération d' H_2O_2 :



2. Données de la littérature

a. Les SOD sont essentielles au métabolisme aérobie

Les organismes, tels que *E.coli*, *S.cerevisiae*, *C.elegans* et la drosophile, invalidés pour une ou plusieurs SOD, développent une intolérance vis-à-vis de l' O_2 , indiquant la nécessité des SOD pour lutter contre l'extrême toxicité du superoxyde dérivé de l' O_2 . Chez *S.cerevisiae*, Sod1 et Sod2 semblent avoir des fonctions distinctes, d'après les différents phénotypes associés à leur invalidation respective. Néanmoins, elles sont toutes les deux essentielles dans la protection contre la toxicité du superoxyde. L'absence de Sod1 et Sod2 n'est pas létale, mais provoque des défauts plus prononcés que la simple invalidation.

L'invalidation de SOD1 engendre différents défauts métaboliques, uniquement dans des conditions aérobiques. La perte de la Sod1 provoque l'incapacité des cellules à survivre en hyperoxie et l'apparition de différents phénotypes en normoxie: un défaut de croissance sur des substrats fermentescibles ou non (Gralla and Valentine, 1991), une haute fréquence de mutations spontanées (Huang et al., 2003) (Gralla and Valentine, 1991), une mort cellulaire précoce en phase stationnaire (sénescence accélérée) (Sturtz et al., 2001), une sensibilité aux composants générant de l'anion superoxyde (ménadione et paraquat) (Gralla and Valentine, 1991), et une auxotrophie en lysine (Liu et al., 1992) et méthionine (Chang and Kosman, 1990). L'auxotrophie en méthionine est d'ailleurs éliminée par la surexpression de Tkl1 (Slekar et al., 1996), une transkétolase de la voie des pentoses phosphate qui augmente la production de NADPH, indispensable aux thiorédoxine pour réduire la PAPS réductase, intervenant dans l'assimilation du soufre (voir introduction III).

b. Sod1 participe au métabolisme des métaux

Sod1 possède en fait deux fonctions métaboliques distinctes: elle intervient dans la protection contre l' O_2 et elle participe au métabolisme des métaux.

Grâce à son activité d'élimination du superoxyde, Sod1 préserve l'intégrité des protéines à centre Fer/Soufre (Fe/S) (pour revue voir (Lill et al., 2006)). En son absence, l'augmentation de la production de superoxyde provoque la destruction des centres Fe/S (voir introduction et schéma 1), conduisant à une libération massive de fer libre dans la cellule (Srinivasan et al., 2000), (De Freitas et al., 2000). Le fer libéré est susceptible de générer un radical hydroxyle (OH^{*}) hautement réactif (voir introduction I.B. réaction n°12 de Fenton), responsable de l'oxydation de l'ADN, des lipides et des protéines (pour revue voir (Imlay, 2003)). Cependant, le fer libéré n'est pas directement utilisable par la cellule pour réparer les centres Fe/S (Srinivasan et al., 2000), ce qui entraîne paradoxalement une carence en fer, détectée par le facteur de transcription Aft1, qui induit l'expression d'un transporteur membranaire de fer (Fet3) (De Freitas et al., 2000) pour augmenter de nouveau le fer intracellulaire afin de reconstruire les centres Fe/S. D'ailleurs, l'augmentation de fer intracellulaire par l'addition de fer (De Freitas et al., 2000) ou l'inactivation de protéines mitochondriales participant à l'assemblage des centres Fer/Soufre (Fe/S) (Ssq1, Jac1, Isu1, Nsf1) (Strain et al., 1998), restaure certains défauts métaboliques de $\Delta sod1$, probablement par la reconstruction des centres Fer/Souffre (Jensen et al., 2004).

Le rôle de Sod1 dans le métabolisme des métaux est conforté par d'autres observations. Par exemple, l'addition de certains métaux ou l'augmentation de la concentration intracellulaire de cuivre ou de manganèse, par l'intermédiaire de l'inactivation ou de la surexpression d'enzymes impliquées dans leur transport ou leur séquestration (Lin and Culotta, 1996), (Lin and Culotta, 1995), (Liu and Culotta, 1994), (Lapinskas et al., 1995), élimine certains phénotypes de la souche $\Delta sod1$. Le cuivre et le manganèse sont en effet des métaux de transition capables d'éliminer le superoxyde *in vitro* par une réaction chimique d'oxydoréduction. Une réaction semblable pourrait exister *in vivo*, mimant ainsi l'activité catalytique de Sod1. Néanmoins, l'addition de cuivre stimule l'expression d'une métallothionéine Cup1 capable d'éliminer le superoxyde selon un mécanisme similaire à Sod1 (Tamai et al., 1993). L'ensemble de ces données montrent donc une relation étroite entre le superoxyde, Sod1 et le métabolisme des métaux.

c. Le rôle de Ccs1 «Copper Chaperone for Sod1» dans l'activation de Sod1

i. Sod1 nécessite du cuivre pour son activité catalytique

Le cuivre est un métal de transition essentiel à l'activité de certains enzymes, et pouvant être toxique à l'état libre (pour revue voir (Valentine and Gralla, 1997)). La concentration intracellulaire de cuivre libre est tellement bien régulée, qu'elle est de l'ordre de moins d'un atome par cellule (Rae et al., 1999) (pour revue voir (Lippard, 1999)). En effet, après son transfert dans le cytoplasme grâce à des transporteurs CTR (Copper TRansporter) de la membrane plasmique, le cuivre libre est rapidement lié à des métalloprotéines, comme la métallothionéine Cup1 et les métallo-chaperons. Les métallo-chaperons Atx1, Cox17 ou Ccs1, assurent le transport du cuivre dans des compartiments spécifiques puis son insertion sur ses protéines cibles: Atx1 sur Ccc2 dans la voie de sécrétion, Cox17 sur Sco1 et Cox11 dans la mitochondrie (pour revue voir (Valentine and Gralla, 1997)) et Ccs1 «Copper Chaperone for Sod1» sur Sod1 dans le cytoplasme. Ccs1 joue alors le rôle d'un récepteur soluble qui transfère à Sod1 son cofacteur cuivre, indispensable à son activité catalytique. Comme Sod1 dépend de Ccs1 pour son activité, l'inactivation de CCS1 provoque les mêmes phénotypes que ceux d'une souche $\Delta sod1$ (Culotta et al., 1997), (Gamonet and Lauquin, 1998).

En l'absence de Ccs1, Sod1 n'est plus capable d'acquieser son cofacteur, excepté en présence d'une très forte concentration de cuivre (Rae et al., 1999). Ccs1 est un métallochaperon très efficace, capable d'assurer sa fonction même dans des conditions de restriction de cuivre (Rae et al., 1999). Ccs1 catalyse l'insertion du cuivre dans Sod1 de façon post-traductionnelle, transformant la forme apoprotéique (sans cuivre) inactive de Sod1 en une forme active holoprotéique (avec cuivre) (Schmidt et al., 2000).

La Ccs1 possède 3 domaines distincts: le domaine I en N-terminal pour recruter et fixer le cuivre intracellulaire grâce à un motif MXCXXC similaire à celui d'Atx1, le domaine central II d'interaction avec Sod1 et le domaine III en C-terminal portant un motif CXC intervenant probablement dans la liaison du cuivre (Schmidt et al., 1999). D'après les données obtenues par cristallisation du complexe Sod1/Ccs1 (Lamb et al., 2001), l'une des cystéines du motif CXC formerait avec Sod1 un pont

disulfure intermoléculaire (voir schéma 22), indispensable au transfert du cuivre dans le site actif de Sod1 et par conséquent à l'activation de Sod1.

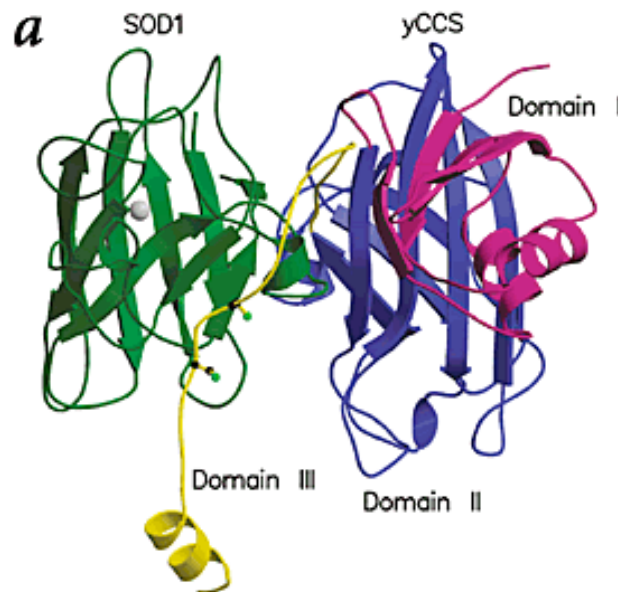


Schéma 22. Cristallisation du complexe Sod1/Ccs1.

La cystéine 57 de Sod1 forme une liaison disulfure intermoléculaire avec la cystéine 229 localisée dans le domaine III de Ccs1 (Lamb et al., 2001).

ii. Sod1 nécessite un pont disulfure intramoléculaire pour être active

Après le transfert du cuivre, le pont disulfure intermoléculaire Sod1/Ccs1 se résout ensuite en un pont intramoléculaire au sein de Sod1. Ce pont est indispensable à la stabilisation structurale de Sod1, compatible avec son activité de dismutation. L'existence d'un pont disulfure intramoléculaire dans Sod1 n'a été montrée *in vivo* que récemment (Furukawa et al., 2004). La formation de ce pont disulfure est en fait dépendante de l'O₂ et de Ccs1 (voir schéma 23) (Furukawa et al., 2004) (Brown et al., 2004). Néanmoins, le mécanisme moléculaire et le lieu de formation de ce pont reste à éclaircir.

Contrairement à la levure, la Sod1 des mammifères ne possède pas les deux résidus proline à proximité d'une cystéine engagée dans la liaison disulfure, rendant ainsi possible la formation du pont disulfure intramoléculaire de Sod1 en l'absence de Ccs1 (Carroll et al., 2004) (Jensen and Culotta, 2005). Chez les mammifères, il existe donc une voie d'activation de Sod1 indépendante de Ccs1.

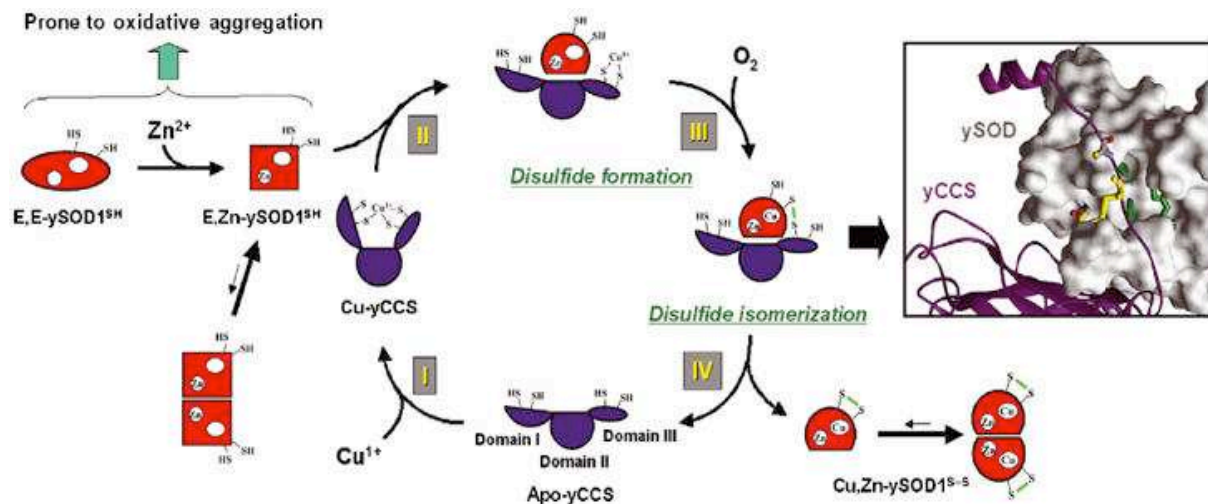


Schéma 23. Modèle de formation du pont disulfure intramolécule de Sod1.

La formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre Sod1 et Ccs1 est catalysée par l'O₂ et le cuivre (Furukawa et al., 2004), puis la cystéine libre de Sod1 résout ce pont en pont disulfure intramolécule.

d. La localisation de Sod1 et Ccs1 dans l'espace intermembranaire mitochondrial (EIM)

Sod1 et Ccs1 sont majoritairement localisées dans le cytoplasme, mais on retrouve 1 à 5% de Sod1 et de Ccs1 dans l'EIM, bien qu'aucune des deux protéines ne possède de pré-séquence N-terminale d'adressage à l'EIM (Sturtz et al., 2001). Par ailleurs, la présence de Sod1 dans l'EIM favorise l'augmentation de la résistance cellulaire en phase stationnaire et supprime l'auxotrophie en lysine et méthionine du mutant $\Delta sod1$ (Sturtz et al., 2001). Sod1 est en fait importée dans l'EIM sous une forme immature, réduite et apoprotéique (Field et al., 2003). Ccs1 doit probablement être importé dans l'EIM sous une forme similaire. La Ccs1 y catalyse ensuite l'insertion du cuivre et la formation du pont disulfure intramolécule de Sod1 (voir schéma 24). Cependant, Sod1 est absente de l'EIM lorsque l'une de ses deux cystéines, ou l'une des cystéines du motif CXC de Ccs1, impliquées dans la liaison disulfure intermoléculaire avec Sod1, est mutée (Field et al., 2003). Ceci indique que la présence de Sod1 dans l'EIM est dépendante de son oxydation sous forme de disulfure, ce qui concorde avec la théorie du «folding trap» (pour revue voir (Herrmann and Kohl, 2007)), dont nous avons parlé dans l'introduction (voir paragraphe IV.C). Comme la formation du disulfure de Sod1 dépend de Ccs1, la localisation de Ccs1 influence la répartition de Sod1 entre le cytoplasme et la mitochondrie (Sturtz et al., 2001).

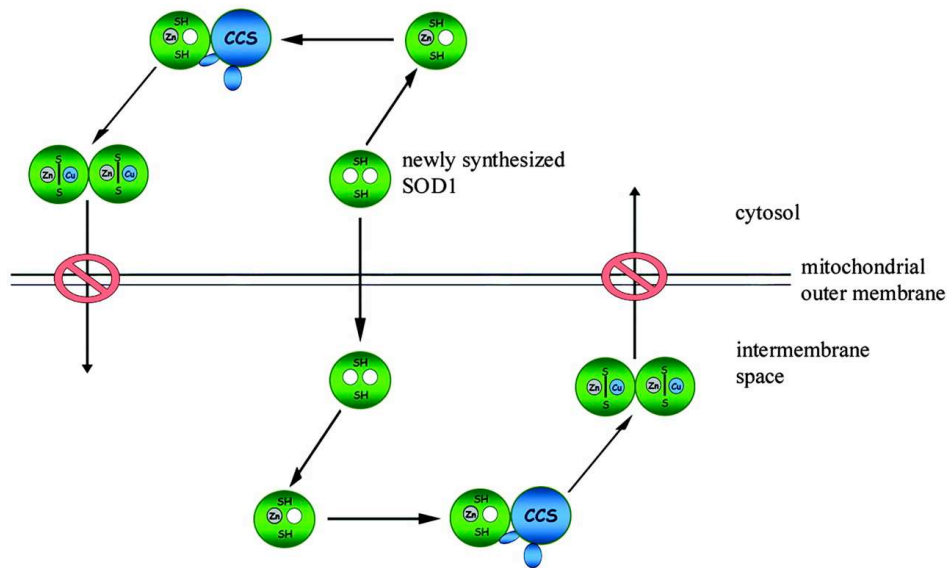


Schéma 24. Modèle de rétention de Sod1 dans l'EIM.

La Sod1 est importée sous une forme réduite et apoprotéique. Ccs1 catalyse ensuite l'oxydation et la métallation de Sod1 (Field et al., 2003). Cette réaction de maturation de Sod1 provoque sa rétention dans l'EIM.

e. L'invalidation de la Sod1 chez l'homme

Chez l'homme, des mutations du gène SOD1 sont associées à la sclérose latérale amyotrophique (FALS «familial amyotrophic lateral sclerosis»), une maladie neurodégénérative des motoneurones mortelle et incurable, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (pour revue voir (Noor et al., 2002)). Dans la plupart des cas, les mutations de SOD1 sont des mutations dominantes, provoquant un gain de fonction de Sod1 plutôt qu'une perte de son activité. La toxicité de ce gain de fonction pourrait éventuellement provenir de l'augmentation de la concentration intracellulaire d' H_2O_2 , résultant de l'augmentation de l'activité de Sod1. D'autres études ont proposé que l'agrégation des formes mutantes de Sod1 sur la membrane externe mitochondriale provoque l'obstruction de la machinerie mitochondriale d'import des protéines, ou encore que ces agrégats séquestrent des protéines anti-apoptotiques.

3. Notre hypothèse de la formation du pont disulfure de Sod1 (schéma 25)

La localisation de Sod1 dans l'EIM semble en fait être régie par différents facteurs: la présence de Ccs1 (Sturtz et al., 2001), la présence d'un relais disulfure Erv1/Mia40 fonctionnel (Mesecke et al., 2005) et son état d'oxydation (Field et al., 2003). Ces découvertes nous ont conduit à supposer que le mécanisme d'oxydation de Sod1 était connecté à Erv1/Mia40, et à envisager que Ccs1 est aussi un substrat de la voie Erv1/Mia40 de formation des ponts disulfures dans l'EIM, de façon similaire au métallo-chaperon à cuivre Cox17 (Mesecke et al., 2005). L'ensemble de ces données nous a conduits à proposer le modèle suivant. Sod1 et Ccs1 sont importées dans l'EIM sous une forme réduite et apoprotéique (Field et al., 2003). Mia40 catalyse ensuite l'insertion d'un pont disulfure sur les cystéines de Ccs1 grâce aux équivalents oxydants fournis par Erv1 (Mesecke et al., 2005). L'insertion du cuivre sur la Ccs1 est potentiellement catalysée par Mia40 ou par un autre métallo-chaperon. Ccs1 peut alors transférer le cuivre et le pont disulfure à Sod1, cette dernière réaction étant probablement catalysée par un échange di-thiol/disulfure (voir schéma 25). Nous pensons que ce mécanisme d'oxydation et de métallation (Cobine et al., 2006) de Sod1 se déroulent exclusivement dans l'EIM, car la formation de ponts disulfures dans un environnement cytoplasmique est difficile à concevoir, de par la présence d'un flux puissant d'équivalents réducteurs (voir introduction). Cependant, Sod1 est majoritairement localisée dans le cytoplasme sous une forme active (oxydée et métallée) (Sturtz et al., 2001). Ceci implique un export de Sod1 de l'EIM vers le cytoplasme. Or, ce phénomène d'export n'a jamais été décrit dans des conditions physiologiques et est contradictoire avec la notion de «folding trap» décrite pour la rétention des protéines dans l'EIM. Cette notion de folding trap pourrait s'expliquer dans le cas de Sod1 par une vitesse d'import supérieure à celle d'export de l'EIM, simulant ainsi une rétention de Sod1 pendant sa maturation dans l'EIM.

Nous avons vu dans l'introduction que la voie Erv1/Mia40 de formation des ponts disulfures dans les protéines de l'EIM présente certaines similarités avec la voie DsbA/DsbB du périplasme d'*E.coli* catalysant l'oxydation des protéines sécrétées (pour revue voir (Nakamoto and Bardwell, 2004)). Or, DsbA est capable de former un pont disulfure dans la Cu-Zn SOD du périplasme d'*E.coli* (Battistoni et al.,

1999), confortant ainsi notre hypothèse que la formation du pont disulfure et la métallation de Sod1 est catalysée dans l'EIM par la voie Erv1/Mia40 *via* Ccs1.

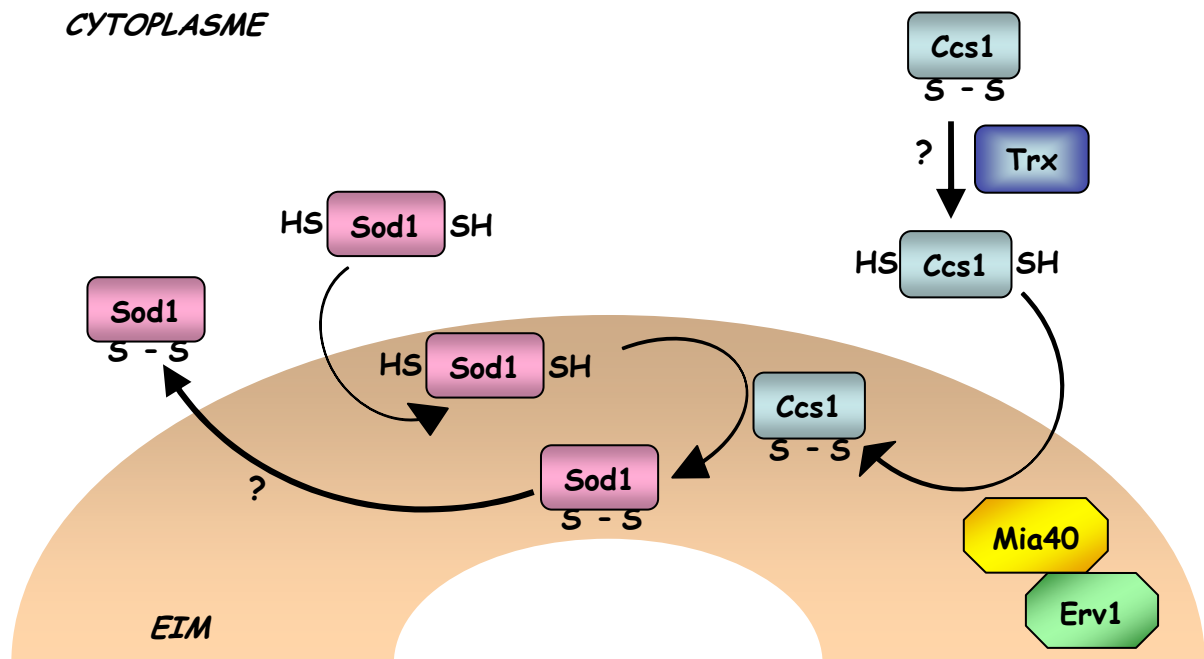


Schéma 25. Hypothèse du mécanisme de formation du pont disulfure intramolécule de Sod1.

Ccs1 et Sod1 sont importées sous une forme apoprotéique et réduite dans l'EIM. La voie Erv1/Mia40 catalyse ensuite l'oxydation de Ccs1. L'insertion du cuivre sur Ccs1 est catalysée par un mécanisme encore inconnu. Ccs1 est alors capable d'oxyder Sod1, selon un mécanisme d'échange di-thiol/disulfure, et de transférer le cuivre sur Sod1.

B.Résultats

Afin d'étayer notre hypothèse, j'ai mis en place les outils génétiques et moléculaires qui permettent d'étudier *in vivo* la formation du pont disulfure intramoléculaire de la Sod1 et l'implication de la voie Erv1/Mia40 dans ce mécanisme moléculaire. Plusieurs contrôles expérimentaux ont été nécessaires à la mise en place de ce sujet entièrement nouveau dans notre laboratoire. Nous avons ainsi pu obtenir *in vivo* des résultats expérimentaux sur Sod1 et Ccs1, en accord avec les données *in vitro* décrites dans la littérature. Grâce à ces outils, nous avons alors pu analyser l'effet de l'inactivation de la voie Erv1/Mia40 sur la formation du pont disulfure intramoléculaire de Sod1.

1. Données expérimentales du protéome oxydé

a. La Sod1

Lorsque nous avons identifié les protéines oxydées par spectrométrie de masse MALDI-TOF, nous avons trouvé la Sod1 sous une forme oxydée dans le cytoplasme d'une souche sauvage au repos (figures 17 et 33). La quantification des thiols oxydés par le NEM C¹⁴ montre que les deux cystéines de Sod1 sont majoritairement sous forme d'un pont disulfure intramoléculaire (voir tableau 1), ce qui est compatible avec les données de la littérature. Nous avons également identifié une protéine du réticulum endoplasmique Pdi1, dont les thiols sont majoritairement sous une forme oxydée (figure 17 et tableau 1). Cependant, Pdi1 est localisée dans un compartiment spécialisé dans la formation des ponts disulfure, alors que Sod1 est la seule protéine cytoplasmique possédant un pont disulfure permanent. La présence d'une protéine oxydée dans un environnement défavorable à l'oxydation des protéines est donc assez surprenante.

Nous avons également remarqué que le profil d'oxydation de Sod1 est modifié dans une souche invalidée pour la voie des thiorédoxines (figure 33). Cette modification se traduit principalement par l'apparition d'isoformes oxydées de Sod1 plus acides et basiques, pouvant être attribuées à des modifications covalentes post-traductionnelles. Par exemple, la formation d'acide sulfonique (-SO₂H) ou sulfonique (-SO₃H) sur les thiols d'une protéine peut conduire à l'apparition de spots plus acides (Wagner et al., 2002), comme nous l'avons observé pour la cystéine catalytique de Tsa1 (figure 20B). La formation d'un acide sulfonique sur une cystéine de Sod1 a été

décrite chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Choi et al., 2005). Cependant, l'analyse par spectrométrie de masse des différentes isoformes de Sod1 ne nous a pas permis de mettre en évidence de telles modifications dans la souche invalidée pour la voie des thiorédoxines (données non illustrées).

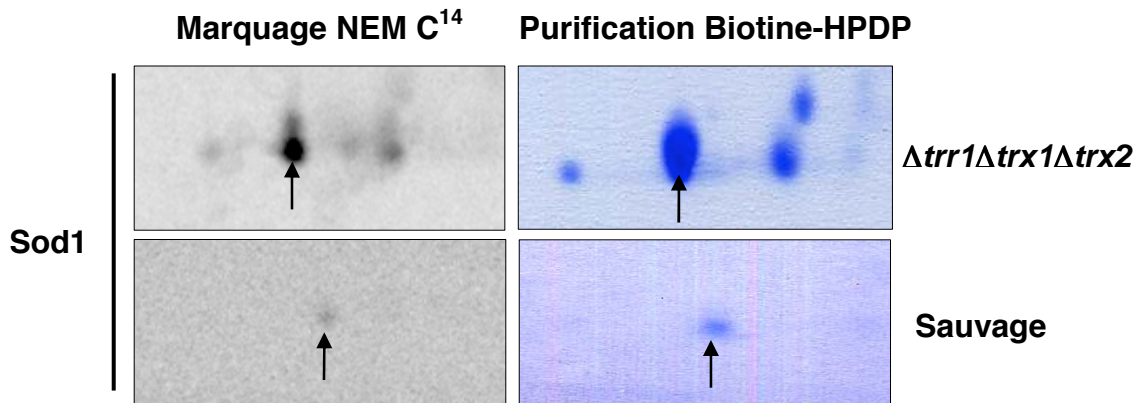


Figure 33. L'oxydation de la Sod1 dans une souche sauvage et invalidée pour la voie des thiorédoxines.

L'agrandissement correspond à la portion des gels bidimensionnels de la figure 23 (A-D) à l'emplacement de la Sod1.

b. La Ccs1

Ccs1 a également été détectée sous une forme oxydée, mais uniquement dans la souche invalidée pour la voie des thiorédoxines (figures 23 et 34). Comme pour Sod1, l'accumulation de Ccs1 oxydée dans cette souche mutante peut résulter de l'élévation de la quantité de protéine et de l'augmentation de son oxydation. Or, contrairement à Sod1, l'absence de la voie des thiorédoxines ne provoque pas d'augmentation de la quantité totale de Ccs1 (figure 23E et F). Ceci signifie que l'identification de Ccs1 dans la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ est principalement due à une augmentation de son oxydation. Or, le seul état d'oxydation décrit pour Ccs1 est un pont disulfure intermoléculaire avec la Sod1 (Furukawa et al., 2004), ce qui suggère que l'absence de la voie des thiorédoxines provoque une augmentation de la liaison disulfure Sod1/Ccs1. Cependant, cette voie n'intervient pas dans la réduction de la liaison Sod1/Ccs1 et son absence n'augmente pas cette liaison disulfure (données non illustrées). La présence d'une autre forme d'oxydation de Ccs1, probablement réduite par les thiorédoxines, ne peut donc être exclue (voir schéma 25).

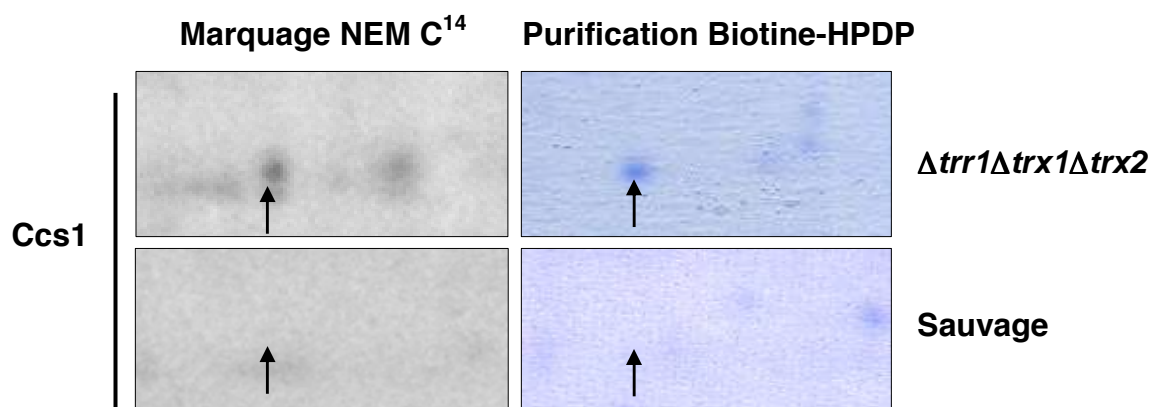


Figure 34. L'oxydation de la Ccs1 dans une souche sauvage et invalidée pour la voie des thiorédoxines.

L'agrandissement correspond à la portion des gels bidimensionnels de la figure 23 (A-D) à l'emplacement de la Ccs1.

2. Analyse de l'état d'oxydation de Ccs1

Une relation étroite semble donc exister entre la voie des thiorédoxines et Ccs1. Comme la voie des thiorédoxines joue un rôle prépondérant dans le métabolisme de l' H_2O_2 , nous nous sommes donc intéressés à la connexion entre Ccs1 et le métabolisme de l' H_2O_2 . Les cellules, sauvage et $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$, sont transformées par le plasmide exprimant la protéine Ccs1-HA et cultivées en présence ou non d' H_2O_2 . Les protéines sont ensuite extraites à différents temps d'incubation, solubilisées, déposées sur un gel SDS-PAGE, et révélées après western-blot par l'anticorps anti-HA (figure 35). Tout d'abord, l'invalidation de la voie des thiorédoxines provoque l'apparition de complexes de haut poids moléculaire (pistes non traitées des gels de gauche et de droite) qui disparaissent en présence d'agents réducteurs (données non illustrés), montrant ainsi la nature redox de ces complexes. La voie des thiorédoxines pourrait donc intervenir directement dans la réduction de ces complexes redox. L' H_2O_2 provoque non seulement une augmentation de ces complexes redox, en fonction de la concentration d' H_2O_2 (pistes traitées des gels supérieurs et inférieurs) mais aussi l'apparition de nouveaux complexes en l'absence de la voie des thiorédoxines (gels de droite). La présence de complexes redox similaires dans la souche sauvage en présence d' H_2O_2 et dans la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$, indique que l'absence des thiorédoxines conduirait à l'augmentation de la concentration intracellulaire d' H_2O_2 , qui provoquerait la formation de complexes redox de Ccs1. La voie des thiorédoxines pourrait donc

intervenir soit directement dans la réduction de complexes redox de Ccs1, soit indirectement dans la formation de ces complexes par une augmentation de la concentration d'H₂O₂. Ces complexes de Ccs1 peuvent être de deux natures: pont disulfure intermoléculaire entre Ccs1 et un partenaire, ou liaisons disulfures entre plusieurs monomères de Ccs1.

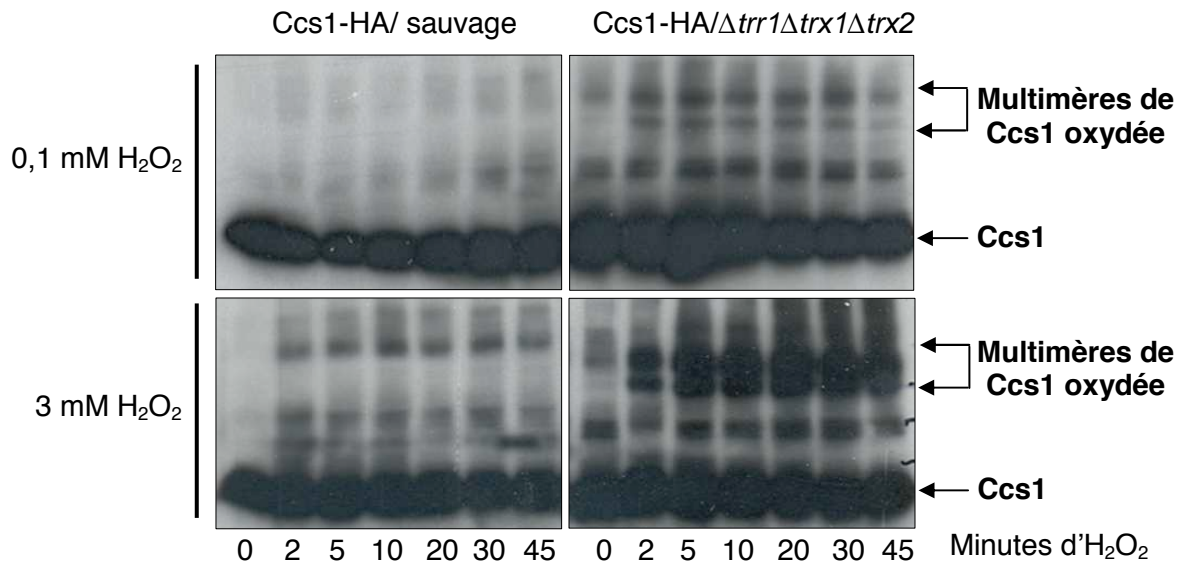


Figure 35. Etude de l'état d'oxydation de la Ccs1.

Cinétique et effet dose du peroxyde d'hydrogène sur l'état redox de Ccs1. Un traitement de 0,1 mM ou de 3 mM de peroxyde d'hydrogène est appliqué pendant 45 minutes, sur une souche sauvage et $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$, transformées par le plasmide exprimant Ccs1-HA. Les cellules sont arrêtées et lysées en milieu acide aux temps de traitement indiqués, puis solubilisées en tampon dénaturant TES contenant du NEM. 20 μ g de protéines sont déposées sur un gel SDS-PAGE non réduit et révélées par l'anticorps anti-HA.

Afin d'identifier la nature de ces complexes redox, nous avons construit un vecteur surexprimant Ccs1 étiquetée His, pour faciliter la purification de cette protéine peu abondante. Nous avons tout d'abord contrôlé l'efficacité de surexpression de ce nouveau plasmide. Les souches $\Delta trx1\Delta trx2$ et $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ sont transformées par Ccs1-His surexprimée ou non. Les protéines sont extraites, déposées sur un gel SDS-PAGE et révélées après western blot avec l'anticorps anti-His (pistes 1 et 3 figure 36). Nous observons une importante surexpression de Ccs1-His. Nous avons ensuite vérifié que Ccs1-His réagit de la même manière que Ccs1-HA en présence d'H₂O₂. Pour cela, les mêmes souches sont incubées en présence d'H₂O₂ et les protéines extraites sont traitées de manière identique (piste 2 et 4,

figure 36). Nous observons bien la formation de complexes redox de Ccs1-His en réponse à l' H_2O_2 , bien que ceux-ci soient moins visibles qu'avec Ccs1-HA, probablement à cause de la faible sensibilité de détection de l'anticorps anti-His.

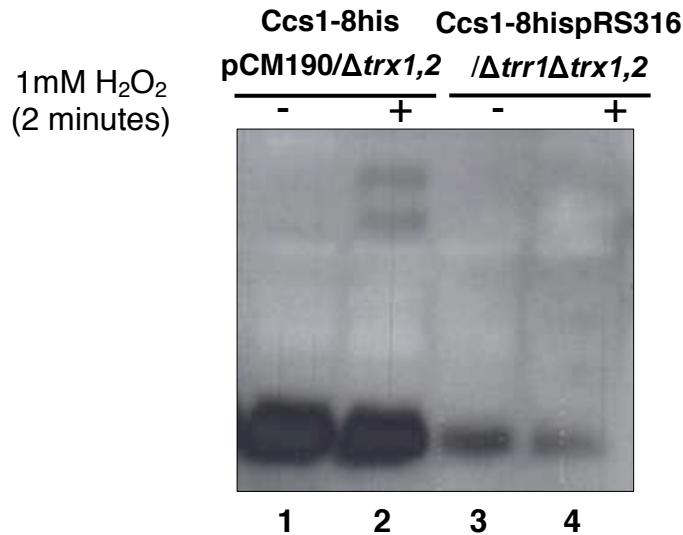


Figure 36. Contrôle de la surexpression et de l'oxydation de Ccs1.

Etat d'oxydation de Ccs1-His dans la souche $\Delta trx1\Delta trx2$ et $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$, après un traitement de 1mM de peroxyde d'hydrogène pendant 2 minutes. Les protéines sont extraites de façon identique à la figure 35 puis révélées après un western blot avec l'anticorps anti-His.

Afin de purifier les complexes redox de Ccs1-His, les protéines extraites des cellules $\Delta trx1\Delta trx2$ surexprimant Ccs1-His sont solubilisées puis incubées sur une résine NiNTA-sépharose selon le protocole indiqué dans la partie «Méthodes». Les protéines purifiées sont déposées sur un gel SDS-PAGE réduit ou non et révélées par coloration au bleu de Coomassie (figure 37A). Après visualisation des complexes, les bandes d'intérêt sont analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Nous avons ainsi identifié la présence d'un complexe redox entre Ccs1 et la peroxydase Tsa1. Pour confirmer cette interaction, nous avons alors vérifié la disparition du complexe Tsa1/Ccs1 dans une souche invalidée pour *TRR1* et *TSA1*. Pour cela, les souches $\Delta trr1$ et $\Delta trr1\Delta tsa1$ sont transformées par le plasmide exprimant Ccs1-HA, cultivées et traitées ou non par l' H_2O_2 . Après extraction des protéines, western blot et révélation avec l'anticorps anti-HA, nous voyons que le complexe Tsa1/Ccs1 disparaît en l'absence de Tsa1, confirmant ainsi que Tsa1 interagit avec Ccs1 en présence d' H_2O_2 (figure 37B).

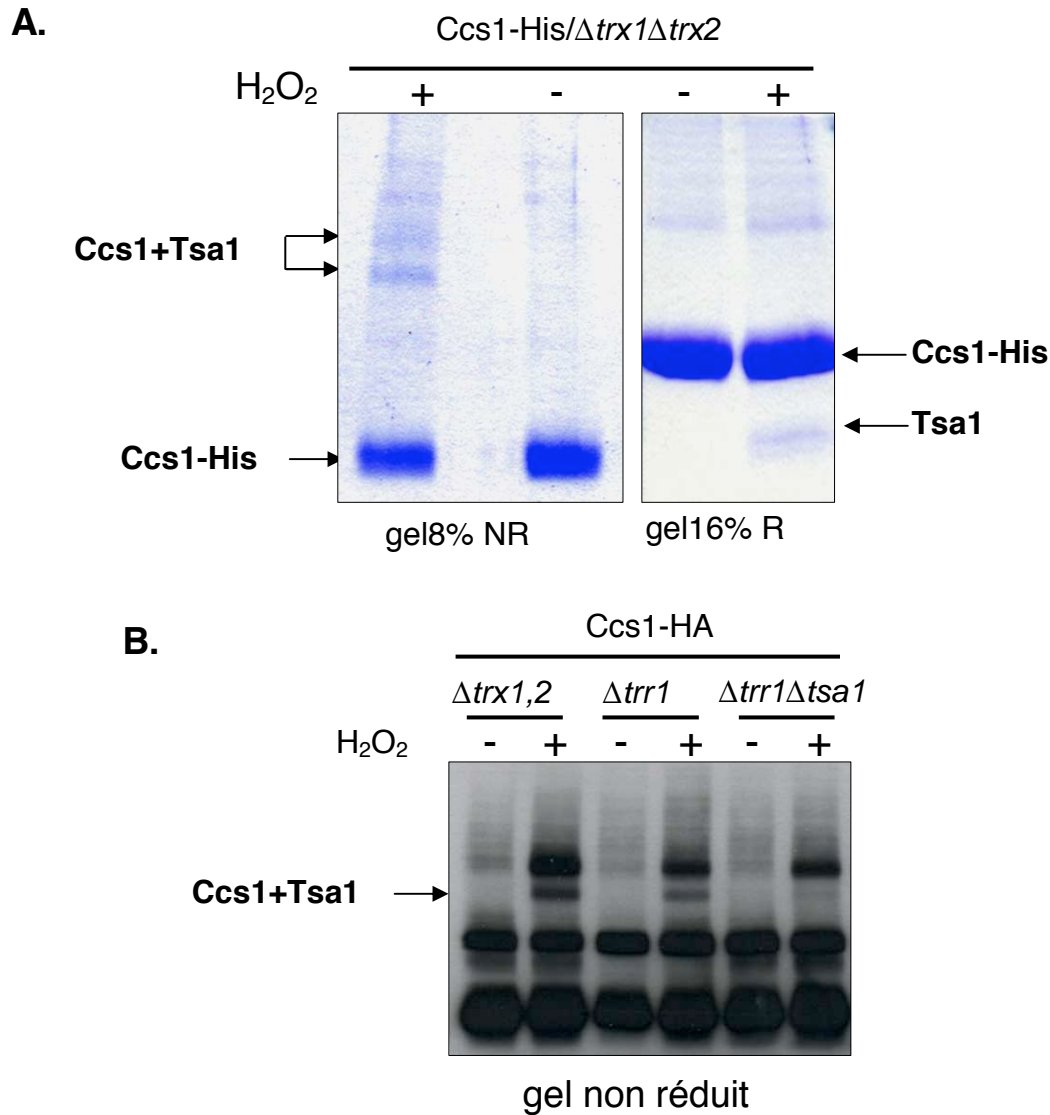


Figure 37. Recherche des partenaires redox de Ccs1.

(A) Purification de Ccs1-8his surexprimée dans une souche invalidée pour les thiorédoxines, en présence ou non de 1 mM de peroxyde d'hydrogène pendant 2 minutes. Les protéines sont extraites en milieu acide et solubilisées dans un tampon dénaturant compatible avec la purification par affinité sur une colonne de sépharose couplée avec du nickel (Ni-NTA). Ces extraits sont incubés en présence de NiNTA sépharose. Les protéines purifiées sont ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE, réduit (R) ou non réduit (NR), et révélés par coloration au bleu de Coomassie. Les complexes de haut poids moléculaire sont identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. (B) Vérification de l'identification du partenaire redox de Ccs1. Les souches indiquées sont transformées par Ccs1-HA et traitées ou non pendant 2 minutes avec 1mM d'H₂O₂. Les protéines extraites en milieu acide sont solubilisée en présence de NEM puis déposées sur un gel SDS-PAGE non réduit et révélées par l'anticorps anti-HA (Ccs1) après western blot.

Contrairement aux autres complexes redox, le complexe Ccs1/Tsa1 n'est présent ni dans la souche sauvage traitée à l' H_2O_2 , ni dans la souche $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ non traitée. Tsa1 ne semble interagir avec Ccs1 que dans des conditions de stress oxydant drastiques, à savoir en l'absence de la voie des thiorédoxines et en présence d' H_2O_2 . Nous savons que dans ces conditions, Tsa1 s'accumule sous une forme majoritairement oxydée (données non publiées du laboratoire). Nous pouvons supposer que cette forme de Tsa1 agirait comme une oxydase de Ccs1, de façon similaire aux thiorédoxines d'*E.coli* en l'absence de la thiorédoxine réductase (Stewart et al., 1998). Cependant, la signification physiologique de l'interaction redox entre Ccs1 et Tsa1 dans ces conditions reste à éclaircir.

3. Etat redox et activité de la Sod1

Dans des expériences préliminaires non illustrées, nous avons tout d'abord vérifié que la transformation des souches $\Delta sod1$ et $\Delta ccs1$, par des plasmides exprimant les versions étiquetées de Sod1 et Ccs1, éliminait les phénotypes de sensibilité à différents agents oxydants (ménadione et paraquat) (Gralla and Valentine, 1991) et d'auxotrophie en lysine et méthionine (Liu et al., 1992) (Culotta et al., 1997) (Gamonet and Lauquin, 1998) de ces souches mutantes. Ces expériences nous ont fournis des résultats satisfaisants, témoignant de l'activité physiologique des protéines Sod1 et Ccs1, fusionnées à une étiquette. Nous avons ensuite étudié l'état redox et l'activité de Sod1 dans différentes conditions expérimentales, afin d'analyser *in vivo* la contribution de Ccs1 dans la formation du pont disulfure intramoléculaire de Sod1.

a. Etat redox de Sod1

Nous avons tout d'abord analysé l'état d'oxydation de Sod1, en présence ou en absence de Ccs1, par la méthode de marquage des thiols par l'AMS décrite auparavant (voir paragraphe I.A.2.a). Une souche invalidée pour les gènes *SOD1* et *CCS1* est transformée par un plasmide exprimant la protéine Sod1-His sauvage ou mutée sur l'un de ses deux résidus cystéines 57 ou 146, en présence ou non du plasmide exprimant Ccs1 étiqueté HA. Les protéines sont extraites, solubilisées dans un tampon contenant de l'AMS, ou du DTT puis de l'AMS, et enfin déposées sur un gel SDS-PAGE. Les protéines sont révélées par western blot avec un anticorps anti-His dirigé contre Sod1 (figure 38).

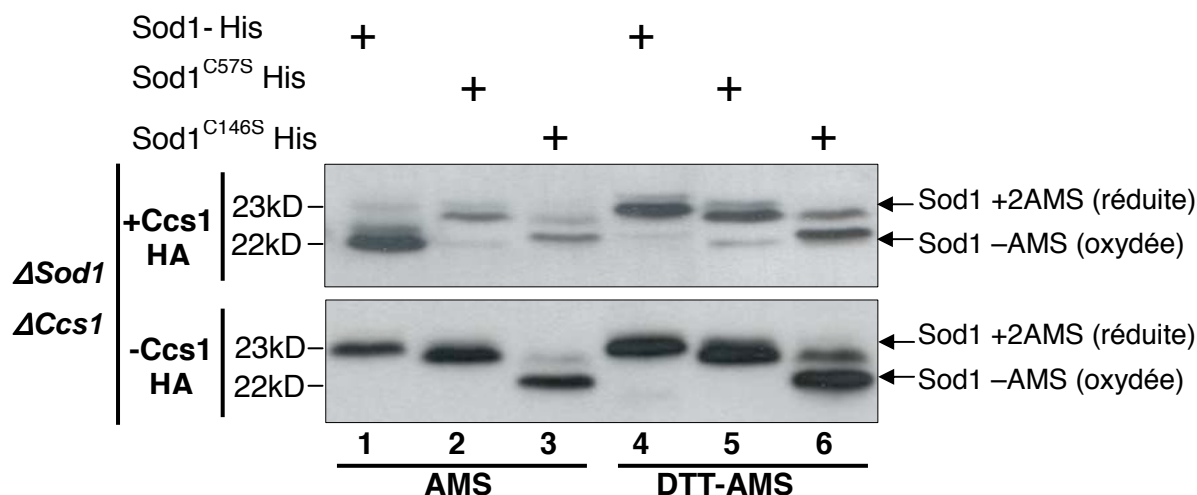


Figure 38. Evaluation de l'état d'oxydation *in vivo* de Sod1-His.

Les cellules invalidées pour les gènes SOD1 et CCS1 sont transformées par les plasmides exprimant Ccs1-HA et Sod1-His sous sa version sauvage ou mutée sur les cystéines 57 et 146, lorsque ceux-ci sont indiqués. Les protéines sont ensuite extraites en milieu acide puis solubilisées en tampon dénaturant TES contenant ou non 20 mM de DTT suivi de 15 mM d'AMS. Les protéines sont ensuite déposées sur un gel SDS-PAGE en l'absence de réducteur, et révélées après un western blot avec l'anticorps anti-His dirigé contre l'étiquette de la Sod1.

En l'absence de Ccs1, la Sod1 est réduite, car l'addition de DTT avant le marquage par l'AMS ne modifie pas sa migration à 23 kDa (figure 38 inférieure, pistes 1 et 4). Par contre, en présence de Ccs1, l'AMS ne provoque un retard de migration de Sod1 qu'après réduction par le DTT, indiquant que Sod1 s'oxyde sous forme d'un pont disulfure intramoléculaire, inaccessible à l'AMS et migrant à 22 kDa [23 – (2x0.5 kDa)], (figure 38 supérieure, pistes 1 et 4). Nous observons de nouveau que Sod1 se trouve majoritairement sous forme de pont disulfure en présence de Ccs1 (> 90%), ce qui est compatible avec notre quantification des thiols oxydés de Sod1 (tableau 1) (Le Moan et al., 2006) et avec les données de la littérature (Furukawa et al., 2004). Si l'on mute l'une des deux cystéines de Sod1, le marquage résiduel par l'AMS de l'une ou l'autre cystéine devrait produire un retard de migration de 0,5 kDa. Or, la mutation de la cystéine 146 ne présente pas un retard de migration aussi important que celui observé pour la mutation de la cystéine 57 (figure 38, pistes 2, 3, 5, 6). La cystéine 57 n'est donc probablement pas marquée par l'AMS après traitement par le DTT (figure 38, pistes 3 et 6). L'absence de marquage par l'AMS pourrait s'expliquer par la présence de la cystéine 57 sous une forme non réductible par le DTT, c'est à dire sous forme d'un acide sulfonique ou sulfonique. La cystéine

57 est impliquée dans la liaison disulfure avec Ccs1 (Lamb et al., 2001), elle possède donc une réactivité importante pouvant potentiellement conduire à sa suroxydation en l'absence de la cystéine 146.

b. Activité de Sod1

Nous avons vu que Sod1-His s'oxyde sous forme d'un pont disulfure en présence de Ccs1. Nous avons donc ensuite vérifié que cette forme de Sod1-His est fonctionnelle, en mesurant son activité de dismutation du superoxyde grâce à la méthode de coloration des gels natifs au NBT «Nitroblue Tétrazolium» (voir partie «méthodes»). Les souches invalidées pour *SOD1* et/ou *CCS1* sont transformées par des plasmides exprimant Sod1 sous sa forme sauvage ou mutée sur la cystéine 146 et Ccs1-HA. Les protéines totales sont extraites puis déposées sur un gel natif. Après migration, l'activité SOD est révélée par coloration au NBT. Le NBT se colore en présence du superoxyde généré par l'oxydation de la riboflavine à l'air ambiant. La disparition du superoxyde résultant de l'activité de dismutation des SOD se traduit donc par une décoloration du NBT à l'emplacement de la Sod1 ou de la Sod2. L'expression de Sod1-His sauvage dans une souche invalidée pour le gène *SOD1* produit une décoloration du NBT (figure 39, piste 2), prouvant son activité de dismutation. Par contre, la protéine Sod1^{C146S} ne présente pas d'activité de dismutation (figure 39, piste 3), confirmant la nécessité du pont disulfure intramoléculaire pour dismuter le superoxyde. Nous observons également que Sod1 est inactive dans une souche invalidée pour *CCS1* (figure 39, piste 4), et que la transformation de cette souche par un plasmide exprimant Ccs1-HA réactive Sod1, prouvant ainsi l'activité de Ccs1 étiquetée (figure 39, piste 5). Nous attribuons la décoloration NBT de la piste 4 à une perte d'activité de Sod1 en l'absence de Ccs1 et non à une diminution de la quantité de Sod1, puisque cette quantité détectée en western blot est inchangée en présence ou en l'absence de Ccs1 (figure 38).

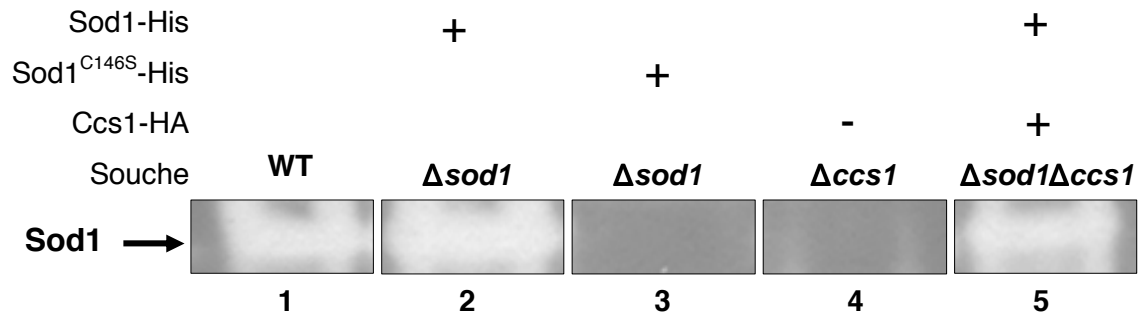


Figure 39. Evaluation de l'activité *in vivo* de la Sod1-His.

Les cellules invalidées pour les gènes *SOD1* et/ou *CCS1* sont transformées par les plasmides exprimant Ccs1-HA et Sod1-His sous sa version sauvage ou mutée sur les cystéines 57 et 146, lorsque ceux-ci sont indiqués. Les protéines totales sont ensuite extraites dans un tampon de lyse non dénaturant en présence de billes de verre et en l'absence d'agent alkylant, puis déposées sur un gel natif et révélées après une coloration au NBT (Nitroblue tetrazolium). L'extrait de protéines d'une souche sauvage est déposé comme contrôle de l'activité de Sod1 endogène (piste 1).

L'ensemble de nos résultats obtenus *in vivo* nous permet de confirmer les données *in vitro* des autres laboratoires, à savoir que Ccs1 est essentielle à la formation du pont disulfure intramoléculaire de Sod1 (Furukawa et al., 2004), indispensable à l'activité catalytique de dismutation de cette dernière.

4. Interaction de Sod1 et Ccs1

a. Visualisation d'une interaction Sod1/Ccs1 *in vivo*

Afin de confirmer *in vivo* la liaison disulfure décrite *in vitro* entre Sod1 et Ccs1, nous avons cherché des conditions expérimentales propices à la visualisation *in vivo* de l'interaction Sod1/Ccs1. Nous avons réalisé ceci de deux manières différentes: par extraction des protéines totales en milieu acide ou par co-précipitation des deux protéines.

i. Extraction des protéines totales en milieu acide

Une souche $\Delta sod1\Delta ccs1$ est transformée par les plasmides exprimant Ccs1-HA et/ou Sod1-His portant ou non une mutation sur les cystéines. Les protéines sont extraites, solubilisées, déposées sur gel SDS-PAGE réduit ou non réduit, et révélées par western blot avec un anticorps anti-HA dirigé contre Ccs1 (figure 40). Ccs1 migre sous deux formes distinctes de poids moléculaire différents (35 et 55 kDa) (figure 40, gel supérieur piste 1). La forme supérieure à 55 kDa disparaît en présence d'agent

réducteur (figure 40, gel inférieur piste 1) et en l'absence de Sod1 (figure 40, piste 4). Cette forme correspond en fait à une liaison disulfure entre Sod1/Ccs1. Cette interaction Sod1/Ccs1 dans une souche exprimant les deux protéines sauvages n'engage qu'une très faible proportion (~1%) de la protéine Ccs1. Cette observation concorde avec la présence de Sod1 sous une forme majoritairement oxydée en disulfure intramoléculaire et non pas en disulfure intermoléculaire avec Ccs1 (figure 38, pistes 1 et 4). La faible proportion de liaison Sod1/Ccs1 est probablement le résultat d'une interaction rapide et transitoire entre les deux protéines, et/ou d'une localisation subcellulaire particulière ne permettant pas sa visualisation avec notre méthode d'extraction des protéines.

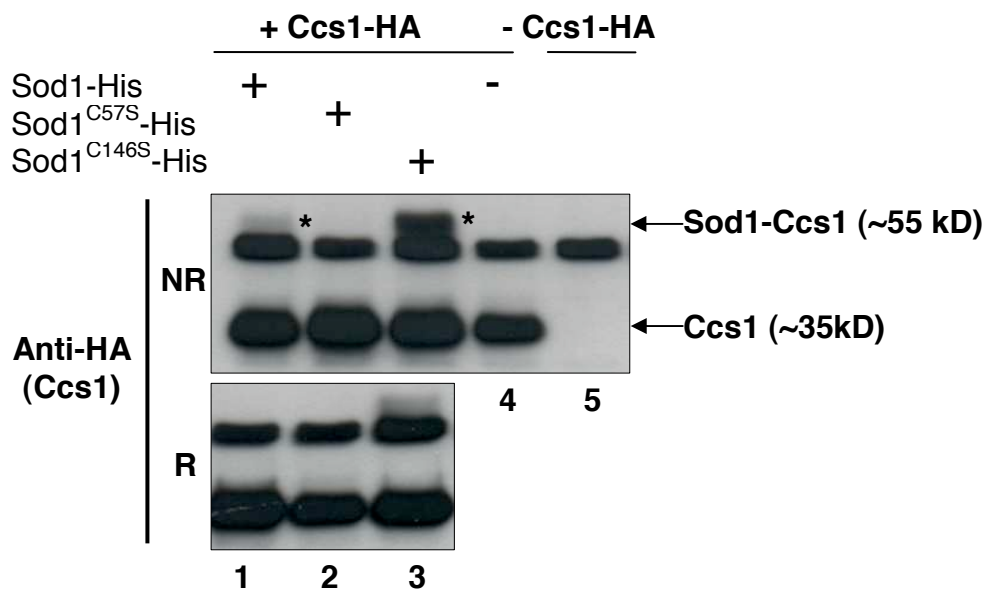


Figure 40. Recherche de l'interaction *in vivo* Sod1-Ccs1 par extraction des protéines totales.

Les cellules invalidées pour les gènes *SOD1* et *CCS1* sont transformées par les plasmides exprimant Ccs1-HA et Sod1-His sous sa version sauvage ou mutée sur les cystéines 57 et 146, lorsque ceux-ci sont indiqués. Les protéines sont ensuite extraites en milieu acide à partir des souches transformées puis solubilisées en tampon dénaturant TES contenant 50 mM de NEM. Les protéines totales sont ensuite déposées sur un gel SDS-PAGE en présence ou non de β -mercaptoéthanol (NR ou R) et révélées après un western blot par l'anticorps anti-HA dirigés contre l'étiquette de Ccs1. L'étoile indique la présence d'un complexe redox Sod1/Ccs1.

ii. Co-précipitation de Sod1 et Ccs1

Nous avons cherché à confirmer l'interaction Sod1/Ccs1 par des expériences de co-précipitation des deux protéines. Les extraits de protéines, issus d'une souche $\Delta sod1\Delta ccs1$ transformée par les plasmides exprimant Sod1-His et Ccs1-HA, sont solubilisés en présence de NEM. Les protéines sont ensuite déposées sur une résine de NiNTA sépharose, ayant une grande affinité pour l'étiquette His de Sod1-8His. Les protéines purifiées par affinité sont déposées sur un gel SDS-PAGE réduit ou non réduit et révélées par western blot avec l'anticorps anti-His (Sod1), ou l'anticorps anti-HA (Ccs1). L'élution de la résine libère un complexe entre Sod1 et Ccs1 (figure 41, pistes 2 et 5) qui disparaît en l'absence de Ccs1 (figure 41, pistes 1 et 8) et en présence d'agent réducteur (figure 41, piste 4), confirmant à nouveau la liaison disulfure entre Sod1 et Ccs1. Nous pouvons noter que la purification enrichit le complexe Sod1/Ccs1 par rapport à l'extraction totale, et que cette interaction est relativement résistante à la présence d'agents réducteurs.

