



HAL
open science

**Les peroxydases à thiol, relais dans la signalisation
cellulaire redox associée au peroxyde d'hydrogène :
mécanismes moléculaires responsables de la spécificité
de l'activation du facteur de transcription Yap1 chez
Saccharomyces cerevisiae**

Antoine Bersweiler

► **To cite this version:**

Antoine Bersweiler. Les peroxydases à thiol, relais dans la signalisation cellulaire redox associée au peroxyde d'hydrogène : mécanismes moléculaires responsables de la spécificité de l'activation du facteur de transcription Yap1 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0270 . tel-01754563

HAL Id: tel-01754563

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754563>

Submitted on 30 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Antoine BERSWEILER**

**Les peroxydases à thiol, relais dans la signalisation
cellulaire redox associée au peroxyde d'hydrogène :
Mécanismes moléculaires responsables de la
spécificité de l'activation du facteur de transcription Yap1
chez *Saccharomyces cerevisiae***

Le 9 décembre 2015

Membres du jury :

| | | |
|---------------|------------------------|--|
| Rapporteurs : | Jean-François COLLET | Professeur, Université catholique de Louvain, Brussels |
| | Kai TITTMANN | Professeur, Georg-August-Universität, Göttingen |
| Examineurs : | Jacques MAGDALOU | Directeur de recherche, CNRS, Nancy |
| | Michel TOLEDANO | Directeur de recherche, CEA, Saclay |
| | Sophie RAHUEL-CLERMONT | Chargée de recherche, CNRS, Nancy, Directeur de thèse |
| | Hortense MAZON | Maître de conférence, Université de Lorraine, Nancy, Co-directeur de thèse |

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Antoine BERSWEILER**

**Les peroxydases à thiol, relais dans la signalisation
cellulaire redox associée au peroxyde d'hydrogène :
Mécanismes moléculaires responsables de la
spécificité de l'activation du facteur de transcription Yap1
chez *Saccharomyces cerevisiae***

Le 9 décembre 2015

Membres du jury :

| | | |
|---------------|------------------------|--|
| Rapporteurs : | Jean-François COLLET | Professeur, Université catholique de Louvain, Brussels |
| | Kai TITTMANN | Professeur, Georg-August-Universität, Göttingen |
| Examineurs : | Jacques MAGDALOU | Directeur de recherche, CNRS, Nancy |
| | Michel TOLEDANO | Directeur de recherche, CEA, Saclay |
| | Sophie RAHUEL-CLERMONT | Chargée de recherche, CNRS, Nancy, Directeur de thèse |
| | Hortense MAZON | Maître de conférence, Université de Lorraine, Nancy, Co-directeur de thèse |

« Lorsque tu fais quelque chose, sache que tu auras contre toi, ceux qui voudraient faire la même chose, ceux qui voulaient le contraire, et l'immense majorité de ceux qui ne voulaient rien faire. »

Confucius

Remerciements

Mon parcours de doctorant étant sur le point de se conclure, le moment est venu de remercier ici les personnes qui m'ont accompagné de près comme de loin dans cette aventure qui, pour moi, a avant tout été une extraordinaire aventure humaine.

Mes premiers remerciements sont destinés à Mme **Christiane Branlant**, Directeur de Recherche émérite au CNRS, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire AREMS (ex-UMR 7214 CNRS-UHP). Je remercie M. **Guy Branlant**, Professeur émérite à l'Université de Lorraine (UL), qui m'a accordé sa confiance en m'acceptant dans son équipe Enzymologie Moléculaire et Structurale. Je tiens également à le remercier pour nos nombreuses discussions, au cours desquelles il m'a fait part de son expertise enzymatique, de son avis critique toujours constructif et de sa forte expérience de la recherche. Je remercie aussi la nouvelle direction du laboratoire IMoPA (UMR 7365 CNRS-UL), M. **Jean-Yves Jouzeau**, Professeur à l'UL et Praticien Hospitalier et M. **Bruno Charpentier**, Professeur à l'UL, qui m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Je tiens à remercier également les nouveaux responsables de l'équipe Enzymologie Moléculaire et Structurale, **Kira Weissman** et **Sandrine Boschi Muller**, toutes deux Professeurs à l'UL.

Je remercie ensuite ma directrice et ma co-directrice de thèse, Mme **Sophie Rahuel-Clermont**, Chargé de Recherche au CNRS, et Mme **Hortense Mazon**, Maître de conférence à l'UL, pour leur encadrement et leur rigueur scientifique. Je les remercie également pour leurs qualités humaines regroupant disponibilité, patience et implication. La confiance qu'elles ont su m'accorder a été l'un des éléments majeurs qui a fait de moi le scientifique que je suis aujourd'hui. Ces quatre années et demie de collaboration (une année d'ATER + trois années de thèse + six mois de stage de M2) ont été riches en rebondissements institutionnels avec un déménagement de l'ex-AREMS à l'actuel Biopôle et une refonte d'université, mais surtout riches en rebondissements expérimentaux, avec l'épisode de la méthode d'étude cinétique par compétition et la caractérisation tardive des complexes par microcalorimétrie.

La suite de mes remerciements est adressée aux membres de mon jury, qui ont accepté de lire ce manuscrit et de juger mon travail. Merci à M. **Kai Tittmann**, Professeur Docteur à l'Université Georg-August de Göttingen, rapporteur de ce travail, que j'ai eu l'occasion de rencontrer lors de mon premier congrès scientifique international, Trends in enzymology 2012. J'espère que ce doctorat me permettra de garnir la fontaine « Gänseliesel » d'un nouveau bouquet. Merci à M. **Jean-François Collet**, Professeur à l'Université catholique de Louvain, rapporteur de ce travail, qui m'a accompagné pendant mes trois années de thèse en tant que membre de mon comité de suivi. Merci à M. **Jacques Magdalou**, Directeur de Recherche émérite au CNRS, de m'avoir également accompagné au même titre. Vos regards extérieurs ont contribué au bon avancement de ce projet. Enfin, je tiens à remercier M. **Michel Toledano**, Directeur de Recherche CEA Saclay au laboratoire Stress Oxydant et Cancer (LSOC), pour ses nombreuses contributions directes et indirectes, et pour son expertise du sujet qui a été le mien pendant plus de quatre ans.

Ces remerciements sont destinés à toutes les personnes sans qui la partie résultats de ce manuscrit se résumerait à seulement quelques lignes. Je remercie de nouveau Mme **Sandrine Boschi Muller** et M. **François Talfournier**, Maître de conférence à l'UL, pour leur accompagnement et leurs conseils sur les techniques de cinétiques rapides « stopped flow » et « quenched flow ». En particulier, j'ai apprécié votre aide lors de ma mésaventure avec la valve de chargement de l'appareil de « quenched flow », qui a été remplacée dans l'instant, me permettant de finir l'acquisition de ma série de points. Ce fut un plaisir de travailler dans ces conditions. Je remercie M. **Alexandre Kriznik** pour sa participation essentielle à la mise au point des conditions de production et de purification des protéines recombinantes et à l'étude des interactions protéine/protéine par microcalorimétrie au sein du service commun de biophysicochimie des interactions moléculaire de l'UL (SCBIM). Je tiens également à le remercier tout particulièrement pour son assistance de tous les instants à la paillasse,

Remerciements

son expertise de la biochimie, ses nombreux conseils toujours avisés et impartiaux, et pour nos très nombreuses discussions (de stratégie expérimentale, bien entendu !). Merci à M. **Arnaud Gruez**, Maître de conférence à l'UL, pour son aide cruciale dans les expériences de diffusion dynamique de la lumière qui m'ont permis d'améliorer la solubilité de la protéine Ybp1 et de définir une solutions tampon commune adaptée aux protéines recombinantes, indispensable à cette étude cinétique. Merci à Mme **Sabrina Hecht** qui, en plus d'assurer la fonctionnalité et l'entretien du parc d'appareil de chromatographie Äkta du laboratoire, m'a mis en relation avec M. **Jean-Marc Alberto** du laboratoire nGERE (UMR 954 Inserm), qui m'a formé à l'utilisation d'un appareil de chromatographie liquide haute pression Ultimate®3000 (Dionex) et m'a ainsi évité quelques 500 injections manuelles. L'aide qu'il m'a apportée et sa réactivité à la suite d'un (léger) incident technique ont été capitales dans l'avancement de mon projet, et je le remercie pour cela. Je remercie également Mme **Sandrine Gulberti**, Maître de conférence à l'UL, et membre de l'équipe 1 du Biopôle, pour les essais préliminaires de ces manipulations (réalisés sur une chaîne Water quelque peu capricieuse au moment des faits) ainsi que pour ses précieux conseils et son expertise de ces approches. Pour conclure avec les personnes du Biopôle, je remercie M. **Jean-Baptiste Vincourt** pour les analyses par spectrométrie de masse MS/MS réalisées au sein de la plateforme de protéomique du Biopôle, de nouveau Mme **Sophie Rahuel Clermont** et Mme **Hortense Mazon** respectivement pour l'étude des interactions protéine/protéine par anisotropie de fluorescence et pour toutes les analyses de spectrométrie de masse de type électrospray accomplies au service commun de spectrométrie de masse et des techniques chromatographiques couplées (UMR 7565 CNRS-UL), et M. **Marc Quinternet** pour les analyses préliminaires par RMN de Orp1^{15N} (SCBIM).

Je tiens ensuite à remercier nos collaborateurs. Merci à M. **Benoît d'Autreaux**, Chercheur au laboratoire stress oxydant et cancer (LSOC, CEA Saclay) qui m'a fait parvenir généreusement les plasmides qui ont servi à produire les protéines recombinantes, ainsi que des échantillons purifiés des protéines Orp1^{CCS} et Yap1^{SCC^{CCC}}. Je tiens également à le remercier pour les échanges que l'on a pu avoir directement et indirectement et pour son expertise du sujet. Je remercie pour leur implication **Johann Stojko**, avec qui j'ai eu l'occasion de partager trois jours d'analyse (intensive !) des interactions protéine/protéine par spectrométrie de masse native au laboratoire de spectrométrie de masse bio-organique (LSMBO), et Mme **Sarah Cianferani** en sa qualité de Responsable du laboratoire et de Chercheur à l'Université de Strasbourg.

Cette série de remerciements serait incomplète sans citer les personnes qui ont contribué à faire de cette aventure, une aventure humaine. Merci à **Sévérine Boutserin**, la reine des commandes et la sainte patronne de la réserve, merci à **Valérie Igel**, la sainte patronne des enzymes de restriction et la reine du style, merci à **Jocelyne Charbonnel**, la sainte patronne de la cuisine et des douze litres de milieux LB (Merci pour ton aide !) et merci à **Hélène le Cordier**. Votre bonne humeur quotidienne et nos longues discussions (pas totalement scientifiques) ont été encourageantes et salvatrices. Merci à l'ensemble des secrétaires du Biopôle, avec en particulier **Valérie Gobert**, **Ghislaine Charpentier** et **Christine Aussenac** qui m'ont aidé à de nombreuses reprises dans mes démarches administratives et m'ont sorti de quelques mauvais pas. Je tiens également à remercier tous mes collègues et ami(e)s, doctorants et docteurs, les ancien(ne)s comme les actuel(le)s. Bosser dans cette atmosphère d'humour potache et d'entraide constante fut un réel plaisir. Vous avez placé la barre très haut. Je remercie **Thibault Annaval** (Alias le Vosgien) pour son humour et ses nombreuses imitations (dont l'emblématique de Dickkenek « je me suis fait carjaquer, je n'ai rien su faire »), **Abbas El Sahili** pour ses conseils expérimentaux judicieux, et nos pauses à la « House of Cards » pendant cette semaine de congrès à Paris, **Jean-Christophe Lec** (dit le blond), pour son soutien lors de mes premiers pas au « quenched flow », **Jonathan Dorival**, pour sa gentillesse de tous les instants, **Arnaud Paul** (le BG à la barbe rousse) pour nos nombreux délires et sa bonne humeur et **Benoît Bragantini**, pour son Champagne. Avec eux, **Florent Canonico**, tu seras très bien

entouré pour reprendre le flambeau. Merci également aux post-docs pour leurs retours d'expériences, **Omar Rifi** et **Jack l'English**, merci à toi pour ces longues soirées de manip dans une ambiance plutôt (voir très) décontracté. Ensuite, je tiens à remercier tous les anciens, mes compagnons de galère qui ont connu l'ex-laboratoire AREMS (et ses pigeons). Je remercie **Marouane Libiad**, pour tout ce qu'il m'a apporté (à quand le prochain NY trip ?) et **Areck Rybicki** pour nos craquages épiques sur les sons d'Inna dans l'ex-salle de purification. Merci à **Samia Boukhenouna** pour toutes nos conversations perso et scientifiques, chacun devant un appareil en pleine manip'. Merci à **Thomas Clément** pour ses blagues et ses jeux de mots toujours, souvent (parfois voire rarement) bien sentis, pour ses talents de cordon bleu et pour tout le reste. Enfin, merci à **Baptiste Fischer** (ou Monsieur Binouse, avec un grand B s'il vous plaît), **Raphaël Bchini**, **Audrey Vautrin** (oh ! une patate !), **Anne Savoye**, **Alexandra Huttin**, **Benjamin Rothe** et **Valentin Vautrot**.

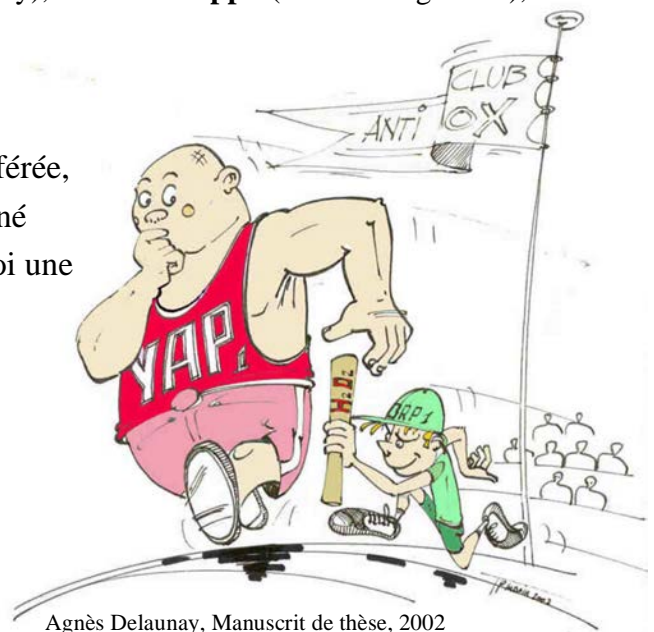
Je remercie également les doctorants et les tout nouveaux Docteurs du deuxième étage (même s'ils sont différents). Merci à **Mathieu Riffault** pour les soirées de guedin dans son ex- (superbe) appart' (et oui...) en compagnie de **Jacqueline Beroud** (quelle femme ! Docteur, boxeuse, maman et bien plus encore...), **Caroline Gauche**, avec une pensée pour **Sarah Laoufi** (Alias « la pas toute nette »). Merci à **Mélissa Yéléhé**, qui représente pour moi un exemple de courage et de tenacité avec sa double thèse, pour toutes nos conversations et son écoute attentive (ça fait parfois du bien de vider son sac). Merci à **Léonore Léger** pour son investissement dans la pérennité de l'association des doctorants en biologie et santé de l'UL, A-Team of BioS (sans oublier bien sur son équipe !), que j'ai eu le plaisir à présider pendant sa deuxième année d'existence. Je tiens à remercier ici ma très chère ex-équipe, composée de **Yoann Abel**, **Amel Mohamadi**, **Mathilde Guibert** et **Fanny Gaignier** (la meilleure secrétaire de tous les temps) avec un remerciement particulier à **Jérémy Lagrange**, président fondateur de cette association qui m'a notamment permis de compléter cette expérience de doctorat, avec la rencontre de la Confédération des Jeunes Chercheurs me sensibilisant à la complexité du monde de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Pendant ces quatre années de « labeur », tout aurait été différent sans le soutien de mes amis de toujours. Merci à vous pour TOUS ces moments partagés, ces très nombreuses discussions parfois hautement philosophique (ouioui !) et ces quelques soirées où l'on s'est parfois (très rarement !) entraînés à la très salubre discipline du levage de coude (soirée Couilles !). Merci à **Fabien Rose**, **Clémence Jacquemin**, **Geoffroy Renard** et **Isabelle Ney**, **Alexandre Geysen**, **Henrith Thach**, **Jérémy Valck**, **Rémi Bourlon** et **Pierre-Yves Moquette**. Je tiens à remercier ici tout particulièrement **Él** guitoune de la guitoune, j'ai nommé **Guillaume Clerget**, mon ami et compagnon de galère depuis les origines. Je tiens à remercier également **Morgane Dos Santos** (grosse pensée à notre première année de fac des sciences à Bar-le-Duc City), **Elena Philippe** (traître d'ingénieur), **Jérémy** et **Eddy Robin** pour tout ce qu'on a partagé.

Ces dernières lignes sont pour ma famille,
pour mes parents et mon frère et ma belle-soeur préférée,
à qui je dédie ce manuscrit, qui m'ont accompagné
jusqu'à toute fin de cette aventure et ont été pour moi une
source et un support de motivation sans faille.

Jamais deux sans trois...

... à ce qu'il paraît !



*Table des
matières*

◆ **INTRODUCTION** ◆

Préambule

Chapitre I. Le peroxyde d'hydrogène, signal oxydant de la signalisation redox.... 1

A. Le peroxyde d'hydrogène : une espèce réactive de l'oxygène à rôle de signalisation..... 1

1. Historique 1

2. Chimie unique du peroxyde d'hydrogène 3

B. Le peroxyde d'hydrogène : production, dégradation et diffusibilité..... 5

1. Sources cellulaires du peroxyde d'hydrogène..... 5

a. Les NADPH oxydases5

b. Les mitochondries7

c. Les peroxysomes9

2. Élimination du peroxyde d'hydrogène 11

a. Les catalases11

b. Les Glutathion peroxydases à SelenoCys12

c. Les peroxydases à thiol.....13

3. Localisation cellulaire du peroxyde d'hydrogène 15

a. Diffusion et compartimentalisation du peroxyde d'hydrogène15

b. Des aquaporines en tant que peroxyporines17

C. Démonstrations du rôle de second messenger du peroxyde d'hydrogène..... 17

Chapitre II. La chimie des thiols, pierre angulaire de la signalisation redox par le peroxyde d'hydrogène 20

A. Chimie redox de la fonction thiol des Cys..... 21

1. Les différentes formes d'oxydation du résidu Cys..... 21

a. L'acide sulfénique21

b. Le pont disulfure22

c. Les formes acide sulfinique et acide sulfonique.....23

d. Le cycle sulfénylamide.....24

2. Les rédoxines : thiorédoxine et glutarédoxine 25

a. Le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase25

b. Le système glutathion/glutarédoxine.....27

| | |
|--|-----------|
| B. Des résidus Cys comme commutateurs redox-dépendant des processus de signalisation..... | 28 |
| 1. Activation directe de facteur de transcription : l'exemple d'OxyR | 28 |
| 2. Inhibiteur cytosolique de facteur de transcription : l'exemple de Keap1/Nrf2 | 29 |
| 3. Les protéines phosphatases et kinases..... | 31 |
| C. Contrôle cinétique de la signalisation redox par le peroxyde d'hydrogène | 33 |
| 1. Réactivité des thiols avec le peroxyde d'hydrogène : l'importance du site actif | 34 |
| 2. Limitations imposées par les systèmes antioxydants | 35 |
| Chapitre III. Les peroxydases à thiol dans la signalisation redox..... | 38 |
| A. Régulation post-traductionnelle des peroxydases à thiol..... | 38 |
| 1. La suroxydation des 2-Cys peroxyrédoxines typiques..... | 39 |
| a. Mécanisme de la suroxydation | 39 |
| b. La suroxydation, une modification réversible..... | 40 |
| c. La suroxydation comme gain de fonction | 40 |
| 2. L'hypothèse du « floodgate » | 43 |
| a. Régulation des peroxyrédoxines par suroxydation..... | 43 |
| b. Régulation des peroxyrédoxines par phosphorylation | 44 |
| B. Les peroxydases à thiol comme relais redox | 46 |
| 1. Chez les mammifères | 46 |
| a. Le relai Prx1/ASK1 | 46 |
| b. Le relai Prx2/STAT3 | 47 |
| 2. Chez les levures..... | 48 |
| a. Le relai Tpx1/Pap1 de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 49 |
| b. Le relai Orp1/Yap1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 51 |
| i. Le facteur de transcription Yap1..... | 51 |
| ii. La peroxydase à thiol Orp1 : capteur et relai..... | 52 |
| iii. Ybp1 : facteur indispensable, fonction inconnue | 54 |
| Objectifs..... | 57 |

◆ RÉSULTATS ◆

| | |
|--|-----------|
| Chapitre I. Production, purification et caractérisation des protéines recombinantes Yap1, Ybp1 et Orp1..... | 59 |
| A. Production et purification de la protéine Yap1 | 59 |
| B. Production et purification de la protéine Ybp1 | 59 |
| C. Production et purification de la protéine Orp1 | 63 |
| D. Détermination d'une solution tampon commune pour les protéines Yap1, Ybp1 et Orp1 | 64 |
| Chapitre II. Caractérisation des interactions entre les protéines Yap1, Ybp1 et Orp1 | 65 |
| A. Étude de l'interaction entre les protéines Yap1 et Ybp1 | 65 |
| 1. Par la technique d'anisotropie de fluorescence | 65 |
| 2. Détermination de la stoechiométrie du complexe Yap1·Ybp1..... | 68 |
| a. Chromatographie par filtration sur gel | 68 |
| b. Par spectrométrie de masse en conditions natives..... | 70 |
| B. Étude des interactions entre la protéine Orp1 et les protéines Yap1, Ybp1 et le complexe Yap1·Ybp1 | 71 |
| C. Conclusions | 74 |
| Chapitre III. Reconstitution et caractérisation cinétique du relai H₂O₂/Orp1/Yap1 <i>in vitro</i> | 76 |
| A. Caractérisation cinétique du cycle peroxydase de Orp1..... | 76 |
| 1. Stratégie..... | 76 |
| 2. Résultats et interprétations | 78 |
| B. Reconstitution du relai <i>in vitro</i> | 82 |
| 1. Stratégie..... | 82 |
| 2. Analyse par électrophorèse de type SDS-PAGE : premier indice sur le rôle de Ybp1 | 83 |
| C. Analyse cinétique de la réaction entre Orp1 et Yap1..... | 86 |
| 1. Test d'une méthode cinétique par compétition au 2-thiolpyridine..... | 86 |
| a. Stratégie expérimentale | 86 |
| b. Adaptation de la méthode par compétition au système Orp1/Yap1 et ses limitations | 86 |
| 2. Analyse cinétique par la méthode de « quenched flow » | 92 |
| a. Stratégie expérimentale | 92 |

Table des matières

| | |
|---|----|
| b. Étude de la cinétique de la réaction entre Orp1 et Yap1 | 93 |
| i. Résultats obtenus avec le mutant Orp1 ^{CSA} | 93 |
| ii. Résultats obtenus avec la forme sauvage de Orp1..... | 97 |
| iii. Résultats obtenus avec la forme sauvage de Orp1 oxydée sous forme pont disulfure | 99 |
| iv. Conclusion sur les constantes de vitesse k_{SS} et k_{Yap1} | 99 |

Chapitre IV. Caractérisation de la régulation du cycle peroxydase de Orp1

par Ybp1 et le complexe Yap1·Ybp1.....100

A. Influence de la protéine Ybp1 et du complexe Yap1·Ybp1 sur l'activité

peroxydase de Orp1 100

1. Stratégie expérimentale

100

2. Détermination des conditions optimales du test d'activité de l'enzyme Orp1.....

100

3. Mesure de l'activité peroxydase de Orp1 en présence de Yap1 et de Ybp1

101

B. Influence du complexe Yap1·Ybp1 sur les deux étapes du cycle peroxydase

de Orp1..... 102

1. Stratégie.....

102

2. Influence du complexe Yap1·Ybp1 sur la première étape du cycle peroxydase de Orp1

103

3. Influence du complexe Yap1·Ybp1 sur la deuxième étape du cycle peroxydase de Orp1

105

◆ DISCUSSION ET PERSPECTIVES ◆

1. Ybp1 : une protéine à activité de type enzyme ?.....108

2. Rôle du complexe Yap1·Ybp1 dans le contrôle de la Cys de recyclage

de Orp1111

3. Ybp1, une protéine « charpente » de signalisation ?113

♦ **MATÉRIELS ET MÉTHODES** ♦

| | |
|--|------------|
| I. Matériels biologiques, milieux de cultures et tampons | 117 |
| 1. Milieux et solutions tampons..... | 117 |
| 2. Souches bactériennes..... | 117 |
| 3. Plasmides..... | 117 |
| II. Techniques de génie génétique..... | 119 |
| 1. Clonage..... | 119 |
| 2. Mutagénèse dirigée..... | 120 |
| 3. Transformation des bactéries compétentes..... | 121 |
| III. Obtention des protéines recombinantes Yap1, Ybp1 et Orp1 | 121 |
| 1. Production et purification de la protéine recombinante Yap1..... | 121 |
| 2. Production et purification de la protéine recombinante Ybp1 | 123 |
| 3. Production et purification de la protéine recombinante Orp1..... | 124 |
| 4. Degré de pureté, stockage et préparation des protéines recombinantes | 126 |
| IV. Caractérisation biochimique des protéines recombinantes..... | 127 |
| 1. Détermination des coefficients d'extinction molaire des protéines recombinantes..... | 127 |
| 2. Dosage des groupements thiols libres par le 5,5'-dithiobis(2-nitro)benzoate | 127 |
| 3. Évaluation du rayon hydrodynamique et de la polydispersité des solutions protéiques | 128 |
| 4. Évaluation du contenu en structures secondaires des protéines recombinantes.... | 128 |
| 5. Détermination de la masse moléculaire des protéines recombinantes par spectrométrie de masse | 128 |
| 6. Spectres de fluorescence de Orp1 réduite et oxydée | 129 |
| V. Électrophorèse de type SDS-PAGE en conditions non réductrices et coloration colloïdale | 130 |
| VI. Techniques d'étude des complexes protéiques..... | 130 |
| 1. Anisotropie de fluorescence..... | 130 |
| 2. Chromatographie de filtration sur gel analytique | 131 |
| 3. Microcalorimétrie de titration isotherme..... | 132 |
| VII. Caractérisation cinétique du cycle peroxydase de Orp1 | 133 |

Table des matières

| | |
|---|------------|
| 1. Technique d'étude des propriétés enzymatiques de Orp1 à l'état pré-stationnaire | 133 |
| 2. Utilisation du logiciel KinTek Global Kinetic Explorer™ | 134 |
| 3. Étude de l'activité de Orp1 à l'état stationnaire | 135 |
| VIII. Caractérisation enzymatique de la réaction entre Yap1 et Orp1 | 135 |
| 1. Étude de la réactivité entre Orp1 et le 2-thiolpyridine | 135 |
| 2. Cinétique rapide : « quenched flow » | 137 |
| 3. Quantification par chromatographie en phase inverse | 138 |
| IX. Définition des paramètres cinétiques du cycle peroxydase de Orp1 en présence du complexe Yap1·Ybp1 | 139 |
| Bibliographie..... | 141 |

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Figure 1. Origine, diversité et réactivité des ERO..... | 3 |
| Figure 2. Les enzymes NOX et DUOX : organisation en domaines et topologie transmembranaire..... | 7 |
| Figure 3. Modèle de l'activité redox de p66 ^{shc} pendant l'apoptose mitochondriale..... | 9 |
| Figure 4. Représentation schématique du mécanisme catalytique des Prx | 14 |
| Figure 5. Exemples de sondes fluorescentes à H ₂ O ₂ codées génétiquement..... | 16 |
| Figure 6. Les différentes oxoformes de la fonction thiol du résidu Cys | 20 |
| Figure 7. État de transition de la réaction entre un thiolate et H ₂ O ₂ | 21 |
| Figure 8. Mécanisme de formation du cycle sulfénylamide pour la PTP1B selon Salmeen et Barford (142)..... | 24 |
| Figure 9. Comparaison des systèmes thiorédoxine/thiorédoxine réductase et glutathion/glutarédoxine..... | 25 |
| Figure 10. Structure à haute résolution en solution de la Trx1 d' <i>E. coli</i> sous forme oxydée disulfure..... | 26 |
| Figure 11. Modèle d'activation du facteur de transcription OxyR chez <i>E. coli</i> | 29 |
| Figure 12. Modèle de la régulation redox de Nrf2 par Keap1..... | 30 |
| Figure 13. Régulation des protéines kinases et phosphatases par la signalisation redox dépendante de H ₂ O ₂ | 31 |
| Figure 14. Les deux modèles proposés pour la régulation redox de Ask1..... | 32 |
| Figure 15. Représentation schématique du site actif des Gpx et des Prx | 34 |
| Figure 16. Voies par lesquelles les thiols relaient la signalisation redox par les peroxydes..... | 36 |
| Figure 17. Corrélation entre la structure et la sensibilité à la suroxydation des 2-Cys Prx typiques..... | 39 |
| Figure 18. Suroxydation des Prx et réduction par la Srx..... | 41 |
| Figure 19. L'oligomérisation des Prx forment des structures de haut poids moléculaire | 42 |
| Figure 20. Oscillations circadiennes de l'oxydation de Prx2 dans des érythrocytes humains | 42 |
| Figure 21. Modèle de la génération de H ₂ O ₂ , la suroxydation réversible de Prx3 et l'induction de Srx dans la stéroïdogenèse..... | 44 |
| Figure 22. Modèle de l'hypothèse du « floodgate » par phosphorylation de Prx1. | 45 |
| Figure 23. Mécanismes proposés de l'activation d'une protéine de régulation par H ₂ O ₂ via un senseur de type peroxydase à thiol | 48 |
| Figure 24. Régulation redox de la localisation nucléaire de Pap1. | 49 |
| Figure 25. Modèle du relai H ₂ O ₂ /Tpx1/Pap1..... | 51 |
| Figure 26. Masquage du domaine NES de Yap1 par interaction entre les domaines n- et c-CRD..... | 52 |
| Figure 27. Modèle du relai H ₂ O ₂ /Orp1/Yap1 | 53 |
| Figure 28. Représentation schématique de la structure de Orp1 | 54 |

Table des matières

| | |
|---|----|
| Figure 29. Stratégie d'étude du relai H ₂ O ₂ /Orp1/Yap1 | 58 |
| Figure 30. Gel bilan de purification de Yap1 | 59 |
| Figure 31. Optimisation de la production et de la solubilité de Ybp1..... | 61 |
| Figure 32. Gel bilan de purification de Orp1 | 63 |
| Figure 33. L'anisotropie comme mesure de la dépolarisation de fluorescence | 66 |
| Figure 34. Suivi de l'interaction entre Yap1 et Ybp1 par anisotropie de fluorescence..... | 68 |
| Figure 35. Profils d'élution de chromatographie par filtration sur gel de Yap1 sauvage et Ybp1..... | 69 |
| Figure 36. Analyse du complexe binaire copurifié Yap1·Ybp1 par spectrométrie de masse en conditions natives | 70 |
| Figure 37. Suivi de l'interaction entre les protéines Orp1—AF et Ybp1 par anisotropie de fluorescence | 72 |
| Figure 38. Caractérisation des interactions entre Orp1 et Yap1, Ybp1 et le complexe Yap1·Ybp1 par microcalorimétrie de titration isotherme | 73 |
| Figure 39. Spectres de dichroïsme circulaire des formes réduite et oxydée disulfure de Orp1 sauvage | 74 |
| Figure 40. Schéma bilan des interactions entre Orp1, Yap1 et Ybp1 | 75 |
| Figure 41. Représentation schématique d'un appareil de cinétique rapide de type « stopped flow ».... | 77 |
| Figure 42. Propriétés de fluorescence de Orp1 sauvage..... | 77 |
| Figure 43. Modèle du cycle peroxydase de Orp1 | 79 |
| Figure 44. Cinétiques réactionnelles de Orp1 en absence de réducteur (état pré-stationnaire) | 79 |
| Figure 45. Représentation graphique du calcul des contours de confiance de chaque paramètre par la fonction « Fitspace » du logiciel KinTek Global Kinetic Explorer™ | 81 |
| Figure 46. Modèle actuel du relai H ₂ O ₂ /Orp1/Yap1..... | 82 |
| Figure 47. Analyse de la formation des espèces Yap1 _{ox} et Yap1—S—S—Orp1 par électrophorèse de type SDS-PAGE en conditions non réductrices | 85 |
| Figure 48. Le 2-thiolpyridine, une sonde chimique chromophore des acides sulféniques..... | 86 |
| Figure 49. Représentation schématique d'un appareil de cinétique rapide de type « stopped flow » monté en double mélange | 87 |
| Figure 50. Cinétique de la réaction de Orp1—SOH avec un excès de 2TP pour différents temps de pré-incubation | 88 |
| Figure 51. État de charge [M+21H] ²¹⁺ de la protéine Orp1 ^{CSA} avant et après modification par le 2TP | 89 |
| Figure 52. Schéma du montage dynamique résolu en temps couplé à la spectrométrie de masse en conditions natives | 90 |
| Figure 53. Évolution des produits de la réaction entre Orp1 ^{CSA} et H ₂ O ₂ observée par spectrométrie de masse en conditions natives | 91 |
| Figure 54. Formation d'un cycle sulfénylamide..... | 91 |

| | |
|---|-----|
| Figure 55. Représentation schématique d'un appareil de cinétique rapide de type « quenched flow » à trois seringues. | 92 |
| Figure 56. Cinétiques de la réaction entre Orp1 et Yap1 ^{SSS CSS} | 94 |
| Figure 57. Schéma représentant l'influence de Ybp1 sur l'ordre des réactions étudiées..... | 96 |
| Figure 58. Évolution de la constante de vitesse observée de la réaction entre Orp1 et Yap1 en fonction de la concentration de Orp1 sauvage..... | 97 |
| Figure 59. Détermination des conditions optimales du test d'activité de Orp1 | 101 |
| Figure 60. Mesure de l'activité peroxydase de Orp1 en présence de Yap1 ^{SSS SSS} et Ybp1 | 102 |
| Figure 61. Détermination des constantes de vitesse k_{SOH} et k_{SS} en présence du complexe Yap1 ^{SSS SSS} .Ybp1 | 104 |
| Figure 62. Bilan de l'étude du relais H ₂ O ₂ /Orp1/Yap1 | 115 |
| Figure 63. Représentation schématique des plasmides pET28b <i>yap1</i> , pET28b <i>ybp1</i> et pET22b <i>orp1</i> | 120 |
| Figure 64. Droite étalon de la colonne préparative Superdex 200 hiload 26/60 | 126 |
| Figure 65. Dosage des groupements thiols libres par le DTNB | 128 |
| Figure 66. Spectres de dichroïsme circulaire des formes sauvage et mutantes des protéines Orp1 et Yap1 | 130 |
| Figure 67. Représentation de la sonde fluorescente Alexa Fluor 488 5-SDP ester..... | 132 |
| Figure 68. Droite étalon de la colonne analytique Superdex 200 10/300. | 133 |
| Figure 69. Schéma de fonctionnement du système « quenched flow » à trois seringues RQF3 (KinTek Corporation)..... | 139 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 1. Les oxydases des peroxysomes qui génèrent H ₂ O ₂ | 10 |
| Tableau 2. Propriétés physiques et électro-chimiques de H ₂ O ₂ et H ₂ O..... | 18 |
| Tableau 3. Comparaison du pKa, de la réactivité avec H ₂ O ₂ et des concentrations de différent(e)s thiols et protéines à (Se)Cys | 37 |
| Tableau 4. Valeurs des paramètres k_{SOH} , k_{SS} et k_{SO2} déterminées à l'aide du logiciel KinTek Global Kinetic Explorer™ | 80 |
| Tableau 5. Masses observées et théoriques des espèces séparées par chromatographie en phase inverse..... | 96 |
| Tableau 6. Milieux utilisés pour la production des protéines d'intérêt | 117 |
| Tableau 7. Les solutions tampon d'usage courant..... | 117 |
| Tableau 8. Souches bactériennes utilisées pour les étapes de clonage et de surproduction des protéines d'intérêts | 118 |

Abréviations

| | |
|---------------------|--|
| 2TP | 2-thiolpyridine |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| AF | sonde Alexa Fluor® 488 5-SDP ester |
| AMP | adénosine 5'-monophosphate |
| ARN | acide ribonucléique |
| ATP | adénosine 5'-triphosphate |
| C _P | cysteine peroxydasique |
| C _R | cysteine de recyclage |
| n- et c-CRD | domaines riches en Cystéine N- et C-terminal |
| CysGpx | glutathion peroxydase à Cys |
| DLS | diffusion dynamique de la lumière |
| DO _X | densité optique à « X » nm |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | acide éthylène diamine tétra acétique |
| EGF | epidermal growth factor |
| ERO | espèces réactives de l'oxygène |
| ESI-MS | spectrométrie de masse électrospray |
| ϵ_x | coefficient d'extinction molaire à « X » nm |
| FAD | cofacteur flavine adénine dinucléotide |
| FPLC | chromatographie liquide moyenne pression |
| GMP | guanosine 5'-monophosphate |
| Gpx | glutathion peroxydase |
| GR | glutathion réductase |
| Grx | glutarédoxine |
| GSH | glutathion |
| GTP | guanosine 5'-triphosphate |
| HPLC | chromatographie liquide haute pression |
| IPTG | isopropyl β -D-thiogalactopyranoside |
| ITC | microcalorimétrie de titration isotherme |
| K _D | constante thermodynamique de dissociation |
| k_{obs} | constante de vitesse observée |
| k_{SOH} | constante de vitesse de formation de l'espèce Orp1—SOH |
| k_{SO_2} | constante de vitesse de formation de l'espèce Orp1—SO ₂ H |
| k_{SS} | constante de vitesse de formation de l'espèce Orp1 _{SS} |
| k_{Yap1} | constante de vitesse de formation de l'espèce Yap1—S—S—Orp1 |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MsrA | méthionine sulfoxyde reductase A |
| NAD(P)H | nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme réduite |
| NAD(P) ⁺ | nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme oxydée |
| NEM | N-éthylmaléimide |
| NES | domaine d'export nucléaire |
| NLS | domaine de localisation nucléaire |
| NOX | NADPH oxydase |
| Orp1 | oxidant receptor peroxydase 1 |

Abréviations

| | |
|-------------------------|--|
| Orp1 _{SS} | Orp1 oxydée sous forme pont disulfure |
| Orp1 ^{CSA} | forme mutante de Orp1 Cys64Ser et Cys82Ala |
| Orp1 ^{CCS} | forme mutante de Orp1 Cys82Ser |
| PAGE | électrophorèse en gel de polyacrylamide |
| Pap1 | <i>pombe</i> activator protein 1 |
| PDGF | plateleted-derived growth factor |
| PdI | indice de polydispersité |
| PK | protéine kinase |
| PP | protéine phosphatase |
| Prx | peroxyrédoxine |
| PTP | protéine tyrosine phosphatase |
| rpm | rotation par minute |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>S. pombe</i> | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> |
| Sec | selenocystéine |
| SDS | sodium dodécyl sulfate |
| SN2 | substitution nucléophile de type deux |
| SOD | superoxyde dismutase |
| —SNH | sulfénylamide |
| —SOH | acide sulfénique |
| —SO ₂ H | acide sulfinique |
| TCEP | tris(2-carboxyéthyl)phosphine |
| TFA | acide trifluoroacétique |
| TNF α | tumor necrosis factor α |
| Tpx1 | thioredoxin peroxidase 1 |
| TR | thiorédoxine réductase |
| Trx | thiorédoxine |
| Tsa1 | thiol specific antioxidant 1 |
| Ve | volume d'élution |
| Yap1 | yeast AP1 |
| Yap1 ^{SCC CCC} | forme mutante de Yap1 Cys303Ser |
| Yap1 ^{SSS CSS} | forme mutante de Yap1 Cys303Ser, Cys310Ser, Cys315Ser, Cys620Ser, Cys629Ser |
| Yap1 ^{SSS SSS} | forme mutante de Yap1 Cys303Ser, Cys310Ser, Cys315Ser, Cys598Ser, Cys620Ser, Cys629Ser |
| Yap1—S—S—Orp1 | espèce disulfure mixte impliquant la C _p de Orp1 et la Cys598 de Yap1 |
| Yap1 _{OX} | espèce Yap1 oxydée par la formation de pon(s) disulfure intramoléculaire(s) avec au moins un pont disulfure entre les Cys303 et Cys598 |
| Ybp1 | Yap1 binding protein 1 |

L'appellation des acides aminés suit le code à une ou trois lettres.