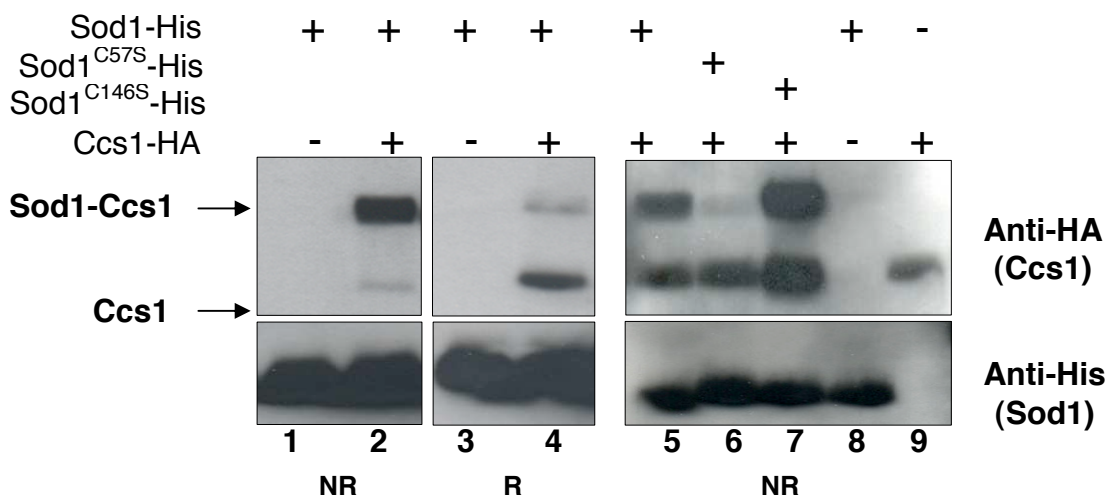


Figure 41. Recherche de l'interaction *in vivo* Sod1-Ccs1 par co-précipitation.

Les cellules invalidées pour les gènes *SOD1* et *CCS1* sont transformées par les plasmides exprimant Ccs1-HA et Sod1-His sous sa version sauvage ou mutée sur les cystéines 57 et 146, lorsque ceux-ci sont indiqués. Les protéines sont ensuite extraites en tampon dénaturant contenant de l'urée et du NEM, permettant leur purification par affinité sur une colonne de sépharose couplée avec du nickel (NiNTA) présentant une forte affinité pour les résidus histidines de Sod1-His. L'élution de la résine avec l'addition d'imidazole permet de décrocher Sod1-His en interaction avec un éventuel partenaire. Les protéines Sod1-His ou co-purifiées avec Sod1-His sont ensuite déposées sur un gel SDS-PAGE en présence ou non de β -mercaptoéthanol (NR ou R) et révélées après un western blot par l'anticorps anti-His ou anti-HA dirigés respectivement contre l'étiquette des protéines Sod1 et Ccs1 lorsque ceux-ci sont indiqués.

L'ensemble de ces résultats démontre sans ambiguïté l'interaction *in vivo* de Sod1 et Ccs1 sous forme d'un pont disulfure intermoléculaire.

b. Effet de la mutation des cystéines de Sod1 sur l'interaction avec Ccs1

Afin de confirmer les données *in vitro* et d'identifier la cystéine de Sod1 en interaction avec Ccs1, nous avons reproduit les expériences ci-dessus avec une Sod1-His mutée sur l'une des deux cystéines 57 ou 146.

i. Extraction des protéines totales en milieu acide

Le pont disulfure intermoléculaire Sod1/Ccs1 est stabilisé lorsque la cystéine 146 de la Sod1 est mutée (figure 40 gel supérieur, piste 3), alors que la mutation de la cystéine 57 provoque la perte de cette interaction (figure 40 gel supérieur, piste 2). Ceci montre que la cystéine 57 est le résidu engagé dans la liaison disulfure avec Ccs1.

ii. Co-précipitation de Sod1 et Ccs1

De la même façon, l'interaction de Sod1 avec Ccs1 disparaît lorsque la cystéine 57 de la Sod1 est mutée et se stabilise quand la cystéine 146 est absente (figure 41, pistes 6 et 7), confirmant le résultat précédent ainsi que les données de cristallographie du complexe Sod1/Ccs1 (Lamb et al., 2001) montrant que la cystéine 57 de Sod1 est engagée dans le pont disulfure intermoléculaire avec Ccs1.

L'ensemble de ces résultats démontre sans ambiguïté la formation *in vivo* d'un pont disulfure intermoléculaire entre la cystéine 57 de Sod1 et Ccs1 et l'intervention de la cystéine 146 de Sod1, afin de résoudre ce pont disulfure intermoléculaire en pont intramoléculaire. Nous avons trois hypothèses non exhaustives de formation de ce pont disulfure intermoléculaire: (i) l'attaque de la C57 sous forme thiolate de Sod1 sur un pont disulfure de Ccs1, (ii) l'attaque de la C57 sous forme sulfénique de Sod1 sur une cystéine de Ccs1, (iii) l'attaque d'une cystéine sous forme sulfénique de Ccs1 sur la C57 de Sod1.

c. Effet de la mutation des cystéines de Ccs1

Il était ensuite logique de rechercher la cystéine de Ccs1 en interaction avec la cystéine 57 de Sod1 afin de déterminer le mécanisme moléculaire de formation de la liaison disulfure Sod1/Ccs1. Ccs1 possède 7 cystéines, dont certaines sont supposées interagir avec la Sod1. Par exemple, la cystéine 229 de Ccs1 se lie à Sod1 dans le cristal du complexe Sod1/Ccs1 (Lamb et al., 2001). Néanmoins d'autres auteurs suggèrent un rôle prépondérant *in vivo* de la cystéine 231 dans l'activité de chaperon de Ccs1 (Schmidt et al., 1999), (Field et al., 2003). Nous avons donc décidé de muter ces deux cystéines. Pour analyser l'effet de ces mutations ponctuelles, nous transformons une souche $\Delta sod1 \Delta ccs1$ par les plasmides exprimant les protéines Sod1-His^{C146S} et Ccs1-HA sauvage ou mutée sur les cystéines 229 ou 231. Les protéines sont extraites en milieu acide, déposées sur un gel SDS-PAGE non réduit et révélées par western blot avec l'anti-HA (Ccs1) (figure 42). Nous avons également réalisé l'extraction des protéines dans un autre tampon de lyse, de façon similaire à la figure 39, en vue d'effectuer le test NBT d'activité de Sod1, après migration des extraits sur un gel natif (données non illustrées).

Nous confirmons à nouveau que la mutation de la cystéine 146 stabilise le complexe Sod1/Ccs1 (figure 42, piste 2). Cependant, dans cette expérience, nous observons la présence de deux complexes Sod1/Ccs1 de poids moléculaire différents, probablement à cause de la méthode de détection utilisée (Odyssey[®]), qui diffère de la précédente. Inversement, le complexe Sod1/Ccs1 est perdu lorsque l'une des deux cystéines de Ccs1 est mutée (figure 42, pistes 3 et 4). Ceci suggère l'importance de conserver les deux cystéines intactes dans le domaine C-terminal de Ccs1 pour interagir de façon covalente avec Sod1. Ce résultat concorde également avec notre hypothèse concernant l'existence d'un disulfure entre les cystéines 229 et 231 de Ccs1, qui serait ensuite attaqué par la cystéine 57 de Sod1, pour former un disulfure Sod1/Ccs1. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que ces cystéines coordonnent le cuivre (Rae et al., 2001) et que leur absence provoque une déstabilisation structurale de Ccs1, empêchant son interaction avec Sod1. Dans ce dernier cas, la cystéine de Ccs1 engagée dans la liaison disulfure avec Sod1 reste à identifier. Cependant, la mutation de l'une des deux cystéines n'empêche pas l'interaction non covalente entre Sod1 et Ccs1 (Schmidt et al., 2000), suggérant que le pont disulfure intermoléculaire Sod1/Ccs1 pourrait encore se former.

Le test NBT a révélé que la Sod1 est inactive lorsque l'une des deux cystéines de Ccs1 est mutée, montrant à nouveau le lien étroit entre l'interaction Sod1/Ccs1 et l'activité de la Sod1 (non illustré). Ce résultat est compatible avec les données du groupe de Culotta sur la perte d'activité de Sod1 en l'absence de l'une des deux cystéines de Ccs1 (Schmidt et al., 1999), (Field et al., 2003). Néanmoins, nous avons montré que cette perte d'activité est corrélée à l'absence d'interaction entre Sod1/Ccs1.

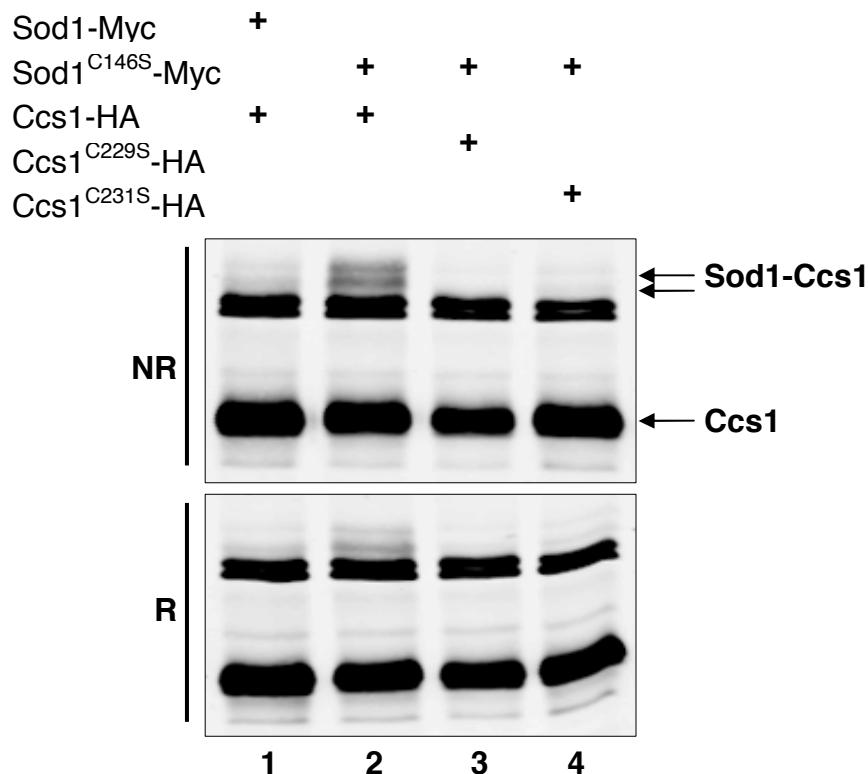


Figure 42. Effet de la mutation des cystéines de Ccs1 sur le complexe Sod1-Ccs1.

Les cellules invalidées pour les gènes *SOD1* et *CCS1* sont transformées par les plasmides exprimant Sod1-Myc sous sa version sauvage ou mutée sur la cystéine 146 et par Ccs1-HA sous sa version sauvage ou mutée sur les cystéines 229 et 231, lorsque ces plasmides sont indiqués. Les protéines sont ensuite extraites en milieu acide à partir des souches transformées et solubilisées en tampon TES contenant 50 mM de NEM. Les protéines sont alors déposées sur un gel SDS-PAGE en présence ou non de β -mercaptoéthanol, révélées après un western blot par l'anticorps anti-HA dirigé contre l'étiquette de Ccs1 et détectées avec l'Odyssey®.

5. Effets de l'inactivation de la voie Erv1/Mia40

Le but est d'établir un lien entre la voie Erv1/Mia40 de formation des ponts disulfures dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (EIM) et la formation du pont disulfure intramoléculaire de Sod1. Cette voie étant essentielle (Mesecke et al., 2005) (Rissler et al., 2005), nous avons du construire des souches d'expression conditionnelle des protéines Erv1 ou Mia40. Un premier essai d'expression d'Erv1 sous contrôle d'un promoteur galactose s'est avéré insuffisant pour inhiber complètement l'expression de la protéine en présence de glucose et induire la mort cellulaire. Notre deuxième stratégie, à savoir l'expression d'Erv1 sous contrôle d'un promoteur répressible par la tétracycline, combinée à une mutation thermosensible (ts) d'Erv1 (Lisowsky, 1994), a permis d'obtenir une extinction totale de l'expression de la protéine, se traduisant par une létalité cellulaire. La construction des souches exprimant Erv1 étiqueté dans une version sauvage (Erv1-His-Myc) ou thermosensible (Erv1^{ts}-His-Myc), sous contrôle d'un promoteur tétracycline, est détaillée dans la partie «Méthodes». Différents tests préliminaires ont été réalisés afin de déterminer les conditions optimales d'utilisation de ce mutant conditionnel.

a. La répression d'Erv1 est létale

i. L'effet de la température

Afin de vérifier que la mutation thermosensible du construit Erv1^{ts}-His-Myc provoque un défaut de croissance à 37°C conduisant à une létalité cellulaire (Becher et al., 1999), la souche invalidée pour le gène ERV1 est transformée par un plasmide exprimant Erv1, étiqueté Myc et His, sauvage ou thermosensible et cultivée à 22°C ou à 37°C. La croissance des deux souches est identique à 22°C, tandis qu'à 37°C, la souche thermosensible présente un net ralentissement de croissance, après 8 heures de culture, indiquant l'effet de la mutation thermosensible (figure 43).

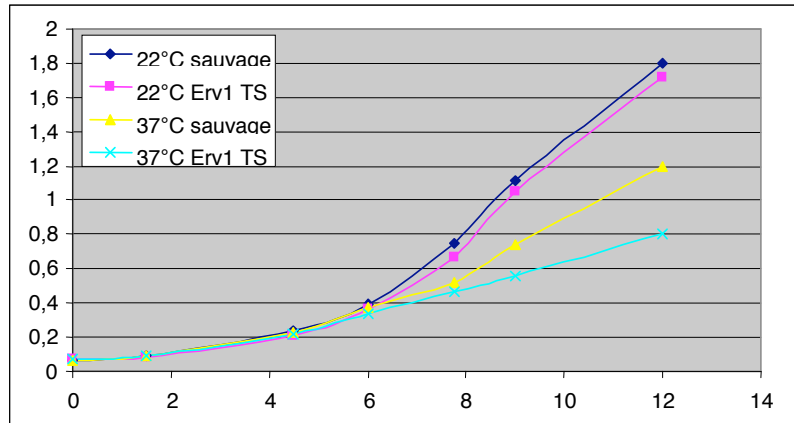


Figure 43. Contrôle de l'effet de la mutation thermosensible d'Erv1 sur la croissance cellulaire.

Les cellules invalidées pour *ERV1* et transformées par un plasmide exprimant Erv1-His-Myc sous sa version thermosensible (ts) ou non et sous contrôle d'un promoteur répressible par la tétracycline sont cultivées à 22°C ou à 37°C en l'absence de tétracycline. La croissance des cellules est estimée par la mesure de la DO_{600} des cultures à 22°C ou à 37°C.

ii. L'effet de la tétracycline

Afin de vérifier que l'extinction de l'expression d'Erv1^{ts}-His-Myc par la tétracycline est létale, les cellules transformées par les plasmides exprimant Erv1 sauvage ou thermosensible sont cultivées à 22°C, en présence ou non de tétracycline, puis déposées à différents temps de culture sur un milieu solide, incubé à 22°C. L'addition de concentrations croissantes de tétracycline provoque peu d'effet sur la viabilité cellulaire à 22°C (figure 44, haut). L'expression d'Erv1 malgré la présence de tétracycline doit être vraisemblablement encore suffisante pour assurer une croissance cellulaire. L'accroissement de la durée de la culture en présence de tétracycline provoquerait probablement la létalité cellulaire.

iii. Combinaison de la température et de la tétracycline

Afin de coupler les effets de la température et de la tétracycline, pour une extinction plus rapide d'Erv1, les cellules Erv1 sauvage et Erv1 thermosensible sont cultivées à 37°C, en présence ou non de tétracycline, puis déposées à différents temps de culture sur un milieu solide, incubé à 22°C. Dans ces conditions, nous remarquons que la souche thermosensible présente un défaut de croissance dès 8 heures de culture à 37°C et que l'addition de tétracycline provoque une létalité cellulaire précoce apparaissant entre 8 heures et 24 heures de culture à 37°C (figure

44, bas). Dans ces mêmes conditions expérimentales, nous n'observons aucun effet sur la souche Erv1 sauvage (figure 44).

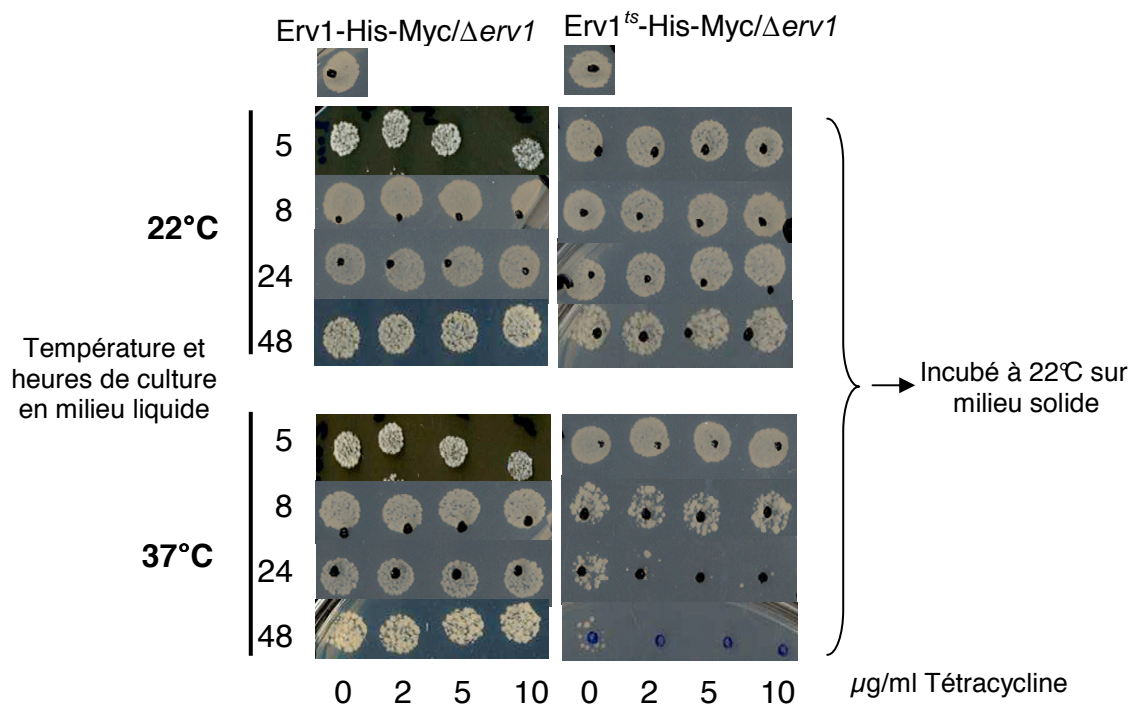


Figure 44. Mise au point des conditions expérimentales pour l'expression conditionnelle d'Erv1.

Les cellules invalidées pour *ERV1* et transformées par un plasmide exprimant Erv1-His-Myc sous sa version thermosensible (ts) ou non et sous contrôle d'un promoteur répressible par la tétracycline sont cultivées à 22°C ou à 37°C en présence ou en l'absence de tétracycline lorsque celle-ci est indiquée. 2000 cellules issues des cultures liquides sont ensuite déposées sur un milieu solide incubé à 22°C. La viabilité cellulaire est observée après trois jours d'incubation.

iv. Conclusion

L'observation d'une mort cellulaire de la souche thermosensible en présence de tétracycline, et à 37°C est liée à la l'extinction efficace d'Erv1. Nous pouvons également souligner que la souche Erv1 sauvage ne présente aucun phénotype de létalité cellulaire, signifiant que l'expression d'Erv1 sous contrôle d'un promoteur exogène (tétracycline) n'altère pas la fonction *in vivo* de cette protéine.

b. Analyse du niveau d'expression d'Erv1

Le niveau d'expression de Erv1 en présence de tétracycline et à 37°C a été analysé par western blot afin de vérifier que l'extinction complète de la protéine conduit à la mort cellulaire. Pour réaliser ce western blot, nous avons dû modifier notre méthode de lyse cellulaire car la localisation subcellulaire de Erv1 dans l'EIM ainsi que son faible niveau d'expression ne permettent pas de détecter une baisse d'expression dans un extrait total. Nous avons dû enrichir l'extrait en mitochondries, par fractionnement cellulaire, consistant en une succession d'ultracentrifugations différentielles d'organites intracellulaires issus de la lyse douce de sphéroplastes (voir partie «méthodes»).

Les souches exprimant Erv1 sauvage ou thermosensible sont cultivées pendant 15 heures à 37°C en l'absence de tétracycline pour la souche sauvage et en présence de tétracycline pour la souche thermosensible. Les mitochondries et le cytoplasme sont isolés par fractionnement cellulaire puis les protéines de chaque fraction sont extraites, solubilisées, déposées sur gel SDS-PAGE réduit et révélées par western blot, avec l'anticorps anti-Myc (Erv1), ou l'anticorps anti-POR1 dirigé contre une protéine de la membrane externe mitochondriale. Ce dernier anticorps permet de contrôler l'enrichissement en mitochondries de nos extraits. Nous observons un très joli signal POR1 dans les extraits mitochondriaux, ainsi qu'une légère contamination mitochondriale dans les extraits cytoplasmiques, résultant probablement de la lyse de la membrane externe mitochondriale pendant la préparation des fractions (figure 45, inférieure). Nous avons par la suite amélioré notre extraction afin d'éviter la lyse des mitochondries (voir figure 47A).

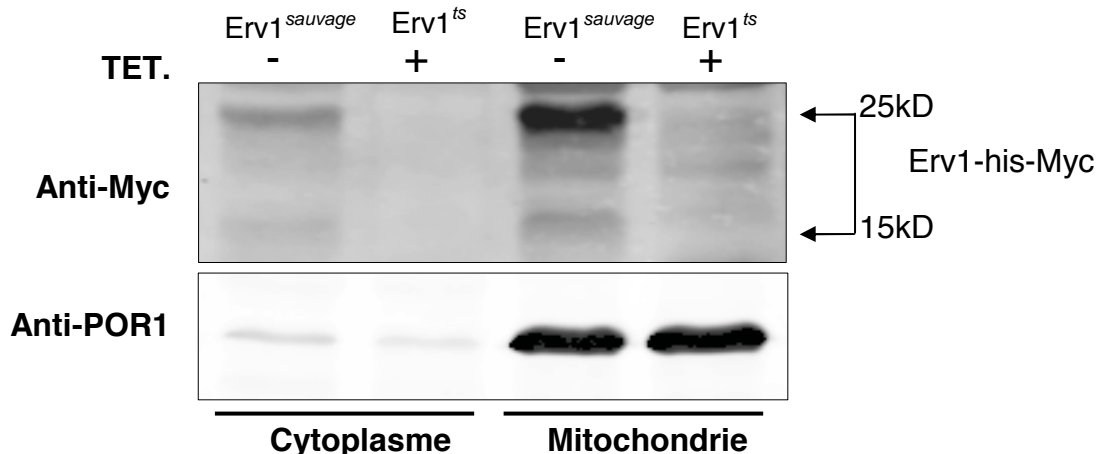


Figure 45. Contrôle de l’extinction de l’expression d’Erv1.

Les cellules invalidées pour *ERV1* exprimant le plasmide Erv1-His-Myc sous sa version sauvage ou thermosensible (*ts*) et sous contrôle d’un promoteur répressible par la tétracycline sont cultivées pendant 15 heures à 37°C en présence (*Erv1 ts*) ou non (*Erv1 sauvage*) de 10 µg/mL de tétracycline. Des sphéroplastes sont ensuite préparés puis lysés par choc osmotique. Les fractions cytoplasmiques et mitochondriales sont alors isolées par ultracentrifugation différentielle. Les mitochondries sont lysées dans un tampon dénaturant contenant du Triton X100 et du NEM. Les protéines cytoplasmiques et mitochondriales extraites et sont ensuite solubilisées en tampon dénaturant TES contenant du NEM et déposées sur un gel SDS-PAGE en présence de β-Mercaptoéthanol. Les protéines sont ensuite révélées après un western blot avec l’anticorps anti-POR1 dirigé contre la porine POR1 de la membrane externe mitochondriale ou anti-Myc dirigé contre l’étiquette d’Erv1.

Nous remarquons que l’anticorps anti-Myc détecte deux formes d’Erv1 sauvage, une forme majoritaire à ~25 kDa et une forme à ~15 kDa. Ces deux formes, décrites par le groupe de Lesowsky, résultent de l’épissage alternatif d’un intron situé dans la région 5’ de l’ARN_m de Erv1 (Lisowsky, 1996). Ces deux formes disparaissent complètement des fractions mitochondriales préparées à partir de la souche thermosensible, exposée à la tétracycline (figure 45, supérieure), indiquant que l’extinction de l’expression d’Erv1-Myc-His est totale dans les conditions expérimentales choisies.

c. L'effet de l'extinction de l'expression d'Erv1 sur l'état redox de son substrat Mia40

Nous avons ensuite vérifié que l'extinction de l'expression d'Erv1 provoque une baisse de son activité de flavine sulfhydryle oxydase (voir introduction IV.C), consistant à former un pont disulfure sur des protéines cibles *via* son groupement FAD. Jusqu'à ce jour, le seul substrat connu d'Erv1 est Mia40 (Mesecke et al., 2005), (Rissler et al., 2005), une oxydase capable de former des ponts disulfures par un mécanisme d'échange di-thiol/disulfure. Nous avons donc analysé l'état d'oxydation de Mia40 avec ou sans Erv1. Les souches exprimant Erv1 sous sa forme sauvage ou thermosensible sont transformées par un plasmide exprimant la protéine Mia40 étiquetée flag (figure 46A et B) ou non (figure 46C), et cultivées 15 heures à 37°C en présence (sauvage) ou non (thermosensible) de tétracycline. Les protéines des fractions mitochondriales et cytoplasmiques sont extraites, solubilisées puis déposées sur un gel SDS-PAGE réduit par différents agents réducteurs (R) ou non (NR), et révélées par western blot avec l'anticorps anti-Flag dirigé contre l'étiquette de Mia40 (figure 46A et B) ou avec l'anticorps anti-Mia40 dirigé contre la protéine endogène (figure 46C).

i. Analyse de l'état d'oxydation de Mia40-Flag dans les mitochondries

Nous observons que la migration de Mia40-flag est affectée d'une part par l'absence d'Erv1 (figure 46A, piste 2) et d'autre part par la présence d'agent réducteur (figure 46A, piste 3). Sur le gel non réduit (NR), nous observons une différence de mobilité électrophorétique de Mia40 liée à l'expression (Erv1^{sauvage}) ou non (Erv1^{ts}) d'Erv1 (figure 46A, piste 1 et 2), se traduisant par une migration plus rapide de Mia40 en présence d'Erv1. Sur le gel réduit (R), cette différence de mobilité électrophorétique n'existe pratiquement plus (figure 46A, pistes 3 et 4). La migration de Mia40, accélérée en présence d'Erv1 et ralentie par des agents réducteurs, témoigne de la présence d'un pont disulfure intramoléculaire au sein de Mia40, formé uniquement en présence d'Erv1. En effet, la formation d'une liaison disulfure entre deux résidus cystéines éloignés structurellement produit une compaction de la protéine, lui conférant ainsi une mobilité électrophorétique accélérée. Ce changement de conformation provoquant une différence de mobilité électrophorétique entre les formes oxydée et réduite a été également décrit dans le cas du facteur de transcription Yap1 (Delaunay et al., 2000). Nous avons donc réussi

à mettre en évidence *in vivo* une modification de l'état d'oxydation de Mia40 en l'absence d'Erv1, ce qui est en accord avec les données *in vitro* du groupe de Mesecke sur l'activité de sulfhydryle oxydase d'Erv1 (Mesecke et al., 2005).

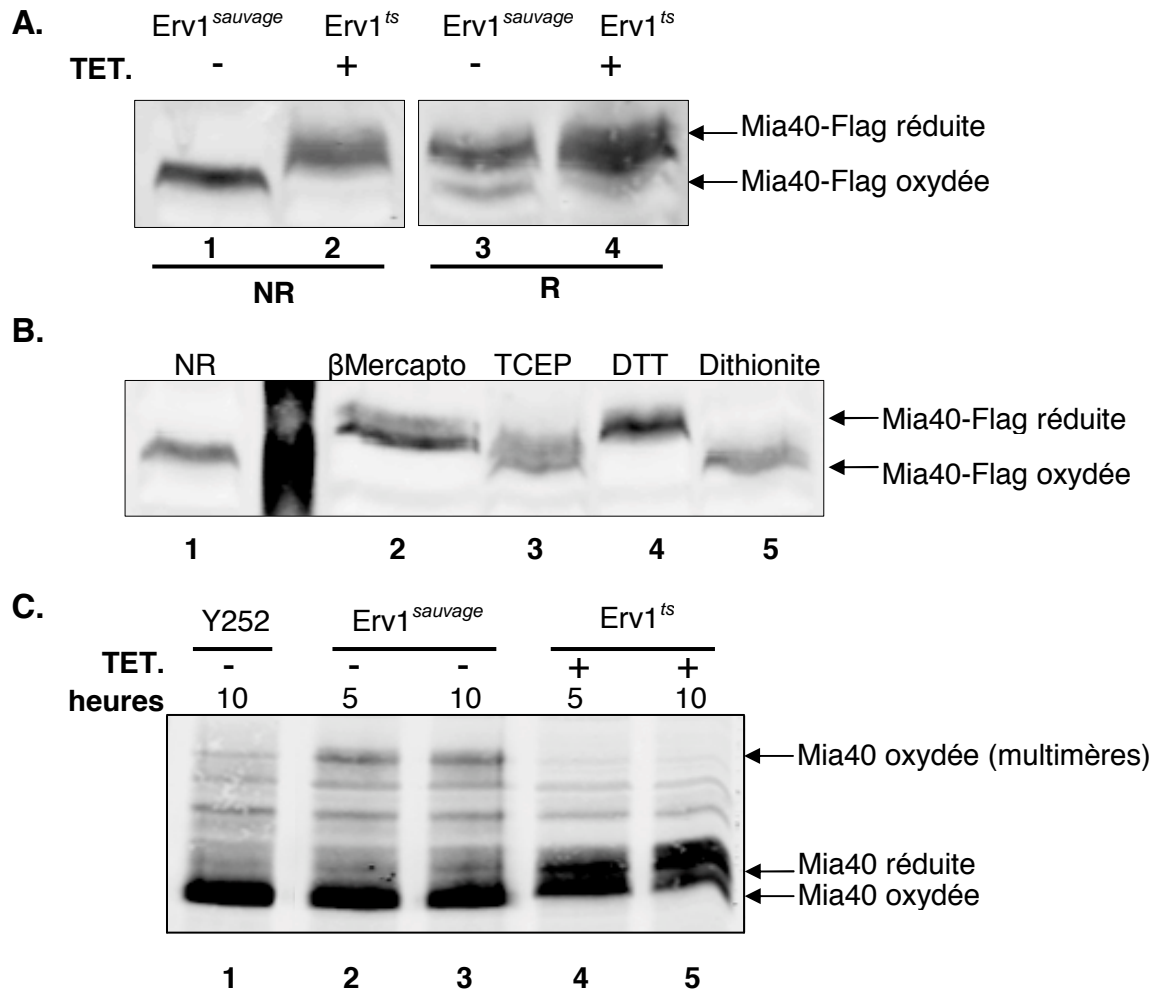


Figure 46. Vérification de l'état redox de Mia40 en fonction de l'expression conditionnelle d'Erv1.

Les cellules invalidées pour *ERV1* exprimant le plasmide Erv1-His-Myc sous sa version sauvage ou thermosensible et sous contrôle d'un promoteur répressible par la tétracycline sont cultivées à 37°C en présence (Erv1^{ts}) ou non (Erv1^{sauvage}) de tétracycline soit pendant 15 heures (A et B), soit pendant 5 ou 10 heures (C). Les protéines totales (C) ou cytoplasmiques et mitochondriales (A et B) sont ensuite extraites soit en milieu acide (C), soit de façon similaire à la figure 45 (A et B), puis solubilisées en tampon dénaturant TES contenant du NEM et déposées sur un gel SDS-PAGE en présence (A et B) ou non (C) de β-Mercaptoéthanol (R et NR) ou de 50 mM de TCEP, de DTT ou de Dithionite lorsque ceux-ci sont indiqués (B). Les protéines sont ensuite révélées après un western blot avec l'anticorps anti-Flag dirigé contre l'étiquette de Mia40 (A et B), ou avec l'anticorps anti-Mia40 dirigé contre la protéine endogène (C).

ii. Analyse de la réduction de Mia40 par différents agents réducteurs

Afin de réduire plus efficacement la forme oxydée de Mia40, nous avons testé d'autres agents réducteurs (figure 46B). Les protéines mitochondriales préparées à partir de la souche exprimant Erv1 sauvage sont déposées sur un gel en l'absence de réducteurs (figure 46B, piste1) ou en présence de 50 mM de TCEP, DTT ou Dithionite (figure 46B, pistes 3, 4 et 5). Le DTT est le réducteur le plus efficace (figure 46B, piste 4).

iii. Analyse de l'oxydation de la protéine endogène Mia40 dans un extrait brut

Afin de s'assurer que la différence de mobilité électrophorétique de Mia40 en présence d'Erv1 provient bien d'une modification de son état d'oxydation *in vivo* et non d'une oxydation non spécifique survenant au cours de la préparation des fractions mitochondriales, nous avons effectué l'extraction des protéines totales en milieu acide. La souche sauvage Y252 et les souches exprimant Erv1 sauvage ou thermosensible sont cultivées à 37°C pendant 5 ou 10 heures en présence ou non de tétracycline. Les protéines sont ensuite extraites, solubilisées, puis déposées sur un gel SDS-PAGE non réduit. Les protéines sont révélées par western blot avec un anticorps anti-Mia40, dirigé contre la protéine endogène (fourni par A. Chacinska). De la même façon que dans l'expérience précédente, nous observons une différence de mobilité électrophorétique de Mia40 liée à la présence ou non de Erv1 (figure 46C, comparer les pistes 2-3 et 4-5). Nous observons également la présence de complexes de hauts poids moléculaires (figure 46C, pistes 2 et 3) qui disparaissent en l'absence d'Erv1 (figure 46C, pistes 4 et 5) ou après addition de DTT (non illustré). Ceci indique la formation d'une liaison covalente sensible au DTT correspondant à une association de Mia40 sous forme de pont disulfure intermoléculaire, soit avec elle-même, soit avec des partenaires. Nous avons donc visualisé *in vivo* deux phénomènes distincts lorsque l'expression de Erv1 est abolie: d'une part, l'absence de formation du pont disulfure intramoléculaire de Mia40, et d'autre part, la diminution des interactions redox de Mia40 avec elle-même ou avec ses partenaires, signifiant que Mia40 n'est plus apte à catalyser des réactions d'échange di-thiol/disulfure avec ses cibles.

La mise en place de ce système expérimental Erv1/Mia40 nous permet maintenant d'analyser l'effet de l'inactivation de cette voie sur la localisation et l'état

d'oxydation de Sod1 et Ccs1. En d'autres termes, Sod1 et Ccs1 sont-elles des cibles de la voie Erv1/Mia40?

d. L'effet de l'extinction de l'expression de Erv1 sur Sod1 et Ccs1

Nous nous sommes placés dans des conditions de culture et de traitement strictement identiques aux précédentes expériences afin d'étudier clairement l'effet de l'inactivation de la voie Erv1/Mia40 sur Sod1 et Ccs1. Les protéines des fractions mitochondriales et cytoplasmiques des souches exprimant Erv1 sauvage ou thermosensible, sont extraites, solubilisées, puis déposées sur un gel SDS-PAGE en présence ou non d'agents réducteurs (R ou NR). Les protéines sont révélées par western blot avec les anticorps anti-POR1, anti-HXK1 dirigé contre une hexokinase cytoplasmique (fourni par C. Mann), anti-Myc dirigé contre l'étiquette de Erv1 et anti-Mia40 dirigé contre la protéine endogène (figure 47), ou avec les anticorps anti-Sod1 et anti-Ccs1 dirigés respectivement contre les protéines endogènes Sod1 et Ccs1 (fourni par V. Culotta) (figures 48 et 49).

i. Contrôle des conditions expérimentales

L'enrichissement des fractions mitochondriales et l'extinction de l'expression d'Erv1 ont été vérifiés avec les anticorps anti-POR1 et anti-Myc, de la même façon que précédemment (figure 45). Cette fois-ci Por1 n'est détectée que dans les fractions mitochondriales et l'expression d'Erv1 est complètement abolie en présence de tétracycline et à 37°C (figure 47A). Comme Sod1 et Ccs1 sont majoritairement localisées dans le cytoplasme, nous avons contrôlé la présence de protéines cytosoliques pouvant contaminer les fractions mitochondriales grâce à l'anticorps anti-Hxk1. Cet anticorps détecte une très faible quantité d'hexokinase dans les fractions mitochondriales (figure 47A), résultant probablement de la fixation de cette protéine sur la membrane externe de la mitochondrie ou du lavage insuffisant des mitochondries. Nous avons également contrôlé l'état d'oxydation de Mia40 lié à la présence ou non d'Erv1 avec l'anticorps dirigé contre la protéine endogène (figure 47B). L'absence de Erv1 conduit bien à la perte de la mobilité électrophorétique accélérée de Mia40 et à l'absence de formation des complexes de haut poids moléculaire (figure 47B, piste 4). Dans ces conditions expérimentales idéales, nous pouvons donc analyser la localisation de Ccs1 et de Sod1 ainsi que l'état d'oxydation et l'activité de Sod1 sur les mêmes extraits de protéines.

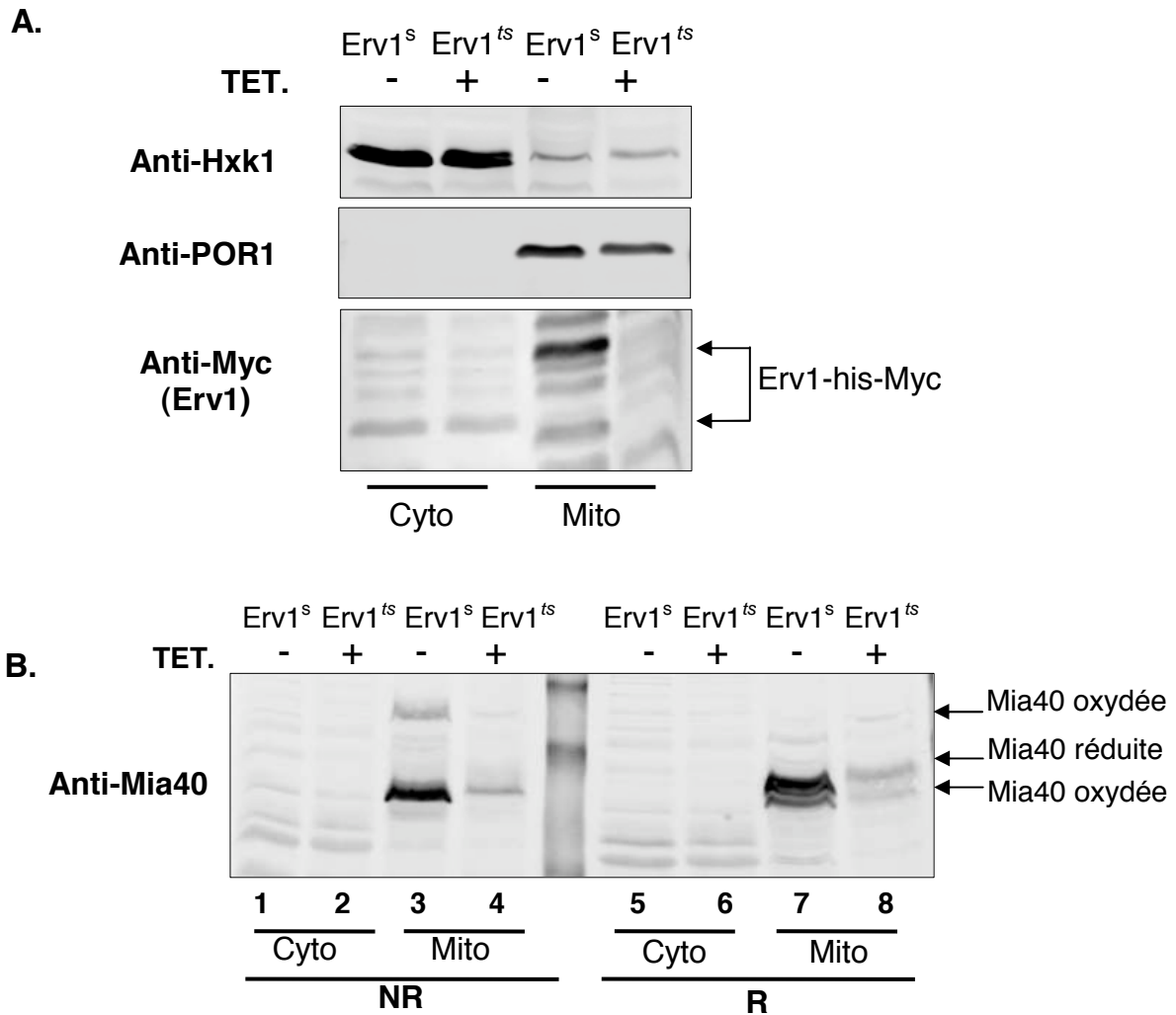


Figure 47. Vérification des conditions expérimentales afin d'analyser la localisation de Sod1 et Ccs1 dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (EIM).

Les cellules invalidées pour *ERV1* exprimant le plasmide Erv1-His-Myc sous sa version sauvage ou thermosensible et sous contrôle d'un promoteur répressible par la tétracycline sont cultivées pendant 15 heures à 37°C en présence (Erv1^{ts}) ou non (Erv1 sauvage) de tétracycline. Les fractions cytoplasmiques et mitochondriales, puis l'extraction des protéines de chaque fraction sont préparées de façon similaire à la figure 45. Les protéines sont ensuite solubilisées en tampon dénaturant TES contenant du NEM, et déposées sur un gel SDS-PAGE en présence ou non de DTT (R et NR) (B), ou en présence de β -Mercaptoéthanol (A). Après un western blot les protéines sont révélées avec l'anticorps anti-Hxk1 dirigé contre une hexokinase cytoplasmique, anti-POR1 dirigé contre la porine POR1 de la membrane externe mitochondriale, anti-Myc dirigé contre l'étiquette d'Erv1 (A), ou anti-Mia40 dirigé contre la protéine endogène (B).

ii. Localisation de Ccs1

Ccs1 est détectée grâce à l'anticorps anti-yCcs1 dirigé contre la protéine endogène. L'absence d'Erv1 provoque une diminution de la présence de Ccs1 dans la mitochondrie (figure 48, pistes 4 et 6). Nous pouvons expliquer ceci de deux façons. La première est que la souche exprimant la forme thermosensible d'Erv1 est caractérisée par une membrane externe mitochondriale fragile, pouvant se rompre pendant l'isolement des mitochondries, et conduire à la perte de Ccs1 de l'EIM. Or, la protéine Por1 de la membrane externe mitochondriale n'est pas détectée dans les fractions cytoplasmiques (figure 47A, gel anti-Por1), faisant de la rupture de membrane un évènement peu probable. Une deuxième explication plus vraisemblable est que l'import de Ccs1 est gouverné par la voie Erv1/Mia40, et diminue donc en l'absence d'Erv1. Néanmoins, des expériences supplémentaires doivent être effectuées afin de confirmer l'intégrité de la membrane externe mitochondriale de ce mutant.

Nous supposons dès lors que l'absence d'une voie Erv1/Mia40 fonctionnelle diminue la localisation de Ccs1 dans l'EIM, par conséquent Erv1 et/ou Mia40 interviennent dans la rétention de Ccs1 dans l'EIM. La rétention de Ccs1 dans l'EIM est probablement dépendante de son état d'oxydation, c'est-à-dire que la protéine ne peut s'accumuler dans l'EIM que sous une forme oxydée. Cette oxydation pourrait potentiellement être catalysée par la flavine sulfhydryle oxydase Erv1 ou par l'oxydase Mia40. Cependant, des expériences de co-immuno-précipitation de Ccs1 avec Erv1-Myc et Mia40-Flag ne nous ont pas permis de mettre en évidence une interaction directe de Ccs1 avec ces protéines (non illustré), probablement à cause de la rapidité des réactions d'oxydation et de la faible abondance de ces protéines dans l'EIM. Dans l'hypothèse où Ccs1 n'interagirait pas avec Erv1 ou Mia40, il existerait donc une autre protéine dépendante de cette voie pour catalyser l'oxydation de Ccs1 dans l'EIM. L'oxydase de Ccs1 resterait donc à identifier. Ces résultats préliminaires ont néanmoins confirmé notre hypothèse de régulation de l'import de Ccs1 par le relais disulfure Erv1/Mia40, l'oxydation de Ccs1 par ce relais n'étant pas exclue.

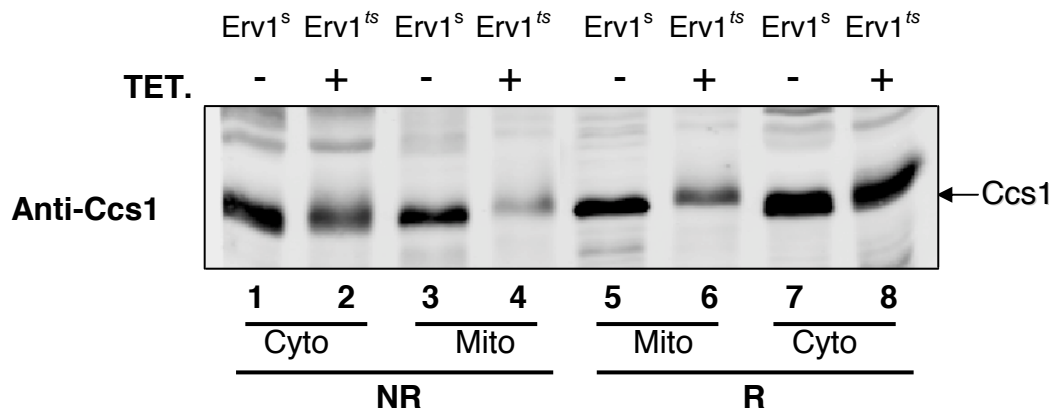


Figure 48. Effet de l'expression conditionnelle d'Erv1 sur la localisation de Ccs1 dans l'EIM.

Les extraits de protéines mitochondriales et cytoplasmiques préparés dans l'expérience précédente (figure 47) sont déposés sur un gel SDS-PAGE en présence ou non de β -Mercaptoéthanol (R et NR), et révélés après un western blot avec l'anticorps anti-Ccs1 dirigé contre la protéine Ccs1 endogène.

iii. Localisation de Sod1

Sod1 est détectée grâce à l'anticorps anti-ySod1 dirigé contre la protéine endogène. De manière similaire à Ccs1, l'absence d'Erv1 conduit à une nette diminution de Sod1 dans la mitochondrie (figure 49, pistes 4 et 8), que nous attribuons également à l'absence d'une voie Erv1/Mia40 fonctionnelle et non à la fragilisation de la membrane externe mitochondriale (figure 47A, gel anti-Por1). Le relais disulfure Erv1/Mia40 intervient donc dans la rétention de Sod1 dans l'EIM, ce qui compatible avec les observations du groupe de Mesecke (Mesecke et al., 2005).

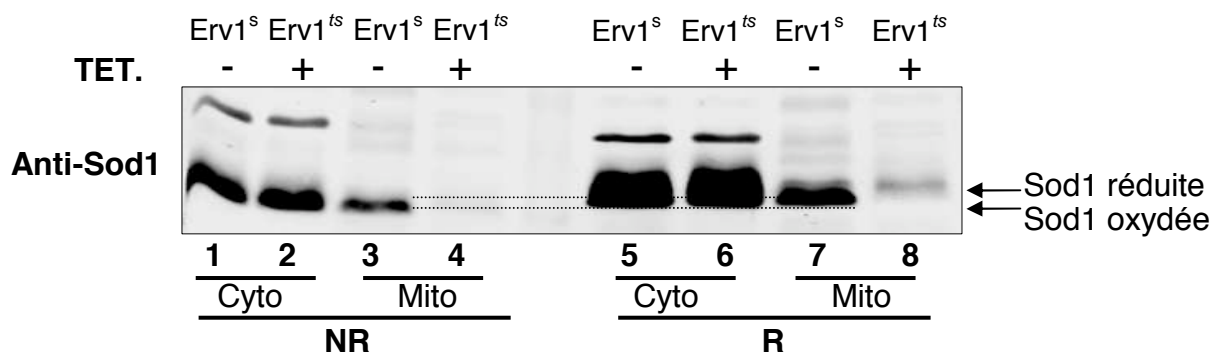


Figure 49. Effet de l'expression conditionnelle d'Erv1 sur la localisation de Sod1 dans l'EIM.

Les extraits de protéines mitochondriales et cytoplasmiques préparés dans l'expérience précédente (figure 47) sont déposés sur un gel SDS-PAGE en présence ou non de β -Mercaptoéthanol (R et NR), et révélés après un western blot avec l'anticorps anti-Sod1 dirigé contre la protéine Sod1 endogène.

iv. Oxydation et activité de Sod1

Nos précédents résultats sur la localisation de Sod1 et Ccs1 dans l'EIM confortent donc notre hypothèse sur l'intervention du relais disulfure Erv1/Mia40 dans l'oxydation de Sod1 par l'intermédiaire de Ccs1. Nous supposons que l'oxydation et la métallation de Sod1 sont exclusivement catalysées dans l'EIM, puis que Sod1 est exportée dans le cytoplasme. Il restait donc à vérifier que l'inactivation de la voie Erv1/Mia40 provoque une diminution de l'oxydation de Sod1. Pour cela, nous avons analysé l'état redox de Sod1 par western blot et étudié son activité de dismutation en gel natif par coloration au NBT à partir d'extraits de protéines cytoplasmiques et mitochondriales provenant des souches exprimant la version sauvage ou thermosensible d'Erv1 (figures 49 et 50).

Nous observons une différence de mobilité électrophorétique de Sod1 dans le gel SDS-PAGE en fonction de la présence ou non de réducteurs (figure 49, pistes 3 et 7). Cette différence est liée aux deux états redox de la protéine, oxydée et réduite. En effet, comme nous l'avons observé pour Mia40 (voir figure 46), le pont disulfure intramoléculaire de Sod1 compacte la protéine qui migre plus rapidement dans le gel SDS-PAGE en l'absence d'agents réducteurs. Nous observons également que la présence ou l'absence d'Erv1 ne produit pas de différence de mobilité électrophorétique de Sod1 dans les fractions cytoplasmiques (figure 49, pistes 1 et 2 gel NR), indiquant que la forme oxydée de Sod1 est encore présente dans le cytoplasme des cellules même en l'absence d'Erv1.

Lorsque l'on mesure l'activité de Sod1 (figure 50), on constate qu'en présence ou non d'Erv1, Sod1 est active dans les fractions cytosoliques (figure 50, pistes 4 et 5) et mitochondriales (figure 50, pistes 2 et 3). Nous pouvons noter que l'activité de Sod2 exclusivement présente dans les fractions mitochondriales témoigne des bonnes conditions expérimentales de préparation des mitochondries.

Ces observations vont à l'encontre de notre hypothèse concernant le mécanisme de formation du pont disulfure intramoléculaire de Sod1 dans l'EIM. Toutefois, nous devons garder en mémoire que la préparation des mitochondries est réalisée en l'absence d'agents alkylants, et peut conduire potentiellement à une oxydation des thiols réactifs à l'air ambiant. Ceci pourrait alors aboutir à une activation de Sod1 (Furukawa et al., 2004) indépendamment de la voie Erv1/Mia40 de l'EIM et expliquerait la présence de Sod1 oxydée dans le cytoplasme en

l'absence d'Erv1. Conjointement à l'oxydation des thiols, le cuivre contenu dans les mitochondries pourrait être libéré lors du fractionnement cellulaire et conduire à l'activation de Sod1 à l'extérieur de la mitochondrie. Nous devons donc réaliser l'isolement des mitochondries en présence d'alkylants et en anaérobiose, afin d'analyser l'état redox des formes cytoplasmique et mitochondriale de Sod1, et de déterminer le rôle du relais disulfure Erv1/Mia40 dans l'oxydation de Sod1.

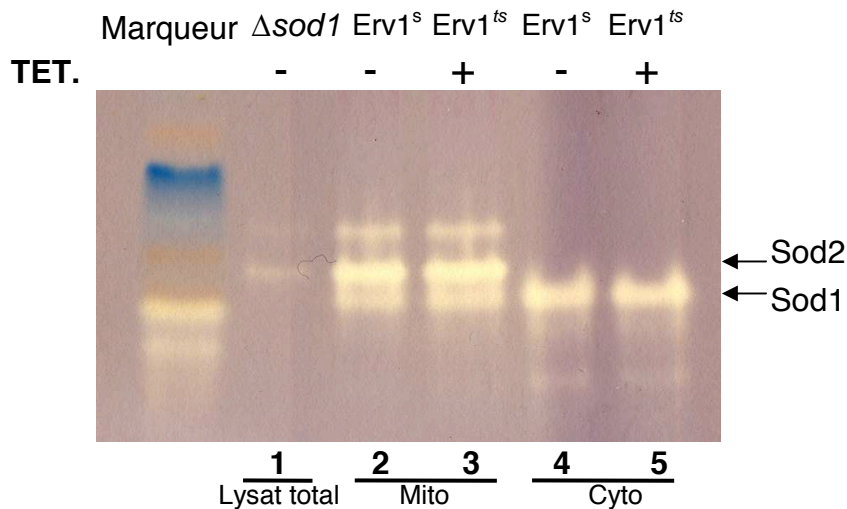


Figure 50. Effet de l'expression conditionnelle d'Erv1 sur l'activité de Sod1.

Les fractions mitochondriales et cytoplasmiques, isolées par ultracentrifugation différentielle de sphéroplastes lysés, sont issues de l'expérience précédente (figure 47). Les protéines de chaque fraction sont extraites, solubilisées dans un tampon non dénaturant ne contenant pas de NEM, puis déposées sur un gel natif. Les protéines sont ensuite révélées par coloration au NBT. Un extrait brut isolé à partir d'une souche invalidée pour *SOD1* est déposé comme contrôle de l'activité Sod1 (piste 1).

6. Recherche de nouvelles cibles de la voie Erv1/Mia40

Afin d'analyser le rôle essentiel de la voie Erv1/Mia40 dans l'oxydation de protéines de l'EIM et la participation d'Erv1 dans le métabolisme des centres fer/soufre (Lange et al., 2001), nous avons tenté d'identifier de nouvelles protéines dont l'oxydation est catalysée par la voie Erv1/Mia40, grâce à notre méthode de marquage différentiel des thiols oxydés et réduits des protéines mitochondriales, par le NEM fluorescent (voir paragraphe I.A.3.b). Nous avons donc isolé les fractions mitochondriales et cytoplasmiques des souches exprimant Erv1-His-Myc sous une forme sauvage ou thermosensible, après une culture à 37°C pendant 15 heures en

présence ou non de tétracycline. Les protéines de chaque fraction sont alors extraites, puis soit solubilisées en présence de NEM pour être détectées ultérieurement par western blot, soit marquées par le NEM-fluorescent. Dans ce dernier cas, elles sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle dans des conditions non réductrices et révélées par fluorimétrie (figure 51). Les westerns blots permettant de contrôler l'enrichissement des fractions mitochondriales et cytoplasmiques, l'extinction de l'expression de Erv1-His-Myc et l'altération de l'oxydation de Mia40 ne sont pas présentés ici, car strictement similaires à ceux de la figure 47.

L'état redox des protéines mitochondriales et cytoplasmiques est analysé après marquage des thiols réduits et oxydés par le NEM fluorescent (figure 51). Le protéome mitochondrial présente un profil très différent des protéines du cytoplasme. En effet, les thiols mitochondriaux émettent majoritairement un signal vert, révélant la présence de nombreuses protéines oxydées (figure 51A), tandis que les thiols cytoplasmiques sont essentiellement réduits (rouges) (figure 51B). Les deux compartiments cellulaires présentent donc un état redox très contrasté.

L'absence d'Erv1 n'altère globalement pas l'oxydation des protéines mitochondriales (vert) (figure 51C), indiquant que Mia40 est potentiellement le seul substrat d'Erv1. Cependant, en l'absence d'Erv1, Mia40 est sous une forme majoritairement réduite (voir figure 47), vraisemblablement incompatible avec son activité d'oxydase. Nous devrions donc visualiser une diminution de l'oxydation des protéines cibles de Mia40, ce qui n'est pas le cas. Par conséquent, soit l'activité d'oxydase de Mia40 est encore suffisante pour assurer l'oxydation de ses cibles, même après 15 heures d'extinction d'Erv1, soit notre méthode ne nous permet pas de visualiser les cibles de Mia40, probablement à cause de leur faible abondance dans l'EIM. Nous devons donc isoler spécifiquement l'EIM afin d'enrichir les protéines de ce compartiment. Nous pourrions également imaginer l'existence d'un mécanisme de compensation d'Erv1, mais qui ne catalyserait pas l'oxydation de Mia40 aussi efficacement, vu que Mia40 est majoritairement réduite en l'absence d'Erv1. Cependant, les cellules dépourvues d'activité Erv1 meurent, suggérant alors que soit le mécanisme de compensation n'est pas assez efficace, soit Erv1 possède une autre fonction essentielle en plus de son rôle d'oxydase de Mia40, comme celle d'export des centres fer/soufre (voir paragraphe V.C.2). Nous ne pouvons pas non

plus exclure que la préparation des mitochondries en l'absence d'agents alkylants peut conduire à une oxydation non spécifique des protéines à l'air ambiant, nous empêchant ainsi de visualiser l'effet de la voie Erv1/Mia40 sur l'oxydation des protéines. Nous devons donc réitérer cette expérience en présence d'agents alkylants.

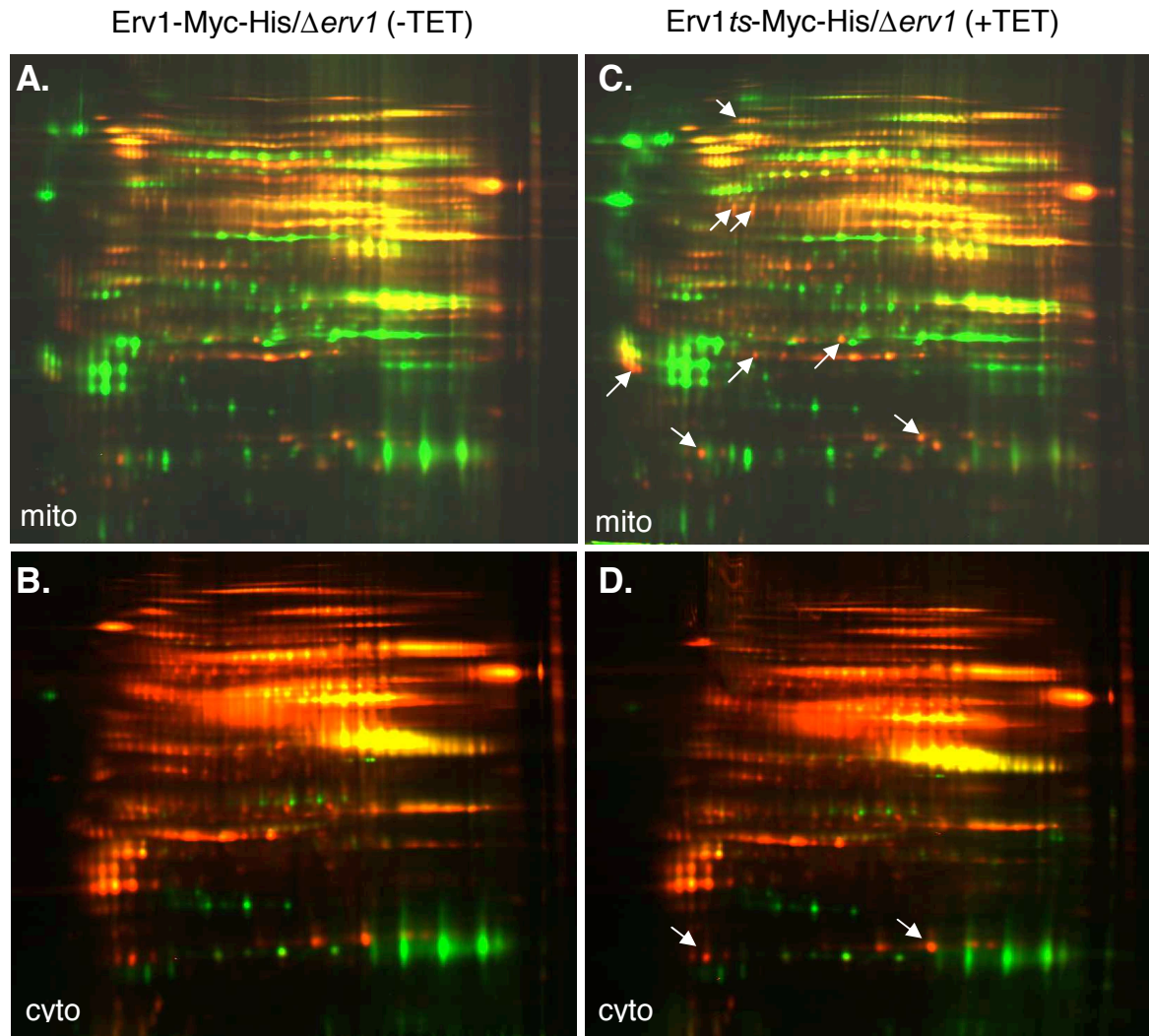


Figure 51. Analyse de l'état redox des fractions mitochondriales et cytoplasmiques après marquage des thiols réduits et oxydés par le NEM-fluorescent d'une souche exprimant Erv1 sous une forme sauvage ou thermosensible.

Les cellules exprimant Erv1 sauvage (A-B) ou thermosensible (C-D) sont cultivées pendant 15 heures à 37°C en présence (ts) ou non (s sauvage) de tétracycline. Les fractions cytoplasmiques (B et D) et mitochondriales (A et C), puis l'extraction des protéines de chaque fraction sont préparées de façon identique à l'expérience décrite dans la figure 45, excepté que le NEM est omis lors de la lyse des mitochondries. Les thiols réduits et oxydés des protéines cytoplasmiques et mitochondriales sont ensuite marqués par le NEM fluorescent (voir «Méthodes»). Les protéines marquées sont alors soumises à une électrophorèse bidimensionnelle et révélées par

fluorimétrie avec l'Odyssey[®]. Les flèches indiquent les protéines dont l'état redox varie en l'absence d'Erv1 (C).

Cependant, nous observons quand même l'accumulation de quelques protéines sous une forme réduite en l'absence d'Erv1 (figure 51C, flèches). Certaines de ces protéines s'accumulent spécifiquement dans la mitochondrie alors que d'autres sont également retrouvées dans le cytoplasme. Ceci signifie que la voie Erv1/Mia40 agit sur ses cibles de deux façons différentes. Les cibles directes du relais disulfure s'accumulent probablement dans le cytoplasme car elles ne sont plus retenues dans l'EIM, du à leur défaut d'oxydation, et les cibles indirectes s'accumulent éventuellement dans l'EIM car elles continuent d'être importées de façon active et non «folding trap» dans l'EIM, mais ne sont plus oxydées par Erv1/Mia40.

Nous avons récemment tenté d'identifier ces cibles directes et indirectes de la voie Erv1/Mia40 par spectrométrie de masse après coloration des gels bidimensionnels au bleu de Coomassie, sans succès. Nous devons par la suite enrichir les protéines oxydées et réduites de l'EIM par une autre méthode de fractionnement cellulaire et par notre méthode de purification après marquage des thiols par la Biotine-HPDP, afin de les identifier.

7. Analyse des cystéines de Mia40 impliquées dans le mécanisme d'échange di-thiol/disulfure avec Erv1

Nous avons également tenté d'étudier le mécanisme moléculaire d'échange di-thiol/disulfure entre Erv1/Mia40. Nous avons cherché à identifier la cystéine de Mia40 impliquée dans la résolution du pont disulfure intermoléculaire Erv1/Mia40. Nous nous sommes inspirés de la méthode développée chez les plantes pour identifier les partenaires des thiorédoxines (Verdoucq et al., 1999). Nous avons donc muté de façon ponctuelle l'une des deux cystéines du motif CXC de Mia40, afin de stabiliser son interaction avec Erv1. Nous avons choisi ce site car les cystéines de ce motif sont impliquées dans des réactions d'échange di-thiol/disulfure chez certaines oxydases (voir introduction IV). En cas de succès, nous devrions observer sur un gel SDS-PAGE la formation d'un complexe d'environ 85 kDa (Mia40~60kDa + Erv1~25kDa) sensible au DTT, et correspondant à la stabilisation de Mia40 en interaction avec Erv1 par une liaison disulfure. Nous avons donc transformé une souche sauvage par les plasmides exprimant Mia40-Flag mutée ou non sur la

cystéine 296 et/ou 298. Les protéines sont extraites en milieu acide, solubilisées en présence de NEM, déposées sur un gel SDS-PAGE en présence ou non de réducteur, et révélées par western blot avec l'anticorps anti-Flag dirigé contre l'étiquette de Mia40 (figure 52A). Le complexe attendu n'apparaît pas, indiquant que les cystéines 296 et 298 de Mia40-Flag ne sont pas impliquées dans la réaction d'échange di-thiol/disulfure avec Erv1. Néanmoins, la mutation ponctuelle de la cystéine 298 ou des cystéines 296 et 298 ralentit la migration électrophorétique de Mia40-Flag suggérant une modification de son état redox (figure 52A).

L'absence de complexe Erv1/Mia40 peut s'expliquer par l'expression persistante de Mia40 sous une forme active dans la souche sauvage, empêchant ainsi l'interaction de Mia40-Flag mutée avec Erv1. Nous avons alors décidé d'utiliser les deux mutants cystéines de Mia40-Flag dans une souche contenant une mutation thermosensible de Mia40 (Chacinska et al., 2004), permettant d'éliminer la protéine endogène (fournie par A. Chacinska). La souche thermosensible (Mia40ts) exprime une version de Mia40 mutée sur les acides aminés T313A, I316M et F342L (Chacinska et al., 2004).

Nous avons tout d'abord vérifié la thermosensibilité de cette souche en la cultivant à 22°C parallèlement à la sauvage, et en déposant des gouttes de 200 à 2000 cellules sur une gélose incubée soit à 22°C soit à 37°C (figure 52B, gauche). Comme prévu, la souche exprimant Mia40 sous sa forme thermosensible est incapable de pousser à 37°C. Nous avons ensuite vérifié la viabilité à 37°C de cette souche transformée par nos constructions Mia40-Flag mutée sur les cystéines 296 et/ou 298. Les souches transformées sont traitées de façon identique à l'expérience précédente, c'est-à-dire cultivées à 22°C, déposées sur gélose incubée à 22°C ou à 37°C. Dans ces conditions, la souche thermosensible exprimant une version mutée de Mia40-Flag est incapable de survivre à 37°C (figure 52B droite), indiquant que la mutation des cystéines de Mia40 est létale pour la cellule. La présence de résidus cystéines intacts dans le domaine CXC de Mia40 est donc indispensable à son activité catalytique.

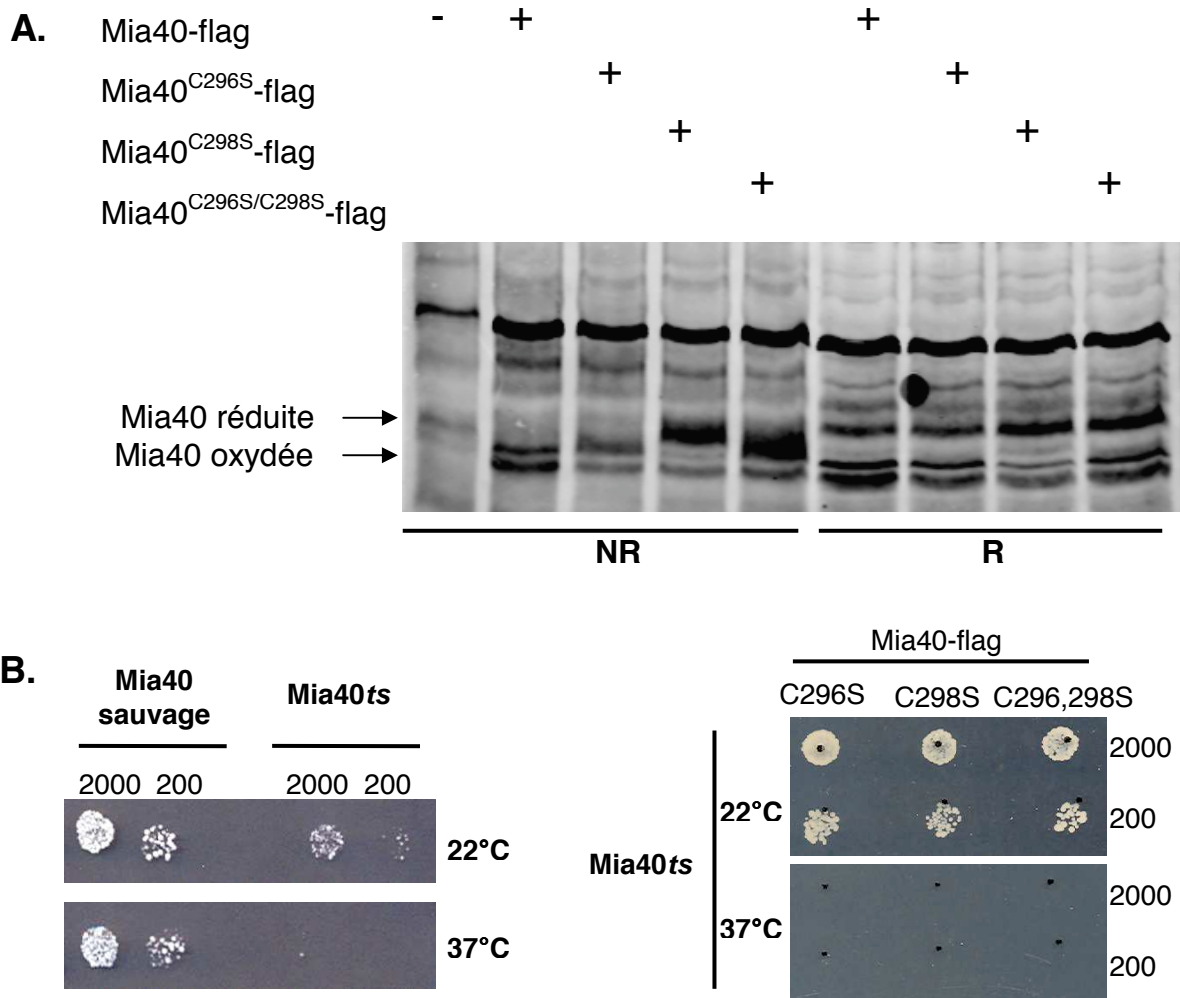


Figure 52. Recherche des cystéines de Mia40 en interaction avec Erv1.

(A) Des cellules sauvage sont transformées par un plasmide exprimant Mia40-Flag sous une version sauvage ou mutée sur les cystéines 296 et/ou 298. Les protéines sont ensuite extraites en milieu acide à partir des cellules transformées puis solubilisée en tampon TES contenant 50 mM de NEM. Les protéines sont alors déposées sur un gel SDS-PAGE en présence ou non de β -mercaptoéthanol (R et NR) et révélées après un western blot avec l'anticorps anti-Flag dirigé contre la protéine Mia40. (B) Les cellules invalidées pour MIA40 sont transformées par les plasmides exprimant Mia40 sous une forme sauvage, thermosensible (ts) ou étiquetée Flag et mutée sur les cystéines 296 et/ou 298, lorsque ceux-ci sont indiqués. Les cellules sont ensuite cultivées en milieu liquide à 22°C, puis 2000 ou 200 cellules sont déposées sur un milieu solide incubé à 22°C ou à 37°C. La viabilité cellulaire est mesurée après trois jours d'incubation.

C.Discussion

La localisation de Sod1 et Ccs1 dans l'EIM est dépendante du relais disulfure Erv1/Mia40

L'import de Sod1 et Ccs1 dans l'EIM par la voie Erv1/Mia40 conforte l'existence d'une nouvelle classe de protéines dépendantes de cette voie, à savoir dépourvues de motif CX₃C ou CX₉C et de poids moléculaire supérieur à 10 kDa (Gabriel et al., 2007) (Terziyska et al., 2007). L'absence de motifs CX_nC dans la structure de cette classe de protéines pose donc la question du mécanisme moléculaire d'import dans l'EIM et de reconnaissance des substrats par Mia40, qui doivent probablement être différents de ceux de Cox17 ou des petites Tim.

Deux mécanismes d'oxydation de Sod1?

Une analyse préliminaire de l'état redox de Sod1, sur des protéines totales extraites en milieu acide, indique que Sod1 acquiert son pont disulfure intramoléculaire en l'absence d'une voie Erv1/Mia40 fonctionnelle, ce qui contredit notre hypothèse de formation du pont disulfure de Sod1, restreinte à l'EIM, et d'export de Sod1 dans le cytoplasme. Cependant, nous n'excluons pas l'existence de deux mécanismes d'oxydation de Sod1, l'un cytoplasmique, n'impliquant que Ccs1, et le second mitochondrial, catalysé par la voie Erv1/Mia40 *via* Ccs1. Le défaut d'import de Sod1 dans l'EIM en l'absence d'une voie Erv1/Mia40 fonctionnelle et la corrélation entre l'état redox de Sod1 et son import suggèrent fortement un rôle, direct ou indirect, du relais Erv1/Mia40 dans l'oxydation de la Sod1 mitochondriale. Dans ce dernier cas, nous devons rechercher l'oxydase de Sod1, dépendante du relais disulfure Erv1/Mia40.

L'existence d'une régulation de l'import de Sod1 dans l'EIM

La régulation de l'import de Sod1 dans l'EIM serait indispensable par exemple lors de l'augmentation de la production de superoxyde. L'entrée de Sod1 dans l'EIM augmenterait la résistance cellulaire à cet oxydant et à ses effets délétères sur les centres Fe/S (De Freitas et al., 2000) (Jensen et al., 2004), ou encore empêcherait l'oxydation des protéines mitochondriales (Sturtz et al., 2001), (O'Brien et al., 2004). L'import de Sod1 dans l'EIM pourrait être régulé par l'intermédiaire de l'import de Ccs1 (Sturtz et al., 2001), étant lui-même probablement régulé par les thiorédoxines (voir résultats II.B.1.c et schéma 25).

L'état redox des thiols mitochondriaux contraste avec celui des thiols cytoplasmiques

De façon surprenante, l'état redox de la mitochondrie semble plus oxydé que celui du cytoplasme (voir figure 52), malgré l'existence de systèmes de réduction propres à ce compartiment (Pedrajas et al., 1999). Cependant, notre préparation mitochondriale inclut l'EIM et la matrice. Nous devons donc isoler chacun de ces compartiments afin de déterminer leur état redox respectif. La matrice étant assimilée à un environnement cytoplasmique, elle posséderait vraisemblablement un état redox similaire à celui du cytoplasme. Les protéines oxydées visualisées dans ces fractions mitochondriales seraient alors localisées dans l'EIM, et reflèteraient l'état oxydé de ce compartiment, compatible avec sa fonction de biosynthèse des ponts disulfures. Ces résultats reflèteraient parfaitement l'existence de systèmes cellulaires opposés, maintenant les thiols cytoplasmiques dans un état réduit ou les thiols mitochondriaux dans un état oxydé en fonction de la direction du flux d'électrons.

Une corrélation entre l'oxydation des protéines mitochondriales et les IRO de la chaîne respiratoire?

Récemment, une étude chez les mammifères de l'état d'oxydation des thiols mitochondriaux, utilisant une méthode de «DIGE redox» similaire à la nôtre (Hurd et al., 2007), a révélé la présence de nombreuses protéines mitochondriales oxydées et a suggéré l'existence d'un lien entre la production d'IRO par la chaîne respiratoire et la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial. Il serait donc intéressant d'observer la variation de l'oxydation des protéines mitochondriales entre des cellules possédant une chaîne respiratoire défectueuse et des cellules en phase stationnaire de croissance, durant laquelle la production d'IRO, issue de la phosphorylation oxydative, peut potentiellement augmenter.

III. Conclusion

L'analyse protéomique de l'état redox des thiols constitue une base fondamentale pour l'étude du maintien de l'homéostasie redox des thiols, indispensable au bon fonctionnement cellulaire.

Au cours de ce travail, nous sommes parvenus à mettre en place des méthodes d'identification et de quantification des protéines oxydées à l'échelle du protéome de la levure *S.cerevisiae*. Nous avons ainsi identifié de nombreuses protéines cytoplasmiques oxydées, ce qui constitue en soi un résultat important, remettant en question le dogme du «cytoplasme réducteur». L'association novatrice de l'égalisation et de la purification des protéines oxydées nous a permis de découvrir de nouvelles protéines oxydées, jamais identifiées jusqu'à aujourd'hui. Cependant, au cours de ces analyses, une même protéine oxydée identifiée dans plusieurs conditions expérimentales, peut être présente en quantité différente, rendant ainsi difficile la comparaison rigoureuse des protéomes oxydés. La quantification des protéines oxydées identifiées est un écueil que nous avons partiellement contourné, avec le marquage radioactif des thiols totaux et oxydés, et que nous pourrions améliorer avec l'approche quantitative des «DIGE redox», en utilisant un troisième marqueur fluorescent comme contrôle interne de la quantité totale de protéines. Malgré cet écueil, les comparaisons que nous avons effectuées nous ont fourni d'importantes informations sur la contribution des différents acteurs (voies des thiorédoxines et du glutathion) dans le contrôle homéostatique de l'état redox des thiols (Le Moan et al., 2006).

Ces méthodes globales peuvent être adaptées à l'analyse d'autres protéomes, tels que celui de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique, des compartiments cellulaires sièges de multiples réactions d'oxydo-réduction, de par la présence respective des voies Erv1/Mia40 et Ero1/Pdi1. L'identification des protéines oxydées dans ces compartiments nous renseignera sur les cibles, encore inconnues, de ces deux voies d'oxydation. Les variations de l'état redox des protéines de l'EIM et du RE, dans des conditions hyper-oxydantes (en présence d'agents oxydants, augmentation de la phosphorylation oxydative, arrêt de la chaîne respiratoire, diminution de la quantité de glutathion intracellulaire) ou hyper-réductrices (augmentation du transport intracellulaire de GSH), nous permettront d'éclaircir les

mécanismes mis en œuvre dans ces compartiments cellulaires pour le contrôle homéostatique de la formation des ponts disulfures.

Parmi les protéines oxydées identifiées, la Sod1 a retenu notre attention car il s'agit d'un enzyme cytoplasmique ayant un pont disulfure indispensable à son activité catalytique, et dont le mécanisme moléculaire d'oxydation demeure peu connu *in vivo*. Nous avons montré que l'import de Sod1 et Ccs1 dans l'EIM dépend de la voie Erv1/Mia40, ce qui suggère fortement un rôle de ce relais disulfure dans l'oxydation directe ou indirecte de ces protéines. L'analyse de la modification de l'état redox de Sod1 dans une souche exprimant soit les oxydases Erv1 et Mia40 dans le cytoplasme, soit Sod1 et Ccs1 dans l'EIM, nous permettra de confirmer le rôle de la voie Erv1/Mia40 dans l'oxydation de Sod1. Cette étude, consécutive à l'identification des protéines oxydées *in vivo*, illustre bien l'intérêt et les informations que l'on peut retirer des analyses protéomiques.

Méthodes Expérimentales

I. Milieux et conditions de culture

A. Souches utilisées dans cette étude

Toutes les souches ont été construites à partir du fond génétique de la souche YPH98 (MATa, *ura3-52*, *lys2-801*^{amber}, *ade2-101*^{ochre}, *trp1-Δ1*, *leu2-Δ1*) (Sikorski and Hieter, 1989). L'ensemble des souches de *S. cerevisiae* utilisées dans cette étude est présenté dans le tableau ci-dessous.

nom de la souche	Génotype	origine
YPH98	a <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>trp1-Δ1</i> , <i>leu2-Δ1</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
yAD1-1C	a <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>trp1-Δ1</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>his3-Δ200</i>	Isnard AD.
Y252	a <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>trp1-Δ1</i> , <i>leu2-Δ1</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
Y253	α <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>leu2-Δ1</i> , <i>his3-Δ200</i>	Isnard AD.
Y252 Rho ⁰	a <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>trp1-Δ1</i> , <i>leu2-Δ1</i>	cette étude
$\Delta tsa1$	Y252 <i>tsa1::TRP1</i>	(Biteau et al., 2003)
$\Delta trx1\Delta trx2$	Y252 <i>trx1::URA3</i> <i>trx2::KAN</i>	(Delaunay et al., 2000)
$\Delta trx1\Delta trx2$	Y252 <i>trx1::TRP1</i> <i>trx2::KAN</i>	(Delaunay et al., 2000)
$\Delta trr1$	Y252 <i>trr1::KAN</i>	Spector D.
$\Delta glr1\Delta gsh1$ <i>pro2-1</i>	Y252 <i>glr1::URA</i> <i>gsh1::LEU2</i> <i>PRO2-1</i>	(Spector et al., 2001)
$\Delta trx1\Delta trx2\Delta trr1$	Y252 <i>trx1::URA3</i> <i>trx2::KAN</i> <i>trr1::KAN</i>	Spector D.
$\Delta sod1$	Y252 <i>sod1::KAN</i>	cette étude
$\Delta sod1\Delta ccs1$	Y252 <i>sod1::KAN</i> <i>ccs1::TRP</i>	cette étude
$\Delta ccs1$	Y252 <i>ccs1::KAN</i>	cette étude
$\Delta erv1$	Y252 <i>erv1::KAN</i>	cette étude
$\Delta mia40$	YPH499 <i>mia40::ADE2</i>	(Chacinska et al., 2004)
$\Delta tdh3$	BY4741 <i>tdh3::KAN</i>	euroscarf
diploïde Y252XY253	<i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>leu2-Δ1</i>	cette étude

B.Conditions de cultures des cellules

1. De *Saccharomyces cerevisiae*

Les cellules de levures *S. cerevisiae* sont cultivées à 30°C soit en milieu complet YPD (extrait de levure 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 20 g/L), soit en milieu CASA (YNB «Yeast Nitrogen Base» 6,7 g/L, glucose 20 g/L, hydrolysate de caséine 1 g/l), soit en milieu minimum SD (YNB 6,7 g/L, glucose 20 g/L). Selon les besoins, les milieux CASA et SD peuvent être complétés avec des acides aminés et bases azotées ajoutés individuellement, aux concentrations finales suivantes: adénine 40 mg/L, uracile 20 mg/L, leucine 60 mg/L, tryptophane 40 mg/L, méthionine 20 mg/L, lysine 30 mg/L, histidine 20 mg/L. Les milieux solides sont obtenus par l'ajout de 5g/L d'agar avant stérilisation.

Les cultures en anaérobiose sont effectuées en YPD supplémenté en ergostérol (30 mg/L) et en Tween 80 (0,2%) et dégazé à l'argon pendant 12 heures. Les cellules sont inoculées dans ce milieu et cultivées sous agitation constante pendant 8 heures dans une chambre anaérobique dont l'oxygène est éliminé à l'aide d'organismes consommant l'O₂ (Anaerocult, Merck). Les conditions d'anaérobiose sont contrôlées par le changement de couleur d'un indicateur coloré (Anaerocult, Merck).

La croissance des cellules en milieu liquide est mesurée par l'absorption à 600 nm. Une valeur d'absorbance DO_{600nm}=0,1 représente une concentration cellulaire égale à environ 4,5.10⁶ cellules/mL.

2. D'*Escherichia coli*

Les cultures de bactéries *E. coli* sont réalisées à 37°C soit en milieu LB (tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L), supplémenté en ampicilline (100 µg/mL), soit en milieu TB (bacto-tryptone 12 g/L, extraits de levure 24 g/L, glycérol 0,4%, KH₂PO₄ 1,15 g/L, K₂HPO₄ 6,25 g/L), supplémenté en kanamycine (40 µg/mL) pour les plasmides d'expression de protéines recombinantes.

C. Techniques de manipulation de *S. cerevisiae*

1. Transformation par choc thermique de *S. cerevisiae*

Les cellules, en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm}=0,4-0,6$), sont lavées en eau, puis en tampon TE LiAc (Acétate de lithium 100 mM, Tris EDTA 1x). Elles sont ensuite remises en suspension dans le tampon TE LiAc (100 μ L pour 10 mL de culture cellulaire) et incubées pendant 30 minutes, à 30°C. A ces 100 μ L contenant les cellules sont ajoutés: l'ADN d'intérêt (300 ng de plasmide ou 1 à 2 μ g de fragment de PCR, pour une invalidation), l'ADN-cargo (50 μ g) et 400 μ L de PEG-TE LiAc (LiAc 100 mM, PEG 40%, Tris EDTA 1x). Le mélange est incubé de 30 minutes à 2 heures, à 30°C. Les cellules subissent ensuite un choc thermique de 20 minutes, à 42°C, puis sont lavées deux fois dans de l'eau et étalées sur un milieu sélectif. Dans le cas d'une invalidation par la cassette *KAN-Mx4*, les cellules lavées sont reprises dans 500 μ L de milieu YPD liquide et incubées à 30°C pendant 2 heures, puis étalées sur boîtes YPD solide, supplémenté avec 200 μ g/mL de généticine. Les clones transformés sont visibles après 2 à 5 jours d'incubation à 30°C, selon les souches.

2. Test de sensibilité en milieu solide

a. Sensibilité aux agents oxydants

Les boîtes contenant des concentrations croissantes d'agent oxydant sont préparées lorsque le milieu, supplémenté selon les besoins et contenant de l'agar fondu, est à une température d'environ 60°C. Une dose appropriée d'agent oxydant (dont le volume est compris entre 10 et 250 μ L pour une concentration choisie) est ajoutée à 20 ml de ce milieu. Après homogénéisation, le milieu contenant l'agent oxydant est versé dans une boîte de Pétri, et laissé à température ambiante pour solidification. Les cellules de levure en phase stationnaire de croissance sont diluées dans de l'eau, à une concentration d'environ 100 cellules/ μ L ou de 10 cellules/ μ L. Deux mille cellules ou 200 cellules (20 μ l) sont ensuite déposées sur les boîtes contenant des concentrations croissantes d'agent oxydant. La croissance des différentes souches est observée après 2 à 3 jours d'incubation à 30 °C, et la tolérance des différentes souches à un oxydant donné est déterminée.

b. Thermosensibilité

Les souches thermosensibles Erv1 et Mia40 sont cultivées à 22°C dans 10 mL de milieu liquide pendant la nuit. Les cellules sont ensuite traitées de différentes manières. La première consiste à diluer les cellules pour obtenir une concentration de 100 cellules/ μ L ou de 10 cellules/ μ L pour déposer 2000 à 200 cellules sur un milieu solide qui sera incubé à 22°C ou à 37°C. La seconde consiste à diluer les cellules dans un nouveau milieu liquide pour les incuber pendant le temps indiqué soit à 37°C soit à 22°C. La mesure de la DO₆₀₀ peut être effectuée dans ces conditions. Après cette étape, soit les cellules sont soumises à un fractionnement cellulaire, soit les cellules sont ensuite diluées dans de l'eau à une concentration de 100 cellules/ μ L ou de 10 cellules/ μ L. Deux mille cellules ou 200 cellules (20 μ l) sont ensuite déposées sur les boîtes qui sont ensuite incubées à 22°C afin de contrôler la viabilité cellulaire.

3. Fractionnement cellulaire pour l'isolement des mitochondries de levure (d'après le protocole de (Daum et al., 1982))

Les cellules sont cultivées dans 1L de milieu liquide jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,5. La culture est ensuite centrifugée à température ambiante pendant 6 minutes à 4000g. Le culot de cellules est lavé dans de l'eau distillée. Après une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions, les cellules sont lavées dans un tampon contenant 0,1M de Tris-Cl pH 9,4 (1 volume de tampon pour 1 volume de cellule) et incubées pendant 5 minutes à 30°C. Les culots de cellules résultant des centrifugations sont lavés successivement dans une solution A composée de 1,2M de sorbitol et de 25 mM de Tris-Cl pH 8,8 (1vol/1vol) puis dans une solution identique contenant 20 mM de KPO₄ (1vol/1vol). Cinq μ L de cette suspension sont dilués dans 1 mL d'eau afin de servir de référence de DO₆₀₀. Cinq milligrammes de Zymolyase 100T (Seikakagu) par gramme de cellules sont ensuite additionnés à la suspension cellulaire, qui est incubée à 30°C sous agitation. La conversion des levures en sphéroplastes (levures dépourvues de paroi) est contrôlée par dilution de 5 μ L de cette suspension dans 1 mL d'eau à différents temps d'incubation avec la zymolyase. Nous considérons que la paroi est totalement digérée lorsque la DO₆₀₀ atteint 10% de la DO₆₀₀ initiale déterminée avant addition de zymolyase, ce qui se produit généralement après 1 heure d'incubation. Les sphéroplastes sont ensuite centrifugés

à température ambiante pendant 5 minutes à 1500g, puis lavés deux fois dans la solution A. Les sphéroplastes sont repris dans la solution de lyse (1vol/1vol) composée de 0,6 M de mannitol, 10 mM de Tris-Cl pH 8,8, 1 mM de PMSF et d'une pastille de cocktail anti-protéase pour 10 mL de cette solution. Les étapes suivantes sont réalisées à 4°C. La solution hypotonique contenant les sphéroplastes est déposée dans un Dounce qui permet de lyser mécaniquement les sphéroplastes par 15 allers-retours de piston. Les sphéroplastes lysés sont ensuite dilués avec un volume de tampon de lyse puis centrifugés pendant 10 minutes à 1000g. Le culot est repris dans la solution de lyse (1vol/1vol) pour être à nouveau centrifugé. Les surnageants résultant des deux centrifugations précédentes sont soumis à une centrifugation de 13000g pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite soumis à une ultracentrifugation à 100000g pendant 1 heure afin d'isoler la fraction cytoplasmique, tandis que le culot est repris dans le tampon de lyse pour être centrifugé à 3000g pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant de cette dernière centrifugation est conservé pour être à nouveau centrifugé pendant 10 minutes à 13000g. Le culot correspondant à la fraction mitochondriale est lavé deux fois dans le même tampon avant d'être lysé avec 3% de triton X100 en présence de 50mM de NEM (pour l'analyse en western blot) ou non (pour le marquage des thiols réduits et oxydés et pour le test NBT d'activité de dismutation du superoxyde de Sod1). Cette suspension est ensuite centrifugée pendant 20 minutes à 15000g afin de récolter la fraction mitochondriale soluble. Les protéines du surnageant sont ensuite précipitées par du TCA 20% et lavées trois fois à l'acétone, ou non dans le cas du test NBT. Le culot est séché sous vide puis soumis soit au marquage des protéines oxydées soit à l'analyse de l'état redox des protéines en western blot.

4. Obtention d'une souche dépourvue d'ADN mitochondrial (Rho⁰)

La souche Y252 est cultivée en milieu liquide YPD jusqu'à atteindre la phase stationnaire. Les cellules sont ensuite solubilisées dans ce même milieu contenant 25µg/mL de BET puis cultivées jusqu'à atteindre à nouveau la phase stationnaire. Cette étape est répétée 4 fois. Les cellules sont ensuite étalées sur un milieu solide YPD puis répliquées sur un milieu YPG dans lequel le glucose est remplacé par du glycérol. Les clones incapables de croître sur YPG sont sélectionnés sur YPD. Ils

sont ensuite analysés par coloration DAPI révélant la présence d'ADN. Les clones dont l'ADN mitochondrial n'est pas marqué sont retenus et appelés Rho⁰.

5. Sporulation et dissection des tétrades pour obtenir une souche invalidée pour *ERV1*

La souche haploïde Y252 de type A, auxotrophe en méthionine et prototrophe pour l'histidine est croisée en milieu liquide YPD avec la souche haploïde yAD1-1C de type α , auxotrophe en histidine et prototrophe pour la méthionine. Les diploïdes hétérozygotes pour les marqueurs MET et HIS sont sélectionnés sur un milieu ne contenant ni histidine, ni méthionine. Ces diploïdes sont ensuite invalidés pour le gène *ERV1* par recombinaison homologue avec la cassette d'inactivation permettant la résistance à la généticine (voir le paragraphe biologie moléculaire). L'ADNg des colonies poussant sur un milieu supplémenté en généticine est ensuite extrait pour contrôler par PCR l'inactivation de l'une des deux copies de *ERV1* (voir le paragraphe biologie moléculaire). Les diploïdes présentant l'inactivation d'une copie de *ERV1* sont ensuite transformés par un plasmide portant le marqueur TRP et exprimant *Erv1* étiqueté His-Myc dans sa version sauvage ou thermosensible sous contrôle d'un promoteur régulé par la tétracycline. Les colonies diploïdes transformées sont sélectionnées sur un milieu sans tryptophane. La sporulation des diploïdes est ensuite réalisée sur un milieu solide minimum en l'absence de tryptophane et en présence des acides aminés et bases azotés pour lesquelles le diploïde est auxotrophe. Après une semaine sur ce milieu de sporulation, les diploïdes forment des tétrades constituées de 4 spores. Les tétrades sont ensuite digérées par de la bave d'escargot afin de fragiliser leur paroi et de faciliter leur dissection sous le micromanipulateur. Les spores sont isolées sur un milieu riche qui permet la formation de colonies haploïdes. Chaque colonie est ensuite analysée pour sa résistance à la généticine, prouvant l'inactivation de *ERV1*, et sa capacité à pousser sur un milieu sans tryptophane, indiquant la présence du plasmide exprimant *Erv1*. Les clones présentant ces deux caractéristiques sont donc retenus car ils sont de génotype $\Delta erv1$ et contiennent un plasmide portant *Erv1* dont l'expression est régulée par la tétracycline.

II. Biologie Moléculaire

A. Construction des plasmides

Le gène d'intérêt est étiqueté et/ou muté par une PCR qui se déroule généralement en deux étapes. L'étiquette et/ou les mutations sont tout d'abord introduites dans les deux premiers fragments de PCR grâce à deux oligonucléotides O1 et O2. Ces deux fragments s'hybrident ensuite par l'intermédiaire de la partie complémentaire, et l'insert total est amplifié par PCR, grâce à deux oligonucléotides S1 et S2 comprenant les sites de clonage (schéma 26). Le clonage est ensuite réalisé par la ligation de cet insert obtenu par PCR dans un vecteur d'expression linéarisé.

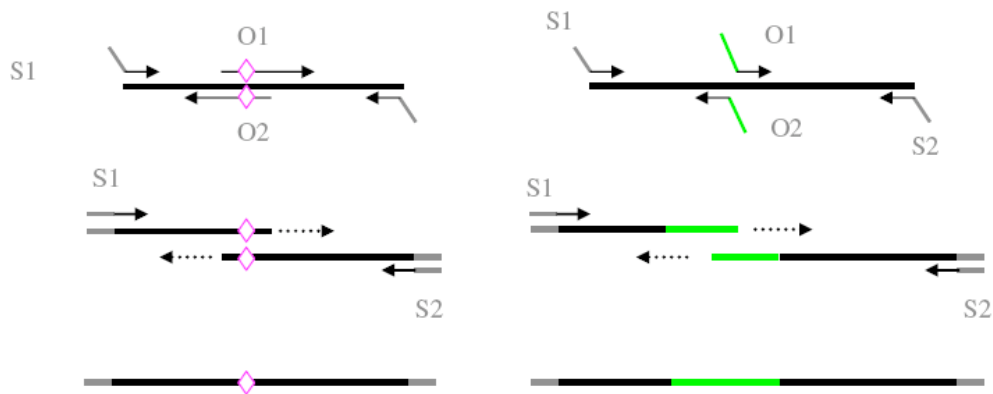


Schéma 26. Introduction d'une mutation ou d'une étiquette par PCR en deux étapes.

Les mutations sont représentées par un losange rose et l'étiquette par un trait vert.

B. Liste des plasmides

L'ensemble des plasmides utilisés dans cette étude est répertorié ci-dessous:

nom du plasmide	Utilisation et construction	Origine
Trx2-ProtA-pRS315	Expression de Trx2 sous contrôle de son propre promoteur chez la levure. Clonage par PCR du gène TRX2 fusionné à la Protéine A (C-terminal) entre les sites EcoRI (amont) et BamHI (aval) du plasmide LEU2 AMPR.	Le Maout S.
Tsa1-Myc pRS316	Expression de Tsa1 sous contrôle de son propre promoteur chez la levure. Clonage par PCR du gène TSA1 fusionné à l'épitope Myc (N-terminal) entre les sites NotI (amont) et EcoRI (aval) du plasmide URA3 AMPR.	(Biteau et al., 2003)
TSA1-6his-pET28a	Expression de Tsa1 chez <i>E. coli</i> et purification. Clonage par PCR du gène TSA1 fusionné avec l'étiquette Gly6His en N-terminal, entre les sites NcoI (amont) et HindIII (aval) du plasmide pET28a KANR et inductible par l'IPTG.	(Biteau et al., 2003)
Ccs1-3HA-pRS316	Expression Ccs1 sous contrôle de son propre promoteur chez la levure. Clonage par PCR du gène CCS1 fusionné à 3 étiquettes HA en N-terminal entre les sites NotI (amont) et XhoI (aval) du plasmide URA3 AMPR.	cette étude
Ccs1 ^{C229S} -3HA-pRS316	Expression du mutant ponctuel Ccs1 ^{C229S} . Remplacement du codon Cys (TGT) par le codon Ser (TCT) par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Ccs1-3HA-pRS316	cette étude
Ccs1 ^{C231S} -3HA-pRS316	Expression du mutant ponctuel Ccs1 ^{C231S} . Remplacement du codon Cys (TGT) par le codon Ser (TCT) par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Ccs1-3HA-pRS316	cette étude
Ccs1 ^{C229SC231S} -3HA-pRS316	Expression du double mutant ponctuel Ccs1 ^{C229SC231S} . Remplacement des codons Cys (TGT) par les codons Ser (TCT) par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Ccs1-3HA-pRS316	cette étude
Ccs1-8his-pCM190	Surexpression de Ccs1 chez la levure et purification. Clonage par PCR du gène CCS1 fusionné à l'étiquette 8His en N-terminal entre les sites BamHI (amont) et PstI (aval) du plasmide URA3 AMPR.	cette étude
Ccs1-8his-pRS314	Contrôle de la surexpression de Ccs1 chez la levure. Clonage par PCR du gène CCS1 fusionné à 3 étiquettes HA en N-terminal entre les sites NotI (amont) et XhoI (aval) du plasmide TRP1 AMPR.	cette étude
Sod1-8his pRS315	Expression Sod1 sous contrôle de son propre promoteur chez la levure. Clonage par PCR du gène SOD1 fusionné à l'étiquette 8His en N-terminal entre les sites PstI (amont) et NotI (aval) du plasmide LEU2 AMPR.	cette étude
Sod1 ^{C57S} -8his-pRS315	Expression du mutant ponctuel Sod1 ^{C57S} . Remplacement du codon Cys (TGT) par le codon Ser (TCT) par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Sod1-8His-pRS315	cette étude
Sod1 ^{C146S} -8his-pRS315	Expression du mutant ponctuel Sod1 ^{C146S} . Remplacement du codon Cys (TGT) par le codon Ser (TCT) par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Sod1-8His-pRS315	cette étude
Sod1-1Myc-pRS315	Expression Sod1 sous contrôle de son propre promoteur chez la levure. Clonage par PCR du gène SOD1 fusionné à l'étiquette 1Myc en N-terminal entre les sites PstI (amont) et NotI (aval) du plasmide LEU2 AMPR.	cette étude
Sod1 ^{C57S} -1Myc-pRS315	Expression du mutant ponctuel Sod1 ^{C57S} . Remplacement du codon Cys (TGT) par le codon Ser (TCT) par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Sod1-1Myc-pRS315	cette étude

Sod1 ^{C57S} -1Myc-pRS315	Expression du mutant ponctuel Sod1 ^{C146S} . Remplacement du codon Cys (TGT) par le codon Ser (TCT) par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Sod1-1Myc-pRS315	cette étude
Tdh3-1Myc-pRS316	Expression Tdh3 sous contrôle de son propre promoteur chez la levure. Clonage par PCR du gène TDH3 fusionné à l'étiquette 1Myc en N-terminal entre les sites EcoRI (amont) et NotI (aval) du plasmide URA3 AMPR.	cette étude
Tdh3 ^{C150SC154S} -1Myc-pRS316	Expression du double mutant ponctuel Ccs1 ^{C150SC154S} . Remplacement des codons Cys (TGT) par les codons Ser (AGT) par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Tdh3-1Myc-pRS316	cette étude
Mia40-1flag-pRS316	Expression Mia40 sous contrôle de son propre promoteur chez la levure. Clonage par PCR du gène MIA40 fusionné à l'étiquette 1Flag en C-terminal entre les sites BamHI (amont) et XhoI (aval) du plasmide URA3 AMPR.	cette étude
Mia40 ^{C296S} -1flag-pRS316	Expression du mutant ponctuel Mia40 ^{C296S} . Remplacement du codon Cys (TGT) par le codon Ser (TCT) par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Mia40-1flag-pRS316	cette étude
Mia40 ^{C298S} -1flag-pRS316	Expression du mutant ponctuel Mia40 ^{C298S} . Remplacement du codon Cys (TGC) par le codon Ser (TCC) par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Mia40-1flag-pRS316	cette étude
Mia40 ^{C296SC298S} -1flag-pRS316	Expression du double mutant ponctuel Mia40 ^{C296SC298S} . Remplacement des codons Cys par les codons Ser par la méthode de PCR chevauchante. Même clonage que Mia40-1flag-pRS316	cette étude
Erv1-8his-1Myc-pCM183	Expression Erv1 sous contrôle d'un promoteur répressible par la tétracycline chez la levure. Clonage par PCR du gène ERV1 fusionné aux étiquettes 8His et 1Myc en C-terminal entre les sites BamH (amont) et PstI (aval) du plasmide pCM183 TRP1 AMPR.	cette étude
Erv1 ^{ts} -6his-1Myc-pCM287	Expression de la version thermosensible de Erv1 sous contrôle d'un promoteur répressible par la tétracycline chez la levure. Remplacement du codon 124 Phe (TTC) par le codon Ser (TCC). Même clonage que Erv1-8His-1Myc pCM183.	cette étude

C. Techniques

1. Invalidation de gène par recombinaison homologue

L'ensemble des invalidations de gènes a été réalisé par l'intégration en une étape d'une cassette d'invalidation par recombinaison homologue au locus (Guthrie, 1991) Les cassettes d'invalidation sont construites par PCR à l'aide d'oligonucléotides ayant la structure suivante: 50 nucléotides homologues aux régions en amont et en aval du cadre ouvert de lecture du gène à invalider et 18 à 20 nucléotides permettant d'amplifier la cassette portant le gène de sélection. Différents marqueurs ont été utilisés pour invalider les gènes: *TRP1*, *LEU2* et *HIS3* de *S. cerevisiae*, *URA3* de *Kluyveromyces lactis* et la cassette d'invalidation *KAN-Mx4*, permettant la résistance à la généticine. La cassette d'invalidation générée par PCR est ensuite transformée dans les levures. L'invalidation du gène dans les clones

obtenus après transformation est finalement contrôlée par PCR sur leur ADN génomique, à l'aide d'amorces extérieures au cadre ouvert de lecture du gène.

2. Extraction de l'ADN génomique

Deux millilitres de cellules de levure sont cultivés jusqu'à saturation, puis centrifugés. Les culots cellulaires sont lysés à température ambiante par vortex pendant 4 minutes à l'aide de 100 μL de billes de verre (Sigma, «acid washed glass beads»), en présence de 200 μL de tampon de lyse (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-Cl pH8 10 mM, Na₂EDTA 1 mM) et de 200 μL de phénol/chloroforme/acide isoamylique (25/24/1). Deux cent μL de tampon TE sont ensuite ajoutés, puis le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 20000g. La phase aqueuse est récupérée dans un tube propre et l'ADN est précipité à l'éthanol puis repris dans de l'eau.

3. Transformation des bactéries compétentes *E.coli* par électroporation

Une préculture de 50 mL de bactéries *E.coli* XL1-Blue est réalisée sur la nuit à 37°C, en milieu LB supplémenté en kanamycine (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les cellules sont ensuite diluées à une DO₆₀₀ de 0,1 dans un litre de milieu LB stérile et incubées à 37°C, jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,5-0,6. La croissance des cellules est arrêtée dans la glace, pendant 1 heure. Les étapes suivantes sont réalisées à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées, lavées deux fois en eau stérile et une fois en glycérol 10%, puis reprises dans 2 ml de glycérol 10% et échantillonnées par 40 μL . Ces bactéries compétentes sont conservées à -80°C.

La transformation par électroporation nécessite le mélange d'un échantillon de bactéries compétentes avec 5 μL d'une solution contenant l'ADN à transformer (1 μL d'ADN plasmidique + 4 μL d'eau). Les bactéries sont ensuite électroporées à 1500 V, dans une cuve Biorad Gene Pulser de 0,1 cm, puis immédiatement reprises dans 400 μL de milieu LB et incubées pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite étalées sur des boîtes de LB solide complémentées en ampicilline, et incubées une nuit à 37°C. Les plasmides des clones sélectionnés sont ensuite extraits pour être séquencés ou conservés à -20°C.

4. Séquençage

Le séquençage automatique est 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 fournisseur. Les séquences sont ensuite analysées, à l'aide du logiciel «Sequencher 3.1».

III. Biochimie des protéines

A. Purification des protéines étiquetées

1. Purification de Ccs1-8His et de ses partenaires à partir de *S. cerevisiae*

Deux litres de culture de cellules $\Delta trx1\Delta trx2$, transformées par le plasmide Ccs1-8His-pCM190, sont cultivés jusqu'à atteindre une phase de croissance correspondant à une $DO_{600}=0,6$. Les cellules sont ensuite traitées ou non avec 4 mM d' H_2O_2 pendant 2 minutes, puis du TCA 10% final est ajouté au milieu. Les cellules sont lysées avec des billes de verres en présence de 10% de TCA. Les protéines extraites sont centrifugées pendant 20 minutes à 4°C et lavées 3 fois en présence d'acétone. Le culot de protéines est ensuite séché sous vide et repris dans 1 mL de tampon (100 mM Tris-Cl pH 8,8, 1,5% Triton X100, 0,05% SDS) contenant 50 mM de NEM. Après une incubation à 37°C sous agitation pendant 1 heure, les protéines solubilisées sont diluées 10 fois avec une solution A (8M urée, 100 mM Tris-Cl pH8, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF) contenant 20 mM d'imidazole. Les 10 mL résultant de la dilution sont successivement chargés 3 fois sur une colonne de 5mL de sépharose HiTrap (Amersham Biosciences) préalablement incubée en présence de nickel. Cette colonne est ensuite lavée avec 50 mL de la solution A contenant 3% de glycérol et 500 mM de NaCl. L'élution des protéines fixées à la résine est effectuée dans 10 mL de solution A en présence de 40 mM d'imidazole. Les protéines purifiées sont ensuite précipitées par du TCA 10% final, lavées dans de l'acétone et séchées sous vide. Le culot est repris dans un tampon (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 1% SDS) contenant 50 mM de NEM. Les protéines solubilisées sont déposées sur un gel SDS-PAGE de 17% en présence de β -mercaptoéthanol ou sur un gel de 10% en l'absence.

2. Co-purification de Sod1-8His et Ccs1-HA

La souche invalidée pour SOD1 et CCS1 est transformée par les plasmides exprimant Ccs1-HA et Sod1-8his sous sa forme sauvage ou mutée sur les cystéines 57 ou 146. Les cellules transformées sont ensuite cultivées à 30°C dans 100 mL de milieu SD jusqu'à atteindre un DO_{600} de 0,6. Les cellules sont alors lavées dans du TCA 20% puis lysées dans cette même solution acide en présence de 1mL de billes de verre. Les protéines extraites sont ensuite solubilisées dans 500 μ L d'un tampon dénaturant A (8M d'urée, 4% de Chaps, 100 mM de Tris-Cl pH8, 300 mM de NaCl, 20 mM d'imidazole, 1% Triton X100 et 0,5% NP40) contenant 50 mM de NEM, pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Après une étape de centrifugation à 15000g pendant 5 minutes, les protéines du surnageant sont dosées avec le kit microBCA (Pierce). Une quantité identique de protéines est ensuite déposée sur 150 μ L d'une résine d'agarose sur laquelle est fixée du nickel (Ni-NTA, Qiagen). Ces protéines sont alors incubées avec cette résine pendant 2 heures à 4°C sous agitation constante. Le surnageant de la résine contenant les protéines ne s'étant pas fixées est ensuite éliminé. La résine d'agarose est alors lavée deux fois dans 300 μ L de la solution A contenant 2% de glycérol et 40 mM d'imidazole afin de décrocher les protéines fixées de façon non spécifique. L'élution des protéines fixées est ensuite réalisée par l'addition de 200 μ L de la solution A contenant 300 mM d'imidazole. Les protéines ainsi purifiées sont ensuite reprises dans du tampon de charge Laemmli contenant ou non du β -mercaptoéthanol puis déposées sur un gel SDS-PAGE 15%. Les protéines sont alors révélées après western blot, par l'anticorps anti-His dirigé contre l'étiquette de Sod1 ou par l'anti-HA dirigé contre l'étiquette de Ccs1.

3. Expression et purification de Tsa1 chez E. coli pour obtenir des échantillons sous différents état redox

a. Expression

La souche BL21 (DE3) (Invitrogen) d'*E.coli* est transformée par le plasmide pET-28a portant la protéine Tsa1-6His recombinante. Les cellules transformées sont cultivées à 37°C dans un milieu LB (tryptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 10 g/l) supplémenté avec de la kanamycine (40 mg/l). Les cellules en phase de croissance exponentielle ($DO_{600}=0,5$) sont ensuite induites pendant 2 heures avec de l'isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, 0,5 mM).

b. Purification

La culture est centrifugée puis le culot est lavé deux fois et repris dans le tampon de solubilisation (Tris-Cl pH6,8 50 mM, KCl 100 mM, DTT 2 mM). Les cellules sont lysées par trois cycles successifs de congélation-décongélation dans de l'azote liquide avec une étape de sonication lorsque les cellules sont décongelées. Les extraits sont ensuite clarifiés par une centrifugation à 20000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Le surnageant est déposé sur une colonne constituée d'une résine d'agarose sur laquelle est fixée du nickel (Ni-NTA, Qiagen), en présence de 20 mM d'imidazole. Après le passage du surnageant à travers la colonne, l'extrait est à nouveau chargé et cette étape est répétée trois fois. La résine est ensuite lavée et les protéines retenues sont éluées dans le tampon de solubilisation contenant 150 mM d'imidazole. La pureté est évaluée après la migration de la fraction purifiée sur un gel SDS-PAGE puis par coloration au bleu de Coomassie. La quantité de protéine est dosée selon la méthode de Bradford. Les protéines purifiées sont ensuite conservées à -80°C.

c. Réduction, Oxydation et Suroxydation in vitro

Tsa1-6his est suroxydée sous la forme d'un acide sulfinique dans le tampon suivant (Tris-Cl pH 6,8 50 mM, KCl 100 mM, DTT 10 mM, H₂O₂ 1 mM) à 30°C pendant 30 minutes. La forme oxydée de Tsa1 est obtenue par omission du DTT dans le tampon. La forme réduite de Tsa1 est produite par élimination de l'H₂O₂ du tampon. 500 ng de protéine purifiée sont incubés dans un volume final de 5 µl.

B.Méthode d'extraction des protéines pour l'analyse de l'état d'oxydation *in vivo* des protéines

1. En milieu acide (protocole adapté de (Delaunay et al., 2000))

Les cellules d'une préculture sont diluées à une DO₆₀₀ de 0,1 dans 20 mL (pour l'analyse de l'état redox d'une protéine en western blot ou pour le marquage des thiols oxydés par le NEM C¹⁴ et fluorescent) ou dans 500 mL (pour la purification des protéines oxydées) de milieu sélectif ou non. Les cellules sont incubées à 30°C ou à 22°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,4-0,6. Les cellules sont ensuite traitées ou non par un agent oxydant. Le traitement est stoppé par l'addition

d'acide trichloroacétique 20 % final (TCA) dans le milieu. Les volumes des différents tampons ou solutions décrits dans le protocole ci-dessous correspondent à 20 mL de culture cellulaire. Ces volumes doivent être bien évidemment ajustés en fonction de la quantité de culture initiale.

La culture est centrifugée pendant 6 minutes à 4000 g puis les cellules sont lavées dans 500 μ L de TCA 20% et transférées dans un ou plusieurs tubes épendorf. Les culots obtenus sont congelés dans un bain de carboglace/éthanol, puis éventuellement conservés à -80°C. La lyse est réalisée sur les culots décongelés, dans 200 μ L de TCA 20%, en présence de 100 μ L de billes de verre (diamètre: 425 - 600 μ m). Les échantillons sont successivement vortexés pendant 1 minute et refroidis pendant 1 minute sur la glace. Cette étape est répétée 5 fois. Le lysat est ensuite récupéré et placé dans un ou plusieurs tubes épendorf. Les billes de verre sont lavées avec 200 μ L de TCA 5% et ce milieu de lavage est ajouté au lysat récupéré à l'étape précédente. Les extraits sont ensuite centrifugés 10 minutes à 20000 g, et le surnageant est soigneusement retiré. Le culot contenant les protéines précipitées est ensuite lavé 3 fois avec 200 μ L d'acétone froid et séché sous vide, afin d'éliminer tout reste d'acétone. Ce culot sec servira pour l'analyse de l'état d'oxydation d'une protéine en western blot ou pour le marquage des protéines oxydées.

2. En milieu natif contenant un agent alkylant (pour l'égalisation)

Une préculture de 500 mL de la souche sauvage ou $\Delta trr1$ estensemencée dans 10 L de milieu CASA complet. Lorsque la culture atteint une DO_{600} de 2, les cellules sont centrifugées à 4000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot est ensuite lavé dans une solution de lyse (PBS 1X, PMSF 1 mM, du iodoacétamide 200 mM / 2L de cellules et du Tris-Cl pH 8,8 25 mM). Après une nouvelle centrifugation, les cellules sont reprises dans la même solution supplémentée par un cocktail d'antiprotéases «complete protease inhibitor cocktail» (Boehringer Mannheim, 1 pastille pour 10 mL), puis congelées dans des presses préalablement placées à -80°C. Les cellules sont ensuite broyées à froid dans la solution de lyse en exerçant une pression de 6 tonnes à l'aide d'une presse de Eaton. Les extraits cellulaires sont clarifiés par une première centrifugation à 13000g pendant 30 minutes à 4°C. Une seconde centrifugation est réalisée à 100000 g

pendant 1h à 4°C. Le tampon de lyse est ensuite dialysé contre une solution contenant du PBS 1X et du PMSF 1 mM qui est remplacée 2 fois à intervalles de 4 heures, puis laissée sur la nuit. L'extrait dialysé est récupéré le lendemain pour doser la quantité de protéines avec le kit microBCA (BiCinconinic Acid) (Pierce). Les protéines sont éventuellement congelées à -80°C à cette étape avant de réaliser l'égalisation.

C. Marquage des protéines oxydées (pour revue voir (Le Moan N., 2007))

Les volumes de tampon de dénaturation indiqués dans le protocole ci-dessous sont compatibles avec le marquage des protéines oxydées par le NEM C¹⁴ et le NEM fluorescent, mais doivent être adaptés au volume de culture cellulaire nécessaire dans le cas de l'utilisation de la Biotine-HPDP.

Après extraction des protéines en milieu acide, les culots séchés sont dissous dans 200 µl de tampon dénaturant composé de 25 mM de Tris-Cl pH 8.8 (pour le marquage des thiols oxydés par le NEM C¹⁴ et la Biotine-HPDP) ou de Tris-Cl pH 9 (pour le marquage des thiols par le NEM fluorescent) et de CHAPS 4%, urée 8 M, EDTA 10 mM et contenant 50 mM de iodoacétamide (IAM). L'alkylation des thiols réduits est effectuée pendant 45 minutes d'incubation à 30°C sous agitation constante (1400 RPM). Afin d'éliminer les agrégats non solubilisés, les échantillons sont centrifugés à température ambiante pendant 10 minutes à 13000g. L'excès d'IAM est éliminé par précipitation des protéines du surnageant de centrifugation avec du TCA 10% final froid. Les étapes de centrifugations, lavages par l'acétone, puis séchage du culot de protéines sont répétées. Les culots secs sont ensuite repris dans 200 µl de tampon dénaturant contenant 20 mM de DTT. Les échantillons sont incubés pendant 45 minutes à 30°C sous agitation afin de réduire les protéines oxydées. Une centrifugation pendant 10 min à 13,000xg à température ambiante élimine les agrégats non solubles. L'excès de DTT est à nouveau éliminé par précipitation des protéines par le TCA. Après les lavages par l'acétone et le séchage du culot de protéines, le marquage des thiols oxydés précédemment réduits par le DTT est effectué. Les échantillons sont donc repris dans 200 µl de tampon dénaturant supplémenté par différents marqueurs des thiols oxydés.