Introduction

Préambule

La signalisation redox implique des espèces réactives de l'oxygène, dont les propriétés ont été capitalisées par l'évolution en tant que messagers, capables de modifier des cibles cellulaires d'une manière réversible et de déclencher une réponse biologique. En particulier, le signal oxydant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être capté par la fonction thiol de la Cys qui peut exister sous de nombreuses oxoformes et jouer le rôle de commutateur redox au sein de protéines de signalisation. Ainsi, par opposition à la signalisation par les cytokines, la signalisation redox est contrôlée par la réactivité de résidus Cys avec le signal peroxyde.

La famille des peroxydases à Cys joue un rôle central dans la physiologie du peroxyde d'hydrogène, en tant qu'enzymes antioxydantes mais aussi en tant que détecteurs spécialisés de peroxydes permettant de relayer le signal à d'autres cibles cellulaires, fonction découverte chez *S. cerevisiae* dans l'activation du facteur de transcription Yap1 par la peroxydase à thiol Orp1. La réactivité de l'intermédiaire acide sulfénique de la Cys ($-SOH$) formé au cours du cycle catalytique est à l'origine de leurs multiples fonctions, en tant que peroxydase ou relais de signalisation et génère une compétition potentielle avec d'autres thiols cellulaires. Dans notre équipe, l'un des thèmes de recherche développés concerne l'étude des mécanismes moléculaires de l'action de H_2O_2 *via* les peroxydases à thiol, en adoptant la perspective de l'enzymologie et en utilisant en particulier des approches cinétiques. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la caractérisation du relai H_2O_2 /Orp1/Yap1, avec pour objectifs d'identifier les mécanismes à l'origine de la spécificité de la réaction entre Orp1 et Yap1, et du rôle de la protéine Ybp1 comme partenaire essentiel de l'activation de Yap1.

Mon mémoire commence par une introduction divisée en trois parties. La première est dédiée à H_2O_2 avec ses propriétés chimiques, son origine et son élimination *in vivo* et la mise en évidence de son rôle de signal. La deuxième partie est consacrée au résidu Cys avec sa chimie redox, son rôle de commutateur, et sa réactivité au sens cinétique. Enfin, la troisième et dernière partie aborde l'état de l'art de l'implication des peroxydases à thiol dans la signalisation redox suivi par un résumé des objectifs du projet de thèse. Les résultats de mon travail de recherche sont présentés ensuite, suivis d'une partie discussion et des questions restant ouvertes. Une partie décrivant la méthodologie est ajoutée en fin de manuscrit.

Chapitre I. Le peroxyde d'hydrogène, signal oxydant de la signalisation redox

A. Le peroxyde d'hydrogène : une espèce réactive de l'oxygène à rôle de signalisation

1. Historique

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été mis en évidence *in vivo* pour la première fois en 1952 par une étude consacrée au rôle physiologique de la catalase chez la bactérie aérobie *Micrococcus lysodeikticus* (1). En 1955, une étude sur la formation de tumeurs chez *Drosophila Melanogaster* démontre que H_2O_2 est une molécule qui, à haute concentration, endommage l'ADN, les lipides et les protéines (2). Dans les années 1960, les deux sources biologiques majeures de H_2O_2 sont identifiées. D'une part, la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) des mitochondries, au cours du processus de la phosphorylation oxydative, génère H_2O_2 par dismutation de $O_2^{\cdot-}$ spontanée ou catalysée par les superoxyde dismutases (SOD). D'autre part, H_2O_2 est produit lors de la poussée respiratoire qui a lieu au cours de la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles (3). Cette poussée génère un mélange très corrosif d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} et $ONOOH$) participant à la dégradation de tous les composants biologiques intégrés par le phagosome. L'enzyme responsable de la production de H_2O_2 a été nommée gp91Phox et est actuellement connue sous le nom de NADPH oxydase 2 (NOX2) (Chapitre I.B.1.a, p.5). H_2O_2 est alors considéré comme un sous-produit toxique du métabolisme aérobique qui doit être dégradé. Cet argument est étayé par la découverte des catalases en tant que systèmes enzymatiques ubiquitaires responsables de la dégradation de H_2O_2 (Chapitre I.B.2.a, p.11). Le concept de stress oxydant en biologie redox et en médecine, formulé par Helmut Sies en 1985, est en accord avec ce point de vue : le stress oxydant est une « perturbation de la balance pro-oxydants/antioxydants en faveur des pro-oxydants » (4) à l'origine du vieillissement et de processus pathologiques majeurs (5–8).

C'est au cours des années 1970 qu'ont été réalisées les premières observations mettant en cause H_2O_2 dans des processus de signalisation. Il a été observé sur des cellules isolées que H_2O_2 pouvait mimer l'effet stimulant de l'insuline sur le transport du glucose (9). H_2O_2 a également été mis en évidence dans l'activation de la guanylate cyclase, enzyme

Introduction

convertissant le GTP en GMP cyclique, agissant comme second messenger dans la transmission du signal de manière similaire à l'AMP cyclique (10). Ces observations sont restées longtemps confinées au cercle de la recherche sur les radicaux libres et ont été reconnues plus largement à partir des années 1980, où quelques découvertes clefs ont été réalisées sur ces bases. En 1989, D. Heffetz et Y. Zick ont montré que H₂O₂ induisait la phosphorylation de résidus Tyr *in vivo*, et potentialisait ainsi les effets de l'insuline (11). Il a aussi été démontré que de faibles doses de H₂O₂ pouvaient stimuler la prolifération cellulaire (12). Il a fallu attendre le début des années 1990 et la mise en évidence de l'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor κB) par des événements redox (12, 13) pour que le champ de recherche de la biologie redox accepte largement l'implication de H₂O₂ dans la signalisation cellulaire. De 1978 à 1990 il a été reconnu que de nombreux types cellulaires étaient capables de produire des ERO en réponse à une stimulation. Au milieu des années 1990, une étude menée par l'équipe de T. Finkel illustre pour la première fois la fonction de second messenger assurée par H₂O₂ (Chapitre I.C, p.17) (15). En 1991, Meier *et al.* fournissent les preuves que ces ERO sont produites par des systèmes très similaires aux NOX des phagocytes (Chapitre I.B.1.a, p.5) (16). Un peu plus tard, entre les années 1990 et 2000, une étude génétique menée à partir de gp91phox a permis d'identifier sept isoformes de NOX et de mettre en évidence l'expression de ces enzymes dans des cellules non phagocytaires (17,18). Les NOX ont par la suite été impliquées dans de nombreux processus physiologiques, dont la signalisation et la survie cellulaires (19, pour revue).

Ainsi, si les cellules disposent de systèmes dédiés à la production spécifique de H₂O₂ finement régulés par des processus de signalisation, cette molécule ne peut pas seulement correspondre à une espèce toxique que la cellule doit éliminer, et doit être considérée comme un messenger secondaire. En outre, plusieurs études cliniques, prenant comme hypothèse que les oxydants (ERO) sont toxiques et que les antioxydants sont bénéfiques pour la prévention du cancer et des maladies cardiovasculaires, n'ont pas été concluantes (19, 20). Ces études ainsi que la précision des mécanismes redox de transduction du signal ont conduit en 2006, à une redéfinition du stress oxydant comme étant « une perturbation de la signalisation et du contrôle redox » (22). Aujourd'hui, la biologie redox est un champ de recherche établi et le rôle essentiel joué par H₂O₂ dans la signalisation par les ERO constitue un sujet majeur d'intérêt.

2. Chimie unique du peroxyde d'hydrogène

Les ERO sont produites par la réduction mono ou bi-électronique du dioxygène (O_2). Ces ERO appartiennent à deux sous-groupes selon leur nature, les espèces radicalaires et les espèces non radicalaires. Les principales ERO, obtenues par réduction successive de O_2 sont par ordre de réduction, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl (OH^{\cdot}). De nombreuses autres ERO (radicalaires et non radicalaires) dérivent de ces espèces primaires et ne seront pas abordées ici (Figure 1). Parmi ces ERO, pourquoi la molécule H_2O_2 a-t-elle été retenue au cours de l'évolution pour porter une fonction de signalisation ? Des éléments de réponse à cette question sont apportés par la confrontation de la chimie, de la durée de vie et de la réactivité de ces différentes espèces.

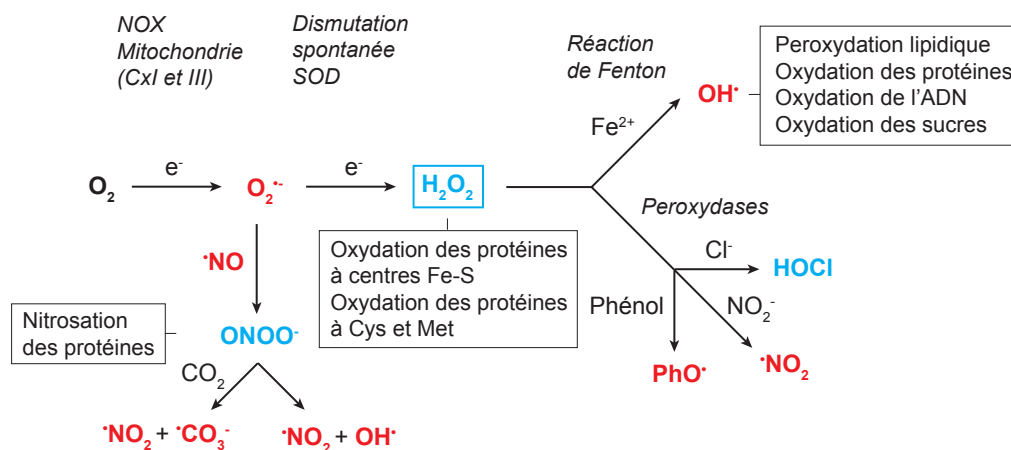


Figure 1. Origine, diversité et réactivité des ERO.

O_2 : oxygène moléculaire, $O_2^{\cdot-}$: anion superoxyde, OH^{\cdot} : radical hydroxyl, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, $\cdot NO$: monoxyde d'azote, $ONOO^{\cdot}$: peroxynitrite, NO_2^- : nitrite, $\cdot NO_2$: dioxyde d'azote, $\cdot CO_3^-$: radical carbonate, $HOCl$: acide hypochloreux, PhO^{\cdot} : radical phénoxy. Les espèces radicalaires sont représentées en rouge, les espèces non radicalaires en bleu. H_2O_2 , issu majoritairement de la dismutation de $O_2^{\cdot-}$ qui est lui-même issu de la réduction mono-électronique de O_2 , est un oxydant réagissant de manière modérée avec les clusters Fe-S et les Cys libres. H_2O_2 peut générer le radical hydroxyl, très réactif et donc toxique, via la réaction de Fenton. Les myéloperoxydases sont les seules peroxydases capables de générer de l'acide hypochloreux en présence d'ion chlorure. Le radical phénoxy (Pho^{\cdot}) est produit à partir de la Tyrosine ou à partir d'autres métabolites phénoliques et xénobiotiques (Adapté de Winterbourn 2008 (23)).

L'anion superoxyde, $O_2^{\cdot-}$, est le produit de la réduction mono-électronique du dioxygène catalysée par des enzymes comme les NOX ou des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chapitre I.B.1.b, p.7). Le potentiel standard redox du couple $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ est de 0,9 V. Néanmoins, malgré ce potentiel redox plutôt élevé, $O_2^{\cdot-}$ oxyde relativement peu de composés biologiques. En effet, à pH physiologique, cette espèce est chargée négativement (le pKa de l'acide HO_2^{\cdot} est de 4,8 (24)) ce qui limite sa diffusibilité à travers les membranes biologiques hydrophobes et sa réactivité en tant qu'oxydant, avec les

Introduction

centres riches en électrons. La forme protonée quant à elle peut réagir avec les thiols, formant un radical thiyl et pouvant initier une réaction radicalaire en chaîne. Cependant, cette réaction, qui présente une constante de vitesse de $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH physiologique (25), devient négligeable par comparaison avec la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 et O_2 (Équation 1), réaction spontanée caractérisée par une constante de vitesse de $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ou catalysée par les SOD cytosoliques et mitochondriales avec une constante de vitesse extrêmement élevée de l'ordre de $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (26). Par conséquent $\text{O}_2^{\cdot -}$ doit être considéré comme une espèce précurseur de H_2O_2 .



Le radical hydroxyl, OH^{\cdot} est issu de la réduction à un électron des peroxydes, par la réaction de Fenton (Équation 2) qui se produit en présence de métaux de transition (Fe^{3+} et Cu^{2+}). Avec un potentiel standard redox du couple $\text{OH}^{\cdot}/\text{H}_2\text{O}$ de 2,31 V, OH^{\cdot} est l'un des plus forts oxydants connus. Cette espèce radicalaire présente une très faible barrière énergétique d'activation. Autrement dit, OH^{\cdot} réagit avec tous les types de biomolécules avec une constante de vitesse de l'ordre de 10^8 à $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (27). Sa réactivité est donc hautement non spécifique, pouvant engendrer des réactions radicalaires en chaîne, avec par exemple la peroxydation lipidique, et surtout, est limitée à son lieu de formation (demi-vie de $\text{OH}^{\cdot} = 10^{-9} \text{ s}$). Le radical hydroxyl ne peut donc pas être considéré comme une molécule de signalisation.



En ce qui concerne H_2O_2 , il provient principalement de la dismutation de $\text{O}_2^{\cdot -}$ et appartient au groupe des espèces non radicalaires des ERO. Cette espèce est l'ERO la plus stable et aussi la plus abondante *in vivo*. Dans les lymphocytes, la demi-vie de H_2O_2 est de l'ordre de 1 ms, alors qu'à titre de comparaison $\text{O}_2^{\cdot -}$ présente un temps de demi-vie de 1 μs (28). La concentration de H_2O_2 dans les tissus est dans la gamme du nM au μM (29). Le caractère oxydant de cette molécule est double : H_2O_2 peut être un oxydant à un électron ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^{\cdot}$) ou un oxydant à deux électrons ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$). H_2O_2 est un faible oxydant à un électron avec un potentiel standard redox de 0,32 V à pH 7. Par la réaction de Fenton (Équation 2) il peut cependant produire le radical hydroxyl. H_2O_2 est également un oxydant fort à deux électrons, présentant un potentiel standard redox de 1,32 V à pH 7 (à titre de comparaison, l'acide hypochloreux OCl^-/Cl^- et le peroxydinitrite $\text{ONOO}^-/\text{NO}_2^-$ présentent des potentiels standard redox de 1,28 et 1,20 V respectivement). Néanmoins, H_2O_2 est faiblement

réactif avec la plupart des molécules biologiques. Par exemple, la constante de vitesse de réaction entre le glutathion (GSH) et OCl^- ou ONOO^- est de $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et de $700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement alors qu'elle est seulement de $0,9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour H_2O_2 (29–32). Cette faible réactivité est due à une barrière énergétique d'activation élevée, à l'opposé de celle de OH^- . Autrement dit, la réactivité de H_2O_2 est contrôlée par la cinétique plutôt que par la thermodynamique.

En raison de son pKa élevé (pKa = 11,6) limitant l'existence de l'anion HOO^- qui est un nucléophile puissant, dans des conditions physiologiques, H_2O_2 joue le rôle d'électrophile au cours de réactions de substitution nucléophile à deux électrons impliquant des thiols, activés sous forme thiolate ($-\text{S}^-$) (34). Cette chimie intéressante de H_2O_2 lui permet d'oxyder spécifiquement certaines cibles cellulaires et ainsi de modifier l'activité d'enzymes, de protéines ou encore d'influencer l'activité de facteurs de transcription (Chapitre II.B, p.28).

B. Le peroxyde d'hydrogène : production, dégradation et diffusibilité

Les ERO et en particulier H_2O_2 sont connues pour influencer l'état redox de la cellule en interagissant avec des thiols et des métaux pouvant conduire à des situations de stress oxydant. L'état redox est défini comme la somme des états de tous les couples redox, et tout comme le pH ou la composition ionique du cytosol, ce paramètre influence un grand nombre de processus cellulaires. Le maintien d'un état redox déterminé est une condition essentielle au bon fonctionnement du métabolisme définissant la notion d'homéostasie redox. La concentration en H_2O_2 dans les cellules doit donc être soumise à une stricte régulation entre production et dégradation plaçant le niveau de H_2O_2 *in vivo* en dessous du seuil de toxicité, condition favorable à l'émergence de processus de signalisation.

1. Sources cellulaires du peroxyde d'hydrogène

a. Les NADPH oxydases

Les NOX sont responsables de la génération d' $\text{O}_2^{\cdot-}$, une source majeure de H_2O_2 . Le premier représentant de cette famille d'oxydases a été mis en évidence au niveau de la membrane des phagosomes des phagocytes neutrophiles et macrophages. Cette NOX (appelée gp91phox, NOX2 ou PHOX) catalyse la poussée respiratoire lors de la phagocytose (35). C'est en 1999 que le premier homologue de NOX a été découvert dans des cellules épithéliales humaines du colon (36). Depuis, plusieurs homologues de NOX ont été décrits

Introduction

chez l'Homme dans différents types cellulaires et d'autres homologues ont été catalogués chez de nombreuses autres espèces (plantes, insectes, champignons, nématodes).

Le domaine catalytique des NOX (domaine NOX flavocytochrome) est enchâssé dans la membrane plasmique. Il se compose de deux sous-domaines. Un sous-domaine cytoplasmique, homologue aux flavoprotéines déshydrogénases qui contient un cofacteur flavine adénine dinucléotide (FAD) et un site de fixation du NADPH (Figure 2, p.7). L'autre sous-domaine est membranaire et contient une série d'hélices α transmembranaires contenant quatre résidus His conservés, fournissant les sites de liaison de deux hèmes (37). Le domaine NOX flavocytochrome catalyse l'oxydation du NADPH du côté cytosolique de la membrane et permet d'acheminer les électrons à travers la membrane, *via* le FAD et les deux hèmes pour finalement réduire l' O_2 moléculaire et former $O_2^{\cdot-}$ à l'extérieur de la cellule (ou à l'intérieur du phagosome). Après dismutation de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 pourra gagner le cytoplasme de la cellule par diffusion simple ou facilitée par les peroxyperines (Chapitre I.B.3.b, p.17).