1. Pour le marquage par le NEM C¹⁴

Après avoir repris les échantillons dans 200 μ l de tampon dénaturant pendant 15 minutes à 30°C, 2 mM de NEM C¹⁴ correspondant à 30 μ l d'une solution stock (2ml à 0,5 mCi/mL d'activité spécifique 37,5 μ Ci/ μ mole) est ajouté. Les échantillons sont à nouveau incubés pendant 15 minutes à 30°C sous agitation. Les agrégats de protéines non solubilisés sont éliminés par la centrifugation des échantillons pendant 10 minutes à 13000g à température ambiante. Une nouvelle précipitation des protéines du surnageant par le TCA permet de se débarrasser du NEM C¹⁴ qui n'a pas été fixé. Les culots de protéines sont lavés par l'acétone, séchés puis repris dans 100 μ l de tampon dénaturant sous agitation à 30°C. Après centrifugation, la concentration du surnageant de protéines est déterminée avec le kit Micro BCA. 100 μ g de protéines marquées par le NEM C¹⁴ sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle.

2. Pour le marquage par la Biotine-HPDP

Les échantillons de protéines sont solubilisés dans le tampon dénaturant contenant 0,5 mM de Biotine-HPDP pendant 45 minutes à 30°C à l'abri de la lumière. L'excès de Biotine-HPDP est éliminé par la précipitation des protéines par le TCA. Le culot de protéines est ensuite lavé par l'acétone, séché et repris dans un volume de tampon dénaturant suffisant pour solubiliser la totalité des protéines. Lorsque les protéines sont complètement dissoutes dans ce tampon, leur concentration est estimée avec le kit Micro BCA.

3. Pour le marquage par le NEM fluorescent

Les protéines sont marquées par 0,1 mM de NEM fluorescent en présence de 200 mM d'IAM dans le tampon dénaturant, au lieu des 50 mM indiqués ci-dessus. Le pH de ce tampon dénaturant est de 9 pour le blocage des thiols réduits par le NEM-680 et de 7,5 pour le marquage des thiols oxydés par le NEM-780. Le culot séché de protéines est incubé dans ce dernier tampon pendant 15 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Les protéines sont ensuite dosées avec le kit Micro BCA et 5 μ g sont soumis à une électrophorèse bidimensionnelle.

D.Purification des protéines oxydées marquées par la Biotine-HPDP

Trois à cinq mg de protéines marquées par la Biotine-HPDP et solubilisées dans le tampon dénaturant sont diluées par addition d'un volume d'une solution contenant 50 mM de Tris-Cl, pH 8.8 et 100 mM de NaCl. Les extraits sont incubés en présence de 500 μ l de résine sépharose CL-4B (Sigma) pendant 3 heures à 4°C sous une rotation constante. Le surnageant de la résine est ensuite ajouté à 500 μ l de résine de streptavidine sépharose pendant la nuit à 4°C sous rotation. Après cette incubation, la résine est lavée une fois dans 1 mL de tampon de fixation (Tris-HCl, pH 8,8, 25 mM, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, urée 4 M, CHAPS 2%), deux fois dans 1 mL de tampon A de lavage (Tris-Cl pH 8,8, 25 mM, NaCl 1 M, urée 8 M, CHAPS 4%), trois fois dans 1 mL de tampon B de lavage (Tris-Cl pH 8,8, 25 mM, urée 8 M, CHAPS 4%), une fois dans 1 mL de tampon d'élution (Tris-Cl pH 8,8, 7 mM, urée 8 M, CHAPS 4%). L'élution des protéines marquées par la Biotine-HPDP est ensuite effectuée par addition sur la résine de 200 μ l de tampon d'élution contenant 20 mM de DTT. Les protéines éluées sont soumises à une électrophorèse bidimensionnelle.

E.Séparation sur un gel bidimensionnel et révélation des protéines oxydées

1. Première dimension

Cinq microgrammes de protéines marquées par le NEM fluorescent ou 100 μ g de protéines marquées par le NEM C¹⁴ ou 200 μ l de protéines purifiées par la Biotine-HPDP sont diluées dans un volume de 400 μ l de tampon de réhydratation des strips (urée 8M, CHAPS 4%, DTT 20 mM, solution d'immobilisation du pH 1%, bleu de bromophénol 0,05%). Le DTT est omis de cette solution dans le cas des protéines marquées par le NEM fluorescent. Les échantillons de protéines sont déposés dans un sarcophage puis le gel déshydraté des strips de pH 3-10 non linéaire est placé au contact des électrodes et de l'échantillon. L'huile minérale est ajoutée au dessus de la strip afin d'empêcher l'évaporation et la cristallisation de l'échantillon. La réhydratation de la strip par les protéines est réalisée par le passage d'un courant de 30 V entre les électrodes du sarcophage pendant 12 heures à 20°C sur l'unité IPGphor (Amersham Bioscience). La séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique (Isoélectrofocalisation «IEF») est ensuite effectuée

pendant 8 heures (1 heure à 150V, 1 heure à 500V, 1 heure à 1000V et 5 heures à 8000V) à 20°C à 50 μ A par strip.

2. Seconde dimension

La solution de polyacrylamide est filtrée avant d'ajouter le SDS et le temed puis déposée dans l'unité de fabrication des gels. L'isopropanol est immédiatement ajouté après avoir laissé un espace de 0,5 cm au dessus du gel pour placer la strip. Après polymérisation la surface du gel est lavée à l'eau distillée et un morceau de 5 mm² de papier Wattman imbibé de 20 μ l de marqueur de taille est placé dans un coin de la surface du gel.

Après isoélectrofocalisation, les strips sont saturées par du SDS dans un tampon d'équilibration (SDS 2%, urée 6 M, Tris-Cl pH 8,8, 50 mM, glycérol 30% et quelques grains de bleu de bromophénol) afin de les préparer à la seconde dimension. Les strips sont alors incubées sous agitation d'abord dans 10 mL de ce tampon contenant 50 mM de DTT pendant 15 minutes, puis dans ce même tampon supplémenté par 100 mM de IAM pendant 15 minutes supplémentaires. Le DTT est omis de cette solution dans le cas des protéines marquées par le NEM fluorescent. Les strips sont lavées par du tampon d'électrophorèse et placées à la surface du gel de polyacrylamide. Une solution de stabilisation des strips (0.5% d'agarose, tampon d'électrophorèse 1X, bleu de bromophénol) précédemment chauffée est ensuite ajoutée au dessus du gel. Les gels sont placés dans l'unité de migration Ettan Dalt six qui contient 4 L de tampon d'électrophorèse 1X dans la chambre inférieure et 0,8 L de tampon d'électrophorèse 3X dans la chambre supérieure. Les protéines migrent dans le gel SDS-PAGE pendant 30 minutes à 5 watts par gel. La migration est prolongée soit pendant 6 heures à 15°C à 17 watts par gel, soit pendant 18 heures à 25°C à 1,5 watts par gel, grâce à un système de réfrigération des gels.

3. Méthodes de détection

Après l'électrophorèse, les gels des protéines marquées par le NEM fluorescent sont immergés dans de l'eau puis déposés sur la vitre de lecture de l'appareil Odyssey[®] préalablement recouverte d'une solution de PBS 1X. L'intensité des lasers utilisés pour détecter le signal varie en fonction de la quantité de protéines déposées (intensité de 4 pour 5 μ g de protéines). Les gels bidimensionnels des protéines marquées par le NEM C¹⁴ et des protéines purifiées par la Biotine-HPDP

sont quant à eux incubés pendant 4 heures sous agitation constante dans 500 mL d'une solution de fixation (5 volumes d'eau, 5 volumes d'éthanol et 1 volume d'acide acétique), avec un lavage toute les heures. Les gels des protéines marquées par le NEM C¹⁴ sont ensuite lavés avec de l'eau et placés sur un morceau de papier Wattman. Les gels sont déshydratés sous vide pendant 4 heures à 80°C, puis exposés au contact d'une cassette phosphor-screen (Amersham Bioscience) pendant 3 semaines. Les signaux sont ensuite analysés avec l'appareil Phosphorimager grâce au logiciel d'analyse et de quantification Image Quant. Les gels bidimensionnels des protéines biotinylées éluées sont ensuite incubés sous agitation pendant 10 heures dans 500 mL de solution coloration (solution de fixation contenant 5g/L de bleu de Coomassie R250 (sigma)). Les protéines oxydées sont visualisées après décoloration des gels dans la solution de fixation. Les protéines d'intérêt sont ensuite découpées pour être analysées par spectrométrie de masse.

F. Analyse de l'état redox des protéines en western blot

Après l'extraction des protéines en milieu acide, les culots secs sont repris dans 50 à 100 μ L de tampon de solubilisation TES (Tris-Cl pH 8,8, 100 mM, EDTA 10 mM SDS 1%) contenant soit du NEM 50 mM, soit de l'AMS 15 mM, soit 50 mM de DTT. Dans le cas d'une réduction des échantillons par le DTT, les protéines solubilisées sont à nouveau précipitées au TCA 20%, lavées à l'acétone, puis reprises dans le même tampon de solubilisation TES contenant de l'AMS 15 mM ou du NEM 50 mM. Les protéines sont incubées sous une agitation constante (1400 RPM) à 30°C, pendant 1 heure dans le cas du NEM et du DTT et pendant 2 heures à 37°C dans le cas de l'AMS. Les échantillons sont en suite centrifugés pendant 5 minutes à 20 000 g et le surnageant clarifié est récolté. A ce stade, la concentration des extraits peut être déterminée par un dosage microBCA (BiCinconinic Acid). Les protéines sont alors préparées à la concentration désirée pour être déposées sur un gel SDS-PAGE. Les extraits sont mélangés à la solution de Laemmli (SDS 2%, glycérol 0,01%, Bleu de bromophénol 0,01%, Tris-Cl pH8,7 62,5 mM). Le réducteur β -mercaptoéthanol (5%) est additionné ou non au tampon Laemmli selon les conditions voulues (échantillons réduits ou non réduits). Les échantillons sont finalement incubés pendant 5 minutes à 95°C, puis déposés sur gel de polyacrylamide (de rapport acrylamide/bisacrylamide 30/0,4) dont le pourcentage est

déterminé en fonction de la taille de la protéine. Après séparation par électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. L'immuno-détection est réalisée au moyen d'anticorps spécifiques. La révélation est effectuée par une réaction de chimiluminescence avec le kit de détection ECL-Plus (Amersham-Pharmacia).

Les anticorps utilisés dans cette étude sont les suivants: anti-myc monoclonal (9E10) (Sod1-Myc, Tsa1-Myc et Erv1-Myc); anti-His monoclonal couplé à la peroxydase HRP (anti-pentaHis, Qiagen) (Sod1-His); anti-HA monoclonal couplé à la peroxydase HRP (12CA5, Roche) (Ccs1-HA); anti-Flag monoclonal (Sigma) (Mia40-Flag); anti-Protéine A (peroxydase anti-peroxydase) (SIGMA) (Trx2-protéine A); anti-ySod1 (Culotta) (Sod1 endogène); anti-yCcs1 (culotta) (Ccs1 endogène); Anti-yMia40 (Chacinska) (Mia40 endogène); anti-Hxk1 (C.Mann) (Hxk1 endogène).

G. Méthode d'égalisation (réalisée par Luc Guerrier CIPHERGEN-Biorad)

Après extraction des protéines en milieu natif et en présence d'un agent alkylant, les protéines sont égalisées par Luc Guerrier du groupe CIPHERGEN. 50 μ L de cette préparation sont déposés pour être tout d'abord analysés par spectrométrie de masse SELDI-Q10 (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization). Chaque moitié des extraits de protéines est ensuite déposée dans une colonne de 1 mL de billes E ou de billes SE (Protein Equalizer™ Beads, CIPHERGEN Biosystems Inc., Fremont, CA), correspondant à une phase solide liée à une librairie combinatoire d'hexapeptides, préalablement équilibrée dans une solution de NaPO_4 à pH 7. Les protéines traversent la colonne par force gravitationnelle pendant 4 heures à 4°C. Les colonnes sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 4000 rpm. L'extrait de protéines issu de cette étape de centrifugation correspond au surnageant des billes, c'est-à-dire aux protéines «non égalisées» ne s'étant pas liées à la résine. 100 μ L de cet extrait sont alors analysés en SELDI. La fraction non égalisée est ensuite congelée à -80°C avant de procéder au marquage des protéines oxydées par la Biotine-HPDP. Les billes de la colonne sont ensuite lavées 3 à 4 fois dans 10 mL de tampon PBS puis dans 10 mL d'eau. L'élution est alors réalisée en ajoutant 1 mL d'une solution contenant de l'urée 8M, du Chaps 2% et 50 mM d'acide citrique à la résine. La colonne est délicatement vortexée pendant 5 minutes puis la fraction éluée est collectée sous pression.

L'étape est répétée 3 fois afin d'obtenir 3 mL d'une solution contenant les protéines égalisées. 50 μ L de ces protéines sont analysés en SELDI. La fraction égalisée est ensuite congelée à -80°C avant de procéder au marquage des protéines oxydées par la Biotine-HPDP. Avant d'effectuer le marquage des protéines oxydées, la concentration des protéines des fractions égalisées et non égalisées est déterminée à l'aide du kit microBCA™ (Pierce).

H. Identification des protéines par spectrométrie de masse

L'empreinte de masse peptidique ou spectrométrie de masse (MS) est une technique d'identification des protéines accessible et très sensible car elle détecte des différences de masse de l'ordre de la molécule. La combinaison de cette méthode avec la chromatographie en phase liquide (LC) permet d'augmenter la sensibilité de détection pour identifier des protéines contenues dans un mélange complexe.

Les bandes ou les spots d'acrylamide contenant les protéines à analyser sont excisés d'un gel SDS-PAGE (coloré au bleu de Coomassie) à l'aide d'un scalpel correctement nettoyé afin d'éliminer tous contaminants protéiques éventuels. Ces morceaux de gel sont ensuite découpés en fragments d'environ 1mm³ et lavés dans 200 μ L d'eau sous agitation pendant 5 minutes. Les morceaux de gel sont déshydratés dans une solution d'acétonitrile 100% pendant 10 à 15 minutes à 25°C. L'acétonitrile est ensuite éliminé par séchage sous vide. Les morceaux de gel séchés sont ensuite repris dans 200 μ L de solution 0,1 M de bicarbonate d'ammonium contenant 50 mM de DTT pendant 30 minutes à 56°C. Après réhydratation des échantillons, cette solution est diluée par un même volume d'acétonitrile 100%. Immédiatement après la solution de bicarbonate/acétonitrile est éliminée afin d'ajouter une solution de 0,1 M de bicarbonate d'ammonium contenant 100 mM de iodoacétamide. Cette étape de réduction/alkylation n'est pas toujours effectuée. Les morceaux de gels sont ensuite repris dans de l'acétonitrile 100%, séchés sous vide, puis réhydratés dans une solution de NH₄HCO₃ 25 mM, CaCl₂ 5 mM avec 12,5 ng/ μ L de trypsine qui clive la liaison peptidique après chaque résidu arginine et lysine d'une protéine. La digestion est ensuite réalisée dans une solution identique sans trypsine pendant 2 à 4 heures à 37°C. Un volume de 0,5 à 1 μ L du surnageant, contenant les peptides digérés est déposé sur une plaque de métal puis mélangé à

un même volume d'une matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique préalablement mélangée dans une solution d'acétonitrile 100% et d'acide trifluoroacétique (TFA) (1:1, v/v). Après le séchage à l'air ambiant de la plaque, les gouttes déposées sont dessalées par une solution de TFA 0,1%. Les peptides digérés sont analysés par MALDI-TOF ou par LC-MS/MS.

1. L'analyse par MALDI-TOF-MS

Le mélange de peptides de tailles différentes déposé sur une plaque de métal est percuté par un rayon laser dans la chambre du MALDI. Les fragments ionisés sont alors propulsés hors de la plaque et sont accélérés à haut voltage à l'aide d'un champ électrique. Leur rencontre avec un champ magnétique dévie ensuite ces particules en fonction de leur charge jusqu'à un détecteur où est calculé leurs temps de passage (Time Of Flight). Les temps de collision au détecteur sont alors convertis pour calculer la masse de l'ion (m) en fonction de sa charge (z). Les spectres de masses (m/z) obtenus correspondent au mélange de différents fragments peptidiques générés par la digestion protéolytique des protéines (voir schéma 27). Les masses peptidiques sont calibrées de façon externe à l'aide de peptides standards externes dont la masse est connue (Sequazyme peptide mass standard kit, Applied Biosystems) et de façon interne à l'aide des peptides générés par l'autodigestion de la trypsine. Les spectres correspondant aux différentes tailles de peptides observées sont acquis par le logiciel Voyager-DE STR (Applied Biosystems), qui exécute une suite d'instructions et de paramètres permettant de convertir les fichiers de spectres en format texte, compatible avec les algorithmes de recherche utilisés pour l'identification des protéines. La liste des fichiers de spectres obtenus expérimentalement est ensuite comparée, à l'aide des logiciels MS-Fit du programme Prowl de la banque «Swiss Protein» Profound Peptide Mapping (http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe), aux banques de données répertoriant les valeurs m/z théoriques calculées après digestion tryptique de différentes protéines. La banque de données SWISS-Prot est probablement celle qui contient le moins de protéines parmi les banques générales qui regroupent l'ensemble des entrées connues, mais c'est la plus rigoureuse car elle rassemble de nombreuses informations sur chaque protéine (isoformes, modifications post-traductionnelles, point isoélectrique) (<http://us.expasy.org/sprot/>). La recherche des peptides inclus deux modifications: les méthionines oxydées et les cystéines

carbamidométhylées avec une tolérance de la masse monoisotopique de 20 à 50 ppm. Les identifications sont réalisées par interrogation des banques de protéines chez tous les organismes et possèdent un Z-score $\geq 1,5$ excepté pour quelques protéines (Prx1, Hsp60, Ado1, Guk1, Ubc1, Cpr1 et Tma19).

Cette méthode permet donc l'identification d'une ou des protéines contenues dans les échantillons, cependant elle reste limitée lorsque les fragments peptidiques sont en faible concentration. L'approche de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet de contrer ce problème car c'est une technique plus sensible.

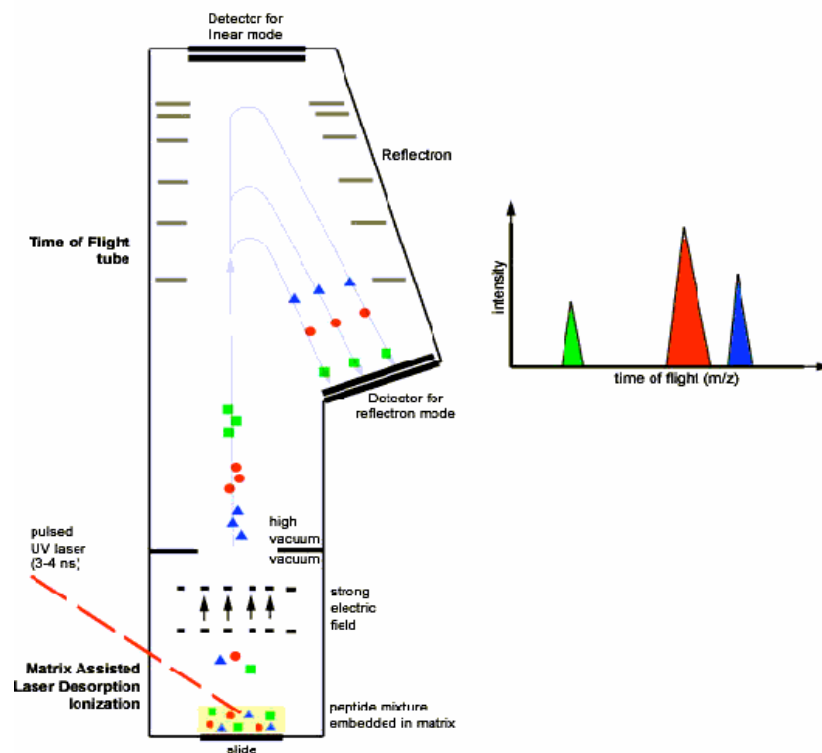


Schéma 27. Schéma explicatif du principe d'identification des protéines par la technique du MALDI-TOF-MS.

2. L'analyse par LC-MS/MS

Cette technique combine la capacité de séparation physique de la chromatographie en phase liquide (LC «liquid chromatography») et la capacité d'analyse de la masse des peptides par la spectrométrie de masse (MS «mass spectrometry») décrite précédemment. L'appareil est constitué d'une colonne de chromatographie en phase liquide (HPLC) qui sépare les fragments peptidiques en fonction de leur hydrophobicité grâce à un gradient d'acétonitrile. Ils entrent ensuite

dans un spectromètre qui génère un premier spectre de masse ressemblant à celui du MALDI-TOF. Chaque peptide est ensuite isolé à l'intérieur d'une chambre, appelée «trappe ionique», par des champs électriques variables, puis fragmenté par des collisions avec les atomes de gaz neutre. Cette étape appelée «collision induced dissociation» rompt les liens peptidiques, ce qui produit des sous-fragments de diverses longueurs ayant des masses différentes. Les sous-fragments les plus courts représentent un acide aminé. L'agencement des différentes combinaisons de masse des sous-fragments obtenus après collision permet de reconstituer la séquence en acides aminés du fragment initial (voir schéma 28). La comparaison des spectres MS/MS, correspondant à la signature de la séquence peptidique, permet ensuite d'identifier les protéines. La banque de données interrogée est la version 52.5 de la banque Swissprot, restreinte à *Saccharomyces cerevisiae*. En outre, cette banque constituée des séquences directes et des séquence inversée permet de déterminer le taux de faux positif.

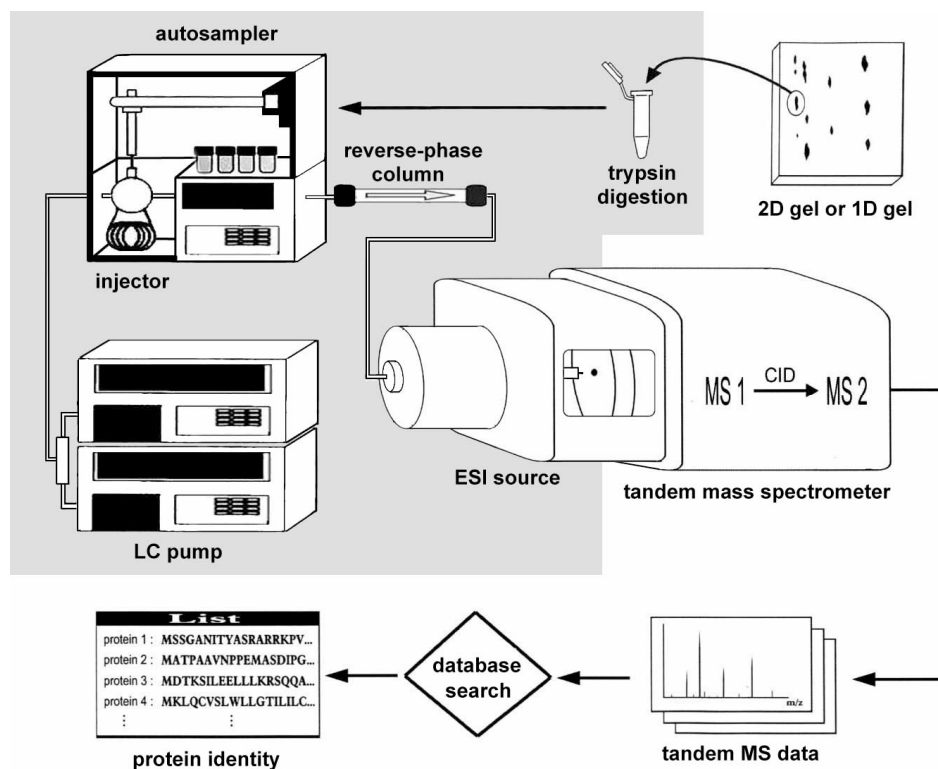


Schéma 28. Explication du principe d'identification des protéines par LC-MS/MS.

Le schéma représente un analyseur LC-ESI-Q-TOF à trappe ionique.

I. Test NBT (d'après le protocole de (Flohe and Otting, 1984))

Les cellules sont cultivées dans 50 mL de milieu YPD jusqu'à atteindre une DO_{600} de 1. La culture est ensuite centrifugée et le culot de cellules est lavé avec de l'eau distillée froide. Après une nouvelle centrifugation, les cellules sont reprises dans 0,5 mL d'un tampon de lyse (10 mM de $NaPO_4$ (pH 7,8), 1mM d'EDTA, 0,1% de Triton X100, 1 mM de PMSF et un cocktail d'antiprotéases) auquel est ajouté 200 μ L de billes de verres. Les cellules sont lysées par agitation pendant 10 minutes puis 5% de glycérol est ajouté à cette suspension. Après centrifugation, les protéines du surnageant sont dosées par la méthode de Bradford. 20 μ g de ces protéines totales ou des protéines mitochondriales/cytosoliques issues du fractionnement cellulaire (voir paragraphe I.C.3. «fractionnement cellulaire») sont diluées dans du tampon Laemmli ne contenant pas de SDS puis sont déposées sur un gel de 12% de polyacrylamide non dénaturant. Après l'électrophorèse, le gel est incubé sous agitation dans le noir pendant 20 minutes dans une solution d'eau distillée contenant 0,025% de NBT et 0,01% de riboflavine (poids/volume). Le gel est ensuite agité pendant 20 minutes supplémentaires dans une solution contenant 1% de Temed (poids/volume) puis exposé à une source lumineuse. La décoloration du gel est visualisée à l'emplacement de l'activité de dismutation du superoxyde.

Références Bibliographiques

- Aguilaniu, H., L. Gustafsson, M. Rigoulet, and T. Nystrom. 2003. Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*. 299:1751-3.
- Allen, S., V. Balabanidou, D.P. Sideris, T. Lisowsky, and K. Tokatlidis. 2005. Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J Mol Biol*. 353:937-44.
- Arnesano, F., E. Balatri, L. Banci, I. Bertini, and D.R. Winge. 2005. Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure*. 13:713-22.
- Aslund, F., K.D. Berndt, and A. Holmgren. 1997. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J Biol Chem*. 272:30780-6.
- Aslund, F., B. Ehn, A. Miranda-Vizuete, C. Pueyo, and A. Holmgren. 1994. Two additional glutaredoxins exist in Escherichia coli: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:9813-7.
- Bader, M., W. Muse, D.P. Ballou, C. Gassner, and J.C. Bardwell. 1999. Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell*. 98:217-27.
- Bader, M.W., A. Hiniker, J. Regeimbal, D. Goldstone, P.W. Haebel, J. Riemer, P. Metcalf, and J.C. Bardwell. 2001. Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. *Embo J*. 20:1555-62.
- Bader, M.W., T. Xie, C.A. Yu, and J.C. Bardwell. 2000. Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J Biol Chem*. 275:26082-8.
- Balmer, Y., A. Koller, G. del Val, W. Manieri, P. Schurmann, and B.B. Buchanan. 2003. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:370-5.
- Bass, R., L.W. Ruddock, P. Klappa, and R.B. Freedman. 2004. A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem*. 279:5257-62.
- Battistoni, A., A.P. Mazzetti, and G. Rotilio. 1999. In vivo formation of Cu,Zn superoxide dismutase disulfide bond in Escherichia coli. *FEBS Lett*. 443:313-6.
- Baty, J.W., M.B. Hampton, and C.C. Winterbourn. 2002. Detection of oxidant sensitive thiol proteins by fluorescence labeling and two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*. 2:1261-6.
- Baty, J.W., M.B. Hampton, and C.C. Winterbourn. 2005. Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. *Biochem J*. 389:785-95.
- Becher, D., J. Kricke, G. Stein, and T. Lisowsky. 1999. A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution. *Yeast*. 15:1171-81.
- Biteau, B., J. Labarre, and M.B. Toledano. 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin. *Nature*. 425:980-4.
- Boschi-Muller, S., A. Olry, M. Antoine, and G. Branlant. 2005. The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta*. 1703:231-8.

- Brennan, J.P., J.I. Miller, W. Fuller, R. Wait, S. Begum, M.J. Dunn, and P. Eaton. 2006. The utility of N,N-biotinyl glutathione disulfide in the study of protein S-glutathiolation. *Mol Cell Proteomics*. 5:215-25.
- Brennan, J.P., R. Wait, S. Begum, J.R. Bell, M.J. Dunn, and P. Eaton. 2004. Detection and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis. *J Biol Chem*. 279:41352-60.
- Brown, N.M., A.S. Torres, P.E. Doan, and T.V. O'Halloran. 2004. Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:5518-23.
- Buchanan, B.B., and Y. Balmer. 2005. Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol*. 56:187-220.
- Camier, S., E. Ma, C. Leroy, A. Pruvost, M. Toledano, and M.C. Marsolier-Kergoat. 2007a. Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. *Free Radic Biol Med*. 42:1008-16.
- Camier, S., E. Ma, C. Leroy, A. Pruvost, M.B. Toledano, and M.C. Marsolier-Kergoat. 2007b. Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. *Free Radic Biol Med*. in press.
- Carmel-Harel, O., R. Stearman, A.P. Gasch, D. Botstein, P.O. Brown, and G. Storz. 2001. Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 39:595-605.
- Carmel-Harel, O., and G. Storz. 2000. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol*. 54:439-61.
- Carroll, M.C., J.B. Girouard, J.L. Ulloa, J.R. Subramaniam, P.C. Wong, J.S. Valentine, and V.C. Culotta. 2004. Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:5964-9.
- Cha, M.K., Y.S. Choi, S.K. Hong, W.C. Kim, K.T. No, and I.H. Kim. 2003. Nuclear thiol peroxidase as a functional alkyl-hydroperoxide reductase necessary for stationary phase growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 278:24636-43.
- Chacinska, A., S. Pfannschmidt, N. Wiedemann, V. Kozjak, L.K. Sanjuan Szklarz, A. Schulze-Specking, K.N. Truscott, B. Guiard, C. Meisinger, and N. Pfanner. 2004. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *Embo J*. 23:3735-46.
- Chae, H.Z., S.J. Chung, and S.G. Rhee. 1994a. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem*. 269:27670-8.
- Chae, H.Z., T.B. Uhm, and S.G. Rhee. 1994b. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:7022-6.
- Chakravarthi, S., C.E. Jessop, M. Willer, C.J. Stirling, and N.J. Bulleid. 2007. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. *Biochem J*. 404:403-11.
- Chan, H.L., S. Gharbi, P.R. Gaffney, R. Cramer, M.D. Waterfield, and J.F. Timms. 2005. Proteomic analysis of redox- and ErbB2-dependent changes in mammary luminal epithelial cells using cysteine- and lysine-labelling two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics*. 5:2908-26.

- Chang, E.C., and D.J. Kosman. 1990. O₂-dependent methionine auxotrophy in Cu,Zn superoxide dismutase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 172:1840-5.
- Chivers, P.T., M.C. Laboissiere, and R.T. Raines. 1996. The CXXC motif: imperatives for the formation of native disulfide bonds in the cell. *Embo J.* 15:2659-67.
- Chivers, P.T., K.E. Prehoda, B.F. Volkman, B.M. Kim, J.L. Markley, and R.T. Raines. 1997. Microscopic pK_a values of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry.* 36:14985-91.
- Chivers, P.T., and R.T. Raines. 1997. General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry.* 36:15810-6.
- Choi, J., H.D. Rees, S.T. Weintraub, A.I. Levey, L.S. Chin, and L. Li. 2005. Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem.* 280:11648-55.
- Cobine, P.A., F. Pierrel, M.L. Bestwick, and D.R. Winge. 2006. Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 281:36552-9.
- Collet, J.F., J. Riemer, M.W. Bader, and J.C. Bardwell. 2002. Reconstitution of a disulfide isomerization system. *J Biol Chem.* 277:26886-92.
- Collinson, E.J., and C.M. Grant. 2003. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J Biol Chem.* 278:22492-7.
- Collinson, E.J., G.L. Wheeler, E.O. Garrido, A.M. Avery, S.V. Avery, and C.M. Grant. 2002. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem.* 277:16712-7.
- Collinson, L.P., and I.W. Dawes. 1995. Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. *Gene.* 156:123-7.
- Culotta, V.C., L.W. Klomp, J. Strain, R.L. Casareno, B. Krems, and J.D. Gitlin. 1997. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 272:23469-72.
- Cumming, R.C., N.L. Andon, P.A. Haynes, M. Park, W.H. Fischer, and D. Schubert. 2004. Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem.* 279:21749-58.
- Cumming, R.C., and D. Schubert. 2005. Amyloid-beta induces disulfide bonding and aggregation of GAPDH in Alzheimer's disease. *Faseb J.* 19:2060-2.
- Cuozzo, J.W., and C.A. Kaiser. 1999. Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat Cell Biol.* 1:130-5.
- D'autreaux B., T.M. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol.8.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, R. Colombo, and A. Milzani. 2003. Actin S-glutathionylation: evidence against a thiol-disulphide exchange mechanism. *Free Radic Biol Med.* 35:1185-93.
- Daum, G., P.C. Bohni, and G. Schatz. 1982. Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b₂ and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 257:13028-33.
- De Freitas, J.M., A. Liba, R. Meneghini, J.S. Valentine, and E.B. Gralla. 2000. Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism. *J Biol Chem.* 275:11645-9.
- Debarbieux, L., and J. Beckwith. 1998. The reductive enzyme thioredoxin 1 acts as an oxidant when it is exported to the *Escherichia coli* periplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10751-6.

- Debarbieux, L., and J. Beckwith. 2000. On the functional interchangeability, oxidant versus reductant, of members of the thioredoxin superfamily. *J Bacteriol.* 182:723-7.
- Delaunay, A., A.D. Isnard, and M.B. Toledano. 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J.* 19:5157-66.
- Delaunay, A., D. Pflieger, M.B. Barrault, J. Vinh, and M.B. Toledano. 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell.* 111:471-81.
- Derman, A.I., and J. Beckwith. 1991. Escherichia coli alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J Bacteriol.* 173:7719-22.
- Derman, A.I., W.A. Prinz, D. Belin, and J. Beckwith. 1993. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli. *Science.* 262:1744-1747.
- Draculic, T., I.W. Dawes, and C.M. Grant. 2000. A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Microbiol.* 36:1167-74.
- Eaton, P. 2006. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Biol Med.* 40:1889-99.
- Eaton, P., H.L. Byers, N. Leeds, M.A. Ward, and M.J. Shattock. 2002. Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem.* 277:9806-11.
- Farah, M.E., and D.C. Amberg. 2007. Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast. *Mol Biol Cell.* 18:1359-65.
- Farrell, S.R., and C. Thorpe. 2005. Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity. *Biochemistry.* 44:1532-41.
- Feng, Y., N. Zhong, N. Rouhier, T. Hase, M. Kusunoki, J.P. Jacquot, C. Jin, and B. Xia. 2006. Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site. *Biochemistry.* 45:7998-8008.
- Field, L.S., Y. Furukawa, T.V. O'Halloran, and V.C. Culotta. 2003. Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem.* 278:28052-9.
- Flohe, L., and F. Otting. 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* 105:93-104.
- Foloppe, N., and L. Nilsson. 2004. The glutaredoxin -C-P-Y-C- motif: influence of peripheral residues. *Structure.* 12:289-300.
- Forman, H.J., J.M. Fukuto, and M. Torres. 2004. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287:C246-56.
- Frand, A.R., and C.A. Kaiser. 1998. The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell.* 1:161-70.
- Frand, A.R., and C.A. Kaiser. 1999. Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell.* 4:469-77.
- Frand, A.R., and C.A. Kaiser. 2000. Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 11:2833-43.

- Fratelli, M., H. Demol, M. Puype, S. Casagrande, I. Eberini, M. Salmona, V. Bonetto, M. Mengozzi, F. Duffieux, E. Miclet, A. Bachi, J. Vandekerckhove, E. Gianazza, and P. Ghezzi. 2002. Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:3505-10.
- Furukawa, Y., A.S. Torres, and T.V. O'Halloran. 2004. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *Embo J*. 23:2872-81.
- Gabriel, K., D. Milenkovic, A. Chacinska, J. Muller, B. Guiard, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2007. Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J Mol Biol*. 365:612-20.
- Gamonet, F., and G.J. Lauquin. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* LYS7 gene is involved in oxidative stress protection. *Eur J Biochem*. 251:716-23.
- Garrido, E.O., and C.M. Grant. 2002. Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol Microbiol*. 43:993-1003.
- Gasch, A.P., P.T. Spellman, C.M. Kao, O. Carmel-Harel, M.B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, and P.O. Brown. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 11:4241-57.
- Gerber, J., U. Muhlenhoff, G. Hofhaus, R. Lill, and T. Lisowsky. 2001. Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J Biol Chem*. 276:23486-91.
- Ghaemmaghami, S., W.K. Huh, K. Bower, R.W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E.K. O'Shea, and J.S. Weissman. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 425:737-41.
- Ghezzi, P. 2005. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res*. 39:573-80.
- Gilbert, H.F. 1990. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 63:69-172.
- Gilbert, H.F. 1995. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol*. 251:8-28.
- Giles, N.M., G.I. Giles, and C. Jacob. 2003a. Multiple roles of cysteine in biocatalysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 300:1-4.
- Giles, N.M., A.B. Watts, G.I. Giles, F.H. Fry, J.A. Littlechild, and C. Jacob. 2003b. Metal and redox modulation of cysteine protein function. *Chem Biol*. 10:677-93.
- Godon, C., G. Lagniel, J. Lee, J.M. Buhler, S. Kieffer, M. Perrot, H. Boucherie, M.B. Toledano, and J. Labarre. 1998. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 273:22480-9.
- Gonzalez Porque, P., A. Baldesten, and P. Reichard. 1970. The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *J Biol Chem*. 245:2371-4.
- Gralla, E.B., and J.S. Valentine. 1991. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol*. 173:5918-20.
- Grant, C.M., F.H. MacIver, and I.W. Dawes. 1996. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 29:511-5.

- Grant, C.M., G. Perrone, and I.W. Dawes. 1998. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 253:893-8.
- Grant, C.M., K.A. Quinn, and I.W. Dawes. 1999. Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 19:2650-6.
- Grauschopf, U., J.R. Winther, P. Korber, T. Zander, P. Dallinger, and J.C. Bardwell. 1995. Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell.* 83:947-55.
- Gross, E., D.B. Kastner, C.A. Kaiser, and D. Fass. 2004. Structure of Ero1p, source of disulfide bonds for oxidative protein folding in the cell. *Cell.* 117:601-10.
- Gross, E., C.S. Sevier, N. Heldman, E. Vitu, M. Bentzur, C.A. Kaiser, C. Thorpe, and D. Fass. 2006. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:299-304.
- Gross, E., C.S. Sevier, A. Vala, C.A. Kaiser, and D. Fass. 2002. A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. *Nat Struct Biol.* 9:61-7.
- Gruber, C.W., M. Cemazar, B. Heras, J.L. Martin, and D.J. Craik. 2006. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci.* 31:455-64.
- Guerrier, L., V. Thulasiraman, A. Castagna, F. Fortis, S. Lin, L. Lomas, P.G. Righetti, and E. Boschetti. 2006. Reducing protein concentration range of biological samples using solid-phase ligand libraries. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 833:33-40.
- Guthrie, C. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* 194:1-863.
- Hara, M.R., N. Agrawal, S.F. Kim, M.B. Cascio, M. Fujimuro, Y. Ozeki, M. Takahashi, J.H. Cheah, S.K. Tankou, L.D. Hester, C.D. Ferris, S.D. Hayward, S.H. Snyder, and A. Sawa. 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol.* 7:665-74.
- Harding, H.P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P.D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D.F. Stojdl, J.C. Bell, T. Hettmann, J.M. Leiden, and D. Ron. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 11:619-33.
- Herrmann, J.M., and K. Hell. 2005. Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 30:205-11.
- Herrmann, J.M., and R. Kohl. 2007. Catch me if you can! Oxidative protein trapping in the intermembrane space of mitochondria. *J Cell Biol.* 176:559-63.
- Hofhaus, G., J.E. Lee, I. Tews, B. Rosenberg, and T. Lisowsky. 2003. The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for in vivo activity and interacts with the primary redox centre. *Eur J Biochem.* 270:1528-35.
- Hofmann, B., H.J. Hecht, and L. Flohe. 2002. Peroxiredoxins. *Biol Chem.* 383:347-64.
- Hofmann, S., U. Rothbauer, N. Muhlenbein, K. Baiker, K. Hell, and M.F. Bauer. 2005. Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space. *J Mol Biol.* 353:517-28.
- Holmgren, A. 1976. Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73:2275-9.

- Holmgren, A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem.* 264:13963-6.
- Holmgren, A. 1995. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure.* 3:239-43.
- Holmgren, A., and F. Aslund. 1995. Glutaredoxin. *Methods Enzymol.* 252:283-92.
- Holmgren, A., B.O. Soderberg, H. Eklund, and C.I. Branden. 1975. Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:2305-9.
- Huang, M.E., A.G. Rio, A. Nicolas, and R.D. Kolodner. 2003. A genomewide screen in Saccharomyces cerevisiae for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:11529-34.
- Huber-Wunderlich, M., and R. Glockshuber. 1998. A single dipeptide sequence modulates the redox properties of a whole enzyme family. *Fold Des.* 3:161-71.
- Hurd, T.R., T.A. Prime, M.E. Harbour, K.S. Lilley, and M.P. Murphy. 2007. Detection of ros-sensitive thiol proteins by redox-difference gel electrophoresis (redox-dige): Implications for mitochondrial redox signalling. *J Biol Chem.* 282: 22040-51
- Hwang, C., A.J. Sinsky, and H.F. Lodish. 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science.* 257:1496-502.
- Imlay, J.A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 57:395-418.
- Inoue, Y., T. Matsuda, K. Sugiyama, S. Izawa, and A. Kimura. 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem.* 274:27002-9.
- Izawa, S., Y. Inoue, and A. Kimura. 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* 368:73-6.
- Izawa, S., K. Maeda, K. Sugiyama, J. Mano, Y. Inoue, and A. Kimura. 1999. Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem.* 274:28459-65.
- Jacob, C., G.I. Giles, N.M. Giles, and H. Sies. 2003. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew Chem Int Ed Engl.* 42:4742-58.
- Jaffrey, S.R., H. Erdjument-Bromage, C.D. Ferris, P. Tempst, and S.H. Snyder. 2001. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 3:193-7.
- Jaffrey, S.R., and S.H. Snyder. 2001. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE.* 2001:PL1.
- Jensen, L.T., and V.C. Culotta. 2005. Activation of CuZn superoxide dismutases from Caenorhabditis elegans does not require the copper chaperone CCS. *J Biol Chem.* 280:41373-9.
- Jensen, L.T., R.J. Sanchez, C. Srinivasan, J.S. Valentine, and V.C. Culotta. 2004. Mutations in Saccharomyces cerevisiae iron-sulfur cluster assembly genes and oxidative stress relevant to Cu,Zn superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 279:29938-43.
- Jeong, J.S., S.J. Kwon, S.W. Kang, S.G. Rhee, and K. Kim. 1999. Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (type II TPx) from Saccharomyces cerevisiae. *Biochemistry.* 38:776-83.
- Johansson, C., K.L. Kavanagh, O. Gileadi, and U. Oppermann. 2007. Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a

- mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria. *J Biol Chem.* 282:3077-82.
- Jonda, S., M. Huber-Wunderlich, R. Glockshuber, and E. Mossner. 1999. Complementation of DsbA deficiency with secreted thioredoxin variants reveals the crucial role of an efficient dithiol oxidant for catalyzed protein folding in the bacterial periplasm. *Embo J.* 18:3271-81.
- Kobayashi, T., S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi, and K. Ito. 1997. Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing Escherichia coli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:11857-62.
- Koc, A., C.K. Mathews, L.J. Wheeler, M.K. Gross, and G.F. Merrill. 2006. Thioredoxin is required for deoxyribonucleotide pool maintenance during S phase. *J Biol Chem.* 281:15058-63.
- Koehler, C.M. 2004. The small Tim proteins and the twin Cx3C motif. *Trends Biochem Sci.* 29:1-4.
- Koh, C.S., C. Didierjean, N. Navrot, S. Panjikar, G. Mulliert, N. Rouhier, J.P. Jacquot, A. Aubry, O. Shawkataly, and C. Corbier. 2007. Crystal structures of a poplar thioredoxin peroxidase that exhibits the structure of glutathione peroxidases: insights into redox-driven conformational changes. *J Mol Biol.* 370:512-29.
- Kolberg, M., K.R. Strand, P. Graff, and K.K. Andersson. 2004. Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim Biophys Acta.* 1699:1-34.
- Kuge, S., and N. Jones. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of Saccharomyces cerevisiae to oxidative stress by hydroperoxides. *Embo J.* 13:655-64.
- Kumar, A., S. Agarwal, J.A. Heyman, S. Matson, M. Heidtman, S. Piccirillo, L. Umansky, A. Drawid, R. Jansen, Y. Liu, K.H. Cheung, P. Miller, M. Gerstein, G.S. Roeder, and M. Snyder. 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.* 16:707-19.
- Kumar, J.K., S. Tabor, and C.C. Richardson. 2004. Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3759-64.
- Lamb, A.L., A.S. Torres, T.V. O'Halloran, and A.C. Rosenzweig. 2001. Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat Struct Biol.* 8:751-5.
- Lange, H., T. Lisowsky, J. Gerber, U. Muhlenhoff, G. Kispal, and R. Lill. 2001. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep.* 2:715-20.
- Lapinskas, P.J., K.W. Cunningham, X.F. Liu, G.R. Fink, and V.C. Culotta. 1995. Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol Cell Biol.* 15:1382-8.
- Laurent, T.C., E.C. Moore, and P. Reichard. 1964. Enzymatic Synthesis Of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation And Characterization Of Thioredoxin, The Hydrogen Donor From Escherichia Coli B. *J Biol Chem.* 239:3436-44.
- Le Moan, N., G. Clement, S. Le Maout, F. Tacnet, and M.B. Toledano. 2006. The Saccharomyces cerevisiae proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J Biol Chem.* 281:10420-30.
- Le Moan, N., Tacnet, F., Toledano MB. 2007. Protein-thiol oxidation, from single proteins to proteome-wide analysis. *Methods in Molecular Biology.* In press.

- Lee, J., C. Godon, G. Lagniel, D. Spector, J. Garin, J. Labarre, and M.B. Toledano. 1999a. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem.* 274:16040-6.
- Lee, J., G. Hofhaus, and T. Lisowsky. 2000. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett.* 477:62-6.
- Lee, J., D. Spector, C. Godon, J. Labarre, and M.B. Toledano. 1999b. A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J Biol Chem.* 274:4537-44.
- Leichert, L.I., and U. Jakob. 2004. Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biol.* 2:e333.
- Lemaire, S.D., L. Michelet, M. Zaffagnini, V. Massot, and E. Issakidis-Bourget. 2007. Thioredoxins in chloroplasts. *Current Genetics.* 51:343-365.
- Levine, R.L., L. Mosoni, B.S. Berlett, and E.R. Stadtman. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:15036-40.
- Lill, R., R. Dutkiewicz, H.P. Elsasser, A. Hausmann, D.J. Netz, A.J. Pierik, O. Stehling, E. Urzica, and U. Muhlenhoff. 2006. Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta.* 1763:652-67.
- Lillig, C.H., C. Berndt, O. Vergnolle, M.E. Lonn, C. Hudemann, E. Bill, and A. Holmgren. 2005. Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8168-73.
- Lillig, C.H., A. Prior, J.D. Schwenn, F. Aslund, D. Ritz, A. Vlamis-Gardikas, and A. Holmgren. 1999. New thioredoxins and glutaredoxins as electron donors of 3'-phosphoadenylylsulfate reductase. *J Biol Chem.* 274:7695-8.
- Lin, S.J., and V.C. Culotta. 1995. The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:3784-8.
- Lin, S.J., and V.C. Culotta. 1996. Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* ATX2, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. *Mol Cell Biol.* 16:6303-12.
- Lind, C., R. Gerdes, Y. Hamnell, I. Schuppe-Koistinen, H.B. von Lowenhielm, A. Holmgren, and I.A. Cotgreave. 2002. Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Arch Biochem Biophys.* 406:229-40.
- Linke, K., and U. Jakob. 2003. Not every disulfide lasts forever: disulfide bond formation as a redox switch. *Antioxid Redox Signal.* 5:425-34.
- Lippard, S.J. 1999. Free copper ions in the cell? *Science.* 284:748-9.
- Lisowsky, T. 1994. ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 26:15-20.
- Lisowsky, T. 1996. Removal of an intron with unique 3' branch site creates an amino-terminal protein sequence directing the scERV1 gene product to mitochondria. *Yeast.* 12:1501-10.
- Liu, X.F., and V.C. Culotta. 1994. The requirement for yeast superoxide dismutase is bypassed through mutations in BSD2, a novel metal homeostasis gene. *Mol Cell Biol.* 14:7037-45.
- Liu, X.F., I. Elashvili, E.B. Gralla, J.S. Valentine, P. Lapinskas, and V.C. Culotta. 1992. Yeast lacking superoxide dismutase. Isolation of genetic suppressors. *J Biol Chem.* 267:18298-302.

- Luikenhuis, S., G. Perrone, I.W. Dawes, and C.M. Grant. 1998. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell*. 9:1081-91.
- Lundstrom, J., G. Krause, and A. Holmgren. 1992. A Pro to His mutation in active site of thioredoxin increases its disulfide-isomerase activity 10-fold. New refolding systems for reduced or randomly oxidized ribonuclease. *J Biol Chem*. 267:9047-52.
- Maeda, K., C. Finnie, and B. Svensson. 2004. Cy5 maleimide labelling for sensitive detection of free thiols in native protein extracts: identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms. *Biochem J*. 378:497-507.
- Maiorino, M., F. Ursini, V. Bosello, S. Toppo, S.C. Tosatto, P. Mauri, K. Becker, A. Roveri, C. Bulato, L. Benazzi, A. De Palma, and L. Flohe. 2007. The thioredoxin specificity of *Drosophila* GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. *J Mol Biol*. 365:1033-46.
- Makmura, L., M. Hamann, A. Areopagita, S. Furuta, A. Munoz, and J. Momand. 2001. Development of a sensitive assay to detect reversibly oxidized protein cysteine sulfhydryl groups. *Antioxid Redox Signal*. 3:1105-18.
- Mallis, R.J., J.E. Buss, and J.A. Thomas. 2001. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. *Biochem J*. 355:145-53.
- Marouga, R., S. David, and E. Hawkins. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*. 382:669-78.
- Mason, H.S. 1957. Mechanisms of oxygen metabolism. *Science*. 125:1185-1188.
- Mesecke, N., N. Terziyska, C. Kozany, F. Baumann, W. Neupert, K. Hell, and J.M. Herrmann. 2005. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*. 121:1059-69.
- Messens, J., and J.F. Collet. 2006. Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol*. 38:1050-62.
- Minard, K.I., C.A. Carroll, S.T. Weintraub, and L. Mc-Alister-Henn. 2007. Changes in disulfide bond content of proteins in a yeast strain lacking major sources of NADPH. *Free Radic Biol Med*. 42:106-17.
- Molina, M.M., G. Belli, M.A. de la Torre, M.T. Rodriguez-Manzaneque, and E. Herrero. 2004. Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J Biol Chem*. 279:51923-30.
- Molteni, S.N., A. Fassio, M.R. Ciriolo, G. Filomeni, E. Pasqualetto, C. Fagioli, and R. Sitia. 2004. Glutathione limits Ero1-dependent oxidation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 279:32667-73.
- Moore, E.C., P. Reichard, and L. Thelander. 1964. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides.V. Purification and Properties of Thioredoxin Reductase from *Escherichia Coli* B. *J Biol Chem*. 239:3445-52.
- Moskovitz, J., B.S. Berlett, J.M. Poston, and E.R. Stadtman. 1997. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:9585-9.
- Moskovitz, J., E. Flescher, B.S. Berlett, J. Azare, J.M. Poston, and E.R. Stadtman. 1998. Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:14071-5.
- Mossner, E., M. Huber-Wunderlich, and R. Glockshuber. 1998. Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci*. 7:1233-44.

- Mossner, E., M. Huber-Wunderlich, A. Rietsch, J. Beckwith, R. Glockshuber, and F. Aslund. 1999. Importance of redox potential for the in vivo function of the cytoplasmic disulfide reductant thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 274:25254-9.
- Muller, E.G. 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem*. 266:9194-202.
- Muller, E.G. 1996. A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol Biol Cell*. 7:1805-13.
- Nakamoto, H., and J.C. Bardwell. 2004. Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *Escherichia coli* periplasm. *Biochim Biophys Acta*. 1694:111-9.
- Naoe, M., Y. Ohwa, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto, and T. Endo. 2004. Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem*. 279:47815-21.
- Nathan, C. 2003. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest*. 111:769-78.
- Navrot, N., V. Collin, J. Gualberto, E. Gelhaye, M. Hirasawa, P. Rey, D.B. Knaff, E. Issakidis, J.P. Jacquot, and N. Rouhier. 2006. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol*. 142:1364-79.
- Nelson, J.W., and T.E. Creighton. 1994. Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry*. 33:5974-83.
- Noor, R., S. Mittal, and J. Iqbal. 2002. Superoxide dismutase--applications and relevance to human diseases. *Med Sci Monit*. 8:RA210-5.
- Norgaard, P., V. Westphal, C. Tachibana, L. Alsoe, B. Holst, and J.R. Winther. 2001. Functional differences in yeast protein disulfide isomerases. *J Cell Biol*. 152:553-62.
- O'Brien, K.M., R. Dirmeier, M. Engle, and R.O. Poyton. 2004. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem*. 279:51817-27.
- Obin, M., F. Shang, X. Gong, G. Handelman, J. Blumberg, and A. Taylor. 1998. Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. *Faseb J*. 12:561-9.
- Ostergaard, H., C. Tachibana, and J.R. Winther. 2004. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J Cell Biol*. 166:337-45.
- Pan, J.L., and J.C. Bardwell. 2006. The origami of thioredoxin-like folds. *Protein Sci*. 15:2217-27.
- Pawlowski, R., and J. Jura. 2006. ALR and liver regeneration. *Mol Cell Biochem*. 288:159-69.
- Pedrajas, J.R., E. Kosmidou, A. Miranda-Vizuete, J.A. Gustafsson, A.P. Wright, and G. Spyrou. 1999. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 274:6366-73.
- Pedrajas, J.R., A. Miranda-Vizuete, N. Javanmardy, J.A. Gustafsson, and G. Spyrou. 2000. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved

- cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem*. 275:16296-301.
- Pelmenschikov, V., and P.E. Siegbahn. 2005. Copper-zinc superoxide dismutase: theoretical insights into the catalytic mechanism. *Inorg Chem*. 44:3311-20.
- Penninckx, M.J. 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res*. 2:295-305.
- Petropoulos, I., and B. Friguet. 2005. Protein maintenance in aging and replicative senescence: a role for the peptide methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta*. 1703:261-6.
- Pollard, M.G., K.J. Travers, and J.S. Weissman. 1998. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*. 1:171-82.
- Poole, L.B., P.A. Karplus, and A. Claiborne. 2004. Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 44:325-47.
- Poole, L.B., B.B. Zeng, S.A. Knaggs, M. Yakubu, and S.B. King. 2005. Synthesis of chemical probes to map sulfenic acid modifications on proteins. *Bioconjug Chem*. 16:1624-8.
- Prinz, W.A., F. Aslund, A. Holmgren, and J. Beckwith. 1997. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem*. 272:15661-7.
- Rae, T.D., P.J. Schmidt, R.A. Pufahl, V.C. Culotta, and T.V. O'Halloran. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*. 284:805-8.
- Rae, T.D., A.S. Torres, R.A. Pufahl, and T.V. O'Halloran. 2001. Mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCCS. *J Biol Chem*. 276:5166-76.
- Raje, S., and C. Thorpe. 2003. Inter-domain redox communication in flavoenzymes of the quiescin/sulfhydryl oxidase family: role of a thioredoxin domain in disulfide bond formation. *Biochemistry*. 42:4560-8.
- Rand, J.D., and C.M. Grant. 2006. The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Mol Biol Cell*. 17:387-401.
- Rhee, S.G., H.Z. Chae, and K. Kim. 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*. 38:1543-52.
- Rietsch, A., P. Bessette, G. Georgiou, and J. Beckwith. 1997. Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol*. 179:6602-8.
- Rissler, M., N. Wiedemann, S. Pfannschmidt, K. Gabriel, B. Guiard, N. Pfanner, and A. Chacinska. 2005. The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J Mol Biol*. 353:485-92.
- Ritz, D., and J. Beckwith. 2001. Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 55:21-48.
- Rodriguez-Manzanares, M.T., J. Ros, E. Cabisco, A. Sorribas, and E. Herrero. 1999. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 19:8180-90.
- Rodriguez-Manzanares, M.T., J. Tamarit, G. Belli, J. Ros, and E. Herrero. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell*. 13:1109-21.

- Rosenfeld, E., and B. Beauvoit. 2003. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 20:1115-44.
- Rouhier, N., H. Unno, S. Bandyopadhyay, L. Masip, S.K. Kim, M. Hirasawa, J.M. Gualberto, V. Lattard, M. Kusunoki, D.B. Knaff, G. Georgiou, T. Hase, M.K. Johnson, and J.P. Jacquot. 2007. Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:7379-84.
- Rouhier, N., A. Villarejo, M. Srivastava, E. Gelhaye, O. Keech, M. Droux, I. Finkemeier, G. Samuelsson, K.J. Dietz, J.P. Jacquot, and G. Wingsle. 2005. Identification of plant glutaredoxin targets. *Antioxid Redox Signal*. 7:919-29.
- Saurin, A.T., H. Neubert, J.P. Brennan, and P. Eaton. 2004. Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:17982-7.
- Schafer, F.Q., and G.R. Buettner. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 30:1191-212.
- Schmidt, P.J., C. Kunst, and V.C. Culotta. 2000. Copper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in vivo. Role for protein-protein interactions with the copper chaperone for SOD1. *J Biol Chem*. 275:33771-6.
- Schmidt, P.J., T.D. Rae, R.A. Pufahl, T. Hamma, J. Strain, T.V. O'Halloran, and V.C. Culotta. 1999. Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 274:23719-25.
- Senkevich, T.G., C.L. White, E.V. Koonin, and B. Moss. 2002. Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:6667-72.
- Sevier, C.S., J.W. Cuozzo, A. Vala, F. Aslund, and C.A. Kaiser. 2001. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat Cell Biol*. 3:874-82.
- Sevier, C.S., H. Kadokura, V.C. Tam, J. Beckwith, D. Fass, and C.A. Kaiser. 2005. The prokaryotic enzyme DsbB may share key structural features with eukaryotic disulfide bond forming oxidoreductases. *Protein Sci*. 14:1630-42.
- Sevier, C.S., and C.A. Kaiser. 2002. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:836-47.
- Sevier, C.S., and C.A. Kaiser. 2006. Disulfide transfer between two conserved cysteine pairs imparts selectivity to protein oxidation by Ero1. *Mol Biol Cell*. 17:2256-66.
- Sevier, C.S., and C.A. Kaiser. 2006. Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways. *Antioxid Redox Signal*. 5: 797-811
- Sevier, C.S., H. Qu, N. Heldman, E. Gross, D. Fass, and C.A. Kaiser. 2007. Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell*. 129:333-44.
- Sharma, K.G., V. Sharma, A. Bourbonloux, S. Delrot, and A.K. Bachhawat. 2000. Glutathione depletion leads to delayed growth stasis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of a partially overlapping role for thioredoxin. *Curr Genet*. 38:71-7.
- Shaw, J., R. Rowlinson, J. Nickson, T. Stone, A. Sweet, K. Williams, and R. Tonge. 2003. Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics*. 3:1181-95.

- Shenton, D., and C.M. Grant. 2003. Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 374:513-9.
- Shenton, D., G. Perrone, K.A. Quinn, I.W. Dawes, and C.M. Grant. 2002. Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 277:16853-9.
- Shi, J., A. Vlamis-Gardikas, F. Aslund, A. Holmgren, and B.P. Rosen. 1999. Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction. *J Biol Chem.* 274:36039-42.
- Shi, Z.Z., J. Osei-Frimpong, G. Kala, S.V. Kala, R.J. Barrios, G.M. Habib, D.J. Lukin, C.M. Danney, M.M. Matzuk, and M.W. Lieberman. 2000. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5101-6.
- Sikorski, R.S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122:19-27.
- Sipos, K., H. Lange, Z. Fekete, P. Ullmann, R. Lill, and G. Kispal. 2002. Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J Biol Chem.* 277:26944-9.
- Sitia, R., and I. Braakman. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature.* 426:891-4.
- Slekar, K.H., D.J. Kosman, and V.C. Culotta. 1996. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J Biol Chem.* 271:28831-6.
- Solovyov, A., R. Xiao, and H.F. Gilbert. 2004. Sulfhydryl oxidation, not disulfide isomerization, is the principal function of protein disulfide isomerase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279:34095-100.
- Spector, D., J. Labarre, and M.B. Toledano. 2001. 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.* 276:7011-6.
- Srinivasan, C., A. Liba, J.A. Imlay, J.S. Valentine, and E.B. Gralla. 2000. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J Biol Chem.* 275:29187-92.
- Stein, G., and T. Lisowsky. 1998. Functional comparison of the yeast scERV1 and scERV2 genes. *Yeast.* 14:171-80.
- Stephen, D.W., and D.J. Jamieson. 1996. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 141:207-12.
- Stewart, E.J., F. Aslund, and J. Beckwith. 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *Embo J.* 17:5543-50.
- Strain, J., C.R. Lorenz, J. Bode, S. Garland, G.A. Smolen, D.T. Ta, L.E. Vickery, and V.C. Culotta. 1998. Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem.* 273:31138-44.
- Stroher, E., and K.J. Dietz. 2006. Concepts and approaches towards understanding the cellular redox proteome. *Plant Biol (Stuttg).* 8:407-18.

- Sturtz, L.A., K. Diekert, L.T. Jensen, R. Lill, and V.C. Culotta. 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem.* 276:38084-9.
- Sztajer, H., B. Gamain, K.D. Aumann, C. Slomianny, K. Becker, R. Brigelius-Flohe, and L. Flohe. 2001. The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *J Biol Chem.* 276:7397-403.
- Tachibana, C., and T.H. Stevens. 1992. The yeast EUG1 gene encodes an endoplasmic reticulum protein that is functionally related to protein disulfide isomerase. *Mol Cell Biol.* 12:4601-11.
- Tamai, K.T., E.B. Gralla, L.M. Ellerby, J.S. Valentine, and D.J. Thiele. 1993. Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:8013-7.
- Tanaka, T., S. Izawa, and Y. Inoue. 2005. GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 280: 42078-87
- Terziyska, N., B. Grumbt, M. Bien, W. Neupert, J.M. Herrmann, and K. Hell. 2007. The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS Lett.* 581:1098-102.
- Terziyska, N., T. Lutz, C. Kozany, D. Mokranjac, N. Mesecke, W. Neupert, J.M. Herrmann, and K. Hell. 2005. Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett.* 579:179-84.
- Thomas, J.A., B. Poland, and R. Honzatko. 1995. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys.* 319:1-9.
- Thorpe, C., K.L. Hooper, S. Raje, N.M. Glynn, J. Burnside, G.K. Turi, and D.L. Coppock. 2002. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch Biochem Biophys.* 405:1-12.
- Tokatlidis, K. 2005. A disulfide relay system in mitochondria. *Cell.* 121:965-7.
- Toledano, M.B., K.C., Le Moan N., Spectro D., Tacnet F. 2007. The system biology of thiol redox system in *E.coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Letters.* 581: 3598-607.
- Toledano, M.B., A. Delaunay, B. Biteau, D. Spector, and D. Azevedo. 2003. Oxidative stress responses in yeast. *Topics in Current Genetics.* Yeast Stress Responses. Vol. vol.1. S.H.P.W.H.M. (Eds), editor. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 241-303.
- Toledano, M.B., A. Delaunay, L. Monceau, and F. Tacnet. 2004. Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci.* 29:351-7.
- Trotter, E.W., and C.M. Grant. 2002. Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 46:869-78.
- Trotter, E.W., and C.M. Grant. 2003. Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *EMBO Rep.* 4:184-8.
- Tu, B.P., S.C. Ho-Schleyer, K.J. Travers, and J.S. Weissman. 2000. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science.* 290:1571-4.

- Tu, B.P., and J.S. Weissman. 2002. The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*. 10:983-94.
- Tu, B.P., and J.S. Weissman. 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*. 164:341-6.
- Vala, A., C.S. Sevier, and C.A. Kaiser. 2005. Structural determinants of substrate access to the disulfide oxidase Erv2p. *J Mol Biol*. 354:952-66.
- Valentine, J.S., and E.B. Gralla. 1997. Delivering copper inside yeast and human cells. *Science*. 278:817-8.
- Veal, E.A., S.J. Ross, P. Malakasi, E. Peacock, and B.A. Morgan. 2003. Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem*. 278:30896-904.
- Verdoucq, L., F. Vignols, J.P. Jacquot, Y. Chartier, and Y. Meyer. 1999. In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J Biol Chem*. 274:19714-22.
- Vignols, F., C. Brehelin, Y. Surdin-Kerjan, D. Thomas, and Y. Meyer. 2005. A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:16729-34.
- Vitu, E., M. Bentzur, T. Lisowsky, C.A. Kaiser, and D. Fass. 2006. Gain of function in an ERV/ALR sulfhydryl oxidase by molecular engineering of the shuttle disulfide. *J Mol Biol*. 362:89-101.
- Wagner, E., S. Luche, L. Penna, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner, and T. Rabilloud. 2002. A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized in vivo at the active-site cysteine during oxidative stress. *Biochem J*. 366:777-85.
- Wilkinson, B., and H.F. Gilbert. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*. 1699:35-44.
- Williams, C.H., L.D. Arscott, S. Muller, B.W. Lennon, M.L. Ludwig, P.F. Wang, D.M. Veine, K. Becker, and R.H. Schirmer. 2000. Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem*. 267:6110-7.
- Williams, C.H., Jr. 1995. Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Faseb J*. 9:1267-76.
- Winterbourn, C.C., and D. Metodiewa. 1999. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 27:322-8.
- Woo, H.A., H.Z. Chae, S.C. Hwang, K.S. Yang, S.W. Kang, K. Kim, and S.G. Rhee. 2003. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science*. 300:653-6.
- Wood, Z.A., L.B. Poole, R.R. Hantgan, and P.A. Karplus. 2002. Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry*. 41:5493-504.
- Wood, Z.A., L.B. Poole, and P.A. Karplus. 2003. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*. 300:650-3.
- Wu, A.L., and W.S. Moye-Rowley. 1994. GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol*. 14:5832-9.
- Xiao, R., B. Wilkinson, A. Solovyov, J.R. Winther, A. Holmgren, J. Lundstrom-Ljung, and H.F. Gilbert. 2004. The contributions of protein disulfide isomerase and its homologues to oxidative protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 279:49780-6.

- Yamazaki, D., K. Motohashi, T. Kasama, Y. Hara, and T. Hisabori. 2004. Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45:18-27.
- Yano, H., J.H. Wong, Y.M. Lee, M.J. Cho, and B.B. Buchanan. 2001. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:4794-9.

Annexes

I. Annexe 1: Identification des protéines oxydées

Tableau 1. Identification des protéines oxydées par MALDI-TOF.

Les protéines oxydées identifiées à partir des extraits égalisés d'une souche sauvage sont indiqués en rouge, et les z-score correspondant ont été déterminés par interrogation d'une banque de données avec le logiciel «Aldente» d'Expasy. Les numéros de la dernière colonne correspondent aux références bibliographiques de l'article (Le Moan et al., 2006).

Tableau I. Identifications des protéines oxydées

Protéines	Z-score	Localisation ^a	Cys	I _{ox} ^{sauvage}	rappor ^b I _{ox} H ₂ O ₂	rappor ^b I _{ox} Δ <i>trr1</i> Δ <i>trx1,2</i>	Identifiés ^c	Thiols réactifs	Références
Enzymes redox									
A, Elimination des ROS									
Sod1	2,43	C/M	2	1,22	1,16	1,32	+	C57-C146 disulfure	47
Tsa1	2,39	C	2	0,44	1,8	1,36	+	C47-C170 disulfure	44,45,47,48,49,50
Ahp1	2,22	C	3	0,22	2,37	1,27	+	C62-C120 disulfure	44
Yhb1	2,43	C/M	4						
Tsa2 ^d	1,85	C	2					C48-C171 disulfure	
Gpx2 ^d	2,31	C/N	4				+	C37-C83 disulfure	38
Prx1 ^d	0,51	M	3				+		45,47
Ccs1 ^d	2,43	C/M	7					Ccs1-Cys-Cys ⁵⁷ -Sod1	
B, Oxydoréductase									
Trr1	2,31	C	4				+	catalytique disulfure	48
Pdi1	243	RE	6	2,98	1,46	1,68	+	catalytique disulfure	49,50
Mxr1 ^d	1,67	C/N	5					catalytique disulfure	
II, Chaperons et maturation des protéines									
Ssa2	2,43	C/V	3	0,24	1,04	2,0	+		18
Sse1	2,43	C	5		1,36		+		48,49
Ssb1	2,43	C	3		0,98		+		48,49
Sti1	2,39	C	3						
Kar2	6271	RE	1						
Hsp60	0,59	M	5				+		49,50
III, Métabolisme des carbohydrates et énergétique									
A, Fermentation Glucose, glycolyse									
Hxk2	2,43	C/N	4						
Tpi1	2,43	C	2	0,34	1,38	2,64	+	C126	18,47,49
Tdh3	2,39	C	2	0,18	3,05	3,33	+	active C149	18,24,44,45,47,48
Gpd1	654	C	10						
Eno1	2,36	C	1				+	C247 site actif	45,48
Eno2	2,43	C	1	0,18	1,66	1,22	+	C247 site actif	18,45
Pgk1	2,37	C	1		1,76		+		48,49
Fba1	2,39	C	5	0,2	1,2	1,6	+		18,50

	aldolase									
Ald6	Alcohol dehydrogenase	2,43	C/M	7		2,10		+	C306 catalytique	18,44,49
Adh6	Aldehyde dehydrogenase	508	C	10						
Adh1	Alcool dehydrogenase	2,40	C	8	0,38	1,51	5,26	+		18,44
Cdc19	Pyruvate kinase	2,43	C	7	0,38	2,12	1,9	+		44,50
Pdc1	Pyruvate decarboxylase	2,43	C/N	4	0,22	3,14	4,54		active C221	
B, Pentose phosphate										
Tkl1	Transketolase	2,43	C	2		1,08				
C, Cycle de Krebs										
Mdh1	Mitochondrial malate dehydrogenase	2,38	M	1		1,8		+		46,47
Aco1	Aconitase	2,38	C/M	7		0,82		+		C437-C503-C506 Centre Fe/S 44,46,47
D, Métabolisme glycérol/mannose										
Gpp1	DL-glycerol-3-phosphatase, glycerol biosynthesis	2,43	C/N	3	0,24					
Pmi40	Mannose-6-phosphate isomerase, protein mannosylation	2,29	C/N	5					active C150	
Sec53	Phosphomannomutase, protein glycosylation/folding	2,36	C	3		0,47				
Psa1	GDP-mannose pyrophosphorylase, cell wall biosynthesis	2,43	C	3						
IV, Métabolisme acides aminés										
Sam1	S-Adenosyl methionine synthetase	2,43	C	5		1,86				
Sam2	S-Adenosyl methionine synthetase	2,43		5		1,5				
Shm2	Serine hydroxymethyltransferase	2,37	C	5		1,77		+		44
Lys12	Homocitrate deshydrogenase	2048	M	5						
Lys20	Homocitrate deshydrogenase	346	M/N	8						
Lys21	Homocitrate deshydrogenase	4993	N	8						
Met6	Cobalamin-independent methionine synthase	2,43	C	3		1,1		+		44
Met17	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase	2,40	C	1		1,24				
Cys4	Cystathionine beta-synthase	2,41	C/M	1		2,05				
Leu1	Isopropylmalate isomerase	2,43	C	11					Centre Fe-S	
Leu2	Isopropyl malate deshydrogenase	1867	C	2						
Hom2	Aspartate beta semi-aldehyde dehydrogenase	2,41	C/N	9				+		44
Gdh1	NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase	2,43	C/N	6		1,9				
Aro3	Aromatic amino acid synthetase	1050	C/M/N	8						
Ilv5	Acetohydroxyacid reductoisomerase	2,41	M	3		1,16				
V, Métabolismes autres										
Ado1	Adenosine kinase	1,49	C/N	3		1,9				
Apa1	Diadenosine tetraphosphate phosphorylase	1179	C/N	6						
Sub2	RNA helicase	2254	N	6						
Ses1	Seryl-tRNA-synthetase	890	C	8						
Gua1	GMP synthase	1043		5						
Ura1	Dihydroorotate dehydrogenase	2,41	C	3						
Guk1	Guanylate kinase	1,43	C/N	1						
Dbp5	RNA helicase	248	C/N	3						
Fur1	Purine synthetase	0		5						
RVS161	Actin binding protein	0	C	3						
Gsp2	GTP-binding protein	234		3						
Ipp1	Inorganic	2,43	C	1		2,33		+		50

pyrophosphatase

VI, Traduction des protéines									
Efb1	Translation elongation factor 1 beta	2,40	R	1	0,26	0,6	0,61		
Tef1	Translational elongation factor EF-1 alpha	2,41	R	7	0,98	1,7	0,73	+	18,45,49
Rpl12A	Protein of the large (60S) ribosomal subunit	2,38	R	1	0,5	1,3	0,17		
Tif5	Translation initiation factor	1166	C	7					
Tif51A	Translation initiation factor eIF-5A	1,85	C/M/R	2	0,06	0,95			
Rps0a	Protein of the small (40S) ribosomal subunit	2,43	R	1					
Rps5	Protein of the small (40S) ribosomal subunit	2,35	R	1	0,33	1,02		+	18,45
Asc1	WD repeat protein (translation regulation)	2,38	C	2	0,08	1,55			
VII, Protéases et Protéasome									
Pep4	Vacuolar aspartyl protease (proteinase A)	2,39	V	4	1,56	1,63	2,56		
Cdc48	ATPase	2,08	C/RE/N	4		0,92			
Ubc1	Ubiquitin-conjugating enzyme	1,33	P	1		0,52		+	49
Ubc4	Ubiquitin-conjugating enzyme	1,99	P	3		0,16		+	C86 assurant la conjugaison de l'Ubiquitine 49
Prb1 ^d	Serine protease		V	4				+	
VIII, Divers									
Cpr1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclophilin)	1,33	C	2		0,81		+	49
Cpr6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclophilin)	2,38	C	7		1,26		+	49
Por1	Mitochondrial porin	2,43	M	2		1,02			Transfert d'électron par la cystéine
Gsp1	GTP binding protein	2,30	C/N	3					
YNL010W		302	C/N	4					
Tma19	Hypothetical protein; unknown function	1,06	C	1	0,25	0,45	0,26	+	18

^a Localisation: C cytoplasme; M mitochondrie; N noyau; R ribosome; RE reticulum endoplasmique; V vacuole; P protéasome

^b Rapport $I_{ox} = I_{ox}^{H_2O_2} / I_{ox}^{sauvage}$ or $I_{ox}^{\Delta trr1\Delta trx1,2} / I_{ox}^{sauvage}$; Bolded values: ratios >2

^c Identifiés précédemment sous forme oxydée ou glutathionylée (avec les références correspondantes)

^d Protéines identifiées dans le mutant $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$

Tableau 2. Identification des protéines oxydées dans la souche $\Delta trr1$ par spectrométrie de Masse LC-MS/MS.

Les protéines communes aux identifications sont indiquées en rouge.

identifiant Swiss-Prot	PM	PI	NBMoi	Name	Sys. Name	identifiant Swiss-Prot	PM	PI	NBMoi	Name	Sys. Name
O13516	22 443	10,8	106 000	RPS9A	YPL081W	P34160	100 017	4,64	11 300	STO1	YMR125W
P05755	22 298	10,9	63 300	RPS9B	YBR189W	P34220	47 390	6,72	1 460	STO1	YBL055C
O13563	17 902	4,28	12 200	RPN13	YLR421C	P34227	29 496	9,47	4 510	PRX1	YBL064C *
P00330	36 849	6,66	12 200	ADH1	YOL086C *	P34730	31 061	4,65	47 600	BMH2	YDR099W
P00358	35 847	6,96	121 000	TDH2	YJR009C	P34760	21 590	4,87	378 000	TSA1	YML028W
P00359	35 746	6,96	169 000	TDH3	YGR192C	P35271	17 037	11,06	48 100	RPS18 A	YDR450W
P00360	35 750	8,59	120 000	TDH1	YJL052W	P35691	18 741	4,25	27 800	TMA19	YKL056C *
P00431	40 353	6,33	6 730	CCP1	YKR066C	P36008	46 520	8,09	102 000	TEF4	YKL081W
P00445	15 855	5,93	519 000	SOD1	YJR104C *	P36010	17 167	9,13	7 130	YNK1	YKL067W
P00447	25 774	9,03	10 900	SOD2	YHR008C	P36013	74 375	8,19	10 500	MAE1	YKL029C
P00498	32 266	5,99	10 900	HIS1	YER055C	P36016	99 571	5,04	137	LHS1	YKL073W
P00546	34 061	8,5	6 670	CDC28	YBR160W	P36024	62 478	4,4	3 750	SIS2	YKR072C
P00549	54 544	7,66	291 000	CDC19	YAL038W *	P36040	30 739	4,42	2 940	ADD66	YKL206C
P00560	44 738	7,77	314 000	PGK1	YCR012W *	P36060	34 138	9,33	1 920	MCR1	YKL150W
P00729	59 802	4,39	44 000	PRC1	YMR297W	P36077	13 854	9,42	538	SRX1	YKL086W
P00812	35 662	5,44	42 800	CAR1	YPL111W	P36105	15 167	11,63	45 300	RPL14 A	YKL006W
P00815	87 721	5,04	521	HIS4	YCL030C	P38754	15 153	11,63	35 100	RPL14 B	YHL001W
P00817	32 299	5,33	68 400	IPP1	YBR011C *	P36114	81 753	4,9	1 770	RPL14 B	YKR018C
P00890	53 360	8,86	68 400	CIT1	YNR001C	P36149	22 129	4,77	2 370	BET3	YKR068C
P00899	56 767	5,7	6 510	TRP2	YER090W	P36421	44 020	8,75	2 710	TYS1	YGR185C
P00924	46 816	6,6	76 700	ENO1	YGR254W *	P36775	127 111	5,36	14 500	PIM1	YBL022C
P00925	46 914	5,88	2 610	ENO2	YHR174W *	P37012	63 088	6,6	3 790	PGM2	YMR105C
P00927	63 831	8,84	11 900	ILV1	YER086W	P50278	35 652	7,59	1 970	SOL1	YNR034W
P00931	76 626	6,48	15 500	TRP5	YGL026C	P37262	34 501	6,84	1 160	SOL2	YCR073W-A
P00937	53 489	6,9	13 400	TRP3	YKL211C	P38858	27 784	5,26	3 420	SOL3	YHR163W
P00942	26 795	5,86	207 000	TPI1	YDR050C *	P53315	28 447	5,11	4 320	SOL4	YGR248W
P00950	27 608	9,65	172 000	GPM1	YKL152C	P37291	52 218	7,44	67 600	SHM2	YLR058C *
P00958	85 677	6,59	85 000	MES1	YGR264C	P37302	60 137	5,04	4 740	APE3	YBR286W
P01123	23 214	5,01	85 000	YPT1	YFL038C	P37303	42 815	6,24	106 000	GLY1	YEL046C
P02309	11 368	11,95	524 000	HHF1	YBR009C	P37898	97 662	5,01	77 000	AAP1	YHR047C
P02365	26 996	11,22	66 000	RPS6A	YPL090C	P38009	65 263	6,53	60 900	ADE17	YMR120C
P02407	15 788	11,28	30 900	RPS17A	YML024W	P38011	34 805	6,17	333 000	ASC1	YMR116C *
P14127	15 803	11,28	30 500	RPS17B	YDR447C	P38013	19 115	4,87	16 200	AHP1	YLR109W *
P02829	81 406	4,66	445 000	HSP82	YPL240C	P38088	75 410	5,88	98 400	GRS1	YBR121C
P02994	50 032	9,72	377	TEF1	YPR080W *	P38109	57 638	5,02	1 420	GRS1	YBR139W
P03965	123 914	5,05	18 000	CPA2	YJR109C	P38115	38 883	5,87	30 200	ARA1	YBR149W
P04046	56 719	6,22	18 700	ADE4	YMR300C	P38137	60 488	9,98	8 770	PCS60	YBR222C
P04076	51 989	5,55	10 200	ARG4	YHR018C	P38143	18 406	8,82	2 010	GPX2	YBR244W *
P04161	23 540	6,4	3 910	ADE8	YDR408C	P38167	123 608	6,88	799	ECM21	YBL101C

P04451	14 473	11,11	3 910	RPL23A	YBL087C	P38174	47 502	6,3	1 080	MAP2	YBL091C
P04456	15 757	10,94	3 910	RPL25	YOL127W	P38199	41 683	5,97	15 600	HEK2	YBL032W
P04801	84 520	7,01	42 600	THS1	YIL078W	P38205	77 878	7,32	16 100	NCL1	YBL024W
P04802	63 515	6,54	42 600	DPS1	YLL018C	P38219	44 174	7,42	36 800	OLA1	YBR025C
P04806	53 738	5,19	40 800	HXK1	YFR053C	P38234	22 921	5,03	7 060	RFS1	YBR052C
P04807	53 942	5,02	114 000	HXK2	YGL253W *	P38248	48 236	4,76	7 060	ECM33	YBR078W
P05030	99 618	4,81	#####	PMA1	YGL008C	P38249	110 343	6,24	52 700	RPG1	YBR079C
P05150	37 845	6,25	1 140	ARG3	YJL088W	P38314	57 187	9,45	2 840	SDS24	YBR214W
P05317	33 717	4,56	1 140	RPP0	YLR340W	P38431	45 261	4,78	48 300	TIF5	YPR041W
P05694	85 859	6,42	264 000	MET6	YER091C *	P38555	24 469	4,81	5 960	YPT31	YER031C
P05735	21 704	11,93	97 700	RPL19A	YBR084C-A	P38616	37 328	5,17	5 960	YGP1	YNL160W
P05737	27 638	10,97	101 000	RPL7A	YGL076C	P38624	23 547	5,73	7 250	PRE3	YJL001W
Q12213	27 696	10,97	7 080	RPL7B	YPL198W	P38625	58 482	6,47	7 250	GUA1	YMR217W
P05738	21 569	10,54	52 400	RPL9A	YGL147C	P38628	62 066	5,78	14 700	PCM1	YEL058W
P51401	21 657	10,47	76 000	RPL9B	YNL067W	P38635	38 582	5,83	4 280	HIS2	YFR025C
P05739	19 986	10,89	38 400	RPL6B	YLR448W	P38687	69 005	9,44	6 280	SRP68	YPL243W
P05744	12 154	11,76	38 400	RPL33A	YPL143W	P38689	35 123	8,34	6 280	PRS3	YHL011C
P05749	13 693	6,01	60 400	RPL22A	YLR061W	P38697	56 530	8,59	7 870	IMD2	YHR216W
P05750	26 503	10,22	146 000	RPS3	YNL178W	P38701	13 907	10,33	7 870	RPS20	YHL015W
P05753	29 410	10,9	573	RPS4A	YJR145C	P38707	62 206	5,66	7 870	DED81	YHR019C
P05754	22 489	11,42	15 900	RPS8A	YBL072C	P38715	37 118	7,07	12 900	GRE3	YHR104W
P05756	17 029	11,24	15 900	RPS13	YDR064W	P38716	42 445	5,8	1 360	GRE3	YHR112C
P06103	88 129	5,88	47 500	PRT1	YOR361C	P38720	53 543	6,6	101 000	GND1	YHR183W
P06105	134 808	5,67	47 500	SCP160	YJL080C	P38764	109 491	4,35	306 000	RPN1	YHR027C
P06106	48 671	6,42	47 500	MET17	YLR303W *	P38777	27 339	6,32	14 600	FSH1	YHR049W
P06115	64 583	6,51	319	CTT1	YGR088W	P38788	58 237	4,78	73 600	SSZ1	YHR064C
P06168	44 368	9,83	883 000	ILV5	YLR355C *	P38791	42 892	5,56	7 600	DYS1	YHR068W
P06169	61 495	6,12	8 970	PDC1	YLR044C *	P38810	103 949	6,24	12 200	SFB3	YHR098C
P06208	68 408	5,89	6 630	LEU4	YNL104C	P38836	49 829	5,03	468	ECM14	YHR132C
P06367	14 537	11,43	29 600	RPS14A	YCR031C	P38891	43 596	9,59	87 300	BAT1	YHR208W
P39516	14 650	11,28	3 370	RPS14B	YJL191W	P38911	46 553	4,19	9 490	FPR3	YML074C
P06634	65 552	7,88	3 370	DED1	YOR204W	P38912	17 435	4,53	35 100	TIF11	YMR260C
P06738	103 274	5,39	3 370	GPH1	YPR160W	P38930	29 842	5,94	7 160	CKB2	YOR039W
P07149	228 689	5,79	91 800	FAS1	YKL182W	P38972	148 904	5,02	40 800	ADE6	YGR061C
P07170	24 255	6,37	123 000	ADK1	YDR226W	P38998	41 464	9,82	112 000	LYS1	YIR034C
P07172	42 646	6,37	123 000	HIS5	YIL116W	P38999	48 917	4,95	57 500	LYS9	YNR050C
P07244	86 067	4,97	35 800	ADE5,7	YGL234W	P39076	57 203	6	57 500	CCT2	YIL142W
P07245	102 204	6,83	35 600	ADE3	YGR204W	P39517	57 544	7,97	42 900	DHH1	YDL160C
P07251	58 617	9,85	41 500	ATP1	YBL099W	P39522	62 861	7,8	171 000	ILV3	YJR016C
P07257	40 478	8,34	35 700	QCR2	YPR191W	P39533	86 582	6,94	4 670	ACO2	YJL200C
P07258	45 361	7,28	2 580	CPA1	YOR303W	P39567	44 386	8,2	4 670	IMD1	YAR073W
P07259	245 124	5,7	11 000	URA2	YJL130C	P39676	44 646	6,25	13 000	YHB1	YGR234W *
P07262	49 570	5,5	77 500	GDH1	YOR375C *	P39692	114 827	5,02	1 580	MET10	YFR030W
P07263	59 952	7,76	26 800	HTS1	YPR033C	P39714	41 538	6,64	8 730	BDH1	YAL060W
P07264	85 794	5,74	96 300	LEU1	YGL009C *	P39721	27 089	6,24	1 800	BDH1	YAL049C
P07267	44 499	4,54	96 300	PEP4	YPL154C *	P39726	18 795	4,49	3 510	GCV3	YAL044C
P07283	29 063	4,99	3 500	SEC53	YFL045C *	P39730	112 268	5,55	13 400	FUN12	YAL035W

P07284	53 309	5,98	3 500	SES1	YDR023W	P39743	52 774	5,89	14 600	RVS16 7	YDR388W
P07342	74 936	8,98	31 900	ILV2	YMR108W	P39935	107 101	5,91	9 760	TIF463 1	YGR162W
P07347	27 603	4,61	3 310	ARD1	YHR013C	P39940	91 816	6,67	9 760	RSP5	YER125W
P07560	23 506	7,11	3 310	SEC4	YFL005W	P39954	49 125	6,2	9 760	SAH1	YER043C
P07806	125 769	6,94	358	VAS1	YGR094W	P39958	51 206	5,87	7 280	GDI1	YER136W
P07991	46 086	6,94	72 000	CAR2	YLR438W	P39960	245 428	8,6	1 230	BEM2	YER155C
P08417	53 151	8,26	6 920	FUM1	YPL262W	P39976	55 225	6,88	13 000	DLD3	YEL071W
P08524	40 483	5,21	6 920	ERG20	YJL167W	P39990	13 569	7,9	13 000	SNU13	YEL026W
P08536	57 724	5,67	1 510	MET3	YJR010W	P40016	60 392	5,37	16 700	RPN3	YER021W
P08566	174 754	6,23	6 420	ARO1	YDR127W	P40024	68 377	6,48	17 600	ARB1	YER036C
P09232	69 621	6,37	1 600	PRB1	YEL060C	P40032	74 041	5,12	8 910	TPA1	YER049W
P09436	122 982	5,94	23 300	ILS1	YBL076C	P40047	56 620	8,43	23 300	ALD5	YER073W
P09624	54 010	8,11	24 600	LPD1	YFL018C	P40053	72 414	9,15	8 200	ALD5	YER080W
P09938	46 147	5,01	538	RNR2	YJL026W	P40069	122 600	4,36	38 300	KAP12 3	YER110C
P0C0T4	12 009	11,13	162 000	RPS25B	YLR333C	P40081	20 441	6,75	6 190	KAP12 3	YER134C
P0C0V8	9 746	5,9	27 400	RPS21A	YKR057W	P40093	38 174	7,5	6 080	KAP12 3	YER156C
P0C0W1	14 626	10,76	40 400	RPS22A	YJL190C	P40099	24 059	7,12	468	FAU1	YER183C
Q3E7Y3	14 626	10,76	19 700	RPS22B	YLR367W	P40106	27 814	6,07	5 000	HOR2	YER062C
P0C0W9	19 720	10,73	39 000	RPL11A	YPR102C	P40150	66 594	5,24	104 000	SSB2	YNL209W
Q3E757	19 750	10,73	21 200	RPL11B	YGR085C	P40165	27 521	8,34	1 380	SSB2	YNL200C
P0C2H6	15 531	11,16	7 380	RPL27A	YHR010W	P40202	27 330	6,65	12 000	CCS1	YMR038C *
P0C2H7	15 505	11,16	22 900	RPL27B	YDR471W	P40213	15 847	11,08	33 800	RPS16 A	YMR143W
P0C2H8	12 953	10,8	22 900	RPL31A	YDL075W	P40217	38 755	5,48	2 400	TIF34	YMR146C
P0C2H9	12 967	10,8	57 500	RPL31B	YLR406C	P40302	25 604	7,43	7 210	PRE5	YMR314W
P0C2I0	21 236	11,16	54 300	RPL20A	YMR242C	P40303	28 439	7,37	16 800	PRE6	YOL038W
P0C2I1	20 713	11,09	54 300	RPL20B	YOR312C	P40363	33 934	6,7	1 750	PRE6	YJL068C
P10081	44 697	4,85	106 000	TIF1	YKR059W	P40364	28 470	5,73	3 390	MPM1	YJL066C
P10591	69 657	4,82	269 000	SSA1	YAL005C	P40457	195 140	5,81	2 770	MLP2	YIL149C
P10592	69 469	4,77	364 000	SSA2	YLL024C *	P40471	32 814	9,92	3 670	AYR1	YIL124W
P10659	41 818	4,91	103 000	SAM1	YLR180W *	P40482	103 635	6,16	3 670	SEC24	YIL109C
P10662	36 728	9,81	2 840	MRP1	YDR347W	P40495	40 069	8,06	19 100	LYS12	YIL094C
P10664	39 092	11,4	2 840	RPL4A	YBR031W	P40510	51 188	6,39	2 010	SER33	YIL074C
P49626	39 062	11,4	151 000	RPL4B	YDR012W	P40513	30 132	4,34	4 910	MAM33	YIL070C
P10869	58 109	6,64	48 100	HOM3	YER052C	P40531	36 670	4,74	7 720	GVP36	YIL041W
P11076	20 529	7,46	19 300	ARF1	YDL192W	P40580	28 804	6,3	1 620	GVP36	YIR036C
P11154	130 098	6,17	12 500	PYC1	YGL062W	P40581	18 641	8,33	8 120	HYR1	YIR037W
P11412	57 521	6,24	15 000	ZWF1	YNL241C	P40825	107 276	5,27	33 800	ALA1	YOR335C
P11484	66 601	5,18	170 000	SSB1	YDL229W *	P40959	59 656	5,27	2 210	MVP1	YMR004W
P11491	63 004	5,39	3 060	PHO8	YDR481C	P41277	27 947	5,31	193 000	RHR2	YIL053W
P11986	59 642	5,77	3 060	INO1	YJL153C	P41338	41 728	7,38	60 900	ERG10	YPL028W
P12385	49 005	4,77	13 100	SUP45	YBR143C	P41805	25 361	10,84	60 900	RPL10	YLR075W
P12695	51 818	7,91	5 440	LAT1	YNL071W	P41807	54 415	6,31	22 500	VMA13	YPR036W
P12709	61 299	6,43	91 600	PGI1	YBR196C	P41810	109 018	5,42	26 000	SEC26	YDR238C
P12904	36 401	5,52	11 700	SNF4	YGL115W	P41811	99 444	4,46	129 000	SEC27	YGL137W

P12945	98 904	9,45	7 600	NAT1	YDL040C	P41921	53 441	7,88	7 600	GLR1	YPL091W
P13188	93 132	8,7	37 500	GLN4	YOR168W	P41940	39 566	6,29	97 100	PSA1	YDL055C *
P13298	24 664	5,92	39 300	URA5	YML106W	P42938	33 337	5,14	4 280	PSA1	YGR205W
P13663	39 543	6,7	18 400	HOM2	YDR158W *	P43535	85 027	6,18	14 600	GCN20	YFR009W
P14020	30 362	7,97	1 890	DPM1	YPR183W	P43577	18 135	4,97	2 550	GNA1	YFL017C
P14120	11 415	10,64	59 300	RPL30	YGL030W	P43590	61 753	6,1	2 550	GNA1	YFR006W
P14126	43 757	11,1	450	RPL3	YOR063W	P43603	48 546	5,73	3 670	LSB3	YFR024C-A
P14540	39 620	5,65	#####	FBA1	YKL060C *	P43616	52 871	5,43	22 300	DUG1	YFR044C
P14742	80 046	6,4	14 300	GFA1	YKL104C	P43639	32 265	4,35	8 120	CKB1	YGL019W
P14832	17 391	7,51	86 000	CPR1	YDR155C *	P46367	56 723	6,72	22 200	ALD4	YOR374W
P14843	41 070	7,35	8 970	ARO3	YDR035W	P46655	80 842	7,55	48 700	GUS1	YGL245W
P14904	57 092	5,69	5 730	LAP4	YKL103C	P46672	42 084	8,01	57 700	ARC1	YGL105W
P15019	37 036	6,36	53 000	TAL1	YLR354C	P46680	67 325	5,34	11 100	AIP1	YMR092C
P15108	80 899	4,59	132 000	HSC82	YMR186W	P46989	30 201	5,53	8 970	ATG27	YJL178C
P15180	67 958	6,04	132 000	KRS1	YDR037W	P47001	23 241	4,34	12 500	CIS3	YJL158C
P15303	85 384	5,44	132 000	SEC23	YPR181C	P47039	50 082	6,53	1 600	BNA3	YJL060W
P15454	20 637	7,31	20 500	GUK1	YDR454C	P47117	49 541	5,6	6 650	ARP3	YJR065C
P15624	67 364	5,61	5 440	FRS1	YLR060W	P47143	36 372	4,86	22 200	ADO1	YJR105W *
P15703	34 118	4,16	45 000	BGL2	YGR282C	P47148	32 208	9,19	1 890	ADO1	YJR111C
P15705	66 264	5,36	67 600	STI1	YOR027W *	P47165	23 671	6,17	721	XPT1	YJR133W
P15790	44 667	9,22	7 180	CKA1	YIL035C	P47169	161 218	5,24	2 900	ECM17	YJR137C
P15873	28 916	4,26	7 180	POL30	YBR088C	P48164	21 634	10,73	43 500	RPS7B	YNL096C
P15891	65 576	4,41	606	ABP1	YCR088W	P48360	56 237	9,6	1 600	ARH1	YDR376W
P16120	57 474	5,39	26 000	THR4	YCR053W	P48570	47 098	7,25	28 100	LYS20	YDL182W
P16140	57 749	4,79	131 000	VMA2	YBR127C	P48589	15 472	4,5	28 100	RPS12	YOR369C
P16387	46 343	8,13	100 000	PDA1	YER178W	P49089	64 470	6,04	28 100	ASN1	YPR145W
P16474	74 467	4,62	337 000	KAR2	YJL034W	P49090	64 593	5,73	58 200	ASN2	YGR124W
P16521	115 944	5,95	871 000	YEF3	YLR249W	P49367	75 150	7,36	7 350	LYS4	YDR234W
P16550	36 492	4,77	19 600	APA1	YCL050C	P49435	20 587	4,87	11 200	APT1	YML022W
P16649	78 307	5,47	5 840	TUP1	YCR084C	P49723	40 054	4,96	88 900	RNR4	YGR180C
P16861	107 969	6,35	89 800	PFK1	YGR240C	P49954	32 549	7,59	4 510	NIT3	YLR351C
P16862	104 617	6,65	90 200	PFK2	YMR205C	P50094	56 394	8,16	2 970	IMD4	YML056C
P17079	17 822	10,2	68 500	RPL12A	YEL054C *	P50095	56 584	7,38	26 300	IMD3	YLR432W
P17255	118 636	6,08	200 000	TFP1	YDL185W	P50861	18 555	6,52	3 260	RIB4	YOL143C
P17423	38 712	5,15	92 600	THR1	YHR025W	P51996	24 520	5,22	4 300	YPT32	YGL210W
P17505	35 650	8,99	28 100	MDH1	YKL085W	P52910	75 491	6,67	225 000	ACS2	YLR153C
P17555	57 521	5,4	8 760	SRV2	YNL138W	P53008	96 506	4,81	2 840	CWH4 1	YGL027C
P17649	52 946	6,78	573	UGA1	YGR019W	P53030	24 486	10,51	116 000	RPL1A	YPL220W
P17709	55 377	6,14	21 100	GLK1	YCL040W	P53063	44 509	6,52	4 030	RAI1	YGL246C
P17967	58 227	4,22	21 100	PDI1	YCL043C *	P53072	33 550	8,51	2 630	TAN1	YGL232W
P18239	34 426	10,61	21 100	PET9	YBL030C	P53081	31 888	7,45	6 000	NIF3	YGL221C
P18408	30 380	5,83	217	MET16	YPR167C	P53090	56 177	5,89	1 770	ARO8	YGL202W
P18544	46 681	7,55	2 300	ARG8	YOL140W	P53101	51 828	7,96	1 770	STR3	YGL184C
P18562	24 594	5,53	2 300	FUR1	YHR128W	P53128	68 560	5,63	8 600	MET13	YGL125W
P19097	206 945	5,21	17 000	FAS2	YPL231W	P53131	87 561	6,38	16 900	PRP43	YGL120C
P19146	20 657	7,46	25 000	ARF2	YDL137W	P53184	24 993	6,23	7 720	PNC1	YGL037C

P19262	50 430	9,62	7 970	KGD2	YDR148C	P53200	28 582	4,61	3 060	PNC1	YGR001C
P19358	42 256	5,06	22 000	SAM2	YDR502C *	P53235	71 304	9,53	3 060	PNC1	YGR054W
P19414	85 368	8,15	96 700	ACO1	YLR304C *	P53261	69 877	5,37	4 530	NOP7	YGR103W
P19454	39 403	8,84	4 540	CKA2	YOR061W	P53301	52 757	4,3	29 500	CRH1	YGR189C
P19657	102 171	4,75	4 540	PMA2	YPL036W	P53303	55 072	4,59	39 900	ZPR1	YGR211W
P19882	60 751	5,06	4 540	HSP60	YLR259C	P53312	46 900	7,49	39 900	LSC2	YGR244C
P20051	40 313	6,51	12 700	URA4	YLR420W	P53334	40 173	4,52	6 190	SCW4	YGR279C
P20081	12 158	5,87	43 300	FPR1	YNL135C	P53598	35 032	8,73	18 400	LSC1	YOR142W
P20436	16 511	4,36	6 210	RPB8	YOR224C	P53622	135 606	5,88	15 200	COP1	YDL145C
P20449	53 873	7,48	14 900	DBP5	YOR046C	P53633	19 412	8,64	5 500	YIP3	YNL044W
P20459	34 717	4,75	17 100	SUI2	YJR007W	P53691	42 072	6,06	18 600	CPR6	YLR216C *
P20606	21 450	5,12	17 100	SAR1	YPL218W	P53731	39 566	6,8	13 400	ARC35	YNR035C
P20967	114 415	7,21	14 300	KGD1	YIL125W	P53834	17 246	4,4	8 530	HCH1	YNL281W
P21243	28 001	6,17	15 200	SCL1	YGL011C	P53839	38 831	6,31	3 280	GOR1	YNL274C
P21304	63 803	4,29	43 800	PWP1	YLR196W	P53860	40 714	8,16	15 400	PDR16	YNL231C
P21576	78 736	8,15	5 960	VPS1	YKR001C	P53912	41 164	6,14	3 490	PDR16	YNL134C
P21801	30 231	8,9	9 540	SDH2	YLL041C	P53981	27 480	5,18	12 600	PDR16	YNL010W
P21965	43 136	8,92	396	MCK1	YNL307C	P54113	65 282	6,52	7 700	ADE16	YLR028C
P22023	156 476	4,88	815	KRE5	YOR336W	P54730	46 964	9,54	3 570	UBX4	YMR067C
P22137	187 232	4,98	28 700	CHC1	YGL206C	P54838	62 206	5,14	23 600	DAK1	YML070W
P22202	69 650	4,86	17 900	SSA4	YER103W	P54839	55 013	8,23	34 800	ERG13	YML126C
P22515	114 265	4,81	17 700	UBA1	YKL210W	P60010	41 689	5,51	34 800	ACT1	YFL039C
P22768	46 939	5,48	1 870	ARG1	YOL058W	P61864	14 554	10,63	11 800	RPL40 A	YIL148W
P22803	11 204	4,62	17 200	TRX2	YGR209C	P80210	48 279	8,34	56 800	ADE12	YNL220W
P22855	124 498	7,22	319	AMS1	YGL156W	P89886	20 277	7,05	4 220	TMA20	YER007C-A
P23202	40 271	6,45	7 060	URE2	YNL229C	Q00055	42 869	5,26	807	GPD1	YDL022W
P23248	28 812	10,81	107 000	RPS1B	YML063W	Q00245	25 312	4,73	5 910	RHO3	YIL118W
P23254	73 805	7,01	40 300	TKL1	YPR074C *	Q00362	59 662	6,36	8 600	CDC55	YGL190C
P23301	17 114	4,64	40 300	HYP2	YEL034W	Q00711	70 229	7,47	10 400	SDH1	YKL148C
P23542	46 057	8,5	7 700	AAT2	YLR027C	P47052	69 382	7,36	10 400	SDH1	YJL045W
P23641	32 812	10,12	7 700	MIR1	YJR077C	Q00764	56 147	6,02	10 900	TPS1	YBR126C
P23776	51 311	4,42	4 280	EXG1	YLR300W	Q00955	250 351	6,22	20 200	ACC1	YNR016C
P24280	34 900	5,26	84 300	SEC14	YMR079W	Q01217	94 868	8,4	1 180	ARG5. 6	YER069W
P24783	60 999	9,34	33 100	DBP2	YNL112W	Q01560	45 407	5,35	78 700	NPL3	YDR432W
P24784	67 917	9,53	1 480	DBP1	YPL119C	Q01662	43 373	7,82	19 600	MAP1	YLR244C
P25044	38 868	8,11	2 690	PTP1	YDL230W	Q01976	26 087	6,31	7 330	YSA1	YBR111C
P25087	43 431	5,6	53 800	ERG6	YML008C	Q02326	19 961	10,91	37 100	RPL6A	YML073C
P25293	47 884	4,06	8 070	NAP1	YKR048C	Q02354	52 418	9,71	7 520	UTP6	YDR449C
P25303	41 543	7,41	8 260	SCJ1	YMR214W	Q02457	62 823	6,59	6 380	TBF1	YPL128C
P25332	36 924	5,04	1 780	RBK1	YCR036W	Q02753	18 242	11,2	6 380	RPL21 A	YBR191W
P25343	30 250	6,57	7 390	RVS161	YCR009C	Q12672	18 274	11,2	66 400	RPL21 B	YPL079W
P25349	26 350	8,34	14 600	YCP4	YCR004C	Q02821	60 441	4,63	2 790	SRP1	YNL189W
P25373	12 380	4,83	3 030	GRX1	YCL035C	Q02959	79 200	7,21	4 420	HOS3	YPL116W
P25374	54 467	8,25	504	NFS1	YCL017C	Q03048	15 901	4,89	19 600	COF1	YLL050C
P25375	81 933	5,6	8 910	PRD1	YCL057W	Q03102	39 976	8,32	19 600	COF1	YML131W

P25443	27 450	11,21	8 910	RPS2	YGL123W	Q03103	65 032	5,42	19 600	ERO1	YML130C
P25451	22 605	4,87	8 910	PUP3	YER094C	Q03161	33 956	6,07	8 580	ERO1	YMR099C
P25491	44 670	6,23	119 000	YDJ1	YNL064C	Q03195	68 340	8,82	6 280	RLI1	YDR091C
P25605	33 986	6,51	15 800	ILV6	YCL009C	Q03558	45 010	6,54	15 100	OYE2	YHR179W
P25623	96 137	9,17	4 280	SYP1	YCR030C	Q03690	145 164	6,36	17 000	CLU1	YMR012W
P25627	30 742	9,69	1 620	BUD23	YCR047C	Q03862	65 212	7,17	45 100	ARX1	YDR101C
P25654	20 703	4,59	3 970	BUD23	YCR090C	Q04067	30 501	6,78	45 100	TIF35	YDR429C
P25694	91 995	4,66	78 400	CDC48	YDL126C *	Q04119	78 344	6,85	319	PPN1	YDR452W
P25719	19 919	9,17	1 960	CPR3	YML078W	Q04120	21 615	7,34	4 820	TSA2	YDR453C *
P26321	33 714	6,82	1 960	RPL5	YPL131W	Q04175	108 403	4,44	16 300	SXM1	YDR395W
P26637	124 140	5,68	158 000	CDC60	YPL160W	Q04217	144 953	6,28	2 000	ECM16	YMR128W
P26781	17 749	11,55	158 000	RPS11A	YDR025W	Q04304	24 882	5,54	704	ECM16	YMR090W
P26783	25 038	9,11	158 000	RPS5	YJR123W *	Q04336	126 623	5,21	2 220	ECM16	YMR196W
P26784	22 201	11,28	43 300	RPL16A	YIL133C	Q04371	54 128	5,43	6 190	ECM16	YMR027W
P26785	22 249	11,34	43 300	RPL16B	YNL069C	Q04409	55 920	6,22	10 600	EMI2	YDR516C
P26786	21 622	10,64	41 000	RPS7A	YOR096W	Q04432	25 670	5,2	358	HSP31	YDR533C
P27614	64 596	5,34	721	CPS1	YJL172W	Q04491	33 043	5,6	21 400	SEC13	YLR208W
P27692	115 649	4,95	2 340	SPT5	YML010W	Q04660	91 704	4,89	2 680	ERB1	YMR049C
P28272	34 801	5,92	264 000	URA1	YKL216W *	Q04728	47 848	7,1	2 680	ECM40	YMR062C
P28777	40 838	7,8	2 310	ARO2	YGL148W	Q04792	65 989	6,61	1 200	GAD1	YMR250W
P29311	30 091	4,65	158 000	BMH1	YER177W	Q04869	38 215	6,61	9 600	GAD1	YMR315W
P29547	47 087	8,9	60 900	CAM1	YPL048W	Q04894	39 617	6,72	21 700	ADH6	YMR318C
P29952	48 188	5,86	5 220	PMI40	YER003C *	Q04947	32 916	9,64	37 100	RTN1	YDR233C
P30619	83 480	7,3	639	SEC1	YDR164C	Q05016	29 158	6,81	3 210	RTN1	YMR226C
P30656	31 636	6,17	8 530	PRE2	YPR103W	Q05022	193 133	6,1	8 860	RRP5	YMR229C
P30822	124 103	5,24	7 080	CRM1	YGR218W	Q05029	82 048	5,09	3 460	BCH1	YMR237W
P31116	38 502	7,75	48 900	HOM6	YJR139C	Q05359	24 723	7,42	20 700	ERP1	YAR002C-A
P31373	42 542	6,52	38 300	CYS3	YAL012W	Q05506	69 524	6,77	20 600	ERP1	YDR341C
P31383	70 906	4,38	16 900	TPD3	YAL016W	Q05515	54 367	4,26	45 200	SVF1	YDR346C
P31412	44 188	6,65	21 100	VMA5	YKL080W	Q05778	30 695	4,53	1 350	SVF1	YLR199C
P31539	102 034	5,2	32 800	HSP104	YLL026W	Q05905	27 501	4,96	15 400	SVF1	YLR301W
P31688	102 976	8,19	22 700	TPS2	YDR074W	Q05911	54 510	6,4	15 400	ADE13	YLR359W
P32288	41 706	6,3	346 000	GLN1	YPR035W	Q05933	20 578	8,11	1 920	ARC18	YLR370C
P32316	58 711	6,77	4 890	ACH1	YBL015W	Q06142	94 775	4,34	51 700	KAP95	YLR347C
P32317	58 264	8,64	3 570	AFG1	YEL052W	Q06151	40 769	6,2	9 920	DCS1	YLR270W
P32319	177 776	4,59	7 210	PEP1	YBL017C	Q06252	22 151	4,61	6 230	DCS1	YLR179C
P32324	93 288	6,25	82 700	EFT1	YOR133W	Q06287	27 895	8,45	6 230	EMG1	YLR186W
P32327	130 166	6,47	17 000	PYC2	YBR218C	Q06344	72 409	4,99	656	ESF1	YDR365C
P32356	85 879	7,82	1 840	NTH1	YDR001C	Q06523	49 279	4,49	656	ESF1	YPR148C
P32366	39 790	4,31	1 630	VMA6	YLR447C	Q06705	47 462	6,61	9 600	CSR1	YLR380W
P32379	28 617	4,49	17 100	PUP2	YGR253C	Q07381	90 747	5,55	1 390	TSR1	YDL060W
P32449	39 749	6,93	26 300	ARO4	YBR249C	Q07478	50 309	5,29	51 700	SUB2	YDL084W
P32454	105 584	7,96	2 910	APE2	YKL157W	Q07551	35 560	6,1	4 030	SUB2	YDL124W
P32457	60 039	5,25	2 910	CDC3	YLR314C	Q07716	44 383	5,23	4 030	SUB2	YDL237W
P32471	22 627	4,13	2 910	EFB1	YAL003W *	Q07825	84 924	6,83	3 240	SUB2	YLL029W
P32472	14 487	5,23	5 400	FPR2	YDR519W	Q08193	51 869	4,3	11 700	GAS5	YOL030W
P32473	40 053	5,06	9 970	PDB1	YBR221C	Q08641	71 485	4,44	17 000	ABP14	YOR239W

P32474	58 982	4,63	9 970	EUG1	YDR518W	Q08686	34 219	5,95	5 770	ABP14	YOR251C
P32481	57 865	6,77	20 800	GCD11	YER025W	Q08732	85 695	7,28	300	HRK1	YOR267C
P32497	93 203	4,69	78 900	NIP1	YMR309C	Q08745	12 739	9,63	54 100	RPS10	YOR293W
P32503				-		P46784	12 738	9,92	7 650	RPS10	YMR230W
P32527	49 019	8,8	86 400	ZUO1	YGR285C	Q08911	41 714	6,44	7 650	FDH1	YOR388C
P32558	118 629	4,82	18 500	SPT16	YGL207W	Q08987	26 487	10,08	7 650	FDH2	YPL275W
P32563	95 528	5,24	55 700	VPH1	YOR270C	Q08920	23 774	4,86	6 200	CBC2	YPL178W
P32565	104 231	6,07	4 750	RPN2	YIL075C	Q08971	17 445	5,07	37 500	CBC2	YPL225W
P32582	56 021	6,66	41 900	CYS4	YGR155W *	Q08972	134 330	5,67	37 600	NEW1	YPL226W
P32589	77 366	4,97	71 700	SSE1	YPL106C *	Q08977	62 779	4,85	37 600	NEW1	YPL260W
P32590	77 620	5,38	6 300	SSE2	YBR169C	Q08985	36 668	4,98	60 300	SAM4	YPL273W
P32598	35 907	5,21	14 600	GLC7	YER133W	Q12068	38 169	6,08	5 460	GRE2	YOL151W
P32599	71 772	5,22	3 510	SAC6	YDR129C	Q12074	33 324	5,33	5 460	SPE3	YPR069C
P32771	41 042	6,74	8 370	SFA1	YDL168W	Q12118	37 218	4,51	9 420	SGT2	YOR007C
P32790	135 847	5,69	952	SLA1	YBL007C	Q12122	48 594	6,25	21 900	LYS21	YDL131W
P32803	23 332	6,78	26 800	EMP24	YGL200C	Q12207	18 967	10,08	21 900	NCE10	YPR149W
P32835	24 810	6,52	26 800	GSP1	YLR293C *	Q12245	16 573	7,93	2 210	NCE10	YPL144W
P32836	24 990	6,67	2 460	GSP2	YOR185C	Q12265	53 504	7,26	3 310	PRS5	YOL061W
P32861	55 987	7,46	17 200	UGP1	YKL035W	Q12305	15 413	6,35	7 470	PRS5	YOR285W
P32895	47 047	5,53	11 700	PRS1	YKL181W	Q12335	20 966	5,61	2 330	PST2	YDR032C
P32905	28 024	4,47	93 700	RPS0A	YGR214W *	Q12363	48 382	5,08	7 750	WTM1	YOR230W
P46654	27 962	4,51	60 900	RPS0B	YLR048W	Q12389	113 157	10,09	7 750	DBP10	YDL031W
P32939	23 043	4,62	5 530	YPT7	YML001W	Q12447	21 947	5,71	8 680	PAA1	YDR071C
P33204	19 916	5,22	9 020	ARC19	YKL013C	Q12458	34 755	7,13	14 100	YPR1	YDR368W
P33322	54 704	9,5	33 600	CBF5	YLR175W	Q12464	51 611	5,06	3 030	RVB2	YPL235W
P33330	43 415	6,52	15 900	SER1	YOR184W	Q12480	36 802	8,66	2 950	RVB2	YPR004C
P33338	108 995	5,25	40 600	SLA2	YNL243W	Q12532	119 068	5,53	7 700	RVB2	YPL009C
P33416	91 335	8,13	2 990	HSP78	YDR258C	Q12680	238 100	6,55	18 900	GLT1	YDL171C
P33442	28 743	10,79	92 400	RPS1A	YLR441C	Q3E792	12 039	11,13	322 000	RPS25	YGR027C
P33734	61 068	5,24	11 800	HIS7	YBR248C	Q86ZR7	26 170	5,69	322 000	RPS25	YKL033W-A
P33892	296 695	5,02	7 330	GCN1	YGL195W	Q99258	22 567	5,61	5 460	RIB3	YDR487C
						Q99316	32 401	6,51	1 520	MPD2	YOL088C
						Q99369	30 418	6,41	1 520	FSH3	YOR280C

II. Annexe 2: Publications

A. Publication n°1: Article paru dans «Journal of Biological Chemistry»

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 281, NO. 15, PP. 10420–10430, APRIL 14, 2006
© 2006 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PRINTED IN THE U.S.A.

The *Saccharomyces cerevisiae* Proteome of Oxidized Protein Thiols

CONTRASTED FUNCTIONS FOR THE THIOREDOXIN AND GLUTATHIONE PATHWAYS*

Received for publication, December 15, 2005, and in revised form, January 12, 2006. Published, JBC Papers in Press, January 17, 2006, DOI 10.1074/jbc.M513346200

Natacha Le Moan[‡], Gilles Clement[§], Sophie Le Maout[‡], Frédérique Tacnet[‡], and Michel B. Toledano^{†1}

From the [‡]Laboratoire Stress Oxydants et Cancer, Service de Biologie Moléculaire Systémique, Département de Biologie Joliot-Curie, and the [§]Laboratoire d'Immunoallergie Alimentaire, INRA-Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Service de Pharmacologie et d'Immunologie, CEA-Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Protein thiol oxidation subserves important biological functions and constitutes a sequel of reactive oxygen species toxicity. We developed two distinct thiol-labeling approaches to identify oxidized cytoplasmic protein thiols in *Saccharomyces cerevisiae*. In one approach, we used *N*-(6-(biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide to purify oxidized protein thiols, and in the other, we used *N*-[¹⁴C]ethylmaleimide to quantify this oxidation. Both approaches showed a large number of the same proteins with oxidized thiols (~200), 64 of which were identified by mass spectrometry. We show that, irrespective of its mechanism, protein thiol oxidation is dependent upon molecular O₂. We also show that H₂O₂ does not cause *de novo* protein thiol oxidation, but rather increases the oxidation state of a select group of proteins. Furthermore, our study reveals contrasted differences in the oxidized proteome of cells upon inactivation of the thioredoxin or GSH pathway suggestive of very distinct thiol redox control functions, assigning an exclusive role for thioredoxin in H₂O₂ metabolism and the presumed thiol redox buffer function for GSH. Taken together, these results suggest the high selectivity of cytoplasmic protein thiol oxidation.

The amino acid cysteine subserves important biological functions due to the unique redox properties of the sulfur atom of its thiol side chain (1). By engaging in a wide variety of redox reactions and coordinating metals, cysteine serves as a key residue in enzyme catalysis, protein oxidative folding (2–4) and trafficking (5), and redox signaling and regulation (6–8). However, these unique redox properties also make the cysteine residue vulnerable to reaction with a wide spectrum of non-physiological electrophiles, especially the reactive oxygen and nitrogen species, potentially leading to unwanted redox modifications and protein loss of function (9).

The cysteine residue exists *in vivo* in the fully reduced free thiol form (–SH or –S[–]) and in different oxidation forms: the thiyl radical (–S[•]); the disulfide bond (Cys–S–S–Cys); the sulfenic (–SOH), sulfinic (SO₂H), and sulfonic (–SO₃H) acid forms; and the *S*-nitrosylated form (–S–NO) (1, 7, 10). The cysteine thiyl radical and cysteine sulfenic acid are very unstable because of their highly reactive nature and thus cannot be easily identified biochemically. In contrast, the cysteine sulfinic and sulfonic acids are irreversible forms of protein oxidation, although the

cysteine sulfinic acid that forms in the peroxide-reducing enzyme peroxiredoxin is enzymatically retroreduced by sulfiredoxin (11, 12). Disulfide bonds are relatively stable, reversing to the reduced state by thiol-disulfide exchange with kinetics depending on the protein context (10). Their occurrence is thought to be restricted to specific subcellular compartments. In the endoplasmic reticulum, disulfide bond formation drives the correct folding of secreted proteins and is catalyzed by a FAD-containing sulfhydryl oxidase (Ero1) and protein-disulfide isomerase (Pdi1) (2–4). Protein import and folding in the mitochondrial intermembrane space are driven by disulfide bond formation by another recently identified redox relay involving the FAD-containing Erv1 oxidase and Mia40 (5, 13). In contrast, the cytoplasm is not thought to contain many protein–disulfide bonds due to its highly reducing nature caused by two potent NADPH-dependent thiol-reducing systems, the thioredoxin and GSH pathways (14, 15). Still, disulfide bonds are formed in this compartment at least in a few enzymes with a thiol oxidation step in their catalytic cycle such as ribonucleotide reductase and in redox-regulated proteins such as the *Saccharomyces cerevisiae* Yap1 and *Escherichia coli* OxyR H₂O₂ sensors (8). Cytoplasmic disulfide bonds are also found in the form of mixed disulfides between GSH and protein thiols, a modification referred to as *S*-thiolation (16–18). Protein *S*-thiolation protects oxidized protein thiols, whether in the thiyl or sulfenic acid form, from further irreversible oxidation and has been proposed to regulate protein function.