Les enzymes NOX peuvent être classées en trois groupes selon la présence de domaines additionnels au domaine catalytique commun (Figure 2, p.7). Le premier groupe contient les NOX 1 à 4 qui présentent seulement le domaine flavocytochrome. NOX 5 est le seul représentant du second groupe. Elle contient un domaine additionnel calmoduline qui permet la fixation de quatre ions Ca^{2+} *via* une structure en « main » EF (38). Ce domaine assure un rôle de régulation, la fixation d'ions Ca^{2+} activant l'oxydase. Le troisième groupe est celui des dual oxydases (DUOX) composé des DUOX 1 et 2. Ces représentants possèdent, en plus du domaine flavocytochrome et du domaine similaire à la calmoduline, un domaine peroxydase, homologue aux peroxydases à hème (myéloperoxydase, lactoperoxydase), exposé sur la face extracellulaire de la membrane plasmique. Ce domaine supplémentaire permettrait aux DUOX d'utiliser directement H_2O_2 généré par le domaine flavocytochrome pour oxyder des substrats extracellulaires (39).

L'activité des NOX est régulée par des mécanismes complexes faisant intervenir des processus de phosphorylation, la fixation d'ions Ca^{2+} , l'assemblage de sous-unités régulatrices et le métabolisme des lipides (événements de phosphorylation de phosphatidylinositols présents dans la membrane plasmique notamment) à l'exception de Nox4 qui est constitutivement active (40). De nombreuses études ont démontré que la fixation de ligands (cytokines, facteurs de croissance) sur des récepteurs à activité tyrosine kinase mène à l'activation des NOX et à la production de H_2O_2 . À titre d'exemple, la fixation de l'EGF (Epidermal Growth Factor) à son récepteur est accompagnée par l'activation de NOX2 dans

des cellules humaines de carcinome épidermoïde A431 (41). De même, la stimulation d'adipocytes humains par le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) augmente la concentration intracellulaire de H_2O_2 via les NOX (42). Il a également été démontré que les NOX peuvent être régulées au niveau transcriptionnel par différents facteurs de croissance selon le type cellulaire (Angiotensine 2, PDGF, etc) (40). Les NOX assurent donc la production de H_2O_2 de manière hautement régulée et ont été associées à des fonctions cellulaires clés incluant la transduction du signal, la réponse immunitaire, le fonctionnement endocrinien et la croissance mitogénique (19).

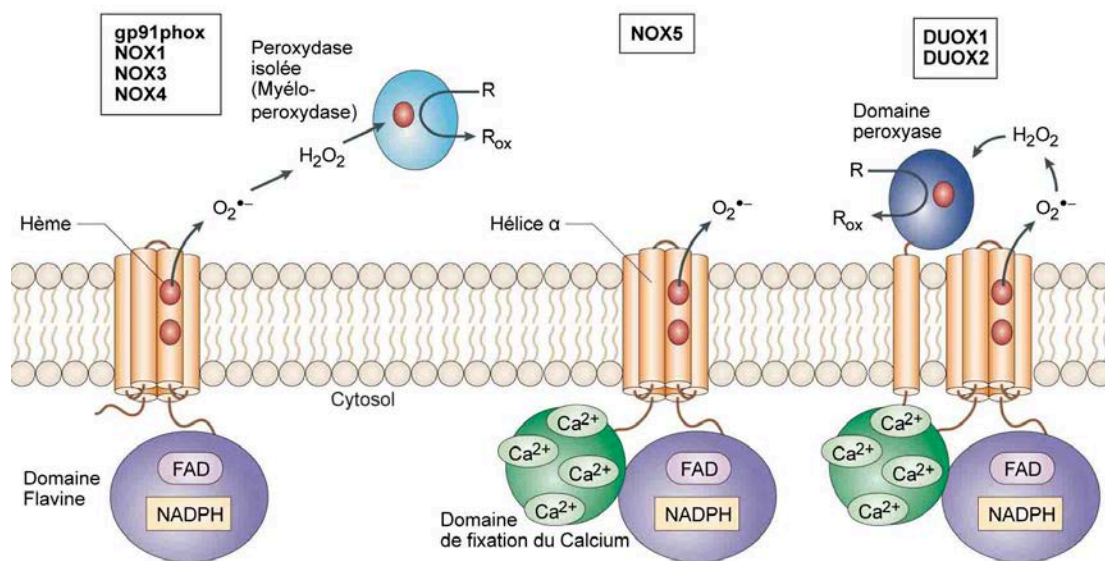


Figure 2. Les enzymes NOX et DUOX : organisation en domaines et topologie transmembranaire.

L'unité catalytique des NOX est caractérisée par un domaine constitué de sept hélices α transmembranaires qui porte un site de fixation pour deux groupements prosthétiques d'hème. La partie C-terminale cytoplasmique fixe les deux cofacteurs FAD et NADPH. Les électrons issus de l'oxydation du NADPH sont transportés à travers la membrane pour former $O_2^{\bullet-}$ qui générera H_2O_2 par dismutation spontanée ou catalysée par les SOD. NOX5 contient en plus du domaine catalytique un domaine de fixation d'ions Ca^{2+} à rôle de régulation. Les DUOX présentent la structure de NOX5 avec un domaine supplémentaire homologue au myéloperoxydase situé sur le côté externe de la membrane plasmique (Adapté d'après Lambeth et al., 2004 (19)).

b. Les mitochondries

La mitochondrie est la source d'énergie principale des cellules eucaryotes, elle est également une source importante d'ERO, et en particulier de H_2O_2 . La chaîne respiratoire (Figure 3, p.9), présente au sein de la membrane mitochondriale interne, produit de l'adénosine triphosphate (ATP) par la phosphorylation oxydative. La chaîne respiratoire est composée d'un ensemble de cinq complexes enzymatiques, transportant les électrons provenant des cofacteurs NADPH et FAD par l'intermédiaire du co-enzyme Q et du

Introduction

cytochrome c. Cette chaîne de transport d'électrons représente le site le plus important de production $O_2^{\cdot-}$ de la mitochondrie. Au niveau des complexes I et III, des électrons peuvent réagir avec O_2 , générant $O_2^{\cdot-}$ qui est rapidement dismuté en H_2O_2 par les SOD de la matrice mitochondriale (Mn-SOD) et de l'espace intermembranaire (Cu- et Zn-SOD) (43). L' $O_2^{\cdot-}$ produit par le complexe I est essentiellement dirigé vers la matrice mitochondriale, bien qu'une partie puisse diffuser sous forme de H_2O_2 vers le cytosol au travers des aquaporines de la membrane mitochondriale interne (44). $O_2^{\cdot-}$ relargué par le complexe III est dirigé vers l'espace intermembranaire (45).

La mitochondrie possède également d'autres sites enzymatiques de production de $O_2^{\cdot-}$. Les α -glycérophosphate déshydrogénases (α GPDH) sont présentes dans la membrane interne et génèrent des électrons par l'oxydation de l' α -glycérophosphate, à travers la matrice et l'espace intermembranaire *via* le co-enzyme Q (40, 41). Les complexes α -kétoglutarate et pyruvate déshydrogénase interviennent dans le cycle de Krebs. L' $O_2^{\cdot-}$ produit par ces trois systèmes est dirigé vers la matrice mitochondriale (48). Enfin, on peut citer la flavoenzyme monoamine oxydase, localisée sur la membrane externe de la mitochondrie et responsable de l'oxydation de monoamines, qui génère H_2O_2 directement dans le cytosol (49).

En plus de ces sources mitochondriales d' $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 dérivant du métabolisme aérobie, la mitochondrie possède des systèmes inductibles de production d'ERO. Récemment, l'enzyme p66^{shc} a été impliquée dans la génération mitochondriale de H_2O_2 en réponse à des signaux pro-apoptotiques incluant la privation de facteurs de croissance, un stress oxydant ou encore une irradiation aux UV (Figure 3, p.9) (50). L'activation de cette enzyme provoque sa translocation dans l'espace intermembranaire où elle catalyse le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire, du cytochrome c à O_2 , produisant $O_2^{\cdot-}$ (et donc H_2O_2). Cette génération de H_2O_2 induit l'apoptose, conférant à p66^{shc} un rôle dans la détermination de la durée de vie des cellules de mammifère (51). Cette enzyme est activée par son oxydation *via* la formation de ponts disulfure, responsable du passage d'un état dimérique (inactif) à tétramérique (actif). Il a été proposé que l'état redox de cette protéine est contrôlé par les systèmes Trx/TR (thiorédoxine/thiorédoxine réductase) et GSH/Grx (glutarédoxine) (52). Un autre système inductible, la protéine ROMO1 (ROS Modulateur 1), a été décrit plus récemment comme stimulant la production d'ERO dans la mitochondrie (53). Cette protéine établit un lien entre la signalisation par le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), la production d'ERO mitochondriale et la mort cellulaire par apoptose (54).

Les mitochondries contiennent des enzymes antioxydantes (peroxyrédoxine (Prx) et glutathion peroxydase (Gpx)) (Chapitre I.B.2, p.11). La concentration de H_2O_2 nette libérée par cet organelle est donc régulée par la balance entre production et élimination.

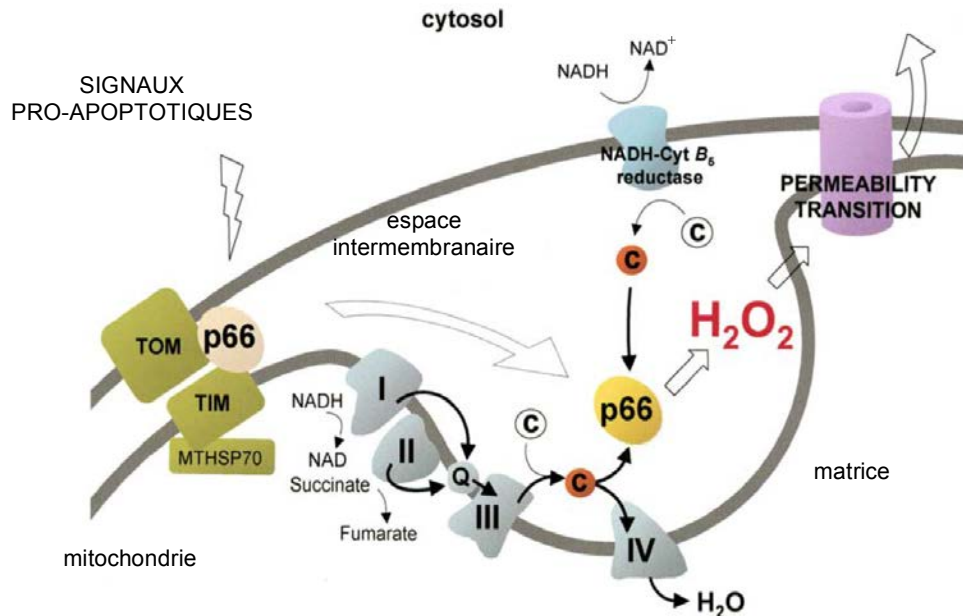


Figure 3. Modèle de l'activité redox de p66^{shc} pendant l'apoptose mitochondriale.

Des signaux pro-apoptotiques induisent la libération de la protéine p66^{shc} d'un complexe inhibiteur putatif. La protéine p66^{shc} libre oxyde alors le cytochrome c et catalyse la réduction de O_2 en H_2O_2 . H_2O_2 provoque alors l'ouverture des pores de transition de perméabilité (PTP) mitochondriaux conduisant à l'apoptose (adapté d'après Georgio et al., 2005 (50)).

c. Les peroxysomes

Ces organites sont impliqués dans la biosynthèse des lipides et notamment du cholestérol chez les animaux. Les peroxysomes sont également le siège de réactions d'oxydation avec principalement la β -oxydation des acides gras, fournissant une part importante de l'énergie cellulaire, et le métabolisme des acides aminés. Ces réactions d'oxydation catalysées par les oxydases qu'ils abritent (Tableau 1, p.10) conduisent à la production d'une quantité significative de H_2O_2 (55). Il a été découvert que les peroxysomes des cellules de foie de rat produisent jusqu'à 35% du H_2O_2 de la cellule et utilisent près de 20% de la consommation d' O_2 cellulaire totale (56). Le lien entre cette source d'ERO et la signalisation redox a été établi pour la voie de réponse impliquant le facteur de transcription NF κ B dans des cellules de rein de singe cos-1 (57).

Les deux processus les plus importants contribuant à la formation de H_2O_2 impliquent l'acyl-CoA oxydase (ACOX) et la xanthine oxydo-réductase (XOR)

Introduction

respectivement au cours de la β -oxydation des acides gras et du catabolisme des purines (58). L'enzyme ACOX catalyse la première étape du cycle peroxysomal de la β -oxydation des acides gras, qui est l'étape cinétiquement limitante contrôlant l'ensemble de cette voie métabolique. Ces enzymes dimériques catalysent la réaction de dégradation de l'acétyl-CoA en présence d' O_2 au cours de laquelle les électrons d'un cofacteur FAD sont transférés directement à O_2 et produisent H_2O_2 (58). Cette réaction métabolique est inductible par une variété de substrats endogènes et exogènes par l'intermédiaire du facteur de transcription PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor α) (59), impliqué dans l'homéostasie des lipides. XOR intervient dans les deux dernières étapes du catabolisme des purines et convertit l'hypoxanthine en xanthine puis la xanthine en acide urique. C'est une enzyme homodimérique d'environ 300 kDa où chaque sous-unité porte un co-facteur molybdoptérine, deux clusters Fe-S et un FAD. L'enzyme est réoxydée par le NAD^+ ou l' O_2 comme accepteur final d'électrons (60). XOR existe sous deux formes fonctionnellement distinctes : la forme déshydrogénase et la forme oxydase. Une forme fraîchement isolée de l'enzyme présente une activité xantine déshydrogénase (XDH), réduisant le NAD^+ en NADH. Néanmoins, si l'enzyme subit une anaérobiose, une protéolyse, un traitement avec des composés modifiant les thiols ou un choc de température, son activité est convertie en xanthine oxydase (XO) conduisant à la formation de $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 à partir d' O_2 (61). Une étude menée sur un cœur de rat isolé, par perfusion d'agent oxydant (H_2O_2 ou diamide), a démontré que cette conversion d'activité est réversible dès lors que les agents oxydants sont retirés du milieu perfusé. Cela démontre la sensibilité de cette enzyme aux conditions cellulaires redox (62) et prouve que les XOR peuvent être la cible d'une régulation redox participant à la génération d'ERO de manière contrôlée.

Tableau 1. Les oxydases des peroxysomes qui génèrent H_2O_2 .

Liste non exhaustive, d'après Schrader et Fahimi, 2006 (58).

| Enzyme | Substrat |
|------------------------------------|---|
| Acyl-CoA oxydases | |
| Palmitoyl-CoA oxydase | Acides gras à longues chaînes |
| Pristanoyl-CoA oxydase | Acide gras portant des groupements méthylés |
| Trihydroxycoprostanoyl-CoA oxydase | Intermédiaires d'acides biliaires |
| Xanthine oxydo-réductase | Xanthine |
| Urate oxydase | Acide urique |
| Acide D-amino oxydase | D-Proline |
| Acide pipecolique oxydase | Acide L-pipecolique |
| D-aspartate oxydase | D-aspartate, N-méthyl-D-aspartate |
| Nitric sulfite oxydase | Sulfite |

Les peroxysomes contiennent un arsenal d'enzymes antioxydantes (catalase, SOD1, Prx). Ainsi, au même titre que les mitochondries, la quantité de H_2O_2 libérée par cet organite dépend de l'équilibre entre production et dégradation.

2. Élimination du peroxyde d'hydrogène

Les hydroperoxydases (catalases, Gpx et Prx) sont des familles d'oxydoréductases ubiquitaires capables de catalyser le clivage hétérolytique de la liaison peroxyde. Bien que le substrat principal de ces enzymes soit H_2O_2 , elles peuvent également accommoder des peroxydes organiques (éthyl hydroperoxyde, acétyl hydroperoxyde, etc). Les catalases présentent en plus la capacité de dégrader H_2O_2 par dismutation, conduisant à la production de O_2 .

a. Les catalases

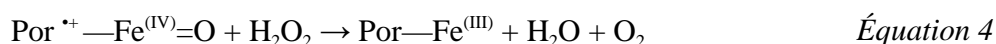
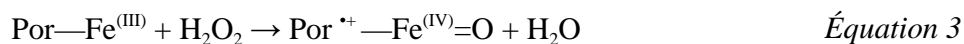
Les catalases sont majoritairement confinées aux peroxysomes des cellules eucaryotes (les erythrocytes et les neutrophiles étant des exceptions), où leur fonction principale est de dégrader H_2O_2 généré par les oxydases peroxysomales ou diffusant dans cet organite (58). Néanmoins, la présence de catalases a été observée dans les mitochondries de cellules d'insecte et de mammifère (57, 58). Dans les mitochondries, les catalases assurent un rôle de prévention contre les altérations des lipides membranaires et de l'ADN mitochondrial et contre l'inactivation de la chaîne respiratoire.

Les catalases sont divisées en trois familles d'enzymes selon l'architecture de leur site actif et leur mécanisme catalytique. Deux de ces familles regroupent des métalloenzymes à hème avec d'une part les catalases typiques et d'autre part les catalase-peroxydases. Alors que le premier type exerce une activité de type catalase, le second présente en plus une activité peroxydasique similaire aux peroxydases conventionnelles (Chapitre I.B.2.c, p.13). Les catalases typiques sont retrouvées chez les bactéries, les archae, les protistes, les fungis, les plantes et les animaux alors que les catalase-peroxydases ne sont pas présentes chez les plantes et les animaux. La troisième famille de catalases est un petit groupe d'enzymes bactériennes, les manganèse-catalases, présentant un site actif à deux Mn^{2+} .

Le mécanisme des catalases à hème compte deux étapes. La première correspond au transfert de deux électrons de l'hème vers H_2O_2 aboutissant à la formation d'une espèce oxydée de l'hème et à la libération d'une molécule d'eau (Équation 3, p.12) (65). La seconde

Introduction

étape fait intervenir une seconde molécule de H_2O_2 en tant que réducteur. Cette étape permet de régénérer l'enzyme et produit de l'eau et du dioxygène, ce dernier étant formé par oxydation à deux électrons de la deuxième molécule de H_2O_2 sans rupture de la liaison peroxyde (66) (Équation 4). Cette réaction de réduction est un processus très efficace présentant une vitesse de réaction de l'ordre de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (67).

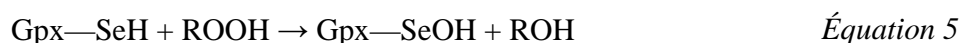


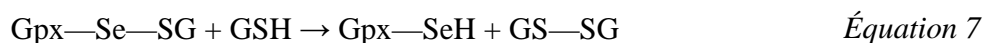
Les catalases sont exprimées en réponse à des conditions de stress oxydant. Leur expression est strictement régulée. D'une part, une déficience en catalase peut entraîner des changements rapides de la concentration de H_2O_2 altérant les voies de signalisation aux peroxydes et affectant des organites comme le réticulum endoplasmique ou le noyau (68). D'autre part, il a été démontré que la surexpression des catalases ralentit le remodelage tissulaire en affectant l'angiogenèse et la fermeture de la plaie (69–71). Les catalases font partie de l'arsenal antioxydant cellulaire, et ont pour fonction la protection de la cellule contre l'action oxydante de H_2O_2 lorsque cette molécule est présente en fortes concentrations.

b. Les Glutathion peroxydases à SelenoCys

Les Gpx à SelenoCys (SecGpx) ont été initialement mises en évidence chez les vertébrés. Le terme Gpx définit aujourd'hui une famille de protéines de plus de sept-cents membres, principalement identifiés par homologie de séquences (72), représentée dans tous les domaines du vivant. Au niveau structural, les Gpx adoptent un repliement de type Trx caractérisé par un feuillet β central et plusieurs hélices α périphériques (73). Chez les mammifères, huit Gpx distinctes ont été décrites. La plupart sont des séléno-enzymes (Gpx1 à 4 et selon les espèces Gpx6) alors que pour d'autres, le résidu du site actif Sec est remplacé par une Cys (les CysGpx, Chapitre I.B.2.c, p.13). La très grande majorité des Gpx des non vertébrés sont des homologues à Cys (74) bien que des SecGpx aient été découvertes chez les trématodes parasitiques (75) et de manière sporadique chez les protistes et les bactéries (76).