The *in vivo* redox state of cysteine residues must reflect both their diverse redox functions and their potential modifications by oxidative and nitrosative stress. We sought to evaluate the scope of cytoplasmic protein thiol oxidation in *S. cerevisiae* with the aim of questioning the dogma of its reducing nature and of identifying new thiol redox-mediated physiological processes. We also evaluated the consequences of thiol redox pathway inactivation on protein thiol oxidation and questioned to what extent cysteine residues represent targets of oxidative stress caused by H₂O₂.

Because of their intrinsic reactivity, cysteine residues can undergo redox modification upon cell lysis, making it difficult to evaluate their true *in vivo* redox state. This problem can be circumvented by quenching the reactivity of thiol groups by acid cell lysis (19, 20), followed by differential labeling of reduced *versus* oxidized thiols with thiol-specific reagents. We used this general thiol-trapping technique together with two different thiol-specific reagents. The use of *N*-(6-(biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide (biotin-HPDP)²

* This work was supported by grants from the Toxicologie Nucléaire et Environnementale, Commissariat à l'Energie Atomique, and from Association pour la Recherche sur le Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed: LSOC, SBMS, DBJC/DSV, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France. Tel.: 331-6908-8244; Fax: 331-6908-8046; E-mail: Michel.Toledano@cea.fr.

² The abbreviations used are: biotin-HPDP, *N*-(6-(biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide; MS, mass spectrometry; NEM, *N*-ethylmaleimide; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; DTT, dithiothreitol; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

allowed the purification of oxidized proteins and their identification by mass spectrometry (MS), whereas the use of *N*-[¹⁴C]ethylmaleimide (NEM) permitted a semiquantitative analysis of the extent of protein oxidation at the proteome level. We present our findings obtained from the combined use of these two redox proteomic approaches and discuss the possible cellular mechanisms underlying cytoplasmic disulfide bond formation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains and Growth Conditions—Experiments were performed with the *S. cerevisiae* wild-type strain Y252 (*MATa ura3-52 lys2-801^{amber} ade2-101^{ochre} trp1-Δ1 leu2-Δ1*), a derivative of YPH98 (21), and isogenic derivatives. The *Δgsh1PRO2-1Δglr1* (yeast *SOGΔglr1*) strain has been described (22). Chromosomal gene inactivation was performed by oligonucleotide-mediated PCR replacement of entire coding regions and confirmed by PCR. *Δtrr1, Δtrx2* and *Δtdh3* were obtained by replacement with *KANMX4*, and *Δtrx1* with *URA3*. The triple mutant *Δtrr1Δtrx1Δtrx2* was obtained by a cross between *Δtrr1* and *Δtrx1Δtrx2* and sporulation of the triple heterozygous diploid. Cells were grown at 30 °C in 0.67% yeast nitrogen base, 0.1% casamino acids, and 2% glucose supplemented with adenine, uracil, and tryptophan as required. For anaerobic growth, liquid medium supplemented with ergosterol (30 mg/ml) and Tween 80 (0.2%) was bubbled under a constant nitrogen flow for 8 h and inoculated with cells. The liquid culture was incubated at 30 °C with constant shaking in an anaerobic chamber in which oxygen had been removed using a Merck Anaerocult A cassette, as confirmed by a Merck indicator strip color change.

Plasmid Constructions—The Myc-Tdh3 fusion protein (containing a C-terminal Myc tag epitope) was constructed by a two-step PCR amplification procedure with oligonucleotide sequences encoding the Myc epitope (5'-AAAGTTGATTTCTGAAGAAGATTTGTAAGTGAATTACTTTAAATCTT and 5'-CTTCTTCAGAAATCAACTTTTGTTCAGCCTTGGCAACGTGTTCAA) and cloned into the EcoRI and NotI sites of the centromeric pRS316 plasmid. The Myc-Tdh3 mutant carrying serine substitutions of its two cysteines (Myc-Tdh3(C150S,C154S)) was created by PCR amplification with oligonucleotides 5'-TCCAACGCTTCTAGTACCACCAACAGTTTGCTCCATTGG and 5'-CCAATGGAGCCAAACTGTTGGTGGTACTAGAAGCGTTGGA. Myc-T was constructed as described (11).

Biotin-HPDP Labeling and Purification—Exponentially growing cells ($A_{600} = 0.4-0.5$) were lysed using trichloroacetic acid and glass beads as described (20, 23). The air-dried trichloroacetic acid pellet was dissolved in denaturing buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 25 mM Tris-Cl (pH 8.8), and 10 mM EDTA) (2v/v) containing iodoacetamide (50 mM) and incubated for 45 min at 30 °C. Aggregates were spun down by centrifugation, and the supernatant was precipitated with trichloroacetic acid (10%). The trichloroacetic acid pellet was acetone-washed, air-dried, dissolved in denaturing buffer containing 20 mM dithiothreitol (DTT), incubated for 45 min at 30 °C, and trichloroacetic acid-precipitated to remove excess DTT. The resulting trichloroacetic acid pellet was dissolved in denaturing buffer containing 0.5 mM biotin-HPDP (Pierce) and incubated for 45 min at 30 °C in the dark. Extracts were trichloroacetic acid-precipitated to remove unbound biotin-HPDP, dissolved in denaturing buffer, and used for protein purification. Protein concentration was measured using the Micro BCA assay reagent kit (Pierce). Biotin-HPDP-reacted protein extracts (3–5 mg) precleared by a 3-h incubation at 4 °C in binding buffer (4 M urea, 2% CHAPS, 25 mM Tris-Cl (pH 8.8), 5 mM EDTA, and 50 mM NaCl) containing Sepharose CL-4B (Sigma) were incubated overnight at 4 °C with continuous tumbling in binding buffer containing streptavidin-Sepharose (Amersham

Biosciences). The resin was washed once with binding buffer, twice with wash buffer A (8 M urea, 4% CHAPS, 1 M NaCl, and 25 mM Tris-Cl (pH 8.8)), three times with wash buffer B (8 M urea, 4% CHAPS, and 25 mM Tris-Cl (pH 8.8)), and once with elution buffer (8 M urea, 4% CHAPS, and 7 mM Tris). Biotinylated proteins were eluted with elution buffer (400 μl) containing DTT (20 mM). Eluted proteins were subjected to two-dimensional gel electrophoresis.

[¹⁴C]NEM Protein Labeling—[¹⁴C]NEM thiol labeling was carried out as described above for biotin-HPDP labeling, except that biotin-HPDP was replaced with 2 mM [¹⁴C]NEM (37.5 mCi/mmol; PerkinElmer Life Sciences). Extracts were trichloroacetic acid-precipitated to remove excess [¹⁴C]NEM, solubilized in elution buffer, and subjected to two- or one-dimensional gel electrophoresis. Where indicated, the denaturing buffer used was 100 mM Tris, 10 mM EDTA, and 1% SDS.

Two-dimensional Gel Electrophoresis—Extracts were adjusted to a 400-μl volume rehydration solution (8 M urea, 4% CHAPS, 20 mM DTT, 1% immobilized pH gradient buffer, and bromphenol blue) and loaded onto strip holders (Amersham Biosciences). Proteins were separated in the first dimension by isoelectric focusing using pH 3–10 nonlinear Immobiline DryStrip gels (18 cm) and run at 34 kV-h (50 μA/strip) for 20 h at 20 °C on an IPGphor unit (Amersham Biosciences). In the second dimension, focused immobilized pH gradient strips were equilibrated for 15 min in equilibration buffer (6 M urea, 2% SDS, 50 mM Tris-Cl (pH 6.8), 20% glycerol, and bromphenol blue) containing DTT (50 mM) and for 15 min in the same buffer containing iodoacetamide (100 mM). Immobiline DryStrip gels were washed with electrophoresis buffer (Tris/glycine/SDS), transferred onto 13% polyacrylamide gels, and embedded in 0.5% (w/v) agarose containing Tris/glycine/SDS. SDS-PAGE migration was performed using an Ettan DALTsix system for 18 h (1.5 watts/gel) at 30 °C. For [¹⁴C]NEM-labeled extracts, gels were fixed, dried, exposed to sensitive screens, and analyzed using a PhosphorImager (Amersham Biosciences). For biotin-HPDP-purified proteins, gels were stained with colloidal Coomassie Blue (Sigma).

Western Blot Analyses—Trichloroacetic acid-precipitated extracts were solubilized in the presence of 50 mM NEM (Sigma). Protein extracts (20 μg) were dissolved in Laemmli buffer without β-mercaptoethanol, boiled, and loaded on SDS-polyacrylamide gel (15%). Separated proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane, probed with either anti-Myc monoclonal antibody 9E10 or horseradish peroxidase-conjugated streptavidin, and revealed using an enhanced chemiluminescence Western blotting reagent kit (Amersham Biosciences).

Protein Identification by MALDI-TOF-MS—Protein spots of interest were excised from stained gels, cut into ~1-mm³ pieces, washed with water, dehydrated in 100% acetonitrile, dried in a SpeedVac vacuum evaporator, and washed with ammonium bicarbonate (0.1 M) for 30 min at 56 °C to remove the dye. Gels pieces were rehydrated for 45 min on ice in a solution containing 25 mM NH₄HCO₃, 5 mM CaCl₂, and 12.5 ng/μl trypsin. In-gel digestion was performed in the trypsin-free solution for 2 h at 37 °C. The digest solution (0.5–1 μl) was applied to a sample plate, and an equal volume of a saturated solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 100% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid (1:1, v/v) was added. Air-dried droplets were desalted twice with 0.1% trifluoroacetic acid. Spectra were acquired using a Voyager-DE STR Biospectrometry workstation (Applied Biosystems) in positive ion reflector mode with an accelerating voltage of 20 kV. Masses were calibrated with external standards (Sequazyme peptide mass standard kit, Applied Biosystems) and with internal autolysis tryptic peptides. Proteins were identified by searching the Swiss Protein Data Base (available at prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe). Among proposed peptide search options, we included the two following modifications:

The *S. cerevisiae* Proteome of Oxidized Protein Thiols

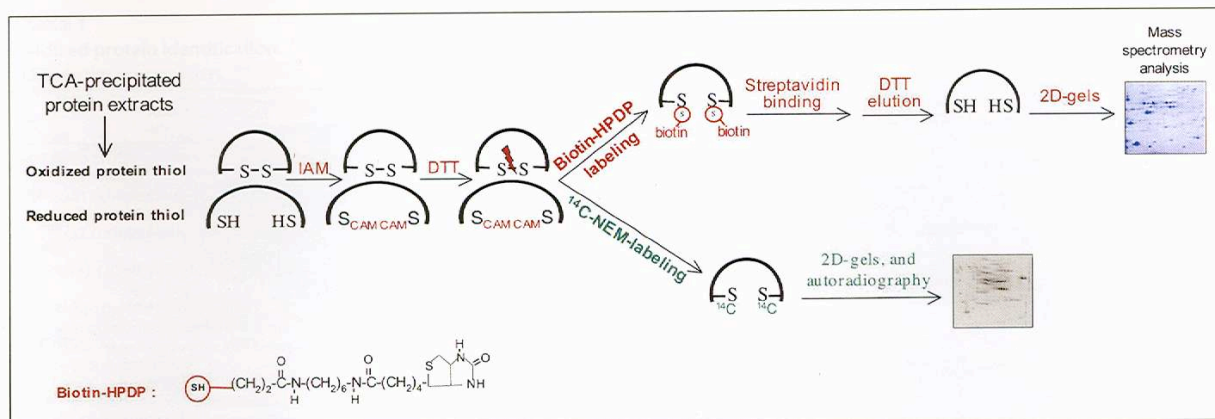
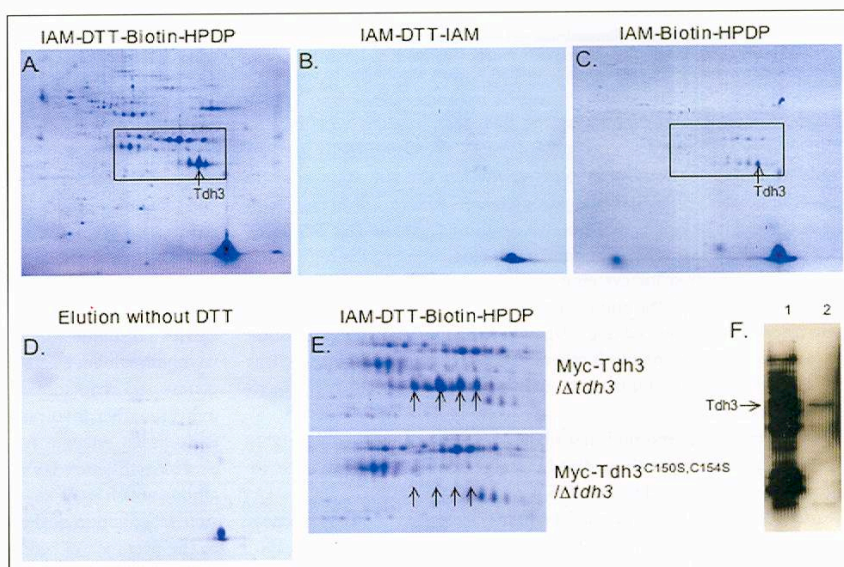


FIGURE 1. Schematics of the biotin-HPDP purification and [¹⁴C]NEM labeling methods. In both methods, reduced cysteine residues of trichloroacetic acid-precipitated extracts were alkylated with iodoacetamide (IAM) to prevent thiol-disulfide exchange and thiol oxidation reactions (see "Experimental Procedures"). Oxidized protein thiols were then reduced with DTT, and newly made accessible thiols were reacted with either biotin-HPDP or [¹⁴C]NEM. Biotin-HPDP-labeled proteins were purified by streptavidin affinity chromatography and eluted by DTT reduction. Purified and ¹⁴C-labeled proteins were resolved by two-dimensional gel electrophoresis and visualized by Coomassie Blue staining or autoradiography, respectively. CAM, carbamidomethylation.

FIGURE 2. Purification of oxidized protein thiols by the biotin-HPDP method. A–E, Coomassie Blue-stained two-dimensional gels of proteins purified from exponential growing wild-type cells in experimental (A) and control (B–E) experiments. A, the experiment followed the scheme shown in Fig. 1. B, biotin-HPDP was substituted with iodoacetamide (IAM). C, DTT was omitted prior to reaction of the extracts with biotin-HPDP. D, DTT was omitted during the elution procedure. E, the same experiment was performed as described for B, except that a strain with a *TDH3* deletion and expressing either Myc-Tdh3 or Myc-Tdh3(C150S,C154S) was used as indicated. Shown is a two-dimensional gel enlargement of a portion corresponding to the boxed two-dimensional gel portion in A. Each of these experiments was reproduced at least twice. 3-mg protein extracts were used in A and C, and 5 mg in B, D, and E. F, visualization of the extent of protein biotinylation. Trichloroacetic acid extracts in equal amounts were iodoacetamide-blocked and reacted with biotin-HPDP (lane 2) or were reduced with DTT and reacted with biotin-HPDP (lane 1). Extracts were resolved by SDS-PAGE and revealed by Western blotting using horseradish peroxidase-conjugated streptavidin.



oxidation of methionines (peptide mass \pm 16 Da) and carbamidomethylation of cysteines (peptide mass \pm 57 Da). Calibrated monoisotopic peptide masses were searched against the Swiss Protein Non-redundant Protein Database using the Prowl program with a mass tolerance between 20 and 50 ppm. Identification was established by searches in all taxonomic categories with a Z-score \geq 1.5, except for Prx1, Hsp60, Ado1, Guk1, Ubc1, Cpr1, and Tma19, which had lower Z-scores.

RESULTS

Purification of Proteins with *in Vivo* Oxidized Thiols—We sought to identify yeast proteins bearing one or more oxidized cysteine residues (in the sulfenic acid or disulfide-bonded form) by adapting the biotin switch method aimed at *S*-nitrosylated proteins (24, 25). In brief, oxidized cysteine residues of crude yeast extracts were specifically labeled with biotin-HPDP and purified by streptavidin affinity chromatography (Fig. 1). HPDP is an absolute thiol-specific reagent that covalently and reversibly attaches to free thiol groups through a disulfide bridge. Two-

dimensional Coomassie Blue-stained gels showed that numerous proteins were purified from exponentially growing cells by streptavidin affinity chromatography (Fig. 2A). We performed several controls for establishing the method specificity. (i) When biotin-HPDP was substituted with iodoacetamide, no proteins were recovered, indicating the absolute specificity of the purification for biotinylated proteins (Fig. 2B). (ii) When the reduction of disulfide bonds by DTT prior to the biotin-HPDP step was omitted in the purification scheme, only traces of proteins were eluted (Fig. 2C), indicating the HPDP labeling specificity for oxidized cysteine residues. The protein traces recovered may indicate unprompted disulfide bond reduction during the *in vitro* procedure and/or a low level of nonspecific HPDP protein labeling. We thus verified by Western blotting the extent of protein biotinylation of the same control extracts, *i.e.* iodoacetamide-blocked but not DTT-reduced, which showed the presence of minor trace signals, with the exception of a discrete 40-kDa band (Fig. 2F, lane 2) corresponding to Tdh3 (see below). Contrasting with the latter control is the heavy labeling of

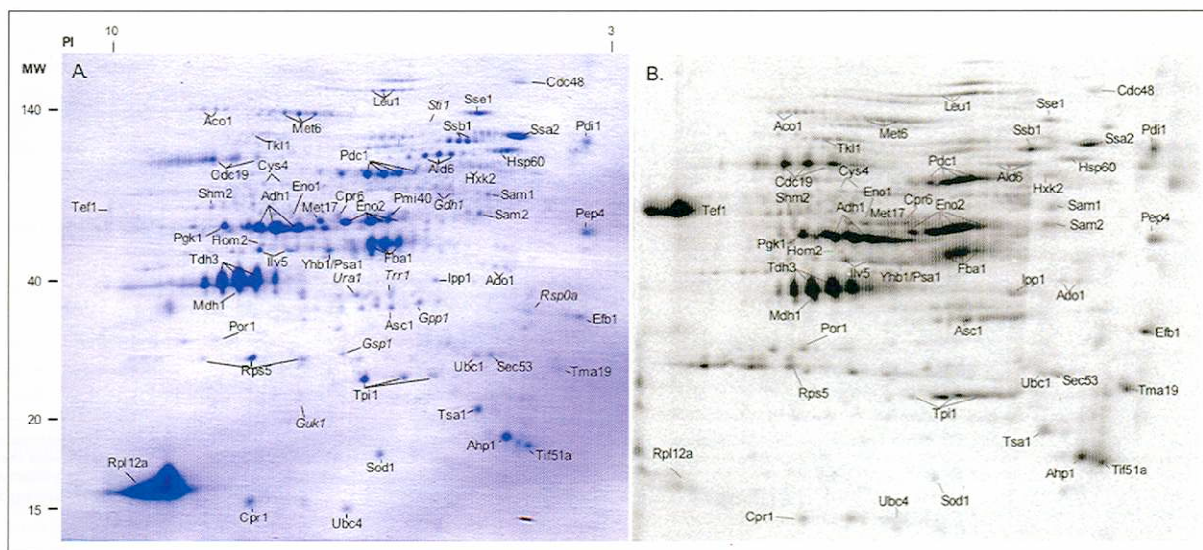


FIGURE 3. Comparison of two-dimensional gel identification of oxidized protein thiols by affinity purification after biotin-HPDP labeling (A) and [^{14}C]NEM labeling (B). Extracts were from exponentially growing cells. Proteins identified by MS are indicated (see Table 1). Gdh1, Gpp1, Gsp1, Guk1, Rsp0a, Sti1, Trp1, and Ura1 are not shown in B because of the weakness or absence of the spots. PI, isoelectric point; MW, molecular weight.

iodoacetamide-blocked extracts that had been reacted with biotin-HPDP after DTT reduction (Fig. 2F, lane 1). We also directly assayed cysteine residue selectivity by testing whether the abundant enzyme glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH; Tdh3) could still be purified if it lacked its two cysteine residues. Cysteine-less Tdh3 was not purified using this experimental procedure, attesting the high selectivity of the method for cysteine residues (Fig. 2E). (iii) Finally, when DTT was omitted in the elution step, no or only barely detectable protein traces were recovered (Fig. 2D), indicating that only proteins bound to beads by a DTT-sensitive biotin attachment could be eluted, and this represents another demonstration of the cysteine selectivity of the purification scheme.

The purification method described here thus appears to be highly specific for proteins with oxidized cysteine residues. Furthermore, its protein yield is adapted to easy MS protein identification.

Identification of the Oxidized Proteome of Unstressed Cells—Coomassie Blue-stained two-dimensional gels of proteins purified from exponentially growing cells contained ~200 spots (Fig. 3A). We carried out an exhaustive MALDI-TOF-MS analysis of these proteins, thereby identifying about one-third of them (Fig. 3A and Table 1). The majority of the proteins identified were cytoplasmic (57/64), with very few residing in the endoplasmic reticulum (Pdi1) and mitochondria (Mdh1, Por1, Hsp60, Prx1, and Ilv5), a result consistent with the data obtained using our protein extraction protocol that eliminated membranous fractions. Purification assays using cytosolic fractions generated by differential centrifugation of yeast spheroplast extracts yielded similar proteome profiles, except for the few endoplasmic reticulum- and mitochondrion-resident proteins that were absent (data not shown). The proteins identified were sorted into functional classes that comprised reactive oxygen species scavengers and sulfur oxidoreductases, stress chaperones, carbohydrate and energy metabolism enzymes, amino acid biosynthetic enzymes, and protein translation factors (Table 1). We have also listed in Table 1 additional proteins identified in cells with an inactive thioredoxin pathway (see below).

Several of these proteins have been iteratively identified in other *in vivo* protein thiol oxidation studies (see Table 1 for references). The

peroxiredoxins (Tsa1 and Ahp1) are antioxidants that use a catalytic cysteine for peroxide reduction (26). Their oxidation in unstressed cells presumably reflects permanent enzyme cycling caused by reduction of endogenous peroxides. The presence of oxidized forms of thioredoxin reductase (Trp1) and protein-disulfide isomerase (Pdi1) is consistent with their thiol reductase functions, also indicating permanent enzyme cycling. Although copper/zinc-superoxide dismutase (Sod1)-mediated dismutation of O_2^- does not involve a catalytic thiol, the mature enzyme carries a disulfide bond essential for activity (27). Thiol oxidation of the flavohemoglobin Yhb1, supposed to carry heme-dependent NO dioxygenase and reductase activities (28), is surprising in contrast and may indicate either involvement of a thiol in these activities or a new cysteine-based enzyme function. Carbohydrate metabolism and amino acid biosynthetic enzymes represent the largest oxidized protein group, among which is the key glycolytic enzyme GAPDH (Tdh3) (see "Discussion"). Oxidation of these enzymes probably relates, for many of them, to the presence of redox-reactive catalytic or metal-coordinating cysteine residues (Table 1).

Quantification of the Oxidized Proteome by [^{14}C]NEM Labeling—The biotin-HPDP-based purification method did not yield information on the extent of protein oxidation. We thus set up a semiquantitative approach in which we used [^{14}C]NEM as a labeling reagent and established a protein oxidation index (I_{ox}) by calculating the ^{14}C signal value ratio of oxidized (S_{ox}) versus total (S_{tot}) protein thiols (Fig. 4A). Oxidized protein thiols were labeled by reacting [^{14}C]NEM with extracts that had been first alkylated with unlabeled iodoacetamide and reduced with DTT (Fig. 4B). Total protein thiols were labeled by directly reacting [^{14}C]NEM with DTT-reduced extracts (Fig. 4C). As expected, the two-dimensional gel autoradiogram of labeled total protein thiols carried much heavier signals (Fig. 4, compare B and C). The two-dimensional gels of [^{14}C]NEM-labeled oxidized protein thiols were rigorously compared with the Coomassie Blue-stained two-dimensional gels of biotin-HPDP-purified proteins (Fig. 3, A and B), revealing very similar spot distributions and providing reciprocal proof of the specificity of the two methods. In particular, all oxidized proteins identified by MS were also visualized as ^{14}C -labeled substrates. For calculating I_{ox} , we considered

The *S. cerevisiae* Proteome of Oxidized Protein Thiols

TABLE 1

Oxidized protein identification

ROS, reactive oxygen species.

	Protein Z-score	Location ^a	Cys	I_{ox} (WT)	I_{ox} ratio ^b		Previous identification ^c	Reactive thiols	Ref.
					H ₂ O ₂	$\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$			
Redox enzymes									
ROS scavengers									
Sod1 (copper/zinc-superoxide dismutase)	2.43	C/M	2	1.22	1.16	1.32	+	Cys ⁵⁷ -Cys ¹⁴⁶ disulfide	47
Tsa1 (thiol-specific antioxidant)	2.39	C	2	0.44	1.8	1.36	+	Cys ⁴⁷ -Cys ¹⁷⁰ disulfide	44, 45, 47-50
Ahp1 (alkylhydroperoxide reductase)	2.22	C	3	0.22	2.37	1.27	+	Cys ⁶² -Cys ¹²⁰ disulfide	44
Yhb1 (flavo-hemoglobin, NO reductase/dioxygenase)	2.43	C/M	4						
Tsa2 ^d (stress-inducible thioredoxin peroxidase)	1.85	C	2					Cys ⁴⁸ -Cys ¹⁷¹ disulfide	
Gpx2 ^d (phospholipid hydroperoxide-glutathione peroxidase)	2.31	C/N	4				+	Cys ³⁷ -Cys ⁸³ disulfide	38
Prx1 ^d (mitochondrial peroxidase)	0.51	M	3				+		45, 47
Ccs1 ^d (copper chaperone for superoxide dismutase-1)	2.43	C/M	7					Ccs1 Cys ²²⁹ Sod1 Cys ⁵⁷	
Sulfur oxidoreductases									
Trr1 (thioredoxin reductase)	2.31	C	4				+	Catalytic disulfide	48
Pdi1 (protein-disulfide isomerase)	2.43	ER	6	2.98	1.46	1.68	+	Catalytic disulfide	49, 50
Mxr1 ^d (methionine-sulfoxide reductase)	1.67	C/N	5					Catalytic disulfide	
Stress chaperones, protein folding									
Ssa2 (ATPase of the HSP70 family, vacuolar import)	2.43	C/V	3	0.24	1.04	2.0	+		18
Sse1 (ATPase of the HSP70 family, component of the HSP90 complex)	2.43	C	5			1.36	+		48, 49
Ssb1 (ATPase of the HSP70 family, protein folding)	2.43	C	3			0.98	+		48, 49
Sti1 (HSP90 co-chaperone)	2.39	C	3						
Hsp60 (mitochondrial chaperone, mitochondrial import)	0.59	M	5				+		49, 50
Carbohydrate and energy metabolism									
Glucose fermentation, glycolysis									
Hxk2 (hexokinase isoenzyme-2)	2.43	C/N	4						
Tpi1 (triose-phosphate isomerase)	2.43	C	2	0.34	1.38	2.64	+	Cys ¹²⁶ , folding and stability	18, 47, 49
Tdh3 (GAPDH)	2.39	C	2	0.18	3.05	3.33	+	Active Cys ¹⁴⁹	18, 24, 44, 45, 47, 48
Eno1 (enolase-1)	2.36	C	1				+	Cys ²⁴⁷ , close to active site	45, 48
Eno2 (enolase-2)	2.43	C	1	0.18	1.66	1.22	+	Cys ²⁴⁷ , close to active site	18, 45
Pgk1 (phosphoglycerate kinase)	2.37	C	1			1.76	+		48, 49
Fba1 (fructose-1,6-bisphosphate aldolase)	2.39	C	5	0.2	1.2	1.6	+		18, 50
Ald6 (aldehyde dehydrogenase)	2.43	C/M	7			2.10	+	Catalytic Cys ³⁰⁶	18, 44, 49
Adh1 (alcohol dehydrogenase)	2.40	C	8	0.38	1.51	5.26	+		18, 44
Cdc19 (pyruvate kinase)	2.43	C	7	0.38	2.12	1.9	+		44, 50
Pdc1 (pyruvate decarboxylase)	2.43	C/N	4	0.22	3.14	4.54		Active Cys ²²¹	
Pentose phosphate shunt									
Tkl1 (transketolase)	2.43	C	2			1.08			
Krebs cycle									
Mdh1 (mitochondrial malate dehydrogenase)	2.38	M	1			1.8	+		46, 47
Aco1 (aconitase)	2.38	C/M	7			0.82	+	Cys ⁴³⁷ -Cys ⁵⁰³ -Cys ⁵⁰⁶ in Fe-S cluster	44, 46, 47
Glycerol/mannose metabolism									
Gpp1 (DL-glycerol-3-phosphatase, glycerol biosynthesis)	2.43	C/N	3	0.24					
Pmi40 (mannose-6-phosphate isomerase, protein mannosylation)	2.29	C/N	5					Active Cys ¹⁵⁰	
Sec53 (phosphomannomutase, protein glycosylation/folding)	2.36	C	3			0.47			
Psa1 (GDP-mannose pyrophosphorylase, cell wall biosynthesis)	2.43	C	3						
Amino acid metabolism									
Sam1 (<i>S</i> -adenosylmethionine synthetase-1)	2.43	C	5			1.86			
Sam2 (<i>S</i> -adenosylmethionine synthetase-2)	2.43	C	5			1.5			
Shm2 (serine hydroxymethyltransferase)	2.37	C	5			1.77	+		44
Met6 (cobalamin-independent methionine synthase)	2.43	C	3			1.1	+		44
Met17 (<i>O</i> -acetylhomoserine- <i>O</i> -acetylserine sulfhydrylase)	2.40	C	1			1.24			

TABLE 1—CONTINUED

	Protein Z-score	Location ^a	Cys	I_{ox} (WT)	I_{ox} ratio ^b		Previous identification ^c	Reactive thiols	Ref.
					H ₂ O ₂	$\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$			
Cys4 (cystathionine β -synthase)	2.41	C/M	1		2.05				
Leu1 (isopropylmalate isomerase)	2.43	C	11					Fe-S cluster	
Hom2 (aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase)	2.41	C/N	9				+		44
Gdh1 (NADP ⁺ -dependent glutamate dehydrogenase)	2.43	C/N	6		1.9				
Ilv5 (acetoxyhydroxy acid isomeroeductase)	2.41	M	3		1.16				
Other metabolisms									
Ado1 (adenosine kinase)	1.49	C/N	3		1.9				
Ura1 (dihydroorotate dehydrogenase)	2.41	C	3						
Guk1 (guanylate kinase)	1.43	C/N	1						
Ipp1 (inorganic pyrophosphatase)	2.43	C	1		2.33		+		50
Protein translation									
Efb1 (translation elongation factor-1 β)	2.40	R	1	0.26	0.6	0.61			
Tef1 (translation elongation factor-1 α)	2.41	R	7	0.98	1.7	0.73	+		18, 45, 49
Rpl12A (protein of the large (60 S) ribosomal subunit)	2.38	R	1	0.5	1.3	0.17			
Tif51A (translation initiation factor-5A)	1.85	C/M/R	2	0.06	0.95				
Rps0a (protein of the small (40 S) ribosomal subunit)	2.43	R	1						
Rps5 (protein of the small (40 S) ribosomal subunit)	2.35	R	1	0.33	1.02		+		18, 45
Asc1 (WD repeat-containing protein, translation regulation)	2.38	C	2	0.08	1.55				
Proteases and proteasomes									
Pep4 (vacuolar aspartyl protease, proteinase A)	2.39	V	4	1.56	1.63	2.56			
Cdc48 (ATPase)	2.08	C/ER/N	4		0.92				
Ubc1 (ubiquitin-conjugating enzyme-1)	1.33	P	1		0.52		+		49
Ubc4 (ubiquitin-conjugating enzyme-4)	1.99	P	3		0.16		+	Cys ⁸⁶ -mediated ubiquitin conjugation	49
Miscellaneous									
Cpr1 (peptidylprolyl <i>cis,trans</i> -isomerase-1, cyclophilin)	1.33	C	2		0.81		+		49
Cpr6 (peptidylprolyl <i>cis,trans</i> -isomerase-6, cyclophilin)	2.38	C	7		1.26		+		49
Por1 (mitochondrial porin)	2.43	M	2		1.02			Cys-mediated electron transfer	
Gsp1 (GTP-binding protein)	2.30	C/N	3						
Tma19 (hypothetical protein, unknown function)	1.06	C	1	0.25	0.45	0.26	+		18

^a C, cytoplasm; M, mitochondria; N, nucleus; R, ribosome; ER, endoplasmic reticulum; V, vacuole; P, proteasome.

^b I_{ox} ratio = $I_{ox}(H_2O_2)/I_{ox}(WT)$ or $I_{ox}(\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2)/I_{ox}(WT)$ (values in boldface represent ratios >2).

^c Previous identifications whether oxidized or S-thiolated (with the corresponding references).

^d Proteins identified in the $\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$ mutant.

two additional parameters. Oxidized spot ¹⁴C signal values not only reflect the amount protein in the oxidized form, but also the number of oxidized thiols/protein, a parameter lacking for most proteins. Furthermore, this number is not necessarily equal to the total number of cysteines/protein. To minimize these biases, we considered the total number of cysteines/protein (N^{Cys}) and arbitrarily set to 1 the number of oxidized thiols/protein ($N^{ox} = 1$) in calculating I_{ox} : $I_{ox} = (S_{ox}/N^{ox})/(S_{tot}/N^{Cys})$. I_{ox} was calculated for many but not all of the 64 proteins identified by MS (Table 1) due to fuzziness of some spots. I_{ox} usually ranged between 0.1 and 0.40 with a few exceptions. A large I_{ox} was found for Pdi1 (2.98), in keeping with this protein being mostly oxidized in yeast (29). Still, by being >1, Pdi1 I_{ox} is obviously overestimated, at least in part because of its four oxidized cysteine residues ($N^{ox} = 4$) (29) not taken into account in the I_{ox} calculation. Sod1 ($N^{ox} = 2$) also had a large I_{ox} (1.22), consistent with this protein being mostly in the disulfide-bonded form in yeast (27). Two other proteins, the translation elongation factor Tef1 and the vacuolar protease Pep4, also appeared to be heavily oxidized. As a control, we determined the oxidized fraction of Tsa1 on nonreducing SDS-polyacrylamide gel by the disulfide bridge homodimeric nature of its oxidized form running at twice the size of the reduced monomeric species (Fig. 4D). Tsa1 ($N^{ox} = 2$) also appeared to

be oxidized (~12%), but less so compared with the I_{ox} prediction (0.44), thus giving an estimate of the approximate nature of I_{ox} . Although approximate, I_{ox} provides a relative protein oxidation scale within a two-dimensional gel.

Oxygen Dependence of Protein Thiol Oxidation—Molecular oxygen is expected to provide the main source of oxidizing equivalents for cellular thiol oxidation, either through reaction of thiols with O₂-derived H₂O₂ or through O₂-dependent catalysis. We thus evaluated the possible changes of the oxidized proteome after O₂ deprivation. Cells were grown to the exponential phase in the presence of 100% N₂ for 8 h before they were processed for [¹⁴C]NEM labeling (Fig. 5B). Two-dimensional gel spot intensities were dramatically decreased compared with those under the control aerobic conditions (Fig. 5A), and many of them almost disappeared. This visual impression was confirmed by the combined I_{ox} spot values that decreased by a factor of 10 in two independent experiments. The [¹⁴C]NEM labeling decrease demonstrates the O₂ dependence of protein thiol oxidation. Longer periods of anaerobic growth (>24 h) would probably fully extinguish the residual oxidation seen after 8 h. The O₂ dependence of protein oxidation is expected for the thiol peroxidases Tsa1 and Ahp1 because H₂O₂ derives from O₂. Decreased oxidation of Pdi1 is consistent with the O₂ dependence of the

The *S. cerevisiae* Proteome of Oxidized Protein Thiols

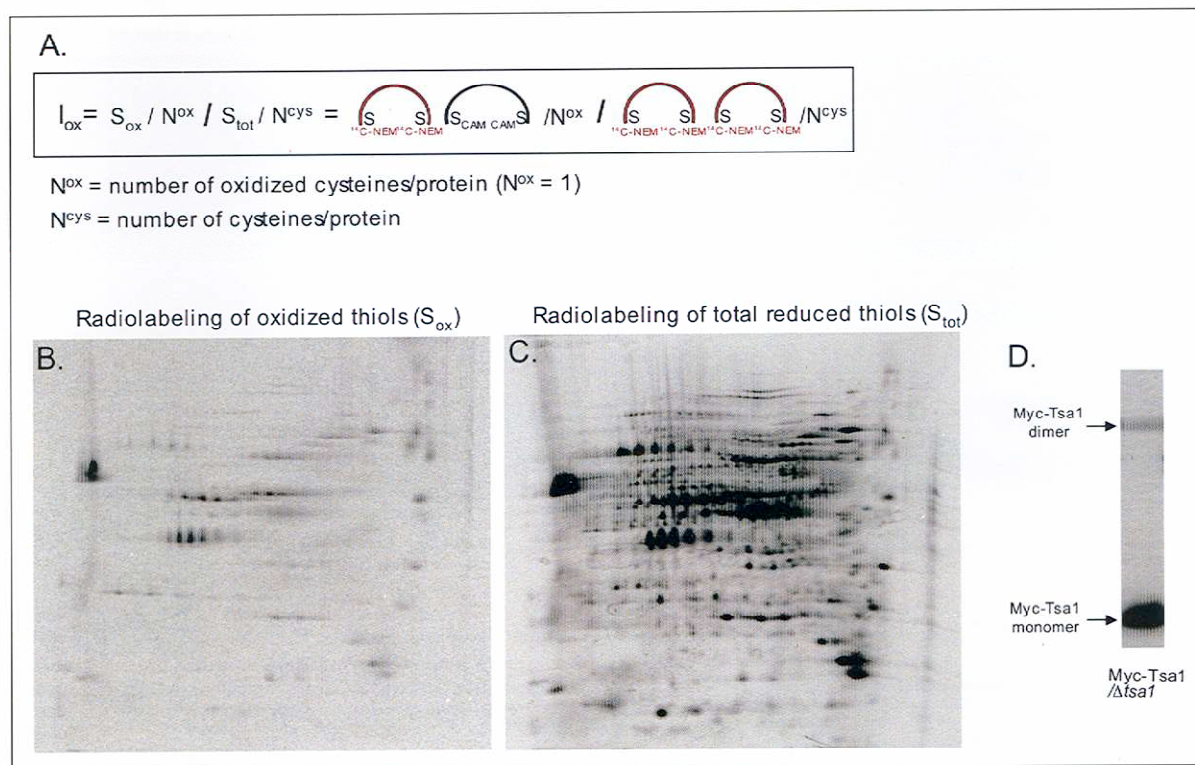


FIGURE 4. Quantification of oxidized protein thiols by $[^{14}\text{C}]$ NEM labeling. *A*, the quantification principle (see "Results"). *B*, two-dimensional gel of oxidized protein thiols. Trichloroacetic acid-precipitated extracts were alkylated with iodoacetamide, reduced with DTT, and reacted with $[^{14}\text{C}]$ NEM (a shorter exposure of the gel compare with Fig. 3*B*). *C*, two-dimensional gel of total protein thiols. Trichloroacetic acid-precipitated extracts were reduced with DTT and reacted with $[^{14}\text{C}]$ NEM. *D*, quantification of Tsa1 oxidation in exponentially growing wild-type cells. Trichloroacetic acid-precipitated extracts of Δtsa1 -expressing Myc-Tsa1 were resolved by nonreducing SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with anti-Myc antibody. CAM, carbamidomethylation.

sulfhydryl oxidase Ero1, which catalyzes Pdi1 oxidation (3). Sod1 was the only protein that did not have decreased oxidation. Sod1 disulfide bond formation is supposedly catalyzed by Erv1 (13) via Ccs1 (27, 30, 31), and Erv1 receives its oxidizing equivalents from cytochrome *c* (32) rather than directly from molecular O_2 . Enough oxidized cytochrome *c* may remain in the mitochondria of anaerobically growing cells to maintain the essential function of Erv1.

Effect of H_2O_2 on Protein Thiol Oxidation—Although O_2 -dependent, it is not clear whether oxidation proceeds through reaction of thiols with O_2 -derived H_2O_2 or through O_2 -dependent catalysis. We thus sought to identify protein directly reacting with H_2O_2 , which should carry solvent-exposed cysteines in the thiolate form ($-\text{S}^-$), i.e. with a pK_a less than the intracellular pH (7). Exponentially growing wild-type cells were exposed to a mildly toxic concentration of H_2O_2 (1 mM) for 1 min, a time point not allowing protein expression changes to occur (33), and oxidized protein thiols were labeled with $[^{14}\text{C}]$ NEM. Two-dimensional gel spot distribution was not different compared with untreated cells (Fig. 5, compare *A* and *C*). We thus quantified the H_2O_2 -induced protein oxidation changes by calculating the matched spot I_{ox} ratio of H_2O_2 -treated versus untreated samples ($I_{\text{ox}(\text{H}_2\text{O}_2)}/I_{\text{ox}(\text{WT})}$) (Table 1). We found no important differences for the majority of proteins ($0.8 < I_{\text{ox}}$ ratio < 2), except for Ahp1 (2.37), Tdh3 (3.05), Ald6 (2.10), Cdc19 (2.12), Pdc1 (3.14), Cys4 (2.05), and Ipp1 (2.33), which had oxidation increases of 2-fold or more. In contrast, Ubc1 (0.52), Ubc4 (0.16), Efb1 (0.6), Sec53 (0.47), and a protein of unknown function, Tma19 (0.45) had clearly decreased I_{ox} values, which could reflect irreversible thiol

oxidation. Tsa1, which carries an H_2O_2 -reactive thiolate, did not show such an increase (1.8), but an additional more acidic spot appeared (Fig. 5*D*, arrow). This new spot identified as Tsa1 by MS likely corresponds to its acidic cysteine sulfinate form occurring at this H_2O_2 concentration (11). The persisting ^{14}C labeling of the Tsa1 acidic form indicates that the other of its two cysteines is in the disulfide-bonded form, probably with itself. One-dimensional SDS-PAGE separation of $[^{14}\text{C}]$ NEM-labeled extracts of cells treated with H_2O_2 at increasing concentrations (0.5–2 mM) visually confirmed the prominence of the Ahp1 and Tdh3 oxidation responses and, conversely, the paucity of the overall proteome response (Fig. 5*E*). This experiment also showed the decrease in Tsa1 dimer at elevated H_2O_2 concentrations.

In conclusion and unexpectedly, H_2O_2 does not apparently cause oxidation of novel proteins, but rather increases the oxidation state of a small number of select proteins that presumably carry H_2O_2 -reactive thiolates. These results therefore suggest that cysteine oxidation is not a major mechanism of H_2O_2 toxicity.

The Oxidized Proteome of Cells with an Altered Thioredoxin Pathway—Cytoplasmic protein thiols are maintained in a reduced state by the thioredoxin and GSH pathways. We analyzed the consequence of genetic ablation of either of these pathways on protein thiol oxidation. The cytoplasmic thioredoxin pathway comprises two thioredoxins (Trx1 and Trx2) and a thioredoxin reductase (Trr1). We used a strain that lacks this entire pathway ($\Delta\text{trr1}\Delta\text{trx1}\Delta\text{trx2}$) and that combines

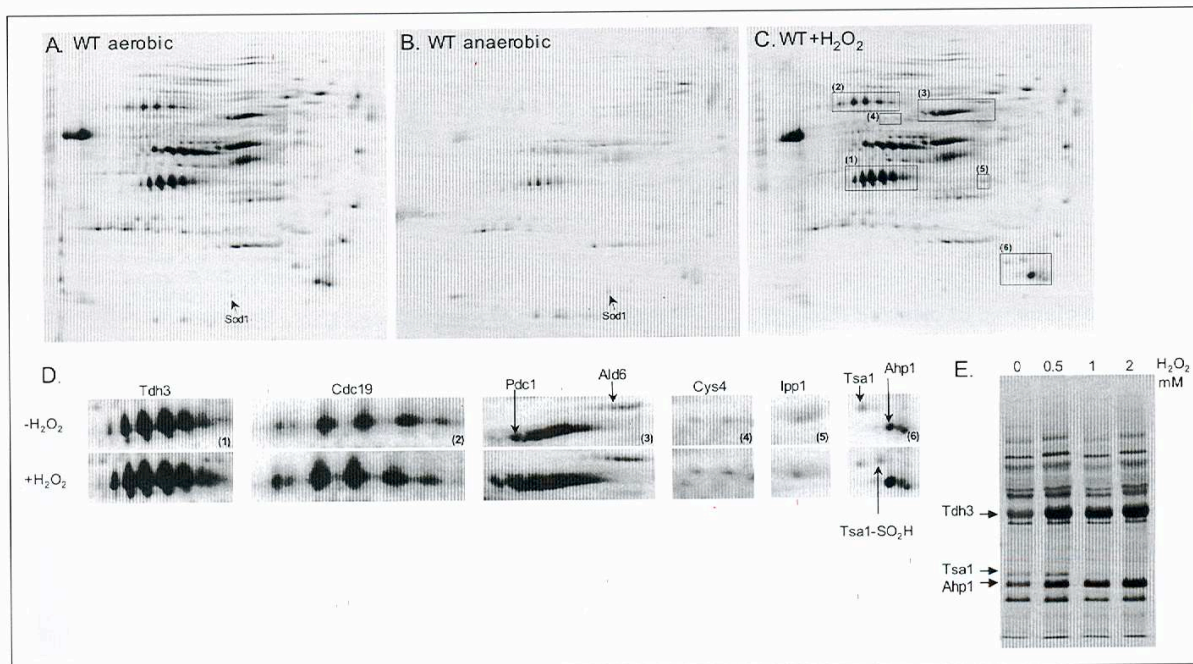


FIGURE 5. Alterations of the oxidized proteome by anaerobiosis and H_2O_2 . Shown are two-dimensional gels of [^{14}C]NEM-labeled extracts from exponentially growing wild-type cells (WT) during aerobiosis (A), during an 8-h anaerobiosis (B), and treated with H_2O_2 (1 mM) for 1 min (C). 100 μ g protein extracts were loaded in A–C. Enlargements of the boxed two-dimensional gel portions in C are shown in D. [^{14}C]NEM-labeled extracts from wild-type cells were left untreated or were treated with H_2O_2 at the indicated concentrations for 1 min (E). Tris/EDTA/SDS extracts were resolved by nonreducing SDS-PAGE.

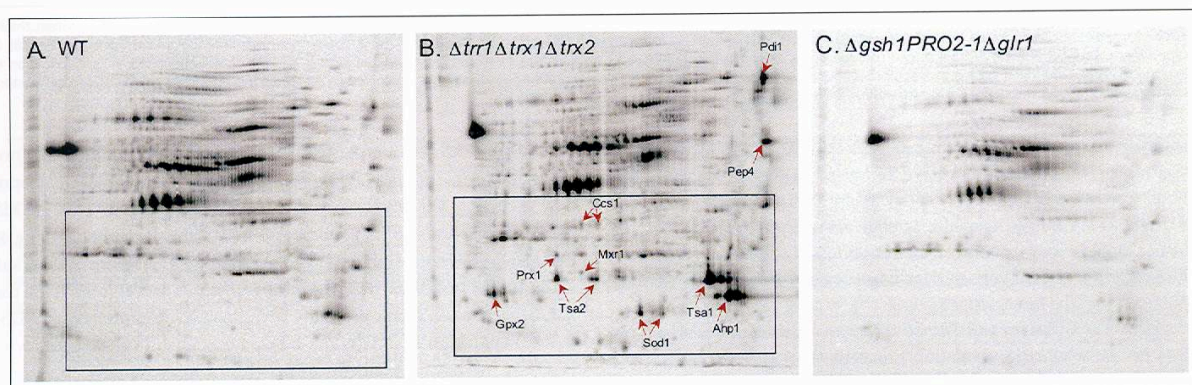


FIGURE 6. Alteration of the oxidized proteome in cells upon thiol redox control inactivation. Shown are two-dimensional gels of [^{14}C]NEM-labeled extracts from exponentially growing wild-type cells (WT; A) or from cells with an inactive cytoplasmic thioredoxin ($\Delta trt1\Delta trx1\Delta trx2$; B) or GSH ($\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$; C) pathway. 100- μ g protein extracts were loaded in A and B, and 500 μ g in C. The two-dimensional gel in A is the same as in Fig. 5A. Red arrows indicate spots with increased [^{14}C]NEM signal intensity in $\Delta trt1\Delta trx1\Delta trx2$.

phenotypes of both thioredoxin and thioredoxin reductase mutants.³ The oxidized proteome was analyzed by both ^{14}C labeling and biotin-HPDP-based purification methods (Figs. 6 and 7). [^{14}C]NEM-labeled two-dimensional gels showed differences compared with wild-type cells, with higher spot intensities and the appearance of several new spots (compare Figs. 6 (A and B) and 7 (A and B)). Furthermore, a few proteins appeared as doublet or triplet spots (Tsa1, Tsa2, Ahp1, Sod1, and Ccs1) that could correspond to undefined redox conformers or other covalent post-translational modifications. Two-dimensional gels of biotin-HPDP-purified proteins (Fig. 7, C and D) confirmed the new

spots and enabled us to identify some of them (Table 1). These are the thiol-based peroxidases Tsa2 and Prx1 and the peroxiredoxin-like Gpx2, Mxr1, and Ccs1. Mxr1 is a methionine-sulfoxide reductase, reducing methionine sulfoxide by a thiol-based mechanism (34). Ccs1 is the copper chaperone for Sod1, also catalyzing Sod1 disulfide bond formation, and has been identified in a disulfide-linked form with Sod1 *in vitro* (27). I_{ox} values were increased compared with the wild-type strain I_{ox} values (Table 1), but only moderately with regard to the especially high intensities of some spots (Figs. 6B and 7B). Spot intensity changes and the appearance of new spots were contributed not only by increased protein oxidation, but also by increased protein levels, explaining the moderate I_{ox} values changes. Increased steady-state pro-

³ M. B. Toledano, unpublished data.

The *S. cerevisiae* Proteome of Oxidized Protein Thiols

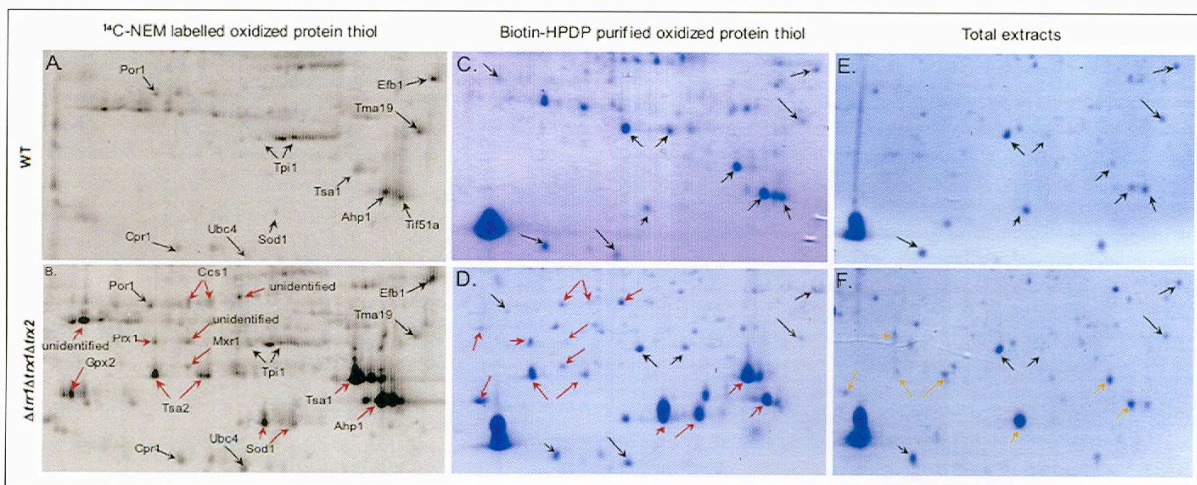


FIGURE 7. Protein thiol oxidation in cells lacking the thioredoxin cytoplasmic pathway. *A* and *B* are enlargements of the boxed two-dimensional gel portions in Fig. 6 (*A* and *B*, respectively). *C–F* are enlargements of same two-dimensional gel portions of biotin-HPDP-purified proteins (*C* and *D*) and total extracts (*E* and *F*) from wild-type (*WT*; *C* and *E*) and $\Delta trr1 \Delta trx1 \Delta trx2$ (*D* and *F*). *Red* and *yellow arrows* indicate proteins with increased [^{14}C]NEM labeling or increased expression in $\Delta trr1 \Delta trx1 \Delta trx2$, respectively. 5-mg extracts were used for the experiments in *C* and *D*. For the experiments in *E* and *F*, extracts (0.5 mg) were dissolved in denaturing buffer containing iodoacetamide (50 mM) and loaded onto two-dimensional gels.

tein levels were seen in Coomassie Blue-stained two-dimensional gels of total extracts (Fig. 7, *E* and *F*) and are likely the consequence of the constitutive Yap1 activation characterizing this strain (20, 35, 36). Indeed, except for Mxr1 and Ccs1, all proteins with increased levels (Fig. 7, *B*, *D*, and *F*, *arrows*) are Yap1-dependent (37).

Thus, if one considers only [^{14}C]NEM-labeled protein spot intensities, the proteins highly oxidized in thioredoxin-deficient cells are Sod1, Ccs1, Mxr1, Pep4, Pdi1, Tsa1, Tsa2, Ahp1, Prx1, and Gpx2. Note that by including five thiol peroxidases and Mxr1, these proteins make up most of the yeast H_2O_2 -metabolizing enzymes. Here, the increased oxidation of these enzymes is consistent with their use of the thioredoxin pathway as the electron donor system for H_2O_2 reduction (8, 26, 34, 38). Note also that H_2O_2 itself does not cause such a high increase in the oxidation state of H_2O_2 -metabolizing enzymes, pointing to the high efficiency of the thioredoxin pathway in H_2O_2 reduction. Finally, note that accumulation of disulfide bonds appears to be selective rather than random in thioredoxin-deficient cells.

The Oxidized Proteome of Cells with an Altered Glutathione Pathway—The GSH pathway was tested with the $\Delta gsh1PRO2-1\Delta glr1$ strain (22), which carries deletions of both *GLR1* (encoding glutathione reductase) and *GSH1* (encoding γ -glutamylcysteine synthase, the rate-limiting enzyme in GSH biosynthesis) and which harbors a third mutation in the proline biosynthetic enzyme gene *PRO2*, which restores the synthesis of GSH to <0.5% of the wild-type cell content. These cells did not show significant variations in protein levels compared with wild-type cells (data not shown). Two-dimensional gels of [^{14}C]NEM-labeled oxidized protein thiol extracts (Fig. 6C) unexpectedly showed a major decrease in spot intensities compared with wild-type cells (Fig. 6A) (5-fold decrease in the ratio of combined I_{ox} values in three independent experiments). This unexpected decrease could be rationalized with regard to the cellular redox buffer function usually attributed to GSH (39). GSH is supposed to protect oxidized thiols in the thiol or sulfenic acid form from further oxidation by forming *S*-thiolated protein adducts (17, 18, 40). Lack of GSH could thus promote further protein thiol oxidation to the NEM-non-reactive SO_2H or SO_3H form, thus decreasing [^{14}C]NEM thiol labeling. Irrespective of its mechanism, this decreased oxidation contrasts with the increased oxidation observed in $\Delta trr1 \Delta trx1 \Delta trx2$

(Fig. 6, compare *B* and *C*), indicating very different functions for the GSH and thioredoxin pathways in yeast.

DISCUSSION

Proteomic approaches aimed at identifying proteins with oxidized thiols are important as a means of discovering new redox-regulated processes and dissecting their interplay with the reduced cytoplasm. We have developed two such approaches in *S. cerevisiae* that take advantage of the technique of differential thiol labeling, both targeting proteins with cysteine residues engaged in a disulfide bond, whether intra- or intermolecular, or with GSH. In one, we used biotin-HPDP (25) to purify oxidized protein thiols. In the other, we used [^{14}C]NEM as a thiol-labeling reagent to quantify the extent of protein thiol oxidation. Both approaches showed a large number of the same proteins (~200) with oxidized thiols. We identified 64 of these proteins, several of which had been previously identified in other redox proteomic studies (Table 1). Our data establish that, irrespective of its mechanism, protein thiol oxidation is dependent upon molecular O_2 . We have also shown that H_2O_2 does not lead to *de novo* protein thiol oxidation, but rather increases the oxidation state of a select group of oxidized proteins, indicating both high selectivity and a limited contribution of thiol oxidation to the toxicity of this oxidant. Our study also reveals contrasting differences in the oxidized proteome of cells upon inactivation of the thioredoxin or GSH pathway, with specific increases and general decreases in protein oxidation, respectively (see Fig. 6). These differences are suggestive of very different thiol redox control functions for these pathways, assigning an exclusive role for the thioredoxin pathway in H_2O_2 metabolism and the presumed thiol redox buffer function for GSH (18, 41). Furthermore, none of these mutant strains revealed the presence of random disulfide bond accumulation, a condition that was expected to occur upon thiol redox control inactivation and referred to as disulfide stress (42).

The two approaches we used have advantages and drawbacks, with the biotin-HPDP-based purification method being essentially qualitative and the [^{14}C]NEM labeling method being both qualitative and semiquantitative. However, the latter is fraught with a much higher background noise likely produced by thiol-nonspecific protein adduct

formation (data not shown). Nonspecific background signals were also present in two recent differential thiol labeling studies (43, 44). Quantification of the extent of protein oxidation is complex. Our method, based on ^{14}C signal value ratios of oxidized (S_{ox}) versus total (S_{tot}) protein thiols, reliably establishes a relative protein oxidation scale within two-dimensional gels, but is approximate when comparing two-dimensional gel series because of intrinsic experimental variations. In their identification of the *E. coli* oxidized protein thiol proteome by differential [^{14}C]iodoacetamide thiol labeling, Leichert and Jakob (44) more appropriately calculated protein-specific activities by establishing ratios of spot ^{14}C signal values to protein quanta measured by Coomassie Blue staining. We failed in using this method because ^{14}C signals dramatically decreased upon Coomassie Blue staining, hampering measures.