Les SecGpx catalysent la réduction des peroxydes en 3 étapes. Leur activité catalytique repose sur l'oxydation d'une Sec catalytique en acide séléénique (77) (Équation 5). Celle-ci est ensuite réduite par deux molécules de GSH (Équation 6 et 7, p.13).



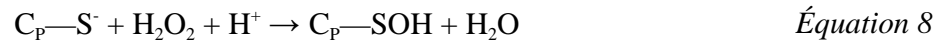


Ces enzymes peuvent être divisées en deux groupes selon leur spécificité de substrat : les SecGpx classiques (Gpx) catalysent la réduction des hydroperoxydes solubles (H_2O_2 , et plusieurs types d'hydroperoxydes organiques) (70–72) alors que les phospholipides hydroperoxydes Gpx (PH-Gpx ou Gpx4) (81) sont capables de réduire les hydroperoxydes de phospholipides. Les Gpx sont homotétramériques alors que les PH-Gpx sont monomériques. Chez les mammifères ces deux groupes d'enzymes remplissent différentes fonctions. Par exemple, Gpx1 joue un rôle majeur dans la défense contre le stress induit par H_2O_2 alors que Gpx4 est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation redox (82).

c. Les peroxydases à thiol

Les peroxydases à thiol comprennent deux familles d'enzymes phylogénétiquement éloignées, les Prx et les CysGpx qui catalysent la réduction de H_2O_2 , des hydroperoxydes organiques (ROOH) ou du peroxyde d'azote (ONOO^-). Ces enzymes de faible poids moléculaire (20 à 30 kDa) qui ne sont pas des peroxydases à hème mais à Cys catalytique, ont été initialement impliquées dans la protection contre les dommages induits par un stress oxydant chez la levure (83). Les Prx sont ubiquitaires et sont présentes *in vivo* à des concentrations élevées (23). À titre d'exemple, les Prx1 et 2 représentent entre 0,2 et 1% de la totalité des protéines solubles dans des cellules de mammifère en culture (84). Les CysGpx quant à elles sont confinées aux bactéries, champignons, protozoaires, insectes et plantes.

La première étape du cycle peroxydase est commune à toutes les peroxydases à thiol et consiste en l'attaque du substrat peroxyde par un résidu Cys catalytique conservé, noté C_p , qui est alors oxydé sous forme d'acide sulfénique ($\text{C}_p\text{—SOH}$), avec libération concomitante d'une molécule d' H_2O (Équation 8, p. 14). La deuxième étape du cycle peroxydase correspond à la régénération de l'acide sulfénique. Cette étape mène à la définition de trois classes d'enzymes, selon qu'elle fait intervenir ou non un second résidu Cys dit de recyclage et noté C_R : ces trois classes sont les 2-Cys Prx typiques, les 2-Cys Prx atypiques et les 1-Cys Prx (Figure 4, p.14). À l'instar des 2-Cys Prx, et contrairement aux SecGpx, les CysGpx possèdent une C_R et présentent un mécanisme catalytique similaire à celui des Prx à 2-Cys atypiques (72) (Figure 4 B, p.14). Ces enzymes ne possèdent pas les éléments structuraux spécifiques responsables de la reconnaissance du GSH et sont réduits par la Trx (85,86).



Au niveau structural, les peroxydases à thiol adoptent un repliement de type Trx caractérisé par un feuillet β à quatre brins et trois hélices α (87). La Cys catalytique C_p occupe une position analogue à la Cys N-terminale ou à la Cys C-terminale du motif CXXC classique des Trx, pour les CysGpx et les Prx respectivement. Les CysGpx, sont monomériques,

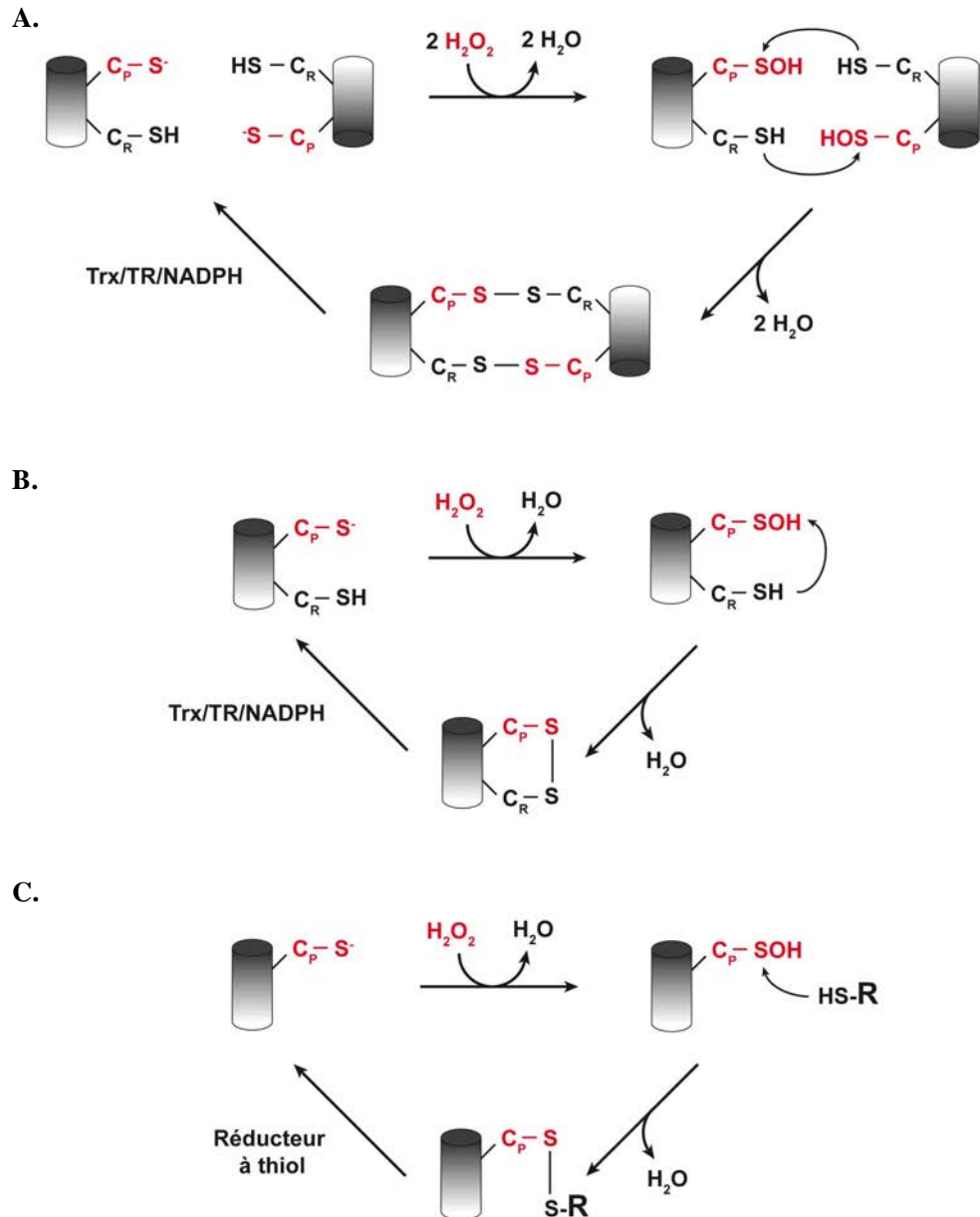


Figure 4. Représentation schématique du mécanisme catalytique des Prx.

R : réducteur à thiol externe.

Les mécanismes catalytiques des 2-Cys-Prx typiques (A), 2-Cys-Prx atypiques (B) et 1-Cys-Prx (C) sont représentés. Les 2-Cys Prx typiques sont régénérées par une C_R portée par la seconde sous-unité au sein d'un dimère, les 2-Cys Prx atypiques par une C_R appartenant au même monomère que la C_p , les 1-Cys Prx par un réducteur à thiol « externe ». Adapté d'après Rhee et al., 2012 (88).

contrairement à la majorité des autres Gpx, elles ne possèdent pas les éléments structuraux spécifiques pour l'oligomérisation.

Si l'activité peroxydase des peroxydases à thiol est aujourd'hui très bien caractérisée, leur rôle biologique est plus complexe. De nombreuses études récentes indiquent que les peroxydases à thiol sont bien plus que de simples enzymes de détoxification. La forme acide sulfénique de la C_p possède une réactivité intrinsèque qui en fait une plaque tournante à l'origine des multiples fonctions de ces enzymes. Leurs propriétés biochimiques et enzymatiques uniques, la régulation post-traductionnelle de leur activité peroxydase ainsi que leur capacité à interagir avec des partenaires variés en font des modulateurs aussi bien que des acteurs essentiels de la signalisation redox par H₂O₂ (89) (Chapitre III, p.38). À titre d'exemple, il a été démontré que la CysGpx Orp1 joue le rôle de détecteur de peroxyde dans la réponse antioxydante dépendante du facteur de transcription Yap1 chez la levure *S. cerevisiae* (Chapitre III.B.2.b, p.51). Mon travail de thèse a été consacré à ce système.

3. Localisation cellulaire du peroxyde d'hydrogène

La concentration intracellulaire de H₂O₂ n'est pas définie uniquement par la balance entre production et dégradation, mais également par son influx et son efflux par diffusion simple à travers les membranes plasmiques. Cette diffusion est limitée par les biomembranes mais peut être facilitée par certaines aquaporines présentant la capacité d'accueillir H₂O₂.

a. Diffusion et compartimentalisation du peroxyde d'hydrogène

La diffusion de H₂O₂ est possible en raison de sa neutralité et de sa durée de vie relativement élevée par rapport aux autres ERO (temps de demi-vie de H₂O₂ de l'ordre de 10⁻³ s, contre 10⁻⁶ et 10⁻⁹ s respectivement pour O₂^{•-} et OH[•]). Une modélisation cinétique a permis d'estimer la distance de diffusion de H₂O₂¹. Celle-ci serait de 1,5 mm en présence de 2 mM de GSH (soit plus de soixante-dix fois le diamètre d'une cellule) et serait restreinte à seulement quelques μm en présence de 20 μM de Prx2 (23). Le développement de sondes fluorescentes spécifiques de H₂O₂ codées génétiquement a permis de confirmer ce résultat *in vivo*. Ces sondes ont connu de nets progrès ces dernières années et permettent actuellement de déterminer la distribution spatio-temporelle de H₂O₂ à partir d'un seuil de l'ordre de la centaine de nM (Figure 5, p.16). Suite à l'exposition de cellules HeLa à des facteurs de

¹ La distance de diffusion est définie comme la distance à partir de laquelle la concentration de l'oxydant atteint un dixième de sa concentration initiale.

croissance, l'équipe de V. Belousov, en utilisant la sonde HyPer (Figure 5), est parvenue à localiser les micro-domaines cytoplasmiques où la concentration de H_2O_2 est augmentée (90). Les auteurs ont estimé la distance de diffusion de H_2O_2 à quelques μm dans les conditions de l'étude. Donc, dans des conditions physiologiques, la diffusion de H_2O_2 serait limitée au site de production et ne permettrait pas à H_2O_2 d'atteindre des compartiments distants.

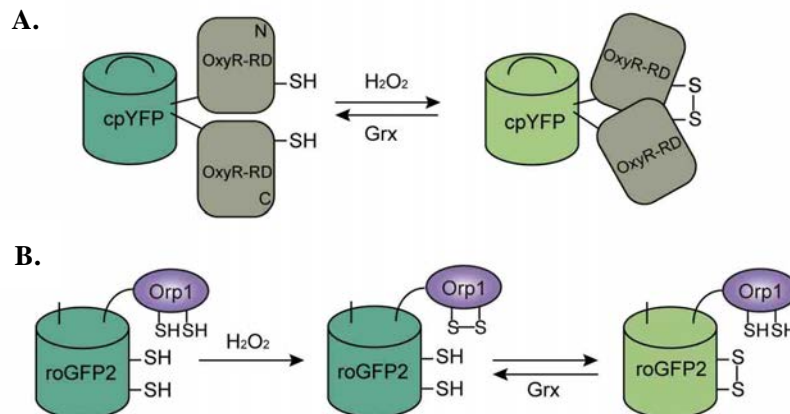


Figure 5. Exemples de sondes fluorescentes à H_2O_2 codées génétiquement.

A. Sonde HyPer. Cette sonde est constituée de la protéine fluorescente jaune (cpYFP) insérée au niveau du domaine de sensibilité à H_2O_2 du facteur de transcription OxyR de *E. coli* (noté RD) (109).

B. Sonde Orp1-roGFP2. Cette sonde a été créée par l'équipe de T. Dick. La protéine fluorescente verte (roGFP2) joue le rôle de réducteur pour la peroxydase à thiol Orp1 de *S. cerevisiae* (110) (adapté de Lukyanov et Belousov, 2014 (91)).

La diffusion de H_2O_2 n'est pas totalement libre, celle-ci est limitée par les membranes plasmiques (107–110). Cette limitation peut s'expliquer par la chimie de la molécule de H_2O_2 , dont le moment dipolaire de 2,26 Debye limite le passage à travers la bicouche lipidique hydrophobe. De plus, la composition chimique et les propriétés biophysiques des membranes, incluant la longueur des acides gras, la quantité d'espèces insaturées, la composition en protéine et le degré de phosphorylation et de glycosylation des lipides membranaires, jouent sur la perméabilité à H_2O_2 . Par exemple, l'une des adaptations de la levure *S. cerevisiae* à une exposition à H_2O_2 correspond à une diminution de la perméabilité des membranes plasmiques (96). Cette observation a été confirmée par des approches protéomiques : les protéines impliquées dans le trafic des lipides et des vésicules sont d'importants médiateurs de l'adaptation à H_2O_2 chez *S. cerevisiae* (97). Les capacités de diffusion de H_2O_2 et par conséquent la concentration intracellulaire de cette molécule impliquent donc directement les membranes plasmiques.

b. Des aquaporines en tant que peroxyporines

Certaines aquaporines spécifiques, dénommées peroxyporines par T. Henzler et E. Steudle (98), ont été impliquées dans la diffusion facilitée de H_2O_2 à travers les biomembranes. Les aquaporines sont une grande famille de protéines transmembranaires, représentées dans tous les domaines du vivant, des archaïes aux eucaryotes, et initialement impliquées dans le transport de l'eau à travers les membranes plasmiques (99). Ces protéines possèdent une masse moléculaire de 26 à 32 kDa et sont formées de six hélices α transmembranaires connectées par cinq boucles. Ce sont des protéines tétramériques où chaque monomère est un canal fonctionnel. Ce canal, hydrophile et bidirectionnel, permet le transport du substrat *via* la formation de liaisons hydrogène avec les résidus de la face interne du pore. Selon la similarité de séquence et la sélectivité de substrat, les aquaporines ont été divisées en deux sous-familles : les aquaporines perméables à H_2O et les aquaglycéroporines perméables principalement au glycérol et seulement en partie à H_2O , qui présentent respectivement un diamètre d'entrée de 2,8 et 3,4 Å (93).

Les molécules de H_2O et H_2O_2 partagent des propriétés physiques et électrochimiques très similaires (Tableau 2, p.18) plaçant H_2O_2 comme substrat potentiel des aquaporines. Cette hypothèse a été testée par l'équipe de G. Bienert, par une approche combinant des tests de croissance et de survie en présence de H_2O_2 sur des cellules de levures exprimant 24 homologues d'aquaporines de plantes et de mammifères (101). Cette étude a permis d'identifier deux aquaporines impliquées dans le transport de H_2O_2 : hAQP8 chez les mammifères (mitochondrie) et AtTIP1 chez les plantes (vacuole). D'autres isoformes d'aquaporines ont par la suite été impliquées dans la diffusion de H_2O_2 selon la même méthodologie (102). Cependant les données disponibles actuellement ne permettent ni de conclure si les capacités de transport de H_2O_2 par les aquaporines sont quantitativement équivalentes à celles de H_2O , ni d'identifier des déterminants moléculaires responsables de la sélectivité du transport de H_2O_2 et de H_2O . Néanmoins, il est clair que les peroxyporines participent à l'ajustement précis et dynamique des concentrations de H_2O_2 présentes dans le cytoplasme et les différents organites.

C. Démonstrations du rôle de second messager du peroxyde d'hydrogène

H_2O_2 est donc une espèce qui présente une production enzymatique régulée (Chapitre I.B.1.a, p.5) ainsi qu'une dégradation contrôlée par un arsenal d'enzymes spécifiques (Chapitre I.B.2, p.11). H_2O_2 peut traverser les membranes plasmiques par diffusion simple ou

Tableau 2. Propriétés physiques et électro-chimiques de H₂O₂ et H₂O.

Adapté d'après Bienert et al., 2006 (103).

| Propriétés | H ₂ O ₂ | H ₂ O |
|---------------------------|-------------------------------|------------------|
| Diamètre moléculaire (nm) | 0,25-0,28 | 0,275 |
| Moment dipolaire (D) | 2,26 | 1,85 |
| Constante diélectrique | 73,1 | 80,4 |

assistée par des aquaporines ou peroxyporines (Chapitre I.B.3.b, p.17). Ces propriétés sont les caractéristiques indispensables d'une molécule de signalisation, mais ne suffisent pas à expliquer le rôle de H₂O₂ en tant que messager secondaire. En effet, la réactivité de H₂O₂ dans les cellules doit également être ciblée vers des effecteurs spécifiques des voies de signalisation. Cette réactivité chimique spécifique, en particulier avec la fonction thiol des Cys, est développée dans le chapitre suivant.

Le rôle de second messager de H₂O₂ a été mis en évidence par plusieurs études sur des cellules de mammifère dans les années 1990. L'une des études pionnières a été menée par l'équipe de T. Finkel en 1995 (15). Les auteurs ont étudié le rôle de H₂O₂ suite à la stimulation de cellules musculaires lisses vasculaires de rat (VSMC pour « Vascular Smooth Muscle Cell ») par le facteur de croissance PDGF. Ils ont démontré que le PDGF augmente de manière transitoire la concentration intracellulaire de H₂O₂, qui se comporte dans la cellule comme un médiateur de signalisation. En effet, la réponse des VSMC au PDGF, qui passe par la phosphorylation de Tyr, l'activation des MAP kinases (Mitogen Activated Protein), la synthèse d'ADN et le chimiotactisme, est inhibée lorsque l'augmentation de la concentration intracellulaire de H₂O₂ est bloquée par la catalase ou un agent chimique antioxydant. D'autres facteurs de croissance ont ensuite été testés sur la même lignée cellulaire, comme l'EGF, le FGF (Fibroblast Growth Factor) et l'angiotensine 2, et les auteurs ont démontré que ces stimulations induisent toutes une augmentation de la concentration de H₂O₂ dont le niveau et la durée sont corrélés à l'activité kinase. Un second messager a pour fonction de transmettre l'effet biologique du messager primaire (hormones, facteurs de croissance, cytokines) à l'intérieur de la cellule en influençant l'activité de différents composants cellulaires de voies de signalisation, pouvant ainsi conduire à des réponses physiologiques comme l'expression des gènes, la prolifération cellulaire, la sécrétion ou encore la mobilité cellulaire. Selon cette définition, ces résultats montrent que H₂O₂ présente la fonction de second messager dans des cellules de VSMC.

Cette fonction de H_2O_2 a par la suite été démontrée pour d'autres facteurs de croissance et cytokines. Par exemple, la production de $O_2^{\cdot-}$ ou de H_2O_2 a été détectée dans des cellules stimulées par le $TGF\beta 1$ (Transforming Growth Factor) (103, 104), l'interleukine 1 (106), le $TNF\alpha$ (106,107), l'EGF (108) et le bFGF (basic FGF) (109). Cette génération de H_2O_2 a été associée à l'activation du facteur de transcription $NF\kappa B$ (110), de la protéine kinase C (111), de la phospholipase D (112,113) et à l'inhibition de protéines tyrosine phosphatases (114–116).

À la même période, les premières preuves de la fonction de signalisation portée par H_2O_2 ont été découvertes chez les plantes, avec la mise en évidence du rôle de signal porté par H_2O_2 dans la réponse immunitaire (117,118), mais également chez les micro-organismes aérobies. H_2O_2 a notamment été associé à la régulation de la transcription chez les bactéries (119,120) (Chapitre II.B.1, p.28) et chez les levures (121) (Chapitre III.B.2, p.48). En effet, les organismes unicellulaires sont continuellement exposés à des sources endogène et exogène de H_2O_2 provenant du métabolisme aérobie (122), de l'environnement (l'exposition aux UV ou à des irradiation gamma induisant la production d' $O_2^{\cdot-}$) (123) et de la réponse d'un hôte à la colonisation. H_2O_2 est alors impliqué en tant que premier messenger dans l'induction de défenses antioxydantes permettant de limiter la concentration intracellulaire de peroxyde à des niveaux non délétères pour la viabilité cellulaire.

Chapitre II. La chimie des thiols, pierre angulaire de la signalisation redox par le peroxyde d'hydrogène

Le concept de signalisation redox a émergé suite à la découverte de protéines de signalisation (comme des phosphatases, des kinases, des facteurs de transcription, etc) contenant un ou plusieurs résidus Cys dont l'oxydation est à l'origine d'une modification de l'activité biologique. Alors que les processus de signalisation impliquant la liaison d'un ligand sur un récepteur est par essence spécifique du fait de la reconnaissance entre les deux partenaires, comment concevoir que l'ERO H_2O_2 , une petite molécule, puisse initier une réaction biologique avec un niveau de spécificité nécessaire et suffisant pour assurer une signalisation efficace ?

La réactivité de la fonction thiol des résidus Cys vis-à-vis de H_2O_2 est particulièrement sensible à l'environnement protéique. Ainsi, l'oxydation de certains résidus Cys dans des protéines, particulièrement réactives avec H_2O_2 , constitue un mécanisme générant une spécificité qui permet à H_2O_2 de jouer le rôle de molécule signal dans des processus de signalisation « chimique ». Les nombreux états d'oxydation adoptés par l'atome de soufre de la fonction thiol (Figure 6) et la réversibilité de certains de ces états constituent un mécanisme de régulation qui peut être comparé au mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation des cascades de signalisation classiques.

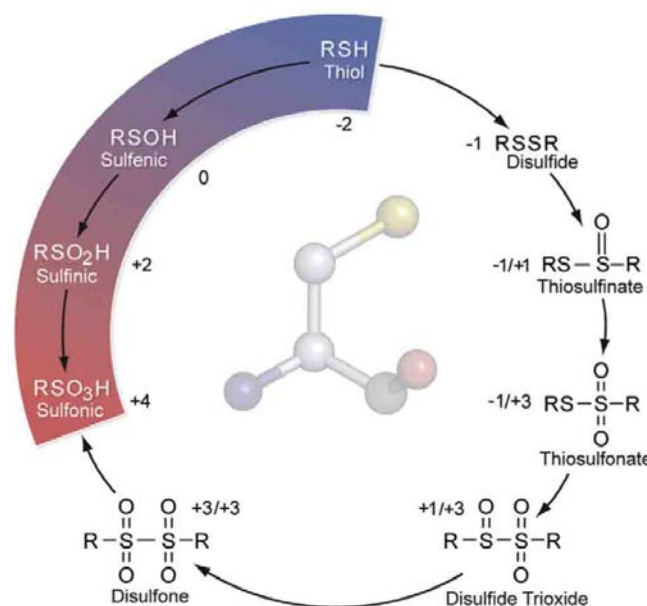


Figure 6. Les différents oxoformes de la fonction thiol du résidu Cys.

Le degré d'oxydation de chaque oxoforme est indiqué (adapté d'après Reddie et Carroll, 2008 (124)).

A. Chimie redox de la fonction thiol des Cys

La Cys est l'un des acides aminés les plus sensibles à l'oxydation avec la Met, l'His, la Tyr et le Trp. Néanmoins, c'est la Cys qui présente la plus forte réactivité envers les agents oxydants électrophiles, comme H_2O_2 , en raison de la densité électronique fortement polarisable de l'atome de soufre de la fonction thiol. Celui-ci peut exister sous différents états d'oxydation, allant de -2 à $+4$ (Figure 6, p.20). L'ensemble de ces oxoformes, réversibles ou non *via* l'action des redoxines (Chapitre II.A.2, p.25), représente autant de mécanismes potentiels à l'origine de la régulation de la fonction des protéines de signalisation redox à Cys.

1. Les différentes formes d'oxydation du résidu Cys

a. L'acide sulfénique

La première étape de l'oxydation de la fonction thiol est la formation de l'acide sulfénique (—SOH , degré d'oxydation 0 du soufre) (Équation 9), une étape cruciale dans les processus de signalisation par H_2O_2 , qui n'est pas aléatoire.



Les résidus Cys réagissent avec H_2O_2 selon une réaction de substitution nucléophile de type 2 (réaction $\text{S}_\text{N}2$) impliquant la fonction thiol en tant que nucléophile sous sa forme déprotonée (103). H_2O_2 présente donc une réactivité limitée avec les résidus Cys et ne peut réagir qu'avec la forme thiolate (—S^\cdot) du groupement thiol (—SH). L'état de transition de la réaction est caractérisé par l'alignement de l'atome de soufre et de la liaison peroxyde, avec un atome d'oxygène partiellement lié à la fois à l'atome de soufre et au groupe partant OH^\cdot (Figure 7).

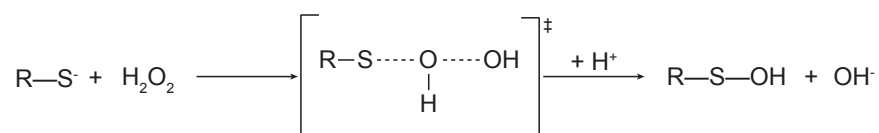


Figure 7. État de transition de la réaction entre un thiolate et H_2O_2 .

L'état de transition de la réaction est caractérisé par un changement de l'état d'hybridation des orbitales moléculaires de l'oxygène électrophile, passant de sp^3 à sp^2 , en accord avec une réaction $\text{S}_\text{N}2$.

À titre d'exemple, les fonctions thiol de la Cys libre et du GSH, présentent un pKa relativement élevé (de l'ordre de 8,5), sont à plus de 90% sous forme protonée à pH physiologique. Leur réactivité avec H_2O_2 est donc très faible avec des constantes de vitesses

Introduction

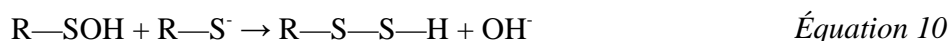
de second ordre égales à 2,9 et 0,87 M⁻¹.s⁻¹ pour la Cys libre et le GSH respectivement (31). Cependant, au sein d'une protéine, la forme thiolate peut être stabilisée et sa réactivité activée par la présence d'éléments moléculaires apportés par le micro-environnement protéique (Chapitre II.C.1, p.34). Ces éléments peuvent être des charges positives (paires d'ions), la distribution de dipôles (dipôles d'hélices α), des interactions faibles avec des résidus non chargés (liaisons hydrogène) ou encore un environnement hydrophobe (119–122). Ces Cys, rendues particulièrement nucléophiles, et donc réactives avec les électrophiles, représentent des sites modifiables par H₂O₂ qui peuvent être mis à profit dans les mécanismes de signalisation redox (Exemple d'OxyR : Chapitre II.B.1, p.28 et des peroxydases à thiol : Chapitre II.C.1, p.34, constantes de vitesse de réaction avec H₂O₂ pouvant atteindre 10⁷ M⁻¹.s⁻¹).

Une fois formé, l'acide sulfénique est relativement instable et possède des propriétés à la fois nucléophile et électrophile (130). Ce dernier doit donc être plutôt considéré comme intermédiaire vers d'autres états d'oxydation sous forme pont disulfure ou acide sulfinique, respectivement par réaction avec un autre groupement thiol ou une seconde molécule de H₂O₂. L'auto-condensation de deux acides sulféniques peut également former un thiosulfinate (Figure 6, p.20).

Les peroxydites (ONOO⁻) et les alkyl hydroperoxydes (ROOH) oxydent les thiols en acide sulfénique selon une réaction très similaire à celle décrite pour H₂O₂.

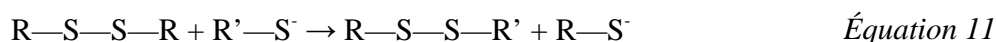
b. Le pont disulfure

En tant qu'électrophile, l'acide sulfénique pourra réagir avec un thiolate, à proximité et accessible, *via* une réaction de substitution nucléophile pour former un pont disulfure (R—S—S—R, degré d'oxydation -1 du soufre) (Équation 10).



La formation de pont disulfure est une modification des Cys largement répandue. Les ponts disulfure peuvent stabiliser la structure de protéines (notamment des protéines extracellulaires), protéger les protéines contre une inactivation irréversible (par oxydation sous forme acide sulfinique ou sulfonique), stabiliser les interactions entre partenaires au sein de complexes protéiques, modifier la structure des protéines pour former, supprimer ou moduler des sites fonctionnels, ou encore réguler leur activité biologique (enzymes et facteurs de transcription par exemple). Comparée à la chimie de la fonction thiol, celle du pont disulfure est relativement limitée et cet état d'oxydation peut être qualifié de stable.

Cependant, un pont disulfure peut être clivé par l'attaque nucléophile d'une seconde fonction thiolate aboutissant à un échange thiol/pont disulfure (Équation 11).

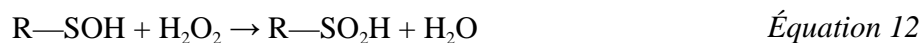


Ces réactions sont extrêmement importantes *in vivo* et interviennent dans un grand nombre de processus cellulaires (le repliement oxydatif des protéines, le métabolisme, l'activité de certaines chaperones), de processus catalytiques (Prx et Gpx notamment) mais également au cours des processus de signalisation orchestrés par H₂O₂.

Le pont disulfure peut être réduit en deux fonctions thiol grâce à l'activité des systèmes NADPH dépendants GSH/Grx ou Trx/TR (Chapitre II.A.2, p.25). L'acide sulfénique et le pont disulfure représentent donc deux modifications oxydatives des Cys réversibles *in vivo*, qui confèrent un potentiel de régulation de la structure et de la fonction des protéines par H₂O₂.

c. Les formes acide sulfinique et acide sulfonique

L'acide sulfinique est formé par la réaction entre un acide sulfénique et une molécule de H₂O₂ (Équation 12).



Il a été estimé qu'environ 5% des protéines cellulaires peuvent subir une oxydation de leurs fonctions thiols en acide sulfinique (R—SO₂H, degré d'oxydation +2 du soufre) (131). Cette forme d'oxydation est stable et peut être isolée. En effet, l'acide sulfinique ne peut être réduit par les systèmes réducteurs classiques Trx/TR et GSH/Grx, car l'atome de soufre sous cette forme d'oxydation présente une charge partielle positive plus importante et se comporte comme un électrophile dur, faiblement réactif avec les nucléophiles mous comme les fonctions thiols. La sulfinylation est donc considérée comme un processus irréversible, à l'exception de la classe des 2-Cys Prx typiques qui peut être réduite enzymatiquement (Chapitre III.A.1.b, p.40). La formation de l'acide sulfinique ayant un rôle clef dans le contrôle redox de la fonction de ces enzymes, c'est au niveau de cette classe d'enzymes que cette forme d'oxydation a été le mieux caractérisée (132,133). Un rôle fonctionnel de l'acide sulfinique a aussi été proposé pour d'autres protéines telles que la D-amino acide oxydase (DAO) (134), la protéine de la maladie de Parkinson DJ-1 (130,131) et la nitrile hydratase (137).

Malgré sa stabilité relative, l'acide sulfénique peut réagir avec une molécule de H_2O_2 pour former un acide sulfonique ($R-SO_3H$, degré d'oxydation +4 du soufre), correspondant au degré d'oxydation le plus élevé des thiols. Néanmoins, la formation de l'acide sulfonique *in vivo* reste sujet à caution.

d. Le cycle sulfénylamide

Plus récemment, une autre forme d'oxydation de la fonction thiol des Cys a été observée par deux groupes indépendants chez la protéine tyrosine phosphatase 1 B (PTP1B) (129, 130). Ces études ont montré pour la première fois qu'une Cys catalytique peut être oxydée sous forme de cycle sulfénylamide au sein d'une enzyme. Bien que ces études aient été réalisées sur des protéines cristallisées, la formation du sulfénylamide serait une réaction compatible avec des conditions physiologiques (140).

Le cycle sulfénylamide se forme par réaction d'un acide sulfénique avec l'atome d'azote de la chaîne principale du résidu suivant de la séquence polypeptidique. Pour la PTP1B, la formation d'un acide sulfénique au niveau de la Cys catalytique (Cys215) favorise l'attaque nucléophile de l'atome d'azote de la fonction amide du résidu voisin (Ser216) sur l'atome de soufre γ électrophile de la Cys, formant ainsi un cycle sulfénylamide stable à cinq atomes (133,136) (Figure 8). Dans ce mécanisme, le caractère nucléophile de la fonction amide serait exacerbé par stabilisation d'une forme mésomère de la liaison peptidique impliquant une liaison hydrogène entre l'atome d'oxygène du carbonyle de la Cys et la chaîne latérale d'un résidu His conservé (His214) (Figure 8).

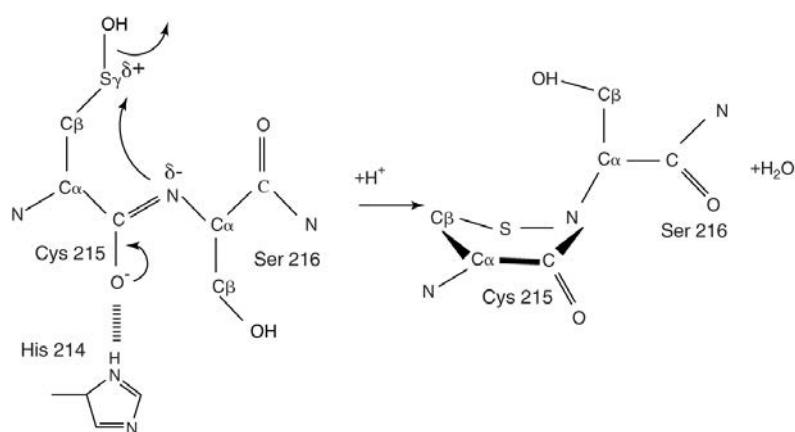


Figure 8. Mécanisme de formation du cycle sulfénylamide pour la PTP1B selon Salmeen et Barford (142).

L'atome S_γ de l'acide sulfénique est attaqué par l'atome d'azote du groupement amide de la Ser216 conduisant à la formation d'un cycle sulfénylamide.

Bien que le cycle sulfénylamide n'ait été observé que pour la PTP1B, cette modification oxydative pourrait être commune à d'autres membres de la famille des protéines tyrosine phosphatase (PTP), étant donné que ces enzymes partagent un domaine catalytique très conservé (autour de 40% d'identité de séquence). Le cycle sulfénylamide a également été observé au niveau du récepteur RPTP α (143), et également chez les Prx2 et 3 humaines au cours du cycle catalytique (144).

Il a été postulé que le cycle sulfénylamide aurait un rôle de protection du site actif en empêchant la suroxydation irréversible du résidu Cys catalytique en acide sulfinique (138). Le cycle sulfénylamide représenterait donc, au même titre que le pont disulfure, un mécanisme de régulation de l'activité des protéines par H₂O₂ (Chapitre II.B.3, p.31).

2. Les rédoxines : thiorédoxine et glutarédoxine

Les rédoxines désignent des protéines à motifs catalytiques CXXC, dont les premiers exemples ont été les Trx et les Grx. Ces enzymes ubiquitaires sont des oxydo-réductases qui utilisent les électrons issus du NADPH (potentiel redox de -315 mV) et jouent un rôle clef respectivement dans la réduction des ponts disulfure et des protéines glutathionylées (Figure 9). Opérant de manière indépendante, ces deux systèmes redox majeurs contrôlent la balance cellulaire redox des thiols et jouent également le rôle de terminateur des voies de signalisation par H₂O₂ (Chapitre II.B, p.28).

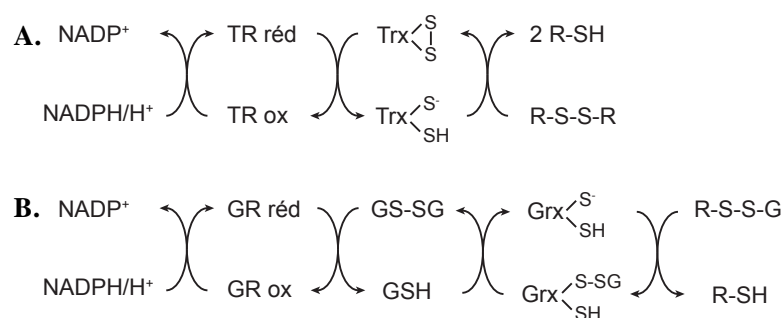


Figure 9. Comparaison des systèmes thiorédoxine/thiorédoxine réductase et glutathion/glutarédoxine.

A. Le système Trx/TR, **B.** le système GSH/Grx monothiol.

a. Le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase

Ce système implique la Trx, la TR et le NADPH, dans une réaction de transfert électronique où les électrons du NADPH sont transférés à la Trx via la TR (Figure 9) (145,146).

Introduction

Le potentiel redox de la Trx est de l'ordre de -270 mV à pH 7 (147) ce qui lui permet de réduire efficacement les liaisons disulfures de protéines oxydées avec un large spectre de spécificité. Les Trx réduisent les ponts disulfure par un processus catalytique à deux étapes. La première étape consiste en l'attaque nucléophile de la Cys N-terminale d'un motif caractéristique CGPC sur l'un des atomes de soufre du pont disulfure cible, conduisant à la formation d'un pont disulfure mixte. Au cours de la deuxième étape, le pont disulfure mixte est échangé en un pont disulfure intramoléculaire par attaque de la seconde Cys du motif catalytique (148). Cette étape aboutit à la libération du substrat réduit et de la Trx oxydée sous forme disulfure (Figure 9, p.25). Cette dernière est régénérée par la TR, une enzyme à FAD, NADPH/H⁺ dépendante homodimérique adoptant une organisation tête bêche (149). La structure des Trx est composée de cinq feuillets β centraux et de quatre hélices α périphériques (Figure 10). Ce repliement caractéristique est retrouvé de façon remarquable chez un grand nombre de protéine redox à thiol comme les Grx, les Gpx et les Prx (150).