The recognized biological importance of protein thiol oxidation has recently spurred several redox proteomic studies. Differential cysteine-trapping techniques identified oxidized protein thiols in *E. coli* (44) and mammals (45) and protein thiol sulfenates using arsenite as a specific sulfenic acid reductant (46). Diagonal electrophoreses identified disulfide-bonded proteins (47, 48). Other studies identified *S*-thiolated proteins in yeast (18) and mammals (49, 50). Emerging from our and these studies is the iterative identification of the same proteins or protein functions, especially enzymes involved in H_2O_2 and carbohydrate metabolism, translation factors, and stress chaperones (see Table 1). One of these, the key glycolytic enzyme GAPDH (Tdh3), is redox-sensitive because of the highly reactive nature of its catalytic cysteine. GAPDH has been identified *in vivo* in the *S*-thiolated, disulfide-linked, and *S*-nitrosylated forms. *S*-Thiolation of GAPDH, which inactivates enzyme activity, has been proposed to regulate glycolytic fluxes during oxidative stress (18). Recently, NO-induced *S*-nitrosylation of GAPDH has been shown to trigger its binding to the ubiquitin ligase Siah, followed by nuclear translocation and apoptosis (51). GAPDH disulfide bond formation also promotes nuclear accumulation, and its extent correlates with Alzheimer disease progression (52). Protein translation factors were identified as disulfide-bonded (48) or *S*-thiolated (18) proteins. *S*-Thiolation of translation factors prevents the inhibition of protein synthesis during oxidative stress (18). The heat stress chaperone HSP70 family has been shown to form intramolecular and mixed disulfides (48) and to undergo *S*-thiolation (18, 49), but how these redox modifications influence protein function is not yet known. The ubiquitin-conjugating enzyme family, two members of which were identified here (Ubc1 and Ubc4), has been shown to undergo *S*-thiolation (49) and could be redox-regulated (53).

Identifying the same oxidized proteins in studies crossing species gives reciprocal credence to their results and also more importantly indicates the remarkable specificity and conservation of the protein thiol oxidation phenomenon. Also emerging from these redox proteomic studies is the important overlap between protein thiol oxidation and *S*-thiolation. This overlap has been pointed out by Cumming *et al.* (48) and is suggested by the analysis of the strain with an inactive GSH pathway showing a dramatic decrease in oxidation of all oxidized proteins identified in wild-type cells. Redox proteomics is providing novel knowledge of the cellular thiol redox reaction, but still, all different approaches have an important limitation in the inability to identify weakly expressed proteins. For instance, we failed to identify the redox-regulated transcription factor Yap1, the redox transducer Orp1/Gpx3, or the sulfiredoxin Srx1, proteins that are known to carry oxidized thiols (8, 11), at least in response to H_2O_2 . Future efforts should aim to increase the sensitivity of redox proteomics to low abundant proteins, which should include many of those involved in redox-regulated processes.

Acknowledgments—We thank B. Biteau for the Tsa1 Western blot, members of the Toledano group and the Service de Biologie Moléculaire Systémique for encouragement and stimulating discussions, J. Labarre and G. Lagniel for advice on two-dimensional gels, and J. C. Aude for advice on signal quantification.

REFERENCES

- Jacob, C., Giles, G. L., Giles, N. M., and Sies, H. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 4742–4758
- Frand, A. R., Cuozzo, J. W., and Kaiser, C. A. (2000) *Trends Cell Biol.* **10**, 203–210
- Tu, B. P., and Weissman, J. S. (2002) *Mol. Cell* **10**, 983–994
- Wilkinson, B., and Gilbert, H. F. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1699**, 35–44
- Tokatlidis, K. (2005) *Cell* **121**, 965–967
- Linke, K., and Jakob, U. (2003) *Antioxid. Redox Signal.* **5**, 425–434
- Poole, L. B., Karplus, P. A., and Claiborne, A. (2004) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 325–347
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L., and Tacnet, F. (2004) *Trends Biochem. Sci.* **29**, 351–357
- Forman, H. J., Fukuto, J. M., and Torres, M. (2004) *Am. J. Physiol.* **287**, C246–C256
- Gilbert, H. F. (1995) *Methods Enzymol.* **251**, 8–28
- Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) *Nature* **425**, 980–984
- Woo, H. A., Kang, S. W., Kim, H. K., Yang, K. S., Chae, H. Z., and Rhee, S. G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47361–47364
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., and Herrmann, J. M. (2005) *Cell* **121**, 1059–1069
- Grant, C. M. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 533–541
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., and Azevedo, D. (2003) in *Topics Current Genetics* (Hohmann, S., and Mager, W. H., eds) Vol. 1, pp. 241–303. Springer-Verlag, Berlin
- Ghezzi, P. (2005) *Free Radic. Res.* **39**, 573–580
- Klatt, P., and Lamas, S. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 4928–4944
- Shenton, D., and Grant, C. M. (2003) *Biochem. J.* **374**, 513–519
- Bardwell, J. (2005) *Nat. Biotechnol.* **23**, 42–43
- Delaunay, A., Isnard, A. D., and Toledano, M. B. (2000) *EMBO J.* **19**, 5157–5166
- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) *Genetics* **122**, 19–27
- Spector, D., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 7011–7016
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002) *Cell* **111**, 471–481
- Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P., and Snyder, S. H. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 193–197
- Jaffrey, S. R., and Snyder, S. H. (2001) *Sci. STKE* **2001**, PL1
- Rhee, S. G., Chae, H. Z., and Kim, K. (2005) *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1543–1552
- Furukawa, Y., Torres, A. S., and O'Halloran, T. V. (2004) *EMBO J.* **23**, 2872–2881
- Gardner, P. R., Gardner, A. M., Martin, L. A., Dou, Y., Li, T., Olson, J. S., Zhu, H., and Riggs, A. F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 31581–31587
- Frand, A. R., and Kaiser, C. A. (1999) *Mol. Cell* **4**, 469–477
- Lamb, A. L., Torres, A. S., O'Halloran, T. V., and Rosenzweig, A. C. (2000) *Biochemistry* **39**, 14720–14727
- Schmidt, P. J., Kunst, C., and Culotta, V. C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 33771–33776
- Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D. P., Lisowsky, T., and Tokatlidis, K. (2005) *J. Mol. Biol.* **353**, 937–944
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B., and Labarre, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22480–22489
- Moskowitz, J. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1703**, 213–219
- Carmel-Harel, O., Stearman, R., Gasch, A. P., Botstein, D., Brown, P. O., and Storz, G. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 595–605
- Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K., Mano, J., Inoue, Y., and Kimura, A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28459–28465
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M. B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16040–16046
- Tanaka, T., Izawa, S., and Inoue, Y. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 42078–42087
- Schafer, F. Q., and Buettner, G. R. (2001) *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1191–1212
- Shackelford, R. E., Heinloth, A. N., Heard, S. C., and Paules, R. S. (2005) *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 940–950
- Thomas, J. A., and Mallis, R. J. (2001) *Exp. Gerontol.* **36**, 1519–1526
- Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D., and Beckwith, J. (1993) *Science* **262**, 1744–1747
- Baty, J. W., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2002) *Proteomics* **2**, 1261–1266
- Leichert, L. I., and Jakob, U. (2004) *PLoS Biol.* **2**, 1–15
- Baty, J. W., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2005) *Biochem. J.* **389**, 785–795
- Saurin, A. T., Neubert, H., Brennan, J. P., and Eaton, P. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17982–17987
- Brennan, J. P., Wait, R., Begum, S., Bell, J. R., Dunn, M. J., and Eaton, P. (2004) *J. Biol.*

The *S. cerevisiae* Proteome of Oxidized Protein Thiols

- Chem.* **279**, 41352–41360
48. Cumming, R. C., Andon, N. L., Haynes, P. A., Park, M., Fischer, W. H., and Schubert, D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 21749–21758
49. Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberini, I., Salmona, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., Bachi, A., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., and Ghezzi, P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3505–3510
50. Lind, C., Gerdes, R., Hamnell, Y., Schuppe-Koistinen, I., von Lowenhilf, H. B., Holmgren, A., and Cotgreave, I. A. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **406**, 229–240
51. Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J. H., Tankou, S. K., Hester, L. D., Ferris, C. D., Hayward, S. D., Snyder, S. H., and Sawa, A. (2005) *Nat. Cell Biol.* **7**, 665–674
52. Cumming, R. C., and Schubert, D. (2005) *FASEB J.* **19**, 2060–2062
53. Obin, M., Shang, F., Gong, X., Handelman, G., Blumberg, J., and Taylor, A. (1998) *FASEB J.* **12**, 561–569

B.Publication n°2: Revue parue dans FEBS letters

FEBS Letters 581 (2007) 3598–3607

Minireview

The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: Differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis

Michel B. Toledano*, Chitranshu Kumar, Natacha Le Moan, Dan Spector, Frédérique Tacnet

CEA, iBiTecS, Laboratoire Stress Oxydants et Cancer, Gif sur Yvette F-91191, France

Received 11 June 2007; accepted 2 July 2007

Available online 11 July 2007

Edited by Roberto Sitia

Abstract By its ability to engage in a variety of redox reactions and coordinating metals, cysteine serves as a key residue in mediating enzymatic catalysis, protein oxidative folding and trafficking, and redox signaling. The thiol redox system, which consists of the glutathione and thioredoxin pathways, uses the cysteine residue to catalyze thiol-disulfide exchange reactions, thereby controlling the redox state of cytoplasmic cysteine residues and regulating the biological functions it subserves. Here, we consider the thiol redox systems of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, emphasizing the role of genetic approaches in the understanding of the cellular functions of these systems. We show that although prokaryotic and eukaryotic systems have a similar architecture, they profoundly differ in their overall cellular functions.

© 2007 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Thiol redox control; Thioredoxin; Glutathione; Oxidative stress; Iron metabolism; Ribonucleotide reductase

1. Introduction

Most life on earth exists in an oxidizing environment. If not properly countered, oxygen would cause most cellular components to become oxidized. Living cells have in fact domesticated the oxidizing power of O₂, not only for the purpose of energy generation in the form of ATP through the proton motive pump in which O₂ acts as terminal electron acceptor, but also in a multitude of enzymatic reactions in which O₂ acts either as a catalyst or as a cofactor. These reactions, many of which are driven by the redox properties of the thiol group of cysteine, include the synthesis of desoxyribonucleotides building blocks of ADN that involves the O₂-initiated reduction of ribonucleotides by ribonucleotide reductase, the oxidative folding of secreted proteins by the FAD-containing thiol oxidase Ero1, and the mitochondrial import of proteins. To be controlled, such O₂-dependent thiol redox reactions need to be reversed by electrons that are mostly provided by the reducing power storage molecules NADH and NADPH and

ultimately by glucose oxidation. To move from one to another component, these electrons are usually funneled in the form of protons through a web of redox wires made of redox-active cysteine residues, which can alternatively exist in the reduced thiol (SH) or oxidized disulfide bond (–S–S–) forms. This redox web constitute the thiol redox system made of two distinct branches, the thioredoxin and glutathione pathway. The thiol redox system not only controls O₂-dependent catalytic disulfides, but is also used in the reductive assimilation of sulfate to sulfite and as an antioxidant system in the reduction of H₂O₂.

We consider here the thiol redox systems of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* emphasizing on the knowledge brought about by genetic approaches in understanding their cellular functions. The role of the thiol redox system in the secretory pathway will not be considered here. We will show that despite a similar architecture, a virtually identical mode of operation using electrons from NADPH to reduce disulfide bonds by a thiol-disulfide exchange mechanism, and sharing many targets, prokaryotic and eukaryotic systems have overall different cellular functions. One of the most striking differences is the abduction of the *S. cerevisiae* GSH pathway by iron metabolism, a feature that has not been described in prokaryotes. *S. cerevisiae* presumably serves as a good model for understanding the mechanism of thiol redox control and homeostasis in higher eukaryotes.

2. Basic description of cytoplasmic thiol redox control systems

The cytoplasmic thiol redox system consist of the GSH and thioredoxin pathways that can be thought of as electron flow pathways operating by virtue of gradients in redox potentials (see Figs. 1 and 2). Ultimately, the electron source for the system is the oxidation of pentose phosphate through the pentose phosphate pathway that regenerates NADPH from NADP⁺. NADPH has an extremely low redox potential of –315 mV that allows it to act as the primary hydrogen donor for both systems.

Both thioredoxin and glutaredoxin reduce disulfide bonds by a thiol-disulfide exchange reaction via two vicinal (CXXC) active-site cysteine residues, which either form a disulfide or a dithiol (for reviews see [1–3]). Oxidized thioredoxin is reduced to its dithiol form by the FAD-bound NADPH-dependent thioredoxin reductase, Oxidized glutaredoxin is instead reduced

*Corresponding author. Fax: +33 169088046.

E-mail address: Michel.Toledano@cea.fr (M.B. Toledano).

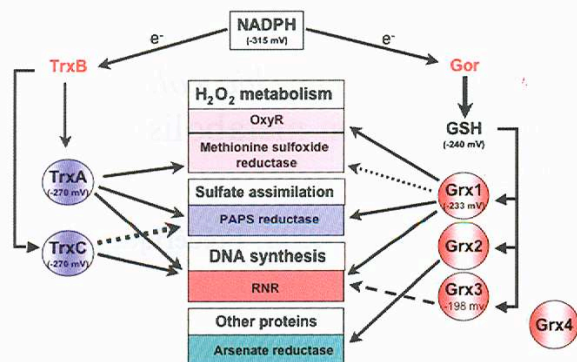


Fig. 1. Components of the *E. coli* thioredoxin and glutaredoxin systems. The figure is modified from Ref. [14]. Only a few thiol redox targets is represented. Black arrows represent electron flows. For references, see text.

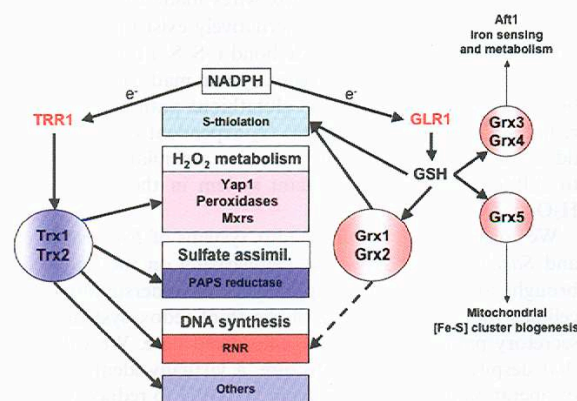


Fig. 2. Overview of the *S. cerevisiae* GSH and thioredoxin pathways. For references, see the text.

by glutathione, which, in turn, is reduced by the FAD-bound NADPH-dependent glutathione reductase. As established in bacteria, these pathways operate in parallel and the extent to which electrons flow between them is not clear. Before examining the thiol redox system in eukaryotes, it is first useful to consider some of its aspects in bacteria since it appears fundamentally widely conserved.

Through a saga that have lasted about 40 years since the initial discovery of thioredoxin in 1964 [4] and that is probably not yet finished, biochemical, enzymatic and genetic approaches conducted by several laboratories, and in particular by those of Holmgren and Beckwith, have provided a very detailed and comprehensive view of the *E. coli* thiol redox system that constitute the working model of this system in other organisms. We essentially consider here the genetics of this system for the sake of providing a picture of its *in vivo* function, bearing in mind that interpretation of genetic data could only be done with the knowledge provided by biochemistry. Thiol redox reactions lead to intermediates that are often labile and therefore difficult to identify biochemically *in vivo*, leaving to genetics a significant part to elucidate the *in vivo* functions of the thiol redox system. Nevertheless, as we will see recent biochemical approaches to the *in vivo* redox state of cysteine

residues and to the identification of the targets of thioltransferases, often conducted at the proteome-wide level are nicely complementing the knowledge brought about by genetics.

3. Lessons from bacteria

In *E. coli*, the glutathione pathway is composed of GSH, synthesized by the action of γ -glutamylcysteine synthetase, the rate-limiting enzyme encoded by *GshA*, and glutathione synthase encoded by *GshB* [5], of glutathione reductase encoded by *Gor*, and of three glutaredoxins, Grx1, Grx2 and Grx3 encoded by *GrxA*, *GrxB*, and *GrxC* [6,7] (Fig. 1). Grx4 is a third glutaredoxin of unknown function that differ from the others as being a monothiol glutaredoxin related to yeast monothiol glutaredoxins [8,9]. The thioredoxin system consists of two thioredoxins encoded by *TrxA*, and *TrxC* and thioredoxin reductase encoded by *TrxB* [5,10].

3.1. Thiol redox systems constitute electron flow pathways

A genetic demonstration of the notion that thiol redox systems operate as electron flow pathways came from experiments by Beckwith and colleagues [11]. They took advantage of the periplasmic enzyme alkaline phosphatase (AP), which becomes active when folded by virtue of intramolecular disulfide bonds formation. When expressed in the cytoplasm upon removing its periplasmic localization sequence, AP remains inactive as not being oxidized and properly folded. Through a screen based upon the enzyme's requirement for disulfide bonds for activity, they searched for mutations that would restore the activity of cytoplasmic AP, identifying *TrxB* [11]. They then showed that deleting both *TrxA* and *TrxC* completely eliminated the AP activity caused by the *trxB* mutation [12], indicating that lack of thioredoxin reductase allows cytoplasmic AP disulfide bond formation not by virtue of a defect in its reduction, but by promoting the accumulation of oxidized thioredoxin that acts as an oxidant for AP. Therefore, interrupting the gradient of redox potentials of the pathway upstream of thioredoxin converts the thioredoxin from a thiol-reduction catalyst to a thiol-oxidation catalyst. These data are also an experimental confirmation of the idea that an aerobic environment tends to oxidize biological systems if not countered. Similarly, ectopic expression of thioredoxin in the periplasm converts this enzyme into an oxidant catalyst capable of replacing DsbA in the oxidative protein-folding pathway [13]. This is because as in the previous example, thioredoxin becomes insulated from its reductant thioredoxin reductase.

3.2. The *E. coli* GSH and thioredoxin pathways are functionally redundant

The two branches of the thiol redox system are functionally redundant in *E. coli* [14] (Table 1). Neither branch alone appears to be required for normal aerobic growth. However, inactivation of both pathways is unviable. What is the cause of this lethality? Two mechanisms were suspected: either a toxic accumulation of disulfide bonds in the cytoplasm, a condition often referred to as disulfide stress, or a defect in the reduction of a protein essential for viability. As we will see, it has taken decades to formally ascribe the essential function of the *E. coli* thiol redox system to the reduction of a unique disulfide bond that forms in the enzyme ribonucleotide

Table 1
Phenotypes of thiol redox mutants in *E. coli*

Mutant	Phenotype	Rescued by	Defects
<i>gsha</i>	nl ^a		
<i>gora</i>	nl		
<i>trxatrxbtvxc</i>	nl		
<i>grxa</i>	nl		
<i>trxagrxa</i>	Special growth requirements	Organic sulfur	Sulfate assimilation
<i>trxagsha</i>	Similar to <i>trxagrxa</i>	Similar to <i>trxagrxa</i>	Similar to <i>trxagrxa</i>
<i>trxbgsha</i>	Barely viable	DTT or anaerobic	Ribonucleotide reduction
<i>trxbgora</i>	Like <i>trxbgsha</i>	Like <i>trxbgsha</i>	Like <i>trxbgsha</i>
<i>trxatrxcgsha</i>	Unviable aerobically	DTT, anaerobiosis	Ribonucleotide reduction
<i>trxatrxcgrxa</i>	Unviable aerobically	Anaerobiosis	Ribonucleotide reduction

Mutations of both thioredoxin and GSH pathways require a source of organic sulfur for growth due to defective sulfate assimilation. For references, see text.

^anl: Normal vegetative growth.

reductase (RNR). Reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides (dNTPs) by RNR is balanced by formation of a disulfide bond in the enzyme that must be reduced for ongoing catalysis (for a review, see [15]).

Mutants lacking both *TrxA* and *GrxA* or *TrxA* and *GshA* are unviable because of a toxic accumulation of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) [16], an intermediate metabolite in sulfur assimilation (Table 1). However, this lethal phenotype is fully reversed by a high concentration of organic sulfate or by deletion of *CysA* or *CysC*, which either represses or inactivates the sulfate assimilation pathway, and therefore inhibits PAPS production. PAPS is reduced to sulfite by the action of PAPS reductase, which is itself recycled back by NADPH-dependent reduction by thioredoxin or glutaredoxin [17]. Therefore, *TrxA* or *Grx1*, but not *TrxC*, *Grx2* or *Grx3*, is adequate for reduction of PAPS reductase and sulfate assimilation (see Fig. 1).

The *trxatrxcgrxa* triple mutant is also aerobically unviable [12], but this phenotype is due to defective RNR reduction, as the anaerobic viability of the mutant strain suggests. Under anaerobiosis, *E. coli* uses an alternate RNR that requires formate as the hydrogen donor, instead of the thiol redox system [18,19]. Therefore, *TrxA*, *TrxC*, or *Grx1* but not *Grx2* and *Grx3* are required for RNR reduction. Likewise, mutants lacking *TrxB* and either *GshA* or *Gor*, or lacking or *TrxA*, *TrxC*, and *GshA* are unviable aerobically, but not anaerobically [12,14]. It is just recently that the essential function of the *E. coli* thiol redox system has been formally established by genetically suppressing the *trxatrxcgrxc* growth defect [20]. Random mutations in *Grx3*, a very poor RNR reductant (see above and Fig. 1), were selected for their ability to restore growth to the mutant strain, identifying *Grx3* mutations that increased its catalytic efficiency towards RNR reduction. Extragenic suppressors of the *trxatrxcgrxc* growth defect were also sought, revealing further insights into the interaction of *Grx3* with RNR. Three independent suppressor mutations were selected that resulted in increased expression of RNR, and which had the effect of allowing reduction of the enzyme by *Grx3*. Thus, increasing either the catalytic efficiency of *Grx3* or the abundance of its low-specificity substrate RNR, allowed sufficient reduction of RNR to rescue the growth of the *trxatrxcgrxc* strain.

Interestingly, a mutation allowing the *trxbgor* strain to grow aerobically occurs at very high frequencies. Such suppressor strain is still able to catalyze disulfide bonds in ectopically expressed AP in the cytoplasm, indicating that disulfide stress

is not lethal per se. Cloning of the suppressor mutation identified a new source of disulfide-reduction power and a surprising genetic twist. The suppressor mutation was mapped to the *ahpC* gene encoding a peroxiredoxin and is the result of a reversible expansion of a triplet nucleotide repeat sequence that convert the *AhpC* protein from a peroxidase to a disulfide reductase.

3.3. Functions of the *E. coli* thiol redox system

Biochemistry and genetics have clearly established RNR and PAPS reductase as substrates of the thiol redox systems. However, many other substrates do exist for this system (see Fig. 1), which do not show up in genetic approaches either because of lack of an overt phenotype or its masking by a dominant one. A proteome-wide biochemical identification of in vivo oxidized protein thiols in *E. coli* elegantly helped visualize an important number of known, suspected or unsuspected substrates of thioredoxin [21]. Thus, the thiol redox system is of biological importance in many other processes, as for instance in cellular detoxification pathways for various kinds of electrophiles and other toxics. In most aerobic organisms, thiol redox systems have also crucial functions in peroxide scavenging by providing the reducing power to all thiol and selenothiol-peroxidases, the peroxiredoxins and glutathione peroxidases (GPx) (see below). In contrast, *E. coli* does not carry GPx enzymes and bypasses the GSH and thioredoxin pathways by using as major peroxide-scavenging enzyme a peroxiredoxin, *AhpC*, which carries its own specific NADPH-dependent reductase *AhpF* [22,23].

4. The *S. cerevisiae* thiol redox system

The yeast thiol redox system is both very similar to the *E. coli* system, also consisting of the thioredoxin and GSH pathways, but much more complex and carrying important differences with its prokaryotic counterpart, which makes it probably closer to higher eukaryotes.

4.1. Description of thiol redox pathways

The yeast GSH pathway consists of GSH, which is synthesized by the action of γ -glutamylcysteine synthetase (*GSH1*) and glutathione synthase (*GSH2*) (for a review see [24,25]), one glutathione reductase (*GLR1*) and of two classes of glutaredoxins (Fig. 2). The catalytic center of the two dithiol glut-

aredoxins Grx1 and Grx2 consists of the CPYC motif [26,27], whereas that of the three monothiol enzymes, Grx3, Grx4 and Grx5, is CGFS [28]. Grx3 and Grx4 carry also an extra N-terminal thioredoxin domain with a WAD/EPCK motif reminiscent of the WCGPCK thioredoxin catalytic motif. *S. cerevisiae* has two thioredoxin pathways, a cytosolic one consisting of two apparently redundant thioredoxin isoforms (Trx1 and Trx2) [29] and a thioredoxin reductase (Trr1) [30], and a mitochondrial one consisting of Trx3 and Trr2 [31] that will not be dealt here.

4.2. The genetics of the *S. cerevisiae* thioredoxin pathway

Although both single and double *TRX1* and *TRX2* mutants are viable, $\Delta trx1\Delta trx2$ has an extended S phase that is not seen in either single mutant [29] (Table 2). This protracted S phase is due to inefficient RNR reduction. This has recently been established on the basis of a significant decrease of the dNTP pools [32,33], an absolute decrease of the RNR reduced form and an increase of its oxidized disulfide bond form as visualized by its *in vivo* redox state, and on the effect of the overexpression of RNR that accelerates the S phase and restores both the dNTPs pool and the abundance of the reduced RNR form [32]. Viability of $\Delta trx1\Delta trx2$ thus indicates that the GSH pathway can operate RNR reduction, but the protracted S phase also indicates that Grx1 and Grx2 are not as efficient as the thioredoxins in RNR reduction. The lethality of a quadruple mutant lacking cytoplasmic thioredoxins and dithiol glutaredoxins [34] supports the redundant role of both dithiol transferase pairs in RNR reduction, although the cause of this lethality has not been formally established. The $\Delta trx1\Delta trx2$ is also auxotroph for sulfur amino acids indicating that thioredoxin is the exclusive hydrogen donor for PAPS reductase [29]. Nevertheless growth under a very low oxygen tension relieves methionine auxotrophy [34], indicating that dithiol glutaredoxins can substitute for this function, albeit very inefficiently. $\Delta trx1\Delta trx2$ is also unable to use methionine sulfoxide as a source of organic sulfate [35] because of defective reduction of this oxidized form of methionine, is hypersensitive to peroxides [36] and has a deregulated Yap1 pathway [37,38], pheno-

types that are related to the role of thioredoxin in reducing methionine sulfoxide reductase [39,40], the yeast thiol peroxidases and Yap1 respectively (see below). A search for *in vivo* substrates of thioredoxin by purification of thioredoxin-interacting proteins and by a directed two-hybrid assay using as bait a thioredoxin mutant lacking the CGPC motif C-terminal cysteine residue that stabilizes interaction with substrates, identified PAPS reductase (Met16), the peroxiredoxins Tsa1 and Ahp1 [41] amongst a few other proteins, confirming some of the phenotypes of the thioredoxin mutant strain.

Interestingly, cells lacking cytoplasmic thioredoxin reductase [42], do not carry the cell cycle and sulfate assimilation phenotypes of $\Delta trx1\Delta trx2$ suggesting that they retain some thioredoxin activity (Spector and Toledano, unpublished observations). However, they are very slow growing [43] especially under aerobic conditions and are hypersensitive to peroxides (see below). The $\Delta trr1$ slow growth phenotype is at least in part related to toxic accumulation of oxidized thioredoxin, as deletion of both *TRX1* and *TRX2* in $\Delta trr1$ improves its growth (Spector and Toledano, unpublished observations). Thioredoxin reductases, as thioredoxin, are also required for the response to reductive stress imposed by dithiothreitol [43].

4.3. The genetics of the *S. cerevisiae* GSH pathway

A major difference with the *E. coli* system is that strains with a deleted *GSH1* and thus lacking GSH are unviable both aerobically and anaerobically, only growing with exogenously added GSH [44–46] (Table 2). GSH has thus an essential function not shared with the thioredoxin pathway. In an attempt to understand this essential function, a search for genetic suppressors of the GSH auxotrophy was conducted, only yielding mutations that restored biosynthesis of very low levels of GSH by the abduction of the proline biosynthetic pathway [47]. The cause of the essential requirement for GSH is very puzzling; it is not related to oxidative stress, or to defective DNA synthesis or sulfate assimilation or to disulfide stress [47], but at least in part to a defect in iron–sulfur cluster ([Fe–S]) assembly as detailed below. The GSH precursor γ -glutamylcysteine can substitute for GSH, although only

Table 2
Phenotypes of thiol redox system mutants in *S. cerevisiae*

Mutant	Phenotype	Rescued by	Defects
$\Delta trx1$	nl ^a		
$\Delta trx2$	nl		
$\Delta trr1$	Slow growth		
$\Delta trx1\Delta trx2$	Protracted S phase, Met auxotrophy	RNR overexpression	Sulfate assimilation, Ribonucleotide reduction
$\Delta trr1\Delta trx1\Delta trx2$	Similar to $\Delta trx1\Delta trx2$	Similar to $\Delta trx1\Delta trx2$	Similar to $\Delta trx1\Delta trx2$
$\Delta gfr1$	nl		Accumulates GSSG
$\Delta grx1\Delta grx2$	nl		
$\Delta grx1\Delta grx2\Delta trx1\Delta trx2$	Unviable		Ribonucleotide reduction
$\Delta trx1\Delta trx2\Delta gfr1$	Unviable aerobically	Anaerobic weak growth	Complex
$\Delta trr1\Delta gfr1$	Unviable aerobically		Complex
$\Delta trx1\Delta trx2\Delta gsh1$	Unviable aerobically	ND	Complex
$\Delta grx2\Delta grx5$	Unviable		Unknown
$\Delta gsh1$	GSH auxotrophy	0.5 μ M GSH	Cytoplasmic [Fe–S] assembly
$\Delta grx1\Delta grx2\Delta grx3\Delta grx4$	nl		
$\Delta grx5$	Slow growth	Grx3 and Grx4 targeted to mitochondria	Mitochondrial [Fe–S] assembly
$\Delta grx3\Delta grx4\Delta grx5$	Unviable		[Fe–S] assembly
$\Delta grx3\Delta grx4\Delta$	Slow growth		Cytoplasmic [Fe–S] assembly

^anl: Normal vegetative growth. All defect presented are hypothetical and have not been yet demonstrated experimentally. For references, see text.

partially [44,48], but not DTT or the overexpression of thioredoxin that only have the effect of delaying the time needed for exhaustion of the cellular GSH pool [47,49,50].

Glutathione reductase in contrast is totally dispensable [51], despite the essential requirement for GSH, indicating that GSSG, which accumulates in the $\Delta glr1$ strain [36], is not deleterious. *S. cerevisiae* probably carries an alternate GSH reducing system since reduced GSH represents up to 40% of the total amount of GSH in $\Delta glr1$.

The genetics of glutaredoxins is complex [27,28]. Dithiol and monothiol glutaredoxins have not only important structural differences but also distinct functions, the later sharing with GSH a function in [Fe-S] assembly (see below). Dithiol glutaredoxins presumably catalyze disulfide bond reduction, capable of replacing thioredoxin for RNR reduction, but their specific *in vivo* substrates are still unknown. The lethality of the quadruple mutant lacking both cytoplasmic thioredoxins and dithiol glutaredoxins [34] indicate that monothiol glutaredoxin cannot substitute for their dithiol counterparts. Grx5 is located in mitochondria where it fulfills its Fe-S assembly function whereas Grx3 and Grx4 fulfill a related function in the cytoplasm. All single glutaredoxin genes mutants are viable, but $\Delta grx5$ has a unique slow growth phenotype with respect to the other mutants [28]; it is unable to respire, and accumulates iron and oxidized proteins at very high levels, phenotypes linked to the function of Grx5 in [Fe-S] assembly. A strain lacking all glutaredoxins but Grx5 is viable demonstrating the importance of this enzyme, but strains lacking Grx5 together with either Grx2 or Grx3 and Grx4 are lethal. These data suggest that Grx5 has at least two essential functions; one of them, the nature of which is unknown, can be rescued by Grx2 and the other, presumably related to [Fe-S] assembly is rescued by either Grx3 or Grx4. A strain lacking both Grx3 and Grx4 is also unviable [52,53], demonstrating that the function of the cytoplasmic monothiol glutaredoxin is as important as that of their mitochondrial counterpart. Thus, monothiol glutaredoxins probably can, but only partially, substitute for each other in their respective [Fe-S] assembly function.

4.4. Genetic interplay between the thioredoxin and glutathione pathways

The existence of a functional overlap between the two branches of the thiol redox system is difficult to establish, because, unlike *E. coli*, ribonucleotide reduction is not the only unique function that makes the system essential. Further yeast does not have as *E. coli* an anaerobic RNR that bypasses the thiol redox system. As mentioned above, the GSH pathway can, albeit inefficiently, substitute for the thioredoxin pathway in RNR reduction, explaining the unviable phenotype of the quadruple mutant lacking both thioredoxins and both dithiol glutaredoxins [34]. However, the GSH pathway has also an exclusive essential function in [Fe-S] assembly unrelated to thiol redox homeostasis. Furthermore, as detailed below and unlike *E. coli*, the thioredoxin pathway has a prominent role in peroxide catabolism that is not properly compensated by the GSH pathway, probably explaining that in strains with an inactivated thioredoxin pathway, the GSH redox state becomes significantly oxidized [36,43], which might impinge on its essential function. In fact, for these reasons all mutants with inactivation of both pathways are unviable probably due to

collapse of multiple essential defects in RNR reduction, [Fe-S] assembly, and disulfide stress (Table 2). The essential requirement of *GLR1* in a strain lacking thioredoxin ($\Delta trx1\Delta trx2$) [36] is the unique situation in which the lethal defect can be ascribed to disulfide stress, because of the growth rescue of the strain under anaerobiosis. This might indicate that in the absence of thioredoxin, reduced GSH can and becomes critically required to compensate for the defect of thioredoxin in peroxide catabolism, and conversely that in the absence of glutathione reductase, thioredoxin is needed for direct or indirect reduction of GSH.

4.5. The yeast thioredoxin pathway has a prominent role in peroxide catabolism

Cells are permanently exposed to reactive oxygen species that are produced during respiration or that originate from exogenous sources. Both superoxide dismutases and catalases, which scavenge the superoxide anion and H_2O_2 , respectively, have an autocatalytic mechanism, whereas thiol- and selenothiol-peroxidases require a reducing power to scavenge peroxides provided by either the thioredoxin or the GSH pathways. Which of the GSH or the thioredoxin pathways assist the scavenging of peroxides in yeast?

Yeast has two thiol-peroxidases family enzymes (for a review see [54]). The peroxidoredoxins (Prxs) consists of five isoenzymes (Tsa1, Tsa2, Ahp1, nTpx, and mTpx) that are strictly dependent upon thioredoxin for reduction of peroxides [30]. The GPx-like Gpx1, Gpx2, and Gpx3 enzymes are also strictly thioredoxin-dependent despite their name [55,56]. Peroxides oxidize the methionine residue to the methionine sulfoxide form that is catalytically reduced by methionine sulfoxide reductase (MSR), which forms a catalytic disulfide that is reduced by thioredoxin [57,58]. Thus, the two *S. cerevisiae* MSRs, MsrA also known as Mxr1 and MsrB, must also be considered as peroxide-reducing enzymes that are strictly thioredoxin-dependent. Likewise, the Yap1 transcriptional regulator of the yeast peroxide response, which is activated by peroxides by oxidation and deactivated by reduction by thioredoxin [37,38], must also be considered. It thus appears that, based on biochemical activities, the thioredoxin pathway has a prominent role in peroxide metabolism in yeast, as it exclusively assists the major peroxide-metabolism pathways. What about the GSH pathway?

GSH cannot react with peroxides *in vivo* because of its very low reactivity towards these compounds [59] and do not participate in peroxide scavenging by GSH-dependent GPx enzymes due to lack of these enzymes in yeast. Nevertheless, GSH may indirectly participate to this metabolism by forming S-glutathionylated adducts with protein-sulfenic acids formed by oxidation of thiols with peroxides, thereby protecting them from irreversible oxidation to the sulfinic or sulfonic acid forms. This activity might be significant given the abundance of this redox-active tripeptide in the cell, in the mM range, as suggests the increase in the GSSG levels and in the glutathionylation of gluceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and of other protein thiols in cells exposed to H_2O_2 [60,61]. The glutaredoxins Grx1 and Grx2 have been reported to act as peroxide-reducing enzymes [62], by a GSH-S-transferase mechanism involving GSH, glutathione reductase and the Yef1 vacuolar ATP-dependent GS-X pump. However, the modest catalytic efficiency ($K_{cat}/K_m = 2-6 \times 10^4 M^{-1} S^{-1}$) together with a high

K_m for the substrate in the mM range [62] suggest that these enzymes act as minor peroxidases and only when the intracellular peroxide concentration is very high.

Tolerance phenotypes correlate with biochemical data also pointing to a predominant role of the thioredoxin pathway in H_2O_2 metabolism. Although inactivation of the thioredoxin [36,63,64] or GSH [44,45,47,65] pathways lead to peroxide sensitivity, mutants of the former pathway are much more severe phenotypes [64]. In fact, whereas the thioredoxin pathway, by being actively involved in H_2O_2 catabolism, is critically required for growth in the presence of H_2O_2 , the GSH pathway seems important for survival upon an acute H_2O_2 challenge [47], in keeping with its suggested redox buffer function.

The prominent role of the thioredoxin pathway in H_2O_2 metabolism is also suggested by a proteomic analysis of oxidized protein thiols [66]. This study showed that the *S. cerevisiae* cytoplasm contains as much as 200 proteins carrying one or more oxidized cysteine residue. Surprisingly, the oxidized protein thiols proteome of strains lacking either the thioredoxin or the GSH pathways were strikingly different. Thioredoxin pathway mutants had both a specific increase in the oxidation of many proteins and the appearance of newly oxidized proteins. Many of these oxidized proteins were H_2O_2 -metabolizing enzymes such as Tsa1, Tsa2, Ahp1, Ntpx, Gpx2, and Mxr1, suggesting an important role of the thioredoxin pathway in H_2O_2 metabolism. Interestingly, all new oxidized spots corresponded to proteins expected to be oxidized according to their function, ruling out random disulfide bond formation that could have potentially resulted from inactivation of the thioredoxin pathway. In contrast, inactivation of the GSH pathway led to a general decrease of protein oxidation that was not modified by exogenous H_2O_2 , and which was interpreted as reflecting the irreversible oxidation of protein thiols, which might have occurred due to the lack of GSH, in keeping with its general redox buffer function.

4.6. Is the essential function of the yeast GSH pathway related to iron metabolism?

In contrast to prokaryotes, GSH is essential for growth in *S. cerevisiae* and also in all eukaryotes where its requirement has been looked at. Identifying the essential biological process (es) in which this redox-active tripeptide takes part is a major biological question but also a long-standing puzzle.

One answer to this question may lie in the cellular [Fe-S] clusters biogenesis machinery and iron homeostasis. Chronologically, the first hint to the function of GSH in iron metabolism was the observation that GSH depletion elicits a specific defect in the maturation of cytoplasmic [Fe-S] proteins and to iron cellular accumulation of [67], and reciprocally cells with a defect in cytoplasmic Fe-S protein maturation accumulate GSH [68]. The second hint came from the phenotypes of the $\Delta grx5$ that associates defective mitochondrial [Fe-S] proteins assembly, cellular iron accumulation and the inability to respire [69]. Suppression of the $\Delta grx5$ phenotypes by overexpression of two genes involved in [Fe-S] cluster-protein biogenesis indicated that Grx5 operates as part of this machinery. The actual role of Grx5 is not yet elucidated but could possibly be to facilitate the transfer of clusters preassembled on the Isu1/2 scaffold proteins onto acceptor proteins [70]. A third, and probably the major piece of this jigsaw puzzle is a recent discovery tying together monothiol glutaredoxins and GSH into the same molecular process in [Fe-S] metabolism [71–

74]. Dithiol mammalian mitochondrial Grx2 [72,73] and poplar cytoplasmic glutaredoxin C1 [71] holoenzymes exist as dimers bridged by a [2Fe-2S] cluster that is ligated by the catalytic cysteines of the two glutaredoxins of the dimer and unexpectedly by the cysteines of two GSH molecules. A glycine residue located right after the first catalytic Cys residue is crucial for poplar Grx-C1 to assemble a [Fe-S] cluster. The presence of a conserved glycine residue in the CGFS motif of yeast monothiol glutaredoxins together with the lack of a role of the Grx-C1 second active-site Cys residue strongly suggest that Grx3, Grx4 and Grx5 are all able to incorporate [Fe-S] clusters [74]. The last important recent discovery is the role of both GSH and the redundant nucleocytoplasmic monothiol glutaredoxins Grx3 and Grx4 in iron sensing by the Aft1 transcriptional regulator of iron homeostasis [52,53,75]. Aft1 indirectly senses iron through the cellular [Fe-S] biogenesis status [75–78], and is thus activated when [Fe-S] biogenesis decreases as a result of either cellular iron depletion or a crippled [Fe-S] biogenesis machinery. Lack of either GSH or both Grx3 and Grx4 lead to a constitutive activation of Aft1 under iron repletion conditions, indicating that they are probably needed to signal to Aft1 the [Fe-S] biosynthetic status [52,53].

How can these data be drawn into a unifying model? It is first important to consider some basics of the biosynthesis of [Fe-S] proteins. The mitochondrion is required for maturation of both mitochondrial and cytoplasmic [Fe-S] proteins (for a review, see [79]). Maturation of cytoplasmic [Fe-S] proteins further requires the mitochondrial export of an as yet unidentified component and the recently discovered cytoplasmic [Fe-S] assembly system termed CIA [80–86]. Further the mitochondrial export of the elusive component requires the mitochondrial inner membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter Atm1, the ERO1-related mitochondrial intermembrane space FAD-sulfuryl oxidase Erv1p, and GSH. The elusive component is probably translocated through ATM, but the function of both Erv1 and GSH in this process is unknown. Interestingly, Erv1 has recently been shown to function together with Mia40 in a thiol redox relay that constitutes a specific IMS import machinery [87].

A speculative model of this pathway is proposed (Fig. 3), which is based on the existence of the suspected GSH-ligated [Fe-S] cluster of yeast monothiol glutaredoxins that might serve as [Fe-S] shuttles within and outside mitochondria. It thus supposes that all functions of GSH and monothiol Grxs in iron metabolism are shared through a unique function. In mitochondria, a GRx5-GSH [Fe-S] cluster would transfer [Fe-S] cluster from Isu1/2 scaffold proteins onto acceptor proteins, and from mitochondria onto GSH-Grx3 or GSH-Grx4 in the cytoplasm, thus constituting, at least part of both the missing exported component of the CIA machinery, and the signal alerting to Aft1 the mitochondrial [Fe-S] biogenesis status. The lack of defective mitochondrial [Fe-S] biogenesis in GSH depleted cells is against an [Fe-S] assembly function of GSH in mitochondria [75], but in the cells used in these assays, traces of mitochondrial GSH might have remained in amounts sufficient to perform this essential function. The combined role of GSH, Grx3, and Grx4 is strongly suggested by the importance of the GSH-binding pocket of glutaredoxins in the ability of the later to signal to Aft1 [52]. The functions of GSH and monothiol Grx suggested here might underlie their essential requirement for yeast viability because [Fe-S] biogenesis is essential for life [79].

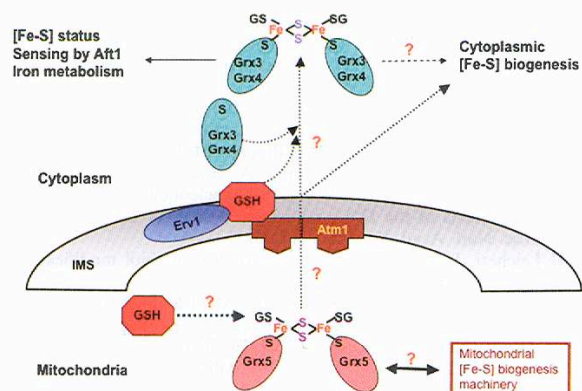


Fig. 3. A speculative model of the function of glutathione and monothiol glutaredoxin in iron-sulfur assembly in yeast. The model is based on the hypothetical existence of GSH-ligated [Fe-S] cluster of yeast monothiol glutaredoxins that might serve as [Fe-S] shuttles within and outside mitochondria. [Fe-S] clusters are synthesized by the mitochondrial [Fe-S] biosynthetic machinery and transferred to acceptor proteins. Mitochondria export an unknown component emanating from the [Fe-S] biogenesis machinery, which requires the mitochondrial inner membrane transporter, Atm1, the mitochondrial intermembrane space (IMS) protein Erv1, GSH and an intact [Fe-S] machinery. This unknown component, which is needed both for [Fe-S] status sensing by Aft1 and for cytoplasmic [Fe-S] assembly, might involve at least in part the hypothetical Grx-GSH-ligated [Fe-S] complexes. In mitochondria, a GRx5-GSH [Fe-S] cluster could also be involved in the transfer of [Fe-S] cluster from Isu1/2 scaffold proteins onto acceptor proteins. For references and further explanations, see text.

5. Comparison of the *E. coli* and yeast thiol redox systems

In *E. coli* the thioredoxin and GSH pathways are functionally redundant and therefore not essential individually (Fig. 1). They also operate in a virtually identical manner, using electrons from NADPH to reduce by a thiol-disulfide exchange mechanism catalytic disulfide bonds, some of which are essential as in RNR and other are not as in PAPS reductase, and to prevent the occurrence of unwanted disulfide bonds. Redundancy is presumably due to the fact that each pathway can substitute for the other for important or essential functions, which raises the question of why does *E. coli* carry two so closely related systems. Notwithstanding, substrate-specificity exists within and between these branches (see Fig. 1); specificity is established through the use of sets of terminal thioltransferases, the thioredoxins and glutaredoxins, which differ from each other by their abundance, redox potential and affinities towards substrates. Remarkably, the *E. coli* thiol redox system is only essential under aerobiosis, and this is uniquely due to its need for RNR reduction and DNA synthesis. It is dispensable under anaerobiosis provided an exogenous source of organic sulfate, and this dispensability is not due to relieve of the low levels oxidative stress of aerobic growth, but to a switch to anaerobic RNR that uses an alternate reducing power source. Disulfide stress, or the accumulation of unwanted disulfide bonds, is fully compatible with life but might impinge to some degrees on the essential role of the thiol redox system under extreme conditions.

Although consisting of a GSH and thioredoxin pathways and fulfilling many of the same functions, the *S. cerevisiae* thiol redox system is clearly different from that of *E. coli*. The two branches of this system are both critically required under both aerobiosis and anaerobiosis and are not functionally redundant, each having preferred or exclusive targets some of which are critical for life. Thus, the *S. cerevisiae* thioredoxin is the preferred reductant of RNR and PAPS reductase and has a prominent role in H_2O_2 metabolism with regard to the GSH pathway. The GSH pathway provides the redox buffering function of GSH, the biological importance of which is not yet clearly established in yeast. More importantly this pathway has been abducted to operate an essential function in [Fe-S] metabolism totally distinct from thiol redox control, thus providing what could be a [Fe-S] shuttle constituted by monothiol glutaredoxins and GSH. Whether a similar function of GSH and glutaredoxin exist in prokaryotes is possible in view of the functional complementation of the yeast $\Delta grx5$ strain by the *E. coli* monothiol Grx4 [88], a protein of yet no known function that carries the CGSF of poplar Grx-C1 [8].

6. Conclusions

The thiol redox system appears as a highly efficient proton-shuttle system that helps cell to domesticate the oxidizing power of O_2 , but because of its intrinsic reactivity it can also become a double-edge sword under some circumstances, leading to unwanted redox reactions. Its role in vivo has been established mainly by the effect of inactivating one or more of its components. However, genetics is necessarily fraught with caveats. Unviability, which is often seen in the genetics of thiol redox control pathways lead to insoluble biological cul-de-sacs, as in the case of the biochemical functions of the GSH pathway. The caveats are also in the interpretation of data, because removing a thiol redox component of one of the two pathways will necessarily perturb the overall thiol redox control equilibrium of the cell. However, such perturbations also suggests the interdependence between the GSH and thioredoxin pathways, especially in yeast in which these pathways are non-redundant. The dynamic interplay between redox systems has not been clearly established because of the cited experimental difficulties, but might be important especially under oxidative stress, conditions under which a very important load is applied on the system. A dynamic interplay necessarily exists as suggested by the presence of an oxidized GSH redox ratio in mutants of the thioredoxin pathway [43]. The activation the unfolded protein response (UPR) of the ER in these same mutants [89] also suggest an interplay between cytoplasmic thiol redox control and the process of oxidative protein folding in the ER. Note also that GSH has an important function in regulating the thiol redox balance in the lumen of the ER and hence the functionality of the Ero1-dependent oxidative protein folding pathway that has not been considered here. In this cell compartment, GSH acts as a load against oxidation by Ero1 [90], and as recently shown is also required for feedback redox regulation of Ero1 activity [91]. The effects of inactivating the thioredoxin pathway on the activation of the UPR could thus be mediated by GSH, the absolute levels of which are significantly increased in these mutants and that is present in both compartments unlike thioredoxin.

The yeast thiol redox system is thus much more complex than its prokaryotic counterpart, and probably represents a very good model of this system in higher eukaryotes. The yeast model should thus be useful to begin to rationalize the lethal phenotypes associated with the mouse knock-outs of thioredoxin 1 [92], thioredoxin 2 [93], mitochondrial and cytoplasmic thioredoxin reductases [94,95] and γ -glutamyl synthase [96], and the defect of monothiol glutaredoxin 5 in human and the zebra fish that leads to defective heme synthesis, anemia and iron overload [97,98].

References

- [1] Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M.E., Hudemann, C. and Lillig, C.H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1375–1377.
- [2] Ritz, D. and Beckwith, J. (2001) Roles of thiol redox pathways in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 21–48.
- [3] Vlamis-Gardikas, A. and Holmgren, A. (2002) Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Method Enzymol.* 347, 286–296.
- [4] Laurent, T.C., Moore, E.C. and Reichard, P. (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 239, 3436–3444.
- [5] Rietsch, A. and Beckwith, J. (1998) The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu. Rev. Genet.* 32, 163–184.
- [6] Aslund, F., Ehn, B., Miranda-Vizuete, A., Pueyo, C. and Holmgren, A. (1994) Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9813–9817.
- [7] Holmgren, A. (1976) Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2275–2279.
- [8] Fernandes, A.P., Fladvad, M., Berndt, C., Andresen, C., Lillig, C.H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A. and Vlamis-Gardikas, A. (2005) A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 280, 24544–24552.
- [9] Molina, M.M., Belli, G., de la Torre, M.A., Rodriguez-Manzanique, M.T. and Herrero, E. (2004) Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* 279, 51923–51930.
- [10] Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E., Gustafsson, J. and Spyrou, G. (1997) Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 272, 30841–30847.
- [11] Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D. and Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262, 1744–1747.
- [12] Stewart, E.J., Aslund, F. and Beckwith, J. (1998) Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* 17, 5543–5550.
- [13] Debarbieux, L. and Beckwith, J. (1998) The reductive enzyme thioredoxin 1 acts as an oxidant when it is exported to the *Escherichia coli* periplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10751–10756.
- [14] Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272, 15661–15667.
- [15] Kolberg, M., Strand, K.R., Graff, P. and Andersson, K.K. (2004) Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1699, 1–34.
- [16] Russel, M., Model, P. and Holmgren, A. (1990) Thioredoxin or glutaredoxin in *Escherichia coli* is essential for sulfate reduction but not for deoxyribonucleotide synthesis. *J. Bacteriol.* 172, 1923–1929.
- [17] Thomas, D., Barbey, R. and Surdin-Kerjan, Y. (1990) Gene-enzyme relationship in the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Study of the 3'-phosphoadenylylsulfate reductase structural gene. *J. Biol. Chem.* 265, 15518–15524.
- [18] Mulliez, E., Ollagnier, S., Fontecave, M., Eliasson, R. and Reichard, P. (1995) Formate is the hydrogen donor for the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8759–8762.
- [19] Eklund, H., Uhlin, U., Farnegardh, M., Logan, D.T. and Nordlund, P. (2001) Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 77, 177–268.
- [20] Ortenberg, R., Gon, S., Porat, A. and Beckwith, J. (2004) Interactions of glutaredoxins, ribonucleotide reductase, and components of the DNA replication system of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7439–7444.
- [21] Leichert, L.I. and Jakob, U. (2004) Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biol.* 2, e333.
- [22] Seaver, L.C. and Imlay, J.A. (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 7173–7181.
- [23] Seaver, L.C. and Imlay, J.A. (2001) Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 7182–7189.
- [24] Penninckx, M. (2000) A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 737–742.
- [25] Toledano, M.B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D. and Azevedo, D. (2003) Oxidative stress responses in yeast, in: *Topics in Current Genetics. Yeast Stress Responses* (Hohmann, S. and Mager, W.H., Eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 241–303.
- [26] Gan, Z.R. (1992) Cloning and sequencing of a gene encoding yeast thioltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 949–955.
- [27] 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.
- [28] Rodriguez-Manzanique, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A. and Herrero, E. (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19, 8180–8190.
- [29] Muller, E.G. (1991) Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 266, 9194–9202.
- [30] Chae, H.Z., Chung, S.J. and Rhee, S.G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* 269, 27670–27678.
- [31] Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J.A., Wright, A.P. and Spyrou, G. (1999) Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 6366–6373.
- [32] Camier, S., Ma, E., Leroy, C., Pruvost, A., Toledano, M. and Marsolier-Kergoat, M.C. (2007) Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1008–1016.
- [33] Koc, A. and Merrill, G.F. (2007) Checkpoint deficient rad53-11 yeast cannot accumulate dNTPs in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 527–530.
- [34] Draculic, T., Dawes, I.W. and Grant, C.M. (2000) A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 36, 1167–1174.
- [35] Mousaheb, N., Thomas, D., Verdoucq, L., Monfort, P. and Meyer, Y. (1998) In vivo functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3312–3317.
- [36] Muller, E.G. (1996) A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol. Biol. Cell* 7, 1805–1813.
- [37] Delaunay, A., Isnard, A.D. and Toledano, M.B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* 19, 5157–5166.
- [38] 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.
- [39] Hanbauer, I. and Moskovitz, J. (2006) The yeast cytosolic thioredoxins are involved in the regulation of methionine sulfoxide reductase A. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1391–1396.

- [40] Moskovitz, J., Berlett, B.S., Poston, J.M. and Stadtman, E.R. (1997) The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9585–9589.
- [41] Vignols, F., Brehelin, C., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D. and Meyer, Y. (2005) A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16729–16734.
- [42] Machado, A.K., Morgan, B.A. and Merrill, G.F. (1997) Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 17045–17054.
- [43] Trotter, E.W. and Grant, C.M. (2003) Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *EMBO Rep.* 4, 184–188.
- [44] Grant, C.M., MacIver, F.H. and Dawes, I.W. (1996) Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 29, 511–515.
- [45] Stephen, D.W. and Jamieson, D.J. (1996) Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 207–212.
- [46] Wu, A.L. and Moye-Rowley, W.S. (1994) GSH1, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell Biol.* 14, 5832–5839.
- [47] Spector, D., Labarre, J. and Toledano, M.B. (2001) 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.
- [48] Grant, C.M., MacIver, F.H. and Dawes, I.W. (1997) Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide γ -glutamylcysteine. *Mol. Biol. Cell* 8, 1699–1707.
- [49] Lee, J.C., Straffon, M.J., Jang, T.Y., Higgins, V.J., Grant, C.M. and Dawes, I.W. (2001) The essential and ancillary role of glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* analysed using a grande gsh1 disruptant strain. *FEMS Yeast Res* 1, 57–65.
- [50] Sharma, K.G., Sharma, V., Bourbouloux, A., Delrot, S. and Bachhawat, A.K. (2000) Glutathione depletion leads to delayed growth stasis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of a partially overlapping role for thioredoxin. *Curr. Genet.* 38, 71–77.
- [51] Collinson, L.P. and Dawes, I.W. (1995) Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. *Gene* 156, 123–127.
- [52] Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J.C., Lill, R. and Winge, D.R. (2006) Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281, 17661–17669.
- [53] Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogueas, A. and de la Torre-Ruiz, M.A. (2006) Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* 119, 4554–4564.
- [54] Toledano, M.B., Delaunay, A., Monceau, L. and Tacnet, F. (2004) Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trend Biochem. Sci.* 29, 351–357.
- [55] Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J. and Toledano, M.B. (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471–481.
- [56] Tanaka, T., Izawa, S. and Inoue, Y. (2005) GPX2 encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*
- [57] Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M. and Branlant, G. (2005) The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 231–238.
- [58] Stadtman, E.R., Moskovitz, J., Berlett, B.S. and Levine, R.L. (2002) Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol. Cell Biochem.* 234–235, 3–9.
- [59] Winterbourn, C.C. and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 322–328.
- [60] Grant, C.M., Perrone, G. and Dawes, I.W. (1998) Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 893–898.
- [61] Shenton, D. and Grant, C.M. (2003) Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 374, 513–519.
- [62] Collinson, E.J., Wheeler, G.L., Garrido, E.O., Avery, A.M., Avery, S.V. and Grant, C.M. (2002) The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* 277, 16712–16717.
- [63] Carmel-Harel, O., Stearman, R., Gasch, A.P., Botstein, D., Brown, P.O. and Storz, G. (2001) Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 39, 595–605.
- [64] Garrido, E.O. and Grant, C.M. (2002) Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol. Microbiol.* 43, 993–1003.
- [65] Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A. (1995) Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 368, 73–76.
- [66] Le Moan, N., Clement, G., Le Maout, S., Tacnet, F. and Toledano, M.B. (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 10420–10430.
- [67] Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R. and Kispal, G. (2002) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J. Biol. Chem.* 277, 26944–26949.
- [68] Kispal, G., Csere, P., Guiard, B. and Lill, R. (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett.* 418, 346–350.
- [69] Rodriguez-Manzanera, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J. and Herrero, E. (2002) Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* 13, 1109–1121.
- [70] Muhlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N. and Lill, R. (2003) Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* 22, 4815–4825.
- [71] Feng, Y., Zhong, N., Rouhier, N., Hase, T., Kusunoki, M., Jacquot, J.P., Jin, C. and Xia, B. (2006) Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site. *Biochemistry* 45, 7998–8008.
- [72] Johansson, C., Kavanagh, K.L., Gileadi, O. and Oppermann, U. (2007) Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria. *J. Biol. Chem.* 282, 3077–3082.
- [73] Lillig, C.H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lonn, M.E., Hudemann, C., Bill, E. and Holmgren, A. (2005) Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8168–8173.
- [74] Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S.K., Hirasawa, M., Gualberto, J.M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D.B., Georgiou, G., Hase, T., Johnson, M.K. and Jacquot, J.P. (2007) Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7379–7384.
- [75] Rutherford, J.C., Ojeda, L., Balk, J., Muhlenhoff, U., Lill, R. and Winge, D.R. (2005) Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 10135–10140.
- [76] Belli, G., Molina, M.M., Garcia-Martinez, J., Perez-Ortin, J.E. and Herrero, E. (2004) *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *J. Biol. Chem.* 279, 12386–12395.
- [77] Chen, O.S., Hemenway, S. and Kaplan, J. (2002) Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12321–12326.
- [78] Chen, O.S., Crisp, R.J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D.R. and Kaplan, J. (2004) Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 29513–29518.
- [79] Lill, R. and Muhlenhoff, U. (2005) Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trend Biochem. Sci.* 30, 133–141.