Les Trx sont des disulfures oxydoréductases essentielles de par leur abondance et leur large variété de substrat. Ce sont des enzymes qui jouent un rôle important dans la réduction des peroxydes, bien qu'elles ne catalysent pas cette réaction directement (la constante de vitesse de réaction des Trx avec H₂O₂ est de $1,05 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (151)), elles sont indispensables à la régénération des peroxydases à thiol. De plus, les Trx sont impliquées dans la signalisation cellulaire dépendante de H₂O₂ puisqu'elles participent au contrôle de la balance redox des thiols et modulent ainsi la fonction de multiples protéines de signalisation redox (Chapitre II.B, p.28).

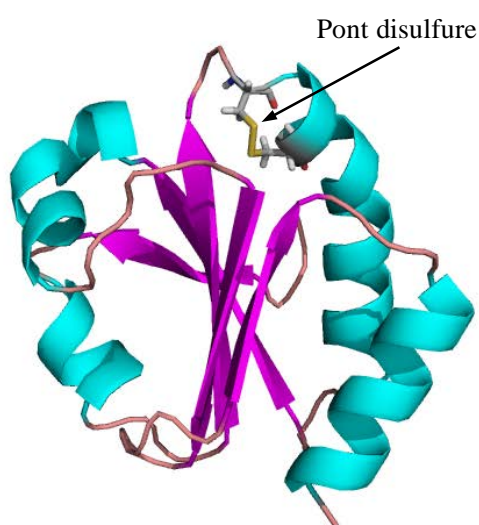


Figure 10. Structure à haute résolution en solution de la Trx1 d'*E. coli* sous forme oxydée disulfure.

Les résidus Cys du motif CGPC oxydés sous forme pont disulfure sont représentés en « stick » (code PDB : 1XOA).

b. Le système glutathion/glutarédoxine

Ce système est composé de la Grx, du GSH (tripeptide γ glutamyl-L-cystéinyl-glycine), de la glutathion réductase (GR) et du NADPH (Figure 9, p.25).

Les Grx sont des protéines d'environ 100 résidus, avec un repliement de type Trx. Deux types de Grx ont été définis selon leur mécanisme catalytique et leur séquence. L'activité des Grx monothioles est généralement restreinte à la réduction des ponts disulfure mixtes entre une protéine et un GSH. Les Grx à mécanisme dithiol ont été associées à la réduction des ponts disulfure intramoléculaires et des ponts disulfure mixtes bien que leurs substrats soient encore peu étudiés *in vivo* (152). Ces enzymes sont dans la plupart des cas des réducteurs des ponts disulfure moins efficaces que les Trx (153), en raison de leur potentiel redox plus élevé que celui des Trx (Grx1 : -233 mV et Grx3 : -198 mV (154) contre -270 mV pour la Trx1 d'*E. coli* (147)). La Grx utilise ensuite le pouvoir réducteur du NADPH *via* le GSH et la GR (77,153). Ainsi, contrairement à la Trx, réduite directement par la TR, les Grx sont réduites par le GSH, dont la forme oxydée est réduite par la GR (Figure 9, p.25).

Le système GSH/Grx, par son implication dans le métabolisme du Fer, joue également un rôle essentiel dans la survie des cellules eucaryotes. L'équipe de M. Toledano a démontré que des souches de levures invalidées en GSH1 et cultivées en absence de GSH ne sont pas viables en conditions aérobie et anaérobie, contrairement à des cellules de *E. coli* (155). Cette fonction essentielle exercée par le GSH qui n'est pas compensée par le système Trx/TR (156,157) a été associée à l'assemblage des protéines à centre [Fe-S].

Tout comme le système Trx, le système GSH, indispensable au cycle catalytique des SecGpx, participe à la régulation du niveau intracellulaire de peroxydes. De plus, le contrôle de la balance redox des thiols par la Grx et la glutathionylation réversible de résidu Cys sont des processus très importants de la signalisation redox. En effet, la glutathionylation des protéines est une modification post-traductionnelle qui peut conduire à l'activation ou à l'inhibition de protéines, comme par exemple l'activation de SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) (158) ou l'inactivation de MAP3K1 (159). D'autre part, la glutathionylation peut aussi être considérée comme une forme de protection prévenant la suroxydation de la fonction thiol (160).

B. Des résidus Cys comme commutateurs redox-dépendant des processus de signalisation

La modification de l'état redox de la fonction thiol de résidus Cys présents au sein de protéines de signalisation, de facteurs de transcription ou de protéines de régulation, peut aboutir à une modification de leurs fonctions et à une réponse cellulaire spécifique. Comment l'altération de l'état redox des Cys peut-elle enclencher une réponse biologique au signal peroxyde ? Quels sont les mécanismes moléculaires mis en jeu ? Sont-ils différents des bactéries aux mammifères ? Afin d'apporter des éléments de réponse à ces questions, plusieurs exemples de systèmes redox impliqués dans les voies de signalisation cellulaire, actuellement bien caractérisés, sont détaillés dans ce chapitre.

1. Activation directe de facteur de transcription : l'exemple d'OxyR

OxyR (Oxidative stress Regulator) est un facteur de transcription de la famille LysR (161) impliqué dans la réponse aux peroxydes et initialement caractérisé chez *E. coli* et *S. typhirium* (162) puis identifié chez de nombreuses espèces bactériennes et mycobactériennes. Il régule positivement la transcription d'un ensemble de gènes de défense contre le stress oxydant, dont une hydroperoxydase (katG), une glutathion réductase (GorA) et une Grx (GrxA) (163).

OxyR est organisé en plusieurs domaines avec un domaine N-terminal de fixation à l'ADN, un domaine central de reconnaissance et de réponse qui détecte le signal peroxyde, et un domaine C-terminal requis pour la multimérisation et l'activation (164). La Cys199 du domaine de reconnaissance réagit directement avec H_2O_2 avec une constante de vitesse très élevée de l'ordre de $10^5 M^{-1}.s^{-1}$ (155, 156), formant un acide sulfénique. Cette réactivité de la Cys199 permet à OxyR de détecter de faibles concentrations intracellulaires de H_2O_2 et peut s'expliquer au niveau moléculaire par la proximité de l'Arg266, qui formerait une paire d'ion avec la Cys199 sous forme thiolate et contribuerait ainsi à la diminution de son pKa et à son activation (167). L'acide sulfénique forme ensuite un pont disulfure intramoléculaire par attaque de la Cys208 (120) (potentiel redox de -185 mV) conduisant à une modification de la conformation de OxyR qui altère son interaction avec la région promoteur des gènes cibles et affecte positivement la liaison entre OxyR et l'ARN polymérase (168) (Figure 11, p.29). GrxA et gorA sont les terminateurs de la voie de réponse à H_2O_2 par OxyR, définissant une

boucle de régulation négative. La cinétique de réduction de OxyR étant plus lente que son oxydation, la réponse transcriptionnelle est activée de manière transitoire.

De manière intéressante, d'autres mécanismes d'activation de OxyR ont été proposés dernièrement (160, 161), dans lesquels des modifications de la Cys199 par sulfénylation (Cys199—SOH), S-nitrosylation (Cys199—SNO) ou glutathionylation (Cys199—S—S—G) affecteraient différemment la structure, l'affinité de fixation à l'ADN et l'activité des promoteurs et permettraient d'activer de manière différentielle certains sous-groupes de gènes cibles.

Actuellement, aucun mécanisme similaire de détection directe des peroxydes par un régulateur transcriptionnel n'a été démontré chez les mammifères.

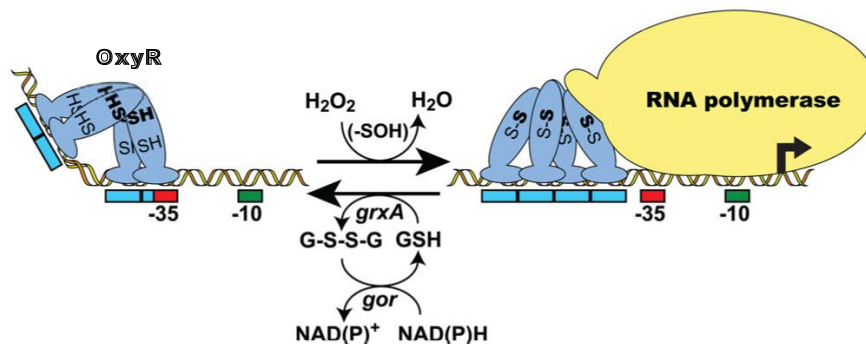


Figure 11. Modèle d'activation du facteur de transcription OxyR chez *E. coli*.

OxyR se lie à l'ADN à la fois sous sa forme réduite et oxydée mais active la transcription de ses gènes cibles seulement sous sa forme oxydée tétramérique (153, 154). En présence de H₂O₂ les Cys 199 et 208 de OxyR s'oxydent en formant un pont disulfure intramolécule. La formation de ce pont disulfure entraîne une modification de la conformation de OxyR qui affecterait l'affinité de l'interaction avec l'ADN, la conformation du promoteur et permettrait à OxyR d'interagir avec l'ARN polymérase et d'activer la transcription de ses gènes cibles. OxyR est ensuite réduit par le système GrxA/GorA (d'après Dubbs et Mongkolsuk, 2012 (171)).

2. Inhibiteur cytosolique de facteur de transcription : l'exemple de Keap1/Nrf2

Le facteur Keap1 (Kelch-like ECH-Associated Protein 1) est un inhibiteur cytosolique de facteur de transcription de mammifères très bien caractérisé (172). Il séquestre le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear Factor erythroid 2) dans le cytoplasme et entraîne sa dégradation par ubiquitinylation *via* le complexe ubiquitine ligase 3 (Cul3). H₂O₂ induit l'oxydation spécifique d'un résidu Cys de Keap1 et stimule une réponse adaptative dépendante de Nrf2, connu pour réguler une centaine de gènes codant des protéines impliquées dans le maintien de l'homéostasie redox et dans la défense contre certains composés toxiques (173).

Introduction

Keap1 est une protéine homodimérique qui présente une organisation en trois domaines (174) (Figure 12). Le domaine BTB (Broad complex/Tramtrac/Bric-a-brac) est impliqué dans l'homodimérisation (175) et dans le recrutement de Cul3 (176). Le domaine IVR (Intervening Region) a un rôle de régulation associé à des résidus Cys en partie coordonnés au Zn^{2+} . Enfin, le domaine DGR (Double Glycine Repeat) est essentiel pour la fixation de Nrf2 (177) et interagit avec l'actine du cytosquelette (178) et/ou la myosine (179), maintenant Keap1 dans le cytoplasme. Il a été démontré que la Cys151 du domaine BTP est cruciale pour l'activation de la réponse à H_2O_2 par le système Keap1/Nrf2 (173,174). Sur une base expérimentale, plusieurs modèles ont été proposés afin de décrire l'impact de l'oxydation de la Cys151 dans ce mécanisme. L'oxydation de la Cys151 en acide sulfénique entraîne la formation d'un pont disulfure intermoléculaire liant les deux monomères de Keap1 par leur Cys151, ce qui impliquerait une modification de la conformation globale de Keap1 et la dissociation du complexe Keap1·Cul3 (Figure 12) (180, 182, 183). Dans ce modèle, Nrf2 ne se dissociant pas de Keap1, c'est la synthèse *de novo* de Nrf2 qui permettrait l'accumulation de ce facteur dans le noyau.

Bien qu'aucune donnée cinétique pour la réaction entre Keap1 et H_2O_2 ne soit disponible, l'équipe de F. Antunes a estimé, d'après les données de Fourquet *et al.*, 2010, que la constante de vitesse de la réaction entre la Cys151 et H_2O_2 serait de l'ordre de $140 M^{-1}.s^{-1}$ (178,179). Il a été prouvé que les systèmes Trx/TR et GSH/Grx assurent le rôle de terminateur de cette voie de signalisation (180).

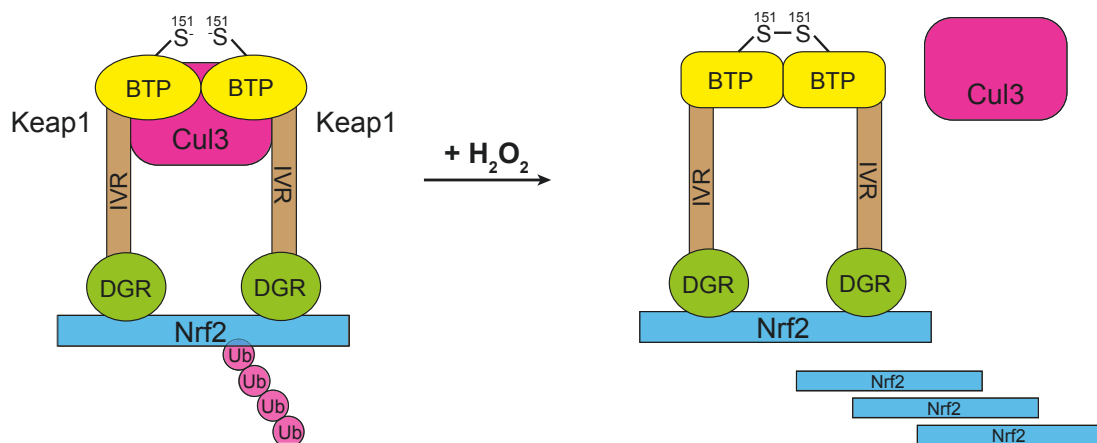


Figure 12. Modèle de la régulation redox de Nrf2 par Keap1

En présence de H_2O_2 , le résidu Cys 151 de Keap1 est oxydé, ce qui a pour conséquence de changer la conformation de Keap1 et d'inhiber le recrutement de Cul3. Les sites d'interaction entre Keap1 et Nrf2 étant occupés, la synthèse *de novo* de Nrf2 permettrait à ce facteur de s'accumuler au niveau du noyau et d'induire une réponse spécifique.

3. Les protéines phosphatases et kinases

Chez les mammifères, les processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la régulation du cycle cellulaire et la survie sont régulés par des cascades de phosphorylation/déphosphorylation, assurées respectivement par des protéines kinases (PK) et des protéines phosphatases (PP) qui contrôlent le commutateur « phosphorylation ». Ces composants clés de la signalisation peuvent être régulés à un niveau supplémentaire par l'oxydation de résidus Cys par H_2O_2 (187). Généralement, ces modifications redox sont reconnues pour inhiber l'activité des PP alors qu'elles stimulent ou inhibent l'activité des PK (Figure 13).

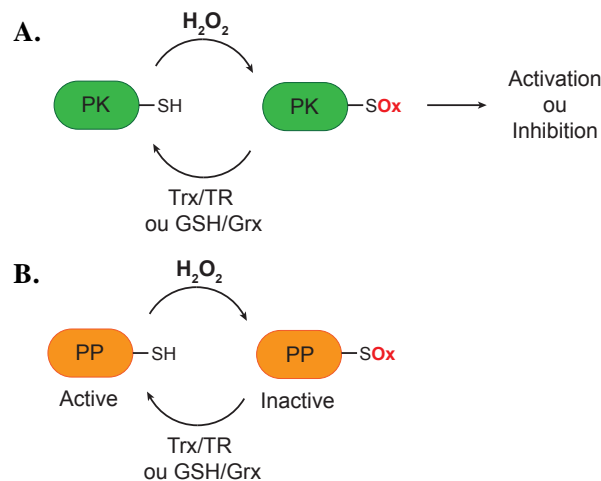


Figure 13. Régulation des protéines kinases et phosphatases par la signalisation redox dépendante de H_2O_2 .

PK : protéine kinase, PP : protéine phosphatase, SOx : Cys oxydée.

A. Dépendant de la PK, les modifications redox de résidus Cys peuvent stimuler ou inhiber l'activité catalytique de ces enzymes, **B.** L'oxydation de la Cys conservée du site actif des PP inactive ces enzymes. (d'après Truong et Carroll 2013 (188)).

Les PK forment une famille très diversifiée d'enzymes qui régulent la fonction de protéines cibles en catalysant la phosphorylation de résidus Tyr, Thr et/ou Ser. Ces enzymes possèdent un à plusieurs résidu(s) Cys particulièrement réactif(s) susceptible(s) d'être modifié(s) par H_2O_2 (189). À titre d'exemple, IKK (Inhibitory κ B Kinase), responsable de l'activation du facteur de transcription NF κ B, est sous contrôle redox. En effet, NF κ B qui régule la transcription de plus de 100 gènes impliqués dans la réponse à l'inflammation, la prolifération et la survie, est inhibé par I κ B (Inhibitor κ B) par séquestration dans le cytoplasme. IKK présente une activité Ser/Thr kinase et phosphoryle I κ B, favorisant ainsi sa dégradation par le protéasome. Il a été démontré dans des cellules épithéliales stimulées par le TNF α que la Cys catalytique (Cys179) de IKK peut être glutathionylée en réponse à H_2O_2 , conduisant à

l'inactivation de l'enzyme et par conséquent à l'inhibition de NF κ B (184, 185). Cependant, les mécanismes mis en jeu sont complexes et restent encore à établir. En effet, des études menées sur d'autres types cellulaires avec différentes concentrations de H₂O₂ ont conduit à la conclusion que ce messager secondaire induit au contraire l'activation de IKK (186, 187).

L'activité de la protéine ASK1 (Apoptose Signal regulator Kinase 1) est également régulée par H₂O₂ de manière directe ou indirecte. ASK1 est une PK responsable de l'activation des MAPK JNK et p38 (c-Jun N-ter kinase), et est requise pour l'induction de l'apoptose induite par le TNF α (194). Deux modèles d'activation ont été proposés (Figure 14). Dans le premier, la Trx1 séquestre ASK1 au sein d'un complexe inactif et est oxydée par la formation d'un pont disulfure intramoléculaire en présence de H₂O₂. Cet événement aurait pour conséquence la libération de ASK1 et permettrait la formation du complexe actif (189, 190) (Figure 14, A). Cependant, plus récemment, une étude a suggéré que l'oligomérisation et l'activation de ASK1 dépendent de la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre deux unités de ASK1 en présence de H₂O₂ (197). Dans ce second modèle, la Trx1 régulerait de manière négative ASK1 en la maintenant dans son état réduit (Figure 14, B). Il a été démontré que ASK1 ne réagit pas directement avec H₂O₂ et que le mécanisme d'oxydation impliquerait la Prx1 (Chapitre III.B.1.a, p.46).

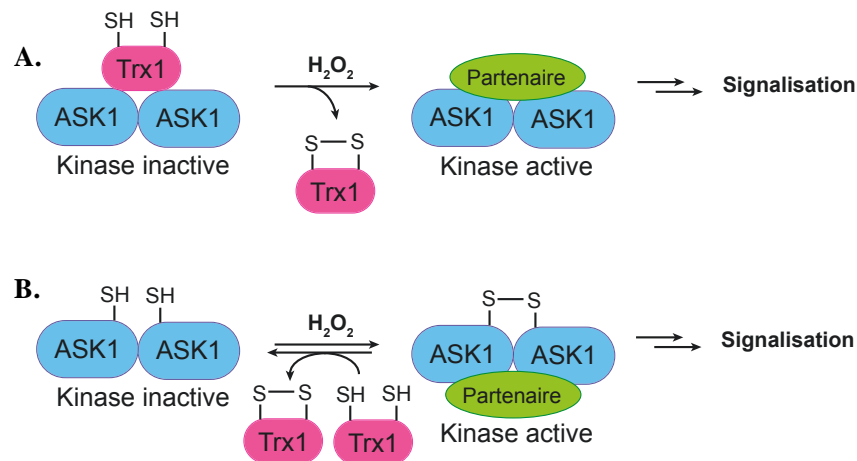


Figure 14. Les deux modèles proposés pour la régulation redox de Ask1.

A. Modèle par oxydation de la Trx. L'association de ASK1 avec la Trx1 séquestre la kinase dans une conformation inactif. L'oxydation indirecte de Trx1 par H₂O₂ inhibe l'interaction avec ASK1 qui peut alors phosphoryler des protéines partenaires et initier les processus de signalisation. **B.** Modèle par oxydation de ASK1. La formation d'un pont disulfure entre deux monomères de ASK1 induite par H₂O₂ permet la dimérisation et l'activation de l'activité kinase. Dans ce mécanisme, la Trx1 est impliquée dans la régulation négative de ASK1 en maintenant la PK sous forme réduite (d'après Truong et Carroll, 2013 (188)).