- [80] Gerber, J., Neumann, K., Prohl, C., Muhlenhoff, U. and Lill, R. (2004) The yeast scaffold proteins Isu1p and Isu2p are required inside mitochondria for maturation of cytosolic Fe/S proteins. *Mol. Cell Biol.* 24, 4848–4857.
- [81] Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. and Lill, R. (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* 18, 3981–3989.
- [82] Lange, H., Kaut, A., Kispal, G. and Lill, R. (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron–sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1050–1055.
- [83] Muhlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J.T., Sipos, K., Kispal, G. and Lill, R. (2004) Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 36906–36915.
- [84] Balk, J., Pierik, A.J., Netz, D.J., Muhlenhoff, U. and Lill, R. (2004) The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron–sulfur proteins. *EMBO J.* 23, 2105–2115.
- [85] Balk, J., Aguilar Netz, D.J., Tepper, K., Pierik, A.J. and Lill, R. (2005) The essential WD40 protein Cial is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron–sulfur protein assembly. *Mol. Cell Biol.* 25, 10833–10841.
- [86] Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W. and Walden, W.E. (2003) A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe–S cluster assembly. *EMBO J.* 22, 4826–4835.
- [87] Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. and Herrmann, J.M. (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121, 1059–1069.
- [88] Molina-Navarro, M.M., Casas, C., Piedrafita, L., Belli, G. and Herrero, E. (2006) Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. *FEBS Lett.* 580, 2273–2280.
- [89] Trotter, E.W. and Grant, C.M. (2002) Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 46, 869–878.
- [90] Cuozzo, J.W. and Kaiser, C.A. (1999) Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat. Cell Biol.* 1, 130–135.
- [91] Sevier, C.S., Qu, H., Heldman, N., Gross, E., Fass, D. and Kaiser, C.A. (2007) Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell* 129, 333–344.
- [92] Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J. and Taketo, M.M. (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.* 178, 179–185.
- [93] Nonn, L., Williams, R.R., Erickson, R.P. and Powis, G. (2003) The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol. Cell Biol.* 23, 916–922.
- [94] Conrad, M., Jakupoglu, C., Moreno, S.G., Lippl, S., Banjac, A., Schneider, M., Beck, H., Hatzopoulos, A.K., Just, U., Sinowatz, F., Schmahl, W., Chien, K.R., Wurst, W., Bornkamm, G.W. and Brielmeier, M. (2004) Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol. Cell Biol.* 24, 9414–9423.
- [95] Jakupoglu, C., Przemek, G.K., Schneider, M., Moreno, S.G., Mayr, N., Hatzopoulos, A.K., de Angelis, M.H., Wurst, W., Bornkamm, G.W., Brielmeier, M. and Conrad, M. (2005) Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol. Cell Biol.* 25, 1980–1988.
- [96] Dalton, T.P., Dieter, M.Z., Yang, Y., Shertzer, H.G. and Nebert, D.W. (2000) Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 324–329.
- [97] Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S. and Iolascon, A. (2007) The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*, in press.
- [98] Wingert, R.A., Galloway, J.L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J.L., Weber, G.J., Dooley, K., Davidson, A.J., Schmid, B., Paw, B.H., Shaw, G.C., Kingsley, P., Palis, J., Schubert, H., Chen, O., Kaplan, J. and Zon, L.I. (2005) Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe–S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 436, 1035–1039.

C.Publication n°3: Chapitre à paraître dans le livre «Methods in Molecular Biology»

Protein-thiol oxidation, from single proteins to proteome-wide analyses

Natacha Le Moan, Frédérique Tacnet and Michel B. Toledano

Abstract

Protein-thiol oxidation subserves multiple biological functions, from enzymatic catalysis, to protein oxidative folding, protein trafficking, reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species sensing and signaling and more generally protein redox regulation. Protein-thiol oxidation may also constitute a sequel of ROS and RNS toxicity. Accurate and robust methods aimed at monitoring the *in vivo* redox state of cysteine residues are thus warranted. To this aim, we have developed biochemical approaches that rely on trapping cysteine residues in their *in vivo* redox state using acidic conditions, followed by the differential labelling of reduced versus oxidized cysteine residues by thiol-specific reagents. These methods have been instrumental in the discovery of eukaryotic peroxide receptors and new ROS-scavenging enzymes, and in identifying the repertoire of cytoplasmic oxidized protein thiols. Proteome-wide approaches also contributed to establish the functions of the thioredoxin and glutathione (GSH) pathways in eukaryotic cytoplasmic thiol-redox control.

Key words: reversible cysteine oxidation, redox regulation, cysteine acid trapping, redox proteomics, ROS sensing and signalling, H₂O₂

1. Introduction

The amino acid cysteine has unique chemical properties endowing it with the ability to engage in a wide variety of redox reactions and to coordinate metals. These properties make cysteine a key residue in enzymatic catalysis, protein oxidative folding and trafficking, ROS and RNS sensing and signaling (Forman et al., 2004; Jacob et al., 2003; Nathan, 2003). Its unique properties also make this residue vulnerable to the reaction with and modifications by a wide spectrum of electrophiles, especially ROS and RNS, potentially leading to protein-loss of function.

The cysteine residue exists *in vivo* in the fully reduced free thiol form (-SH or -S⁻) and in different oxidation forms, the thiyl radical (-S[•]), the disulfide bond (Cys-S-S-Cys), the sulfenic (-SOH), sulfinic (SO₂H) and sulfonic (-SO₃H) acid forms, and the S-nitrosylated form (-S-NO) (Poole et al., 2004). Cysteine-thiyl radical and cysteine-sulfenic acid are very unstable because of their highly reactive nature and thus cannot be easily identified biochemically. In contrast, cysteine-sulfinic and sulfonic

acid are irreversible forms of protein oxidation, although the cysteine-sulfinic acid that forms in peroxiredoxins is enzymatically retro-reduced by sulfiredoxin (Biteau et al., 2003; Woo et al., 2003). Disulfide bonds are relatively stable, reversing to the reduced state by thiol-disulfide exchange with kinetics depending on the protein context and the redox nature of the milieu. Disulfide bonds can be formed catalytically by specific thiol oxidases systems, such as the oxygen-dependent FAD-sulfhydryl oxidases Ero1 (Tu and Weissman, 2002) and Erv1 that drive ER-protein oxidative folding during ER secretion and intermembrane mitochondrial space protein import respectively (Mesecke et al., 2005). Disulfide bonds can also form upon reaction of thiols with peroxide or RNS, as for instance at the reactive cysteine residues of thiol-based peroxidases and of redox sensors (Forman et al., 2004; Linke and Jakob, 2003; Toledano et al., 2004). Disulfide bonds are formed as part of the catalytic cycle of specific enzymes such as ribonucleotide reductase (Camier et al., 2007b). In the cytoplasm, disulfide bonds are also often found in the form of mixed disulfides between protein-thiols and GSH or S-thiolation. Protein S-thiolation emanates from the condensation between reduced GSH and oxidized protein thiols in the thiol or sulfinic acid forms that have been formed by reaction with peroxides and other intracellular oxidants. S-thiolation protects these oxidized cysteine residues from further oxidation and may also regulate the function of specific proteins (Ghezzi, 2005). Two potent NADPH-dependent thiol-reducing systems, the thioredoxin and glutathione (GSH) pathways are present in the cytoplasm that assists protein-thiol reduction (Toledano et al., 2003). Establishing the *in vivo* redox state of cysteine residues is thus an important task given the many important cellular responses that rely on cysteine redox modifications.

During cell breakage, reduced cysteine residues can undergo oxidation by O₂-derived H₂O₂ and, conversely, oxidized residues can be reduced by thiol-disulfide exchange with cellular reductases, potentially making difficult to evaluate their true *in vivo* redox state. Acidic quenching of thiol groups can circumvent this problem (see **Note 1**). Acid quenching is best achieved by breaking cells in the presence of trichloroacetic acid (TCA) (pH < 1), which also precipitates soluble cellular proteins. TCA-based acidic quenching is common to and the first step of the methods presented here (see figure 1). Basically, the methods presented rely for most of them on the principle of sequential labeling of reduced versus oxidized cysteine residues. Cysteine-specific reagents used for labeling thiol are derived from the alkylating agents iodoacetamide (IAM) or *N*-ethylmaleimide (NEM) and include the high molecular weight alkylating agents AMS and Mal-PEG, ¹⁴C-radiolabeled- (Le Moan et al., 2006; Leichert and Jakob, 2004) and fluorescent-IAM and -NEM (Baty et al., 2005; Maeda et al., 2004). The thiol-reagent HPDP attaching to cysteine residues through a disulfide linkage is also commonly used in fusion with a biotin moiety (Jaffrey and Snyder, 2001). The redox forms that are accessible to analysis by these techniques are disulfide bonds, whether intra or intermolecular, including S-thiolation and the sulfinic and sulfonic acid forms. Cysteine residues in the sulfinic acid form are very difficult to identify due to their very unstable nature, although some researchers have succeeded in this task, relying either on the exclusive reduction of the sulfinic acid by sodium arsenite (Saurin et al., 2004) or on its reaction with specific chemicals such as dimedone (Poole et al., 2005).

2. Materials

2.1. Cell culture and cell lysis

1. CASA medium: 6.7 g/l Yeast Nitrogen Base (Fisher) without amino acids, 20 g/l glucose (Sigma), 1 g/l casamino acids (Fisher). Adenine, tryptophan or uracil (5 g/l) are added as required.
2. Trichloroacetic acid (TCA, VWR): 500 g are dissolved in 227 ml of water to obtain a 100% solution (stored at 4°C).
3. H₂O₂ (Sigma): 30 % w/w in H₂O stored at 4°C
4. Acid-washed glass-beads 425-600 μm diameter (Sigma)
5. Acetone (VWR) stored at 4°C
6. Centrifuge (Sigma 3K10)

2.2. Sequential labeling of oxidized protein thiols

1. Denaturing buffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8.8 for labeling by [¹⁴C]NEM and biotin-HPDP and pH 9 or 7.5 for fluorescent-dye labeling, 10 mM EDTA, 8 M urea, 4% CHAPS. Filter on 0.2 μm and store at -20°C.
2. Iodoacetamide (IAM, Sigma), 50 mM final concentration, is added extemporaneously.
3. Dithiotreitol (DTT, Sigma), 20 mM, is added extemporaneously.
4. In the qualitative approach, N-(6-(Biotinamido)Hexyl)-3'-(2'-Pyridylthio)Propionamide (Biotin-HPDP, Pierce) is dissolved at 50 mM in DMSO, and used at 0.5 mM final concentration.
5. In the quantitative approach, 1 mCi (27 mM) N-[Ethyl-1-¹⁴C]-maleimide (NEM) at 37.5 mCi/mmol (Perkin Elmer) is dissolved in 2 ml DMSO and stored at -80°C until use (2 mM final concentration).
6. For fluorescent labeling, 1 mg of maleimide DYE680 or maleimide DYE780 (Dyomics) was added to 100 μl of DMSO. The stock solution was stored in the dark at -20°C.
7. AMS is 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, disodium salt
8. Thermomixer comfort (Eppendorf)

2.3. Purification of oxidized protein thiols (biotin-HPDP-labeled)

1. Protein concentration is measured using the Micro BCA assay reagent kit (Pierce).
2. Affinity beads: Sepharose CL-4B (Sigma) and Streptavidine-Sepharose High Performance (Amersham Biosciences) are stored at 4°C. Beads are pre-washed 3 times in water and 3 times in binding buffer, immediately before use.
3. Binding buffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 4 M urea, 2% CHAPS
4. Washing buffer n^o1: 25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1 M NaCl, 8 M urea, 4% CHAPS
5. Washing buffer n^o2: 25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 8 M urea, 4% CHAPS
6. Elution buffer: 7 mM Tris, 8 M urea, 4% CHAPS
7. Tumbling device

2.4. Bi-dimensional gel electrophoresis: first dimension

1. Rehydration solution: 8 M urea, 4% CHAPS, 20 mM DTT, 1% immobilized pH gradient buffer, bromophenol blue (0.05% w/v)
2. pH 3-10 non-linear Immobiline DryStrip gels (18 cm), regular strip holders (18 cm), IPGphor Isoelectrofocusing unit and IPG buffer 3-10 nonlinear are from Amersham Biosciences.
3. RNase A (Sigma) (10 mg/ml, i.e., 100X concentrated, stored at -20°C) is added to prevent interferences with eventual residual RNAs

2.5. Bi-dimensional gel electrophoresis: second dimension

1. Equilibration buffer: 2% SDS, 6 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 30% glycerol, bromophenol blue. This buffer is either supplemented with 50 mM DTT or 100 mM IAM, as indicated in the Methods section.
2. Electrophoresis buffer (10X): 250 mM Tris, 1.92 M glycine, 1% SDS
3. Stabilizing strip buffer: 0.5% (w/v) agarose in electrophoresis buffer
4. Thirty percent acrylamide/0.4% bis solution (Interchim) (stock solution, stored at 4°C), 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 10% SDS (0.45 μ m filtered)
5. Ammonium Persulfate (APS) (Sigma), 10% solution in water stored at -20°C and N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED, Sigma)
6. 2-isopropanol (Fluka) stored at room temperature
7. Prestained molecular weight marker (Benchmark, Invitrogen)
8. Ettan DALTsix 1mm Gelcaster, electrophoresis unit and electrophoresis power supply (EPS 601) are from Amersham Biosciences.
9. Laemmli buffer 3X: 150 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6% SDS, 30% glycerol, 0.1% bromophenol blue (stored at room temperature)

2.6. Detection of labeled protein thiols

1. Speed-Vacuum concentrator
2. Slab gel dryer (Hofer)
3. Proteins are fixed in fixation buffer (5:1:5 : 5 volumes of water, 5 volumes of ethanol, 1 volume of acetic acid) and stained with Coomassie brilliant blue R250 (Sigma) at 2.5 g/l of fixation buffer. Destain buffer is the same solution without Coomassie blue.
4. [¹⁴C]NEM-labeled extracts are exposed to general purpose Phosphor screens (Amersham Biosciences), and analyzed using a Phosphorimager with the Image Quant analysis software.
5. Fluorescent extracts are analyzed with an Odyssey infrared imaging system (Li-Cor Biosciences).

3. Methods

3.1. Methods outlines

An outline of the different methods is presented in figure 1. The first step common to all these methods involves breaking cells in the presence of TCA allowing thiol-acidic quenching, also resulting in the precipitation of soluble cellular proteins.

From there, protein-thiol alkylation by IAM, NEM or their derivatives or with other thiol-specific reagents is performed upon solubilizing TCA-precipitated proteins by increasing the pH of the solution to 7.5-9 (see **Note 1**). When applicable, differential alkylation of reduced- versus oxidized-cysteine residues is achieved, sequentially prior to and after reduction of oxidized residues using the thiol-reducing agents dithiotreitol (DTT) or β -mercaptoethanol.

3.1.1. Redox state of individual proteins *in vivo*

The following techniques rely all on the differential separation of oxidized versus reduced proteins by either sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gels electrophoresis (SDS-PAGE) or by isoelectrofocalization and on their visualization by western blot. They are thus adapted for proteins for which specific antibodies are available. They can be also applied to purified proteins that are then visualized by gel Coomassie staining.

1. Disulfide-linked protein complexes

In the simplest case, the presence of an intermolecular disulfide bond between the protein of interest and another known or unknown protein can be easily visualized by SDS-PAGE under non-reducing conditions (see figures 2A and 2B). The disulfide-linked complex will migrate at a size corresponding approximately to the sum of the size of the proteins forming this complex. Comparative migration under non-reduced and reduced conditions will establish that the change of mobility of the protein of interest observed under non-reducing conditions is the consequence of a reduction-sensitive covalent linkage, which equal to a disulfide bond. Alkylation of remaining reduced cysteine residues with IAM or NEM is absolutely required upon cysteine acid quenching to prevent oxidation of these residues during sample preparation or electrophoresis. This method not only establishes the presence of an intermolecular disulfide linkage but can also accurately quantify the proportion of the protein of interest engaged in this linkage.

2. Intramolecular disulfide bonds

The presence of an intramolecular disulfide bond may change the protein electrophoretic mobility by maintaining a packed conformation under non-reducing but otherwise denaturing conditions, especially when the cysteine residues forming the disulfide bond are distant from each other (figure 2A). In this case also, protein oxidation will be visualized by the differential mobility of the protein upon reducing versus non-reducing SDS-PAGE. Usually, the intramolecular disulfide bond makes the protein migrates faster (Delaunay et al., 2000), but the reverse situation can also be seen (Camier et al., 2007b). Here also, it is essential to covalently block the remaining reduced cysteine residues of the protein by alkylation, as discussed in 1.

3. General method for analyzing the redox state of individual proteins

More often however, the change of electrophoretic mobility imparted by an intramolecular disulfide bond is too small to be visualized by SDS-PAGE. In these cases, thiol derivatization is required using modified form of IAM or NEM that increase their molecular weight. A classic reagent that have been used in this laboratory is AMS that consist of a fusion between NEM to another small size molecule, increasing its size by 0.4 kDa, and thus causing a corresponding change of protein SDS-PAGE migration for each cysteine residue it modifies (figures 2C and 2D). MAL-PEG, a fusion between maleimide and methoxypolyethylene glycol is also often used (Makmura et al., 2001). Many other derivatives of IAM and NEM exist,

each having specific advantages. These thiol-labeling reagents can be used to label cysteine residues in their *in vivo* reduced- or oxidized-forms upon *in vitro* reduction by DTT.

4. Reagents altering proteins isoelectric points (pI)

IAM and the related compound iodoacetic acid (IAA) differ by their charge. They can be used to differentially label free reduced from oxidized protein thiols. In this case, modification of proteins by either agent is estimated by the differences of charge observed upon isoelectric focalization (Mallis et al., 2001).

3.1.2. Proteome-wide approaches

1. Oxidized protein-thiols labeling

Oxidized protein thiols can be visualized at the proteome level by differential labeling of reduced versus oxidized cysteine residues upon thiols acid trapping, followed by two-dimensional (2D) gel electrophoresis. Thiol-specific reagents that have been most commonly used are ¹⁴C-labeled IAM and NEM (Le Moan et al., 2006; Leichert and Jakob, 2004) (figure 3) allowing identification of oxidized proteins by the radioactive signal of their 2D-gels spot, also providing estimates of protein redox ratios, when accurate controls are used. Fluorescent derivatives of IAM (Baty et al., 2005), and NEM (Maeda et al., 2004), made by their fusion with fluorescent dyes, require the analysis of 2D-gels by fluorimetry (figure 4). These dyes have the virtue of providing a very accurate measure of the redox ratio of a given substrate, when dyes of different spectral emission are used to differentially label reduced and oxidized cysteine residues respectively. It should be said that these proteome-based thiol-labelling methods are fraught with a relatively high noise background likely produced by thiol-non-specific protein-adduct formation, which warrant the use of the adequate controls to subtract noise from specific signals.

2. Oxidized protein-thiols purification

HPDP is an absolute thiol-specific reagent that covalently and reversibly attaches to free thiol groups through a disulfide bridge (Jaffrey and Snyder, 2001; Le Moan et al., 2006). Labeling of oxidized protein-thiols using biotin-HPDP allows their purification by streptavidin affinity (figure 5). Elution of streptavidin-bound proteins involves reduction of the disulfide linkage between them and biotin-HPDP, using DTT. These purified proteins can then be separated by 2D gel electrophoresis, and identified by mass spectrometry. This method is only qualitative. Biotin-HPDP-modified proteins can also be recognized by streptavidin western blot. Biotin-NEM and Biotin-IAM exist and can also be used for purification of oxidized protein-thiols, or in streptavidin western blots.

3.2. Basic protocols for proteome-wide oxidized protein thiols identification

The protocol detailed here is adapted for the proteome-wide identification of protein-thiol oxidation in the single-celled eukaryote *S. cerevisiae*, using [¹⁴C]NEM as the thiol-labeling reagent. Modifications required when using other thiol-labeling reagents are indicated with reference to this protocol.

3.2.1. Acid quenching of protein thiol by TCA precipitation

1. Cells are grown in CASA medium supplemented with adenine, uracile and tryptophane (5 g/l) at 30°C (200 rpm shaking)

2. TCA is added to a 20% final concentration into 20 ml cell culture at an O.D. 0.6, which has been treated or not with H₂O₂, at concentrations between 0.2 to 1 mM (see **Note 1**)
3. The cell culture is centrifuged 5 minutes at 4000 g and at 4°C
4. The pellet is washed with 1ml of a 20% TCA cold solution
5. The sample is centrifuged 5 minutes at 4000 g and at 4°C
6. The pellet is immediately frozen in dry ice
7. 0.2 ml of a 20% TCA cold solution is added to the TCA-precipitated pellet together with 0.1 ml glass beads.
8. Cells in suspension in a 1.5 ml Eppendorf are broken by vigorous agitation on a vortex during 10 min. Agitation is repeated three or four times after samples are cooled down by incubation on ice 1 min.
9. Glass beads are brought down by gravity during a few minutes. The supernatant is collected in a 1.5 ml Eppendorf tube. The beads are washed with 0.2 ml 5% TCA cold solution, and the wash solution is added to the first supernatant.
10. After centrifugation at 13,000xg for 10 minutes at 4°C, the protein pellet is washed 3 times in 1ml of cold acetone (see **Note 2**) to remove TCA.
11. The pellet is then air-dried in a speed-vacuum during 5 minutes.
12. Steps 1-11 are identical when using fluorescent NEM or IAM instead of [¹⁴C]NEM. However, when using biotin-HPDP, the starting culture volume is 500 ml, and steps 1-11 should be adapted to this volume.

3.2.2. Protein-thiol labeling (figures 3 and 4)

1. Protein pellets are dissolved in 200 μ l denaturing buffer containing 50 mM IAM. Alkylation of free thiols is performed by a 45 minutes incubation at 30°C under constant shaking (1400 rpm) (see **Note 3**)
2. To remove aggregates, samples are centrifuged 10 minutes at 13,000xg at room temperature.
3. To remove excess of IAM, supernatants are precipitated with cold TCA at a 10% final concentration as in section 3.2.1, steps 10 and 11.
4. Dried pellets are solubilized in 200 μ l of denaturing buffer containing 20 mM of DTT. Samples are incubated 45 minutes at 30°C under shaking to allow full reduction of oxidized thiols.
5. Aggregated proteins are removed by centrifugation 10 min at 13,000xg at room temperature.
6. To remove excess of DTT, step 3 is repeated once.
7. To label oxidized thiols that have been reduced by DTT in step 4, dried pellets are dissolved in 200 μ l of denaturing buffer and incubated during 15 minutes at 30°C, after which 30 μ l (15 μ Ci) of [¹⁴C]NEM stock solution (2 mM final concentration) is added. Samples are further incubated during 15 minutes at 30°C under shaking.

8. Protein samples are then centrifuged during 10 minutes at 13,000xg at room temperature to remove aggregated proteins.
9. To remove unbound [¹⁴C]NEM, repeat steps 3 and 5
10. The dried protein pellets are dissolved in 100 μ l of denaturing buffer with shaking at 30°C.
11. After centrifugation, the concentration of the resulting supernatant is determined by the Micro BCA assay reagent kit (see **Note 4**)
12. 100 μ g of the [¹⁴C]NEM labeled proteins are then subjected to 2D-gel electrophoresis.
13. When using biotin-HPDP, buffer volumes are adapted to the starting culture volume; biotin-HPDP labeling (step 7) is performed by incubating samples during 45 min at 30°C, in the dark. Then, steps 8-10 are identical, except for the volume of denaturing buffer that should be such to optimize protein solubilization (between 500 μ l and 3 ml).
14. For fluorescent NEM thiol labeling, dyes are used at a 0.1 mM final concentration in the presence of 200 mM IAM (step 1 and/or 7). The pH of the denaturing buffer is 9 in steps 1 and 4, and 7.5 in step 7. Labeling is performed upon an incubation of 15 min at 4°C in the dark (step 7). Steps 9 and 10 are omitted. (see **Notes 5 and 6**)

3.2.3. Purification of biotin-HPDP labeled proteins (figure 5)

1. Three to five milligrams of biotin-HPDP-labeled extracts in denaturing buffer from step 11 (**3.2.2**) are diluted by addition of one volume of buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 100 mM NaCl. Extracts are then pre-cleared by incubation with 500 μ l of sepharose CL-4B beads for 3 hours at 4°C, with tumbling.
2. The sepharose beads are discarded and 500 μ l of streptavidin-sepharose beads are added to the extracts that are then incubated overnight at 4°C with tumbling.
3. The beads are washed once with 1ml of binding buffer, twice with 1 ml of washing buffer n^o1 and three times with 1 ml of washing buffer n^o2 and once with 1 ml of elution buffer (see Materials).
4. The beads are collected. Elution of biotin-HPDP-labeled proteins is achieved in 200 μ l of elution buffer containing 20 mM of DTT.
5. The proteins eluted are subjected to 2D-gel electrophoresis.

3.2.4. 2D-gel first dimension

1. 5 μ g of fluorescent NEM- or 100 μ g of [¹⁴C]NEM-labeled proteins or 200 μ l of biotin-HPDP-purified proteins are diluted to a 400 μ l final volume of IPG strip rehydration buffer (see **Note 7**). DTT is omitted from the rehydration buffer in the case of fluorescent NEM-labeled proteins (see **Note 8**)
2. Protein samples are loaded onto regular strip holders and the Immobiline DryStrip gel pH 3-10 is placed gel-side down against electrodes (see **Note 9**)
3. Mineral oil is added in the strip holder on top of the strip to prevent sample evaporation and urea crystallization.

4. Sample rehydration is performed by applying 30 V between electrodes on the IPGphor unit during 12 hours. Iso-electro-focusing (IEF) is then performed for 8 hours at 20°C with a step-and-hold program using 50 μ A per strip (1 hour at 150V, 500V, 1000V for each step and 5 hours at 8000V).

3.2.5. 2D-gel second dimension

1. The polyacrylamide solution (13% acrylamide, 25% Tris-HCl pH8.8, 1% APS) is filtered against a 0.45 μ filter before adding 1% SDS and 0.15% Temed (600 ml of solution for 6 gels).
2. The polyacrylamide solution is poured into the gel caster unit, leaving 0.5 cm space at the top for the IPG strip, and immediately overlaid with 2-propanol.
3. After polymerization, the top of the gel is washed with distilled water. Twenty μ l of the molecular-weight markers solution are applied on a piece of Whatmann of 5 mm², which is then placed at the gel upper edge on one of its two corners.
4. Isoelectrofocused IPG strips are saturated with SDS for the second dimension: they are first incubated for 15 minutes with shaking in 10 ml of equilibrating buffer supplemented with 50 mM of DTT and for 15 minutes in 10 ml of the same buffer supplemented with 100 mM of IAM. For fluorescent NEM-labeled proteins, DTT is omitted.
5. After washing the IPG strip in 1X running buffer, strips are transferred onto the upper edge of polyacrylamide gels and embedded in pre-boiled stabilizing strip buffer (40°C) (see **Note 10**).
6. The gel units are placed in the Ettan Daltsix unit containing 4 liters of 1X running buffer in the lower chamber and 800 ml of 3X running buffer in the upper chamber.
7. The SDS PAGE is run first for 30 minutes at 5 watts per gel. Migration is extended either during 18 hours at 25°C and at 1.5 watts per gel or during 5 hours at 15°C and at 17 watts per gel.

3.2.6. Labeled-proteins revelation and analyses

1. [¹⁴C]NEM-labeled and biotin-HPDP-eluted proteins 2D gels are fixed during 4 hours under constant agitation in 500 ml of fixation buffer, with one wash every hour.
2. [¹⁴C]NEM labeled proteins-2D gels are washed once in water, placed on Whatmann paper and dried in the gel dryer during 4 hours at 80°C. The dried gels are exposed in phosphor-screen cassettes during 3 weeks. ¹⁴C-signals are then analyzed on the PhosphorImager using the Image Quant analysis software.
3. Biotin-HPDP-eluted proteins-2D gels are incubated overnight in staining buffer. Oxidized proteins are visualized by de-staining gels in destain buffer. Spots of interest are excised and analyzed by mass spectrometry.
4. When using fluorescent NEM, gels are first immersed in water, then carefully placed onto the Odyssey glass screen that had been overlaid with PBS and are scanned.

3.3. Protocols for redox state analysis of individual proteins

3.3.1 Oxidation produces a visible SDS-PAGE mobility-shift (figs. 2A, 2B)

The following protocol is adapted for proteins carrying inter-molecular disulfides bonds, but may also work for those carrying intramolecular disulfide bonds.

1. Initial steps follow steps 1-11 (3.2.1).
2. The speed-vacuum dried pellet is dissolved in 50 μ l of [100 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1% SDS, 10 mM EDTA] containing 50 mM NEM or 75 mM IAM and incubated 1 hour at 37°C or 20 min at 25°C, respectively.
3. Extracts are centrifuged 10 minutes at 13,000xg.
4. The concentration of proteins in the supernatant is determined by the Micro BCA assay reagent kit. Twenty micrograms of protein extracts are dissolved in 1X Laemmli buffer without reducing agents. This amount of protein extracts has to be adapted for low abundant proteins. Samples are loaded on SDS-PAGE, migrated, and transferred on nitrocellulose membranes for western blot analysis.

3.3.2 Oxidation does not produce a visible SDS-PAGE mobility-shift (figures 2C and 2D)

The following protocol is adapted to all oxidized proteins but, in contrast to the previous one, it does not inform on the nature of the oxidation, whether, an inter- or an intramolecular disulfide bond.

All steps are performed as in 3.3.1, except that in step 2 NEM is replaced with 15 mM of AMS, and samples are incubated 2 hours instead of one.

4. Discussion

We have presented several variations of the same protocol for the monitoring of the *in vivo* redox state of proteins. Many other variations are possible depending on the biological questions. These assays have been highly valuable and reliable in our experience. They can serve establishing the oxidized to reduced ratio of a protein, which can then be used to calculate its redox potential, using the Nernst equation. Assays aimed at individual proteins not only establish the presence of a redox modification of a given protein, but have also the advantage of providing information on the nature of this modification, especially when combined to site-directed mutagenesis of cysteine residues. For example, these methods have been instrumental in diagnosing two H₂O₂-inducible redox forms of the *S. cerevisiae* Yap1 oxidative stress response regulator. These forms are an intermolecular disulfide linkage between Yap1 and a small protein identified as the glutathione peroxidase Orp1 also called Gpx3, which we showed mediate Yap1 oxidation (Delaunay et al., 2002), and the intramolecular disulfide bond of the active form of the regulator (Delaunay et al., 2000) (figure 2A). These methods also enabled to discover the function of the sulfinic acid reductase sulfiredoxin (Biteau et al., 2003), by identifying a disulfide-linked complex between this protein and its substrate the peroxiredoxins Tsa1 and Tsa2, upon purification of sulfiredoxin under non-reducing conditions (figure 2B). AMS alkylation of reduced thiols has also been instrumental in demonstrating both the *in vivo* reversibility of the sulfinic acid formed at the peroxiredoxin catalytic cysteine and the catalytic role of sulfiredoxin in reversing this cysteine oxidized form (figure 2D). Proteome-wide approaches can establish the

presence of one or more oxidized cysteine residues in a given protein, but not the nature of the oxidation. Despite this limit, the combined use of [¹⁴C]NEM-labelling (figure 3) and biotin-HPDP-based purification of oxidized proteins-thiols (figure 5) has enabled us to identify more than 60 oxidized proteins in the cytoplasm of yeast cells (Le Moan et al., 2006). This study also established striking differences in the role of the two thiol-redox control pathways glutathione and thioredoxin, with the former carrying the function of cellular thiol-redox buffer and the later having an exclusive role in peroxide catabolism. As an alternative to the proteome-wide approaches presented, the use of diagonal electrophoresis, which consists in consecutive non-reducing and reducing SDS-PAGE, allows assessing the presence of intra and inter-molecular disulfide bonds (Brennan et al., 2004; Cumming et al., 2004).

Limits to the methods presented are nevertheless present, especially with proteome-wide approaches that restrict analyses to abundant proteins ignoring most regulatory proteins, which are usually expressed at low levels. This question remains unsolved for the moment. Hence, future efforts should be spent at designing new methods allowing the detection of protein of low abundance. The use of two-dimensional difference gel electrophoresis (DIGE) (Chan et al., 2005; Marouga et al., 2005) through the labelling of thiols using thiol-reagents of different spectral emissions, allows to quantify the differences of protein-oxidation between samples, and should also help increase the coverage of proteomes when combined to mass spectrometry analysis of complex protein solutions. The proteomic analysis of oxidized protein-thiols labelled with either radioactive or fluorescent thiol-reactive reagents is also fraught with a significant level of non-specific signals, due to non-specific amino acid residues-adduct formation. Efforts should also be made towards new reagents with improved thiol specificity and capable of discriminating between disulfide bonds and irreversible forms of cysteine oxidation such as the sulfinic and sulfonic acid. Because many of the oxidized protein-thiols correspond to protein modification by S-thiolation, methods aimed at recognizing the GSH moiety in these complexes are also highly desirable.

5. Notes

1. The thiol group can engage in redox reaction only when in the thiolated (deprotonated) state ($-S^-$), which occurs when the pH of the solution $>$ pKa value of the cysteine residue. Free cysteine has a pKa of 8.3, and cysteine residues have pKa values from 4 to 10 depending on their amino acid environment. Therefore cell lysis under acidic conditions, which is best achieved using trichloroacetic acid (TCA) (pH $<$ 1), will keep cysteine residues in their protonated form thus preventing any redox modifications.
2. During acetone washing, the protein pellet should be manually brought to a powder with the help of a spatula.
3. Denaturing buffer containing urea should not be used at a temperature over 30°C, which may change protein pl.
4. A low protein concentration can be due to partial protein during the acetone wash or to low cells lysis efficiency.
5. Fluorescent dyes are of non-negligible sizes. When using these reagents, protein spot signals very often appear as doublets of slightly different molecular size (figure 4), which can be accounted by an uneven number of

modified thiols per protein. The use of dyes at concentrations that saturate protein-thiols should circumvent this problem. However this is not possible due to the price of the reagents. We therefore recommend instead using a higher concentration of IAM.

6. Alkylation temperature at 4°C decreases the non specific fluorescent labeling.
7. The presence of bromophenol blue, which migrates towards the anode, allows monitoring the quality of protein sample migration during isoelectrofusing.
8. DTT is omitted during both first and second dimension to prevent subsequent dye labeling of any remaining oxidized thiols by the dyes that are not removed in this particular procedure.
9. Air bubbles under the IPG strip should be avoided, because their perturb IEF.
10. The plastic side and not the gel side of the IPG strip must be placed against the glass plate. When placing the IPG strip on the upper edge of the SDS polyacrylamide gel, it is also recommended to avoid air bubbles.

Acknowledgments: Many thanks to Benoit Biteau for the Myc-Tsa1 western-blot, and Ludivine Monceau for the Myc-Yap1 western-blot.

References

1. Forman, H.J., Fukuto, J.M., and Torres, M. 2004. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C246-256.
2. Jacob, C., Giles, G.I., Giles, N.M., and Sies, H. 2003. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew Chem Int Ed Engl* 42:4742-4758.
3. Nathan, C. 2003. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest* 111:769-778.
4. Poole, L.B., Karplus, P.A., and Claiborne, A. 2004. Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:325-347.
5. Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M.B. 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425:980-984.
6. Woo, H.A., Chae, H.Z., Hwang, S.C., Yang, K.S., Kang, S.W., Kim, K., and Rhee, S.G. 2003. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 300:653-656.
7. Tu, B.P., and Weissman, J.S. 2002. The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 10:983-994.
8. Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., and Herrmann, J.M. 2005. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121:1059-1069.
9. Linke, K., and Jakob, U. 2003. Not every disulfide lasts forever: disulfide bond formation as a redox switch. *Antioxid Redox Signal* 5:425-434.
10. Toledano, M.B., Delaunay, A., Monceau, L., and Tacnet, F. 2004. Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* 29:351-357.
11. Camier, S., Ma, E., Leroy, C., Pruvost, A., Toledano, M.B., and Marsolier-Kergoat, M.C. 2007. Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. *Free Radic Biol Med* in press.
12. Ghezzi, P. 2005. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res* 39:573-580.
13. Toledano, M.B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., and Azevedo, D. 2003. Oxidative stress responses in yeast. In *Topics in Current Genetics. Yeast Stress Responses*. S.H.P.W.H.M. (Eds), editor. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 241-303.
14. Le Moan, N., Clement, G., Le Maout, S., Tacnet, F., and Toledano, M.B. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J Biol Chem* 281:10420-10430.
15. Leichert, L.I., and Jakob, U. 2004. Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biol* 2:e333.
16. Baty, J.W., Hampton, M.B., and Winterbourn, C.C. 2005. Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. *Biochem J* 389:785-795.

17. Maeda, K., Finnie, C., and Svensson, B. 2004. Cy5 maleimide labelling for sensitive detection of free thiols in native protein extracts: identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms. *Biochem J* 378:497-507.
18. Jaffrey, S.R., and Snyder, S.H. 2001. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* 2001:PL1.
19. Saurin, A.T., Neubert, H., Brennan, J.P., and Eaton, P. 2004. Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17982-17987.
20. Poole, L.B., Zeng, B.B., Knaggs, S.A., Yakubu, M., and King, S.B. 2005. Synthesis of chemical probes to map sulfenic acid modifications on proteins. *Bioconjug Chem* 16:1624-1628.
21. Delaunay, A., Isnard, A.D., and Toledano, M.B. 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* 19:5157-5166.
22. Makmura, L., Hamann, M., Areopagita, A., Furuta, S., Munoz, A., and Momand, J. 2001. Development of a sensitive assay to detect reversibly oxidized protein cysteine sulfhydryl groups. *Antioxid Redox Signal* 3:1105-1118.
23. Mallis, R.J., Buss, J.E., and Thomas, J.A. 2001. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. *Biochem J* 355:145-153.
24. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., and Toledano, M.B. 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111:471-481.
25. Brennan, J.P., Wait, R., Begum, S., Bell, J.R., Dunn, M.J., and Eaton, P. 2004. Detection and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis. *J Biol Chem* 279:41352-41360.
26. Cumming, R.C., Andon, N.L., Haynes, P.A., Park, M., Fischer, W.H., and Schubert, D. 2004. Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem* 279:21749-21758.
27. Chan, H.L., Gharbi, S., Gaffney, P.R., Cramer, R., Waterfield, M.D., and Timms, J.F. 2005. Proteomic analysis of redox- and ErbB2-dependent changes in mammary luminal epithelial cells using cysteine- and lysine-labelling two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* 5:2908-2926.
28. Marouga, R., David, S., and Hawkins, E. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 382:669-678.

Figure legends

Figure 1. Schematic overview of the different methods presented in this chapter.

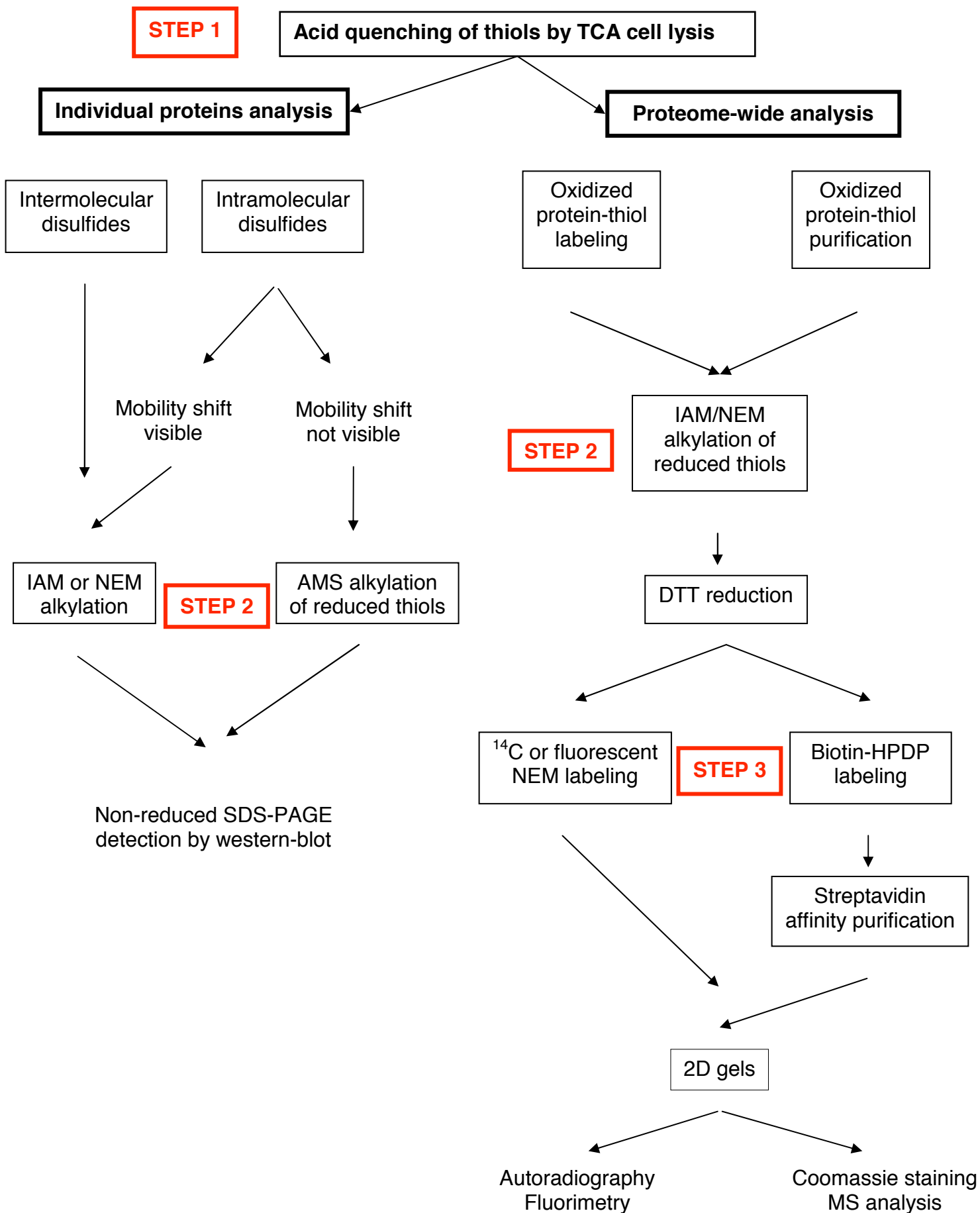
Figure 2. Analysis of the *in vivo* redox state of individual proteins. **(A)** Yeast extracts of cells expressing a Myc-tagged Yap1 and treated with H₂O₂ (400 μM) during 5 to 90 min, as indicated, were processed as described in 3.3.1. Carbamidomethylated Yap1 was analyzed by western blot with the anti-Myc antibody 9E10, revealing the Yap1-Orp1 disulfide-linked complex, the reduced protein and the protein carrying the intramolecular disulfide bonds, as indicated. **(B)** As in (A) but with cells expressing Myc-tagged Tsa1 (NEM-alkylated). Cells were treated with 500 μM of H₂O₂ during 5 to 60 minutes, as indicated. **(C)** Yeast extracts of cells expressing Protein A-tagged Trx2 that were left untreated or were treated with 300 μM of H₂O₂ during 5 minutes. Samples were processed for AMS alkylation, as described in 3.3.2. AMS alkylates both Trx2 cysteine residues in reduced protein, but does not modify the intramolecular-disulfide-bonded protein. **(D)** Detection of the overoxidized (cysteine sulfinic acid), DTT-resistant form of Tsa1-Myc. Extracts of cells expressing Myc-tagged Tsa1 are treated or not with 500 μM of H₂O₂ during 30 minutes, processed as in 3.3.2 (with a supplementary step of DTT reduction) and separated by reduced SDS-PAGE. Residues alkylated by AMS are those present *in vivo* in the reduced- and in the disulfide bond DTT-sensitive-forms, but not those in the cysteine-sulfinic acid form. Therefore, both reduced and disulfide-bond forms of Tsa1 will carry two molecules of AMS, whereas the cysteine-sulfinic acid form will carry only one molecule.

Figure 3. Oxidized protein-thiols were labeled with [¹⁴C]NEM and separated by 2D-gel electrophoresis, as described in 3.2.2. Exponentially growing wild-type yeast cells were either left untreated or were treated during 1 min with 1 mM H₂O₂. The glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH or Tdh3) and the peroxiredoxin Ahp1 increase in oxidation upon H₂O₂ treatment.

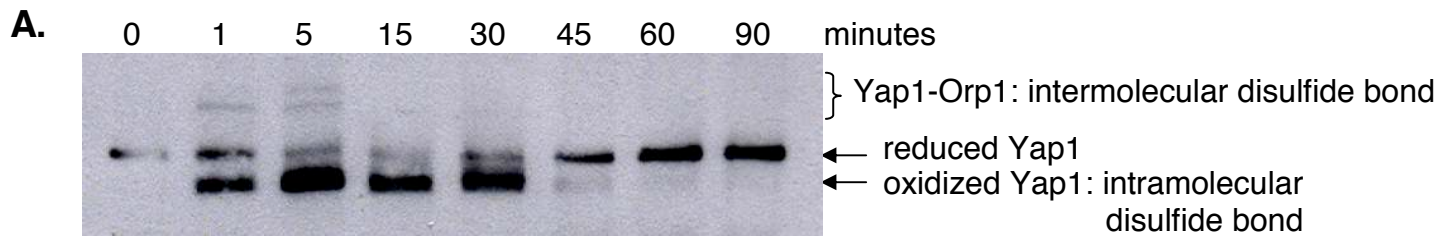
Figure 4. 2D-gel electrophoresis of reduced and oxidized protein-thiols differentially labeled with fluorescent dyes of distinct emission wavelengths, as described in 3.2.2. Reduced thiols were first labeled with the NEM derivative DYE680 (red). Then, after their reduction by DTT, oxidized thiols were labeled with DYE780 (green). Red and green signal overlap appears in yellow. The gel on the left corresponds to untreated cells. Pdi1 and Sod1 are here fully oxidized and appear therefore in green. The gel on the right corresponds to cells treated with 1 mM of H₂O₂ during 2 min. The green signals which appeared on the right gel correspond to protein-thiols oxidized by H₂O₂.

Figure 5. 2D-gel electrophoresis of oxidized protein-thiols purified using biotin-HPDP, as described in 3.2.2 and 3.2.3. Typical profiles of oxidized protein-thiols purified from wild type cells that were: **(A)** left untreated, or **(B)** treated with 1 mM of H₂O₂ during 1 minute, or **(C)** purified from cells lacking both cytoplasmic thioredoxins.

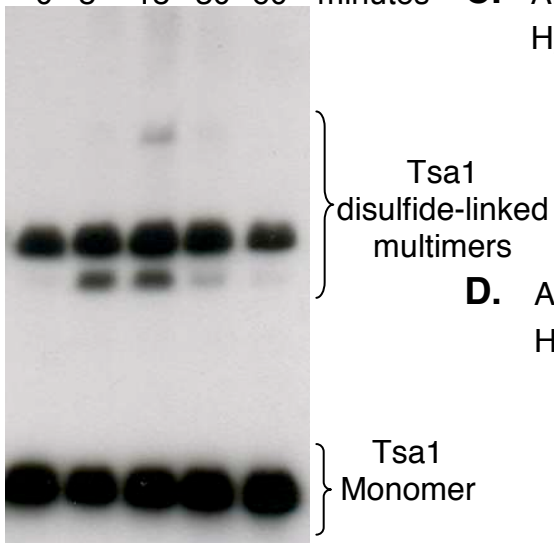
Arrows indicate proteins that show an increased oxidation upon H_2O_2 treatment or upon inactivation of the thioredoxin pathway. **(D)** A control experiment showing the thiol-specificity of the biotin-HPDP-based purification procedure: Tdh3 cannot be purified when lacking its two cysteine-residues. A strain with inactivation of the TDH3 gene was transformed with plasmid expressing a Myc-tagged version of Tdh3 (left gel) or Myc-Tagged Tdh3 in which the two cysteines were replaced by serine residues (right gel). The region of gel where Tdh3 migrates was blown up.



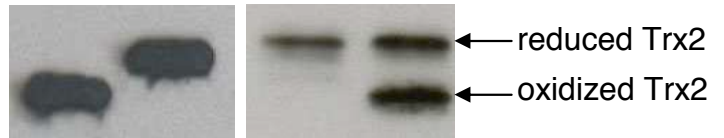
Le Moan *et al.*, figure 1



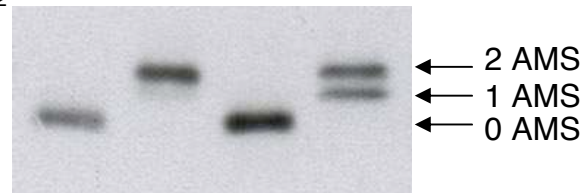
B. 0 5 15 30 60 minutes



C. AMS - + + +
H₂O₂ - - - +

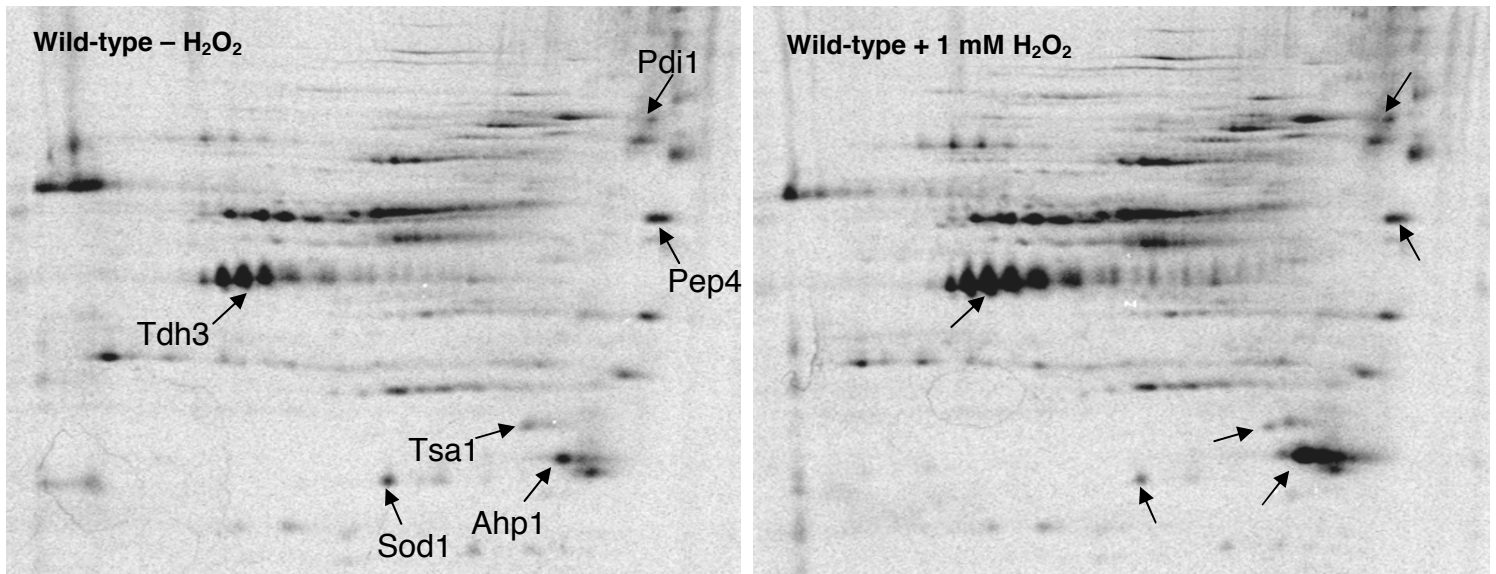


D. AMS - + - +
H₂O₂ - - + +

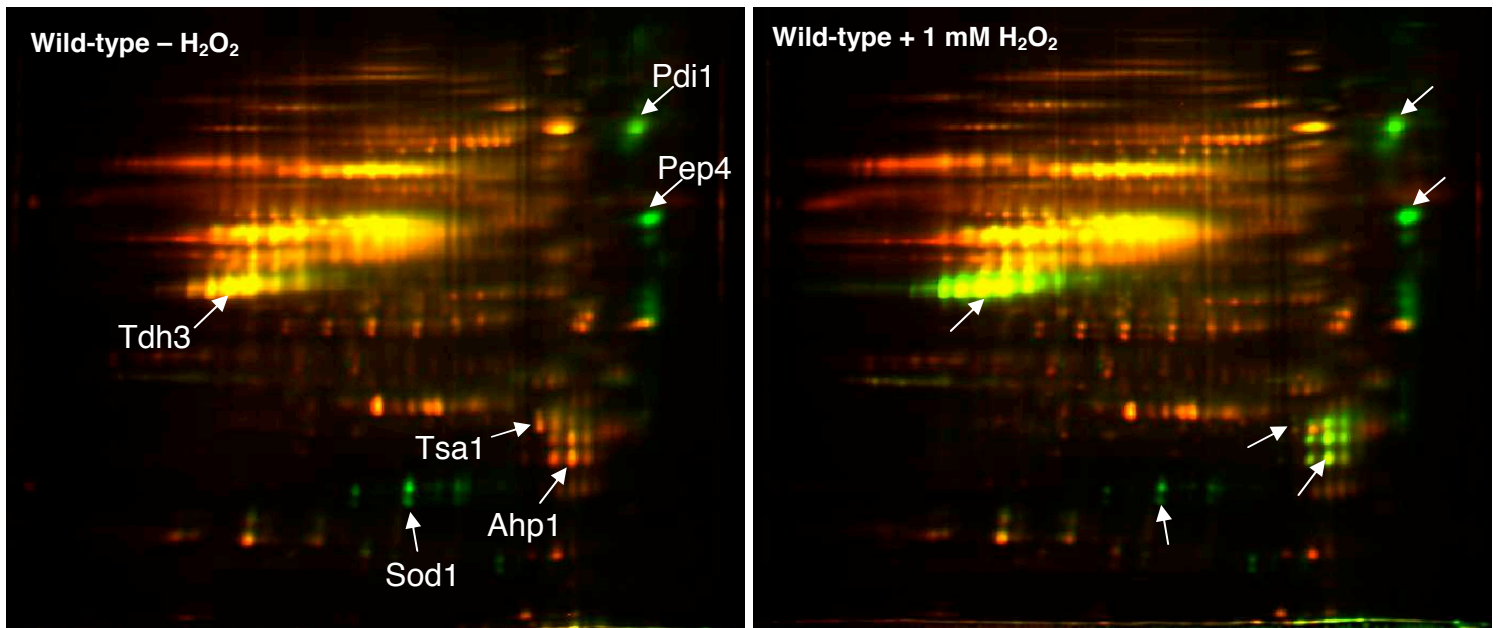


1 AMS= overoxidized Tsa1

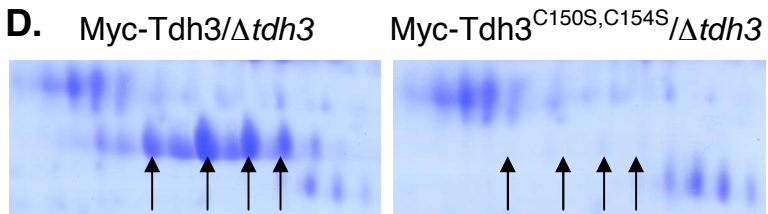
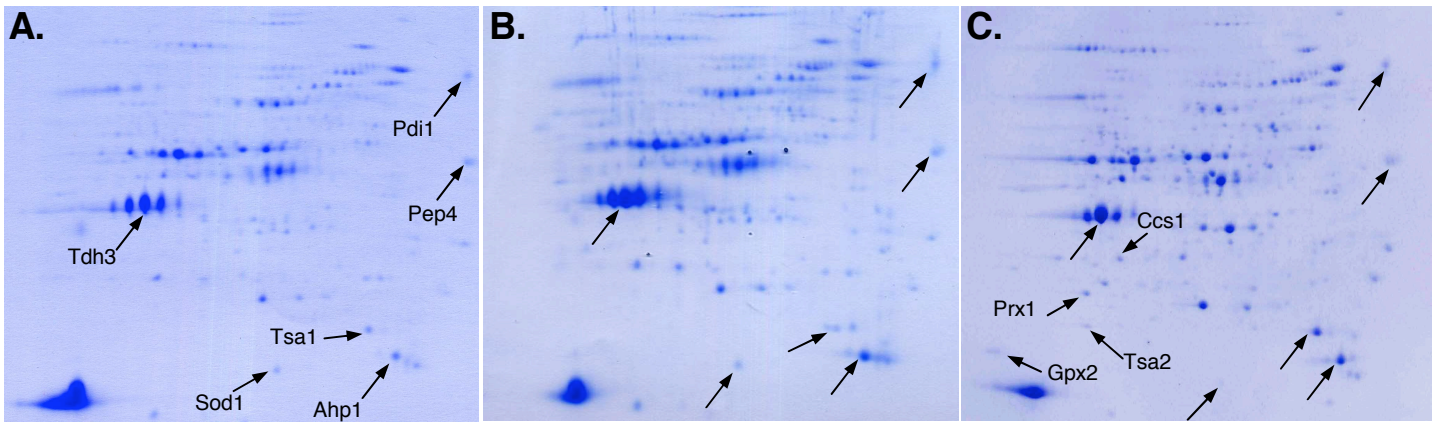
Le Moan *et al.*, figure 2



Le Moan *et al.*, figure 3



Le Moan *et al.*, figure 4



Le Moan *et al.*, figure 5

Approches globales de l'état redox du résidu cystéine

Le métabolisme de l'oxygène conduit à la formation d'espèces chimiques oxydantes, capables de provoquer l'oxydation de nombreux composants cellulaires, dont les résidus cystéines des protéines. L'oxydation du résidu cystéine est contrôlée par un système de réduction composé de deux branches distinctes, appelées la voie des thioredoxines et la voie du glutathion. Ces deux voies utilisent la chimie redox du soufre de la cystéine pour réduire les cystéines oxydées, avec des électrons fournis par le NADPH. Notre travail a consisté à étudier l'état d'oxydation des résidus cystéines de la cellule et la contribution respective des mécanismes opérant le contrôle de l'état redox des thiols. Pour cela, nous avons exploité les approches génétiques chez *S.cerevisiae*, et les avons couplés à une approche protéomique d'identification des thiols oxydés. Ce travail nous a permis d'identifier de nombreuses protéines cytoplasmiques portant un ou plusieurs résidus cystéine oxydés et d'établir une différence frappante entre les voies des thioredoxines et du glutathion dans le contrôle de l'état redox des thiols intracellulaires. Au cours de notre travail, nous nous sommes également intéressés à la superoxyde dismutase, une protéine cytoplasmique, que nous avons identifié comme oxydée constitutivement. Nous avons étudié le mécanisme d'oxydation de Sod1, et avons observé que celui-ci semble se dérouler dans l'espace intermembranaire mitochondrial et fait intervenir une oxydase spécifique des thiols.

Mots-clés: thioredoxines, glutathion, peroxydes, état redox des thiols, protéomique quantitative et qualitative, superoxyde dismutase, levure

Global approaches of redox state of cysteine residue

Aerobic metabolism generates reactive oxygen species that oxidize cellular components, like protein cysteine residues. Two efficient electron flow pathways, the thioredoxine and the glutathione pathways, that catalyze thiol reduction, control cysteine oxidation. These two pathways use the sulfur redox chemistry to reduce oxidized cysteines with electrons provided by NADPH. We studied the redox state of cysteine residues and the respective contribution of the thioredoxine and glutathione pathways in thiol redox control. Thus, we combined *S.cerevisiae* genetic approaches to proteomic identification of oxidized protein thiols. These analyze revealed numbered oxidized cytoplasmic proteins, which contain one or more oxidized thiol, and established contrasted functions between thioredoxine and glutathione pathways in intracellular thiol redox control. We also focus on constitutively oxidized cytoplasmic protein: the superoxide dismutase. We studied this protein oxidation mechanism, that seems to be catalyzed in intermembrane space of mitochondria by specific oxidase.