Pour ce qui est des PP, les protéines Tyr phosphatases (PTP) sont caractérisées par un motif catalytique HCX5R (198). La Cys de ce motif est activée sous forme thiolate et

pourra s'oxyder en acide sulfénique en présence de H_2O_2 qui pourra évoluer vers la formation d'un pont disulfure ou d'un sulfénylamide, rendant la PTP inactive. Par exemple, la PTP1B est sélectivement oxydée par H_2O_2 (116). Cette phosphatase est un régulateur négatif des voies de signalisation insuline et leptine (199) et est inactivée par production massive de H_2O_2 concomitante à la fixation de l'insuline à son récepteur membranaire (200). La réaction entre la PTP1B et H_2O_2 se produit avec une constante de vitesse de 10 à 20 $M^{-1}.s^{-1}$ et conduit à l'oxydation de la Cys catalytique en un acide sulfénique qui évoluera en sulfénylamide (201) (Chapitre II.A.1.d, p.24). Tout comme la PTP1B, la PTEN (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate 3-phosphatase) peut être inactivée en présence de H_2O_2 . La PTEN est un régulateur négatif de la voie de signalisation PI3-kinase-AKT et fonctionne comme un important suppresseur de tumeur (202). Le résidu catalytique de cette enzyme, la Cys124 pour la PTEN humaine, est oxydée par H_2O_2 (203) sous forme acide sulfénique, puis sous forme pont disulfure intramoléculaire conduisant à l'inactivation de l'enzyme (204).

À l'exception de la PTP1B, il a été prouvé que les modifications redox des Cys impliquées dans les mécanismes décrits ci-dessus sont réversibles grâce aux système Trx/TR et/ou GSH/Grx (Chapitre II.A.2, p.25) qui jouent alors le rôle de terminateur dans ces événements de signalisation cellulaire. Bien que les cascades de phosphorylation/déphosphorylation tiennent une place essentielle dans la réponse cellulaire à de nombreux stimuli, la modulation redox de ces voies apparaît donc comme un niveau supplémentaire de régulation.

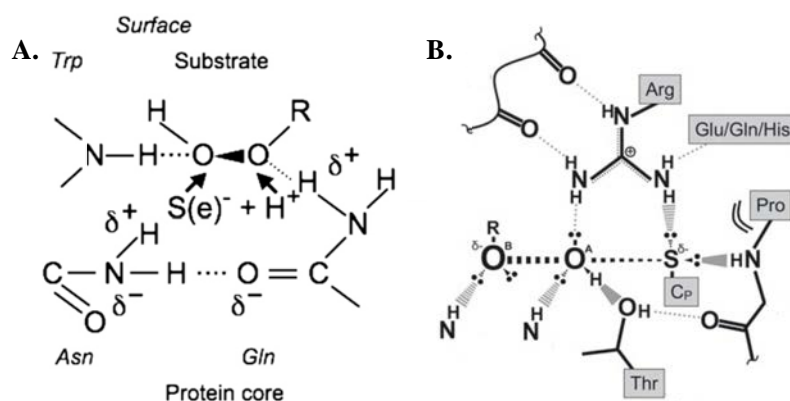
C. Contrôle cinétique de la signalisation redox par le peroxyde d'hydrogène

Au sein de la complexité et de la diversité du milieu cellulaire, un grand nombre de résidus Cys activés sous forme thiolate sont potentiellement capables de réagir avec H_2O_2 . L'oxydation de ces résidus est alors dictée par la réactivité, au sens cinétique, décrite par une constante de vitesse de réaction avec le signal peroxyde. Les événements de signalisation redox dépendent donc des cinétiques relatives de ces réactions d'oxydation et de la compétition entre ces réactions.

1. Réactivité des thiols avec le peroxyde d'hydrogène : l'importance du site actif

La présence d'un résidu Cys activé sous forme thiolate à pH proche de la neutralité, présentant un pKa acide est une condition nécessaire aux modifications oxydatives des protéines de signalisation dans des conditions physiologiques. Néanmoins, cet unique paramètre ne suffit pas à expliquer la réactivité des protéines à thiol avec H_2O_2 . Si l'on considère d'une part, les phosphatases (la PTP1B, la PTP VHR, ou encore la phosphatase cdc25B), et d'autre part les peroxydases à thiol (AhpE, Prx2, Prx5) (Tableau 3, p.37), ces enzymes présentent toutes une Cys catalytique activée caractérisée par un pKa compris entre 5 et 6. Cependant, les constantes de vitesse de réaction avec H_2O_2 de ces deux groupes d'enzymes diffèrent de plusieurs ordres de grandeur. Alors que les phosphatases réagissent avec H_2O_2 avec des constantes de vitesse comprises entre 9,1 et $164 M^{-1}.s^{-1}$, les peroxydases à thiol sont caractérisées par des constantes de vitesse allant de 10^5 à $10^7 M^{-1}.s^{-1}$. Cette efficacité catalytique, quasiment exclusive à cette famille d'enzymes (à l'exception de OxyR) et spécifique aux substrats peroxydes trouve son explication au niveau du micro-environnement de la cystéine catalytique C_p .

Les CysGpx possèdent un site catalytique composé des résidus C_p , Asn, Gln et Trp (205) (Figure 15 A). Les acides aminés Asn, Gln et Trp forment un réseau de liaisons hydrogène qui favorise la polarisation nucléophile du résidu Cys, l'abaissement de son pKa, et la polarisation de la liaison peroxyde, permettant ainsi l'attaque sur l'atome d'oxygène appauvri en électrons du substrat peroxyde.



Les Prx, quant à elles, présentent un site catalytique composé des résidus C_p, Pro, Thr et Arg (206) (Figure 15 B, p.34). Un réseau de liaisons hydrogène impliquant à la fois les chaînes principales et latérales de ces quatre résidus permet de positionner le substrat peroxyde et de stabiliser l'état de transition linéaire de la réaction caractérisée par la formation partielle de la liaison entre l'atome de soufre et l'un des atomes d'oxygène du peroxyde et le clivage partiel de la liaison peroxyde (Figure 15 B, p.34). Au sein de la tétrade, il a été postulé que les résidus Thr et Arg positionnent et polarisent le substrat peroxyde. L'Arg participerait en plus à l'activation de la C_p sous forme thiolate. Le résidu Pro positionnerait les résidus Thr et Arg de manière optimale pour la formation de liaisons hydrogène (206) et jouerait un rôle de fermeture du site actif. Dans ce mécanisme, une molécule d'H₂O jouerait le rôle de donneur de H⁺, facilitant le départ du groupe partant.

Les CysGpx et les Prx sont donc des catalyseurs spécialisés dans la réduction des peroxydes possédant un site actif à Cys hautement sensible à l'oxydation par H₂O₂, qui permet non seulement de stabiliser la forme thiolate de la C_p, mais en plus d'accommoder le substrat peroxyde de manière à stabiliser l'état de transition de la réaction, polariser la liaison peroxyde et à faciliter le départ du groupe partant.

2. Limitations imposées par les systèmes antioxydants

Les thiols réagissent avec les peroxydes par une réaction de second ordre : en d'autres termes, la vitesse de la réaction d'oxydation est proportionnelle à la concentration en H₂O₂ et en thiol. Dans ce contexte, si l'on compare les constantes de vitesse et les concentrations des Prx, Gpx et catalases d'une part et des protéines de signalisation à thiol d'autre part, il apparaît que ces dernières ont peu de chance de réagir avec H₂O₂ dans des conditions physiologiques. Les protéines de signalisation comme la PTP1B ou Keap1 présentent des constantes de vitesse de réaction avec H₂O₂ inférieures de plusieurs ordres de grandeur comparées à celles des enzymes antioxydantes (Tableau 3, p.37). De plus, les concentrations intracellulaires de ces protéines sont beaucoup plus faibles (lorsqu'elles sont connues). Les Prx, Gpx et catalases pourraient donc réduire la majorité de H₂O₂, constituant un goulot d'étranglement cinétique empêchant toute réaction significative entre H₂O₂ et les protéines de signalisation à thiol (207) (Figure 16, p.36). Une modélisation cinétique réalisée par l'équipe de M. Kemp a permis de conclure que l'oxydation directe de protéines à thiol (autres que les peroxydases à thiol) deviendrait non significative, dans des conditions physiologiques, pour des constantes de vitesse de réaction avec H₂O₂ de l'ordre de

Introduction

$5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui reste supérieur de un à deux ordres de grandeur par rapport aux constantes de vitesse des protéines de signalisation connues actuellement (208), à la seule exception de OxyR. De plus, ces protéines à thiol, pour entrer en compétition avec les systèmes antioxydants, devraient présenter des constantes de vitesse de l'ordre de $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et/ou des concentrations intracellulaires de l'ordre de $200 \mu\text{M}$ (208).

Néanmoins, plusieurs mécanismes pourraient permettre l'activation spécifique des protéines de signalisation à thiol en réponse à un signal oxydant, bien qu'ils aient été peu caractérisés. Premièrement, la colocalisation de la cible et de la source de peroxydes permettrait d'augmenter les concentrations locales des deux réactants et par conséquent les vitesses de réaction. Deuxièmement, les réactions d'oxydation pourrait avoir lieu dans un environnement privé des peroxydases à thiol, comme dans des endosomes ou « redoxosomes » (209). Troisièmement, la réactivité des protéines de signalisation avec les peroxydes pourrait être exacerbée par modification post-traductionnelle ou par interaction avec un partenaire protéique à rôle de « catalyseur » (210). Enfin une autre hypothèse serait que les peroxydases à thiol (Prx et CysGpx) jouent le rôle d'intermédiaires dans les processus de signalisation redox dépendants de H_2O_2 (Figure 16) (Chapitre III, p.38).

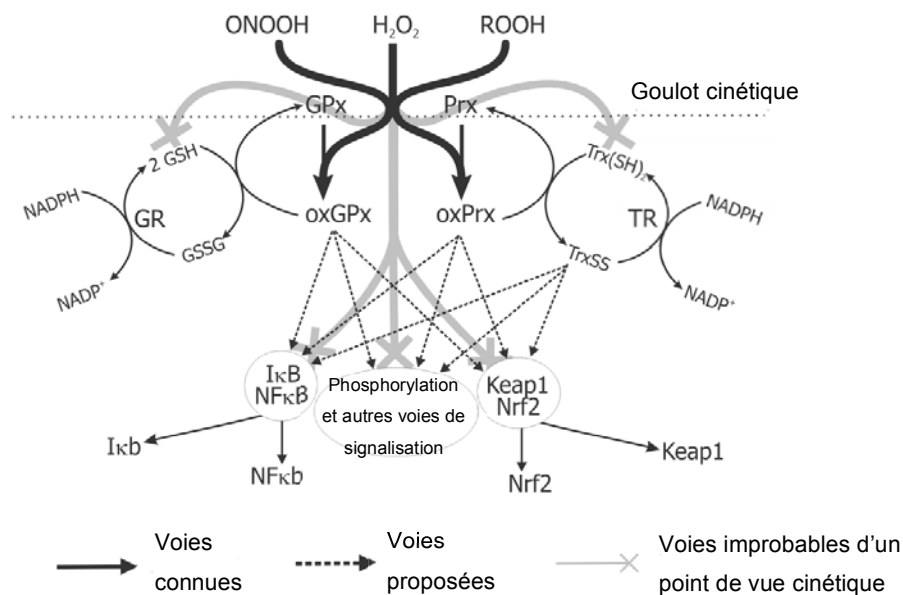


Figure 16. Voies par lesquelles les thiols relaient la signalisation redox par les peroxydes.

oxGpx, oxPrx : Gpx et Prx oxydées.

Les Gpx et les Prx représentent des cibles cinétiquement favorables pour l'oxydation par les peroxydes à un niveau où elles limitent fortement toute réaction entre les peroxydes et les autres thiols. La réaction entre les peroxydes et les molécules de signalisation comme par exemple Keap1 et IκB pourrait avoir lieu de manière indirecte au cours de réactions impliquant les Gpx et les Prx (d'après Ferrer-Sueta et al., 2011 (211)).

Tableau 3. Comparaison du pKa, de la réactivité avec H₂O₂ et des concentrations de différent(e)s thiols et protéines à (Se)Cys.

Les concentrations ont été estimées selon une concentration de protéine cellulaire totale de 200 mg/mL et le poids moléculaire des protéines de tel sorte qu'un composé correspondant à 0,1% de la fraction totale présentera une concentration de 5 à 10 µM (203, 212).

| Thiol - protéine | Organisme | pKa de la fonction thiol du résidu Cys | Constante de vitesse de réaction avec H ₂ O ₂ (M ⁻¹ .s ⁻¹) | Concentrations intracellulaires | Conditions de mesure | Références |
|------------------------------|-------------------------|--|---|---------------------------------|----------------------|---------------|
| GSH | - | 8,8 | 0,87 | 2 mM | 37°C, pH 7,4 | 31, 212 |
| Cys libre (-SH) | - | 8,3 | 2,9 | - | 37°C, pH 7,4 | 31 |
| GS ⁻ | - | - | 17-18 | - | 25°C | 31 |
| Cys libre (-S ⁻) | - | - | 17-18 | - | 25°C | 31, 198 |
| PTP1B | <i>Homo sapiens</i> | 5,5 | 9,1-42,8 | 0,1 µM | 30°C, pH 7 | 201, 212, 218 |
| PTP VHR | <i>Homo sapiens</i> | 5,6 | 18 | - | 30°C, pH 7 | 201, 219 |
| Phosphatase cdc25B | <i>Homo sapiens</i> | 5,9 | 164 | 0,1 µM | 20°C, pH 7 | 212, 220, 221 |
| Keap1 | <i>Homo sapiens</i> | - | 140 | - | - | 185 |
| OxyR | <i>Escherichia coli</i> | - | 2.10 ⁵ | - | pH7 | 166 |
| SeGpx | <i>Bovinae</i> | - | 6.10 ⁷ | 2 µM | - | 212, 222 |
| Gpx3 Humaine | <i>Homo sapiens</i> | - | 4,0. 10 ⁷ | 2 µM | 37°C, pH 7,4 | 223, 212 |
| Gpx1 bovin | <i>Bovinae</i> | - | 1,5.10 ⁷ | 20 µM | - | 222, 212 |
| AhpE | <i>M. tuberculosis</i> | 5,2 | 8,2.10 ⁴ | - | 25°C, pH 7,4 | 212, 213 |
| Prx 2 | <i>Homo sapiens</i> | 5-6 | 1,3.10 ⁷ | 240 à 410 µM (erythrocyte) | 20°C, pH 7,4 | 214, 215 |
| Prx 5 | <i>Homo sapiens</i> | 5,1 | 3,0.10 ⁵ | 1,8 à 9 µM (Rattus Norvegicus) | 25°C, pH 7,5 | 216, 217 |

Chapitre III. Les peroxydases à thiol dans la signalisation redox

L'expression de multiples isoformes de peroxydases à thiol suggère l'évolution de certaines de ces enzymes comme médiateurs de la signalisation redox (227,228). En effet, ces enzymes ne sont pas seulement des systèmes de dégradation passif des peroxydes mais jouent un rôle actif dans la signalisation par les peroxydes. Les Prx peuvent être inactivées par différentes modifications post-traductionnelles et ainsi jouer le rôle de fins régulateurs locaux du signal peroxyde. L'oxydation des peroxydases à thiol est transformée en l'oxydation des Trx qui peuvent alors moduler certains événements de signalisation redox. Les Prx et CysGpx présentent la capacité d'interagir avec des protéines sensibles aux conditions redox (229–232) et peuvent jouer le rôle de capteur et de relai du signal peroxyde garantissant ainsi la spécificité et la vitesse nécessaire au processus de signalisation. La localisation, l'abondance cellulaire, la réactivité de ces enzymes envers les peroxydes et l'implication de ces enzymes dans les voies de signalisation cellulaire redox ont conféré aux peroxydases à thiol un rôle complexe dans la physiologie cellulaire.

A. Régulation post-traductionnelle des peroxydases à thiol

La fonction peroxydase des Prx peut être inhibée par des modifications post-traductionnelles avec notamment la suroxydation sous forme acide sulfinique du résidu C_p et la phosphorylation de résidu Thr et Tyr. Ces modifications, qui peuvent être réversibles, sont à l'origine d'un gain de fonctions. De telles modifications des CysGpx ont été très peu décrites et ne seront pas abordées ici.

1. La suroxydation des 2-Cys peroxyrédoxines typiques

a. Mécanisme de la suroxydation

La suroxydation des peroxydases à thiol résulte de l'attaque d'une seconde molécule de H_2O_2 sur la C_p oxydée sous forme acide sulfénique (C_p-SOH) (Chapitre II.A.1.c, p.23). Elle a pour conséquence d'inhiber l'activité peroxydase. L'équipe de P. Karplus a démontré en 2003 que les 2-Cys Prx typiques eucaryotes et de cyanobactéries sont particulièrement sensibles à la suroxydation sous forme acide sulfinique (C_p-SO_2H).

Ces Prx possèdent deux motifs conservés, identifiés par des alignements de séquences (233) et des mutants de délétion (234). Le premier motif correspond à une boucle portant la séquence conservée GGLG située dans l'environnement de la C_p , et le second à une hélice supplémentaire à l'extrémité C-terminale portant le motif conservé YF. La présence de ces éléments structuraux stabilise l'hélice portant la C_p , ce qui limiterait la vitesse du réarrangement conformationnel requis pour la formation du pont disulfure et augmenterait la susceptibilité de la C_p oxydée sous forme acide sulfénique (C_p-SOH) à l'oxydation par une seconde molécule de H_2O_2 (Figure 17). En effet, des études structurales ont révélé l'existence de deux conformations du site actif (96, 227) : une conformation totalement repliée (Figure 17 A) (228, 229) où la C_p et la C_R sont peu accessibles et situées à plus de 14 Å l'une de l'autre, et une conformation partiellement dépliée (Figure 17 B) (230, 231) dans laquelle la réaction entre la Cys C_p-SOH et la C_R est possible.

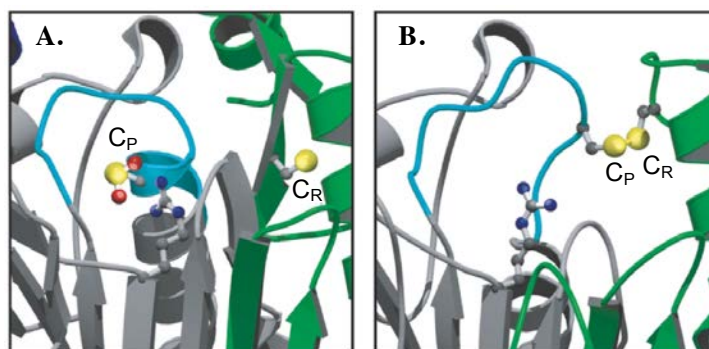


Figure 17. Corrélation entre la structure et la sensibilité à la suroxydation des 2-Cys Prx typiques.

Structure des sites actifs de la Prx2 humaine dont la C_p est oxydée sous forme acide sulfinique (A) et de la Prx1 humaine dont les C_p et C_R sont oxydées sous forme pont disulfure (B).

La boucle et le premier tour d'hélice du motif structural boucle-hélice sont représentés en turquoise. Les résidus Arg, C_p et C_R sont représentés selon le modèle boule-bâton, avec les atomes de soufre colorés en jaune, les carbones en noir et les azotes en bleu. Les monomères sont représentés en gris et en vert (d'après Wood et al., 2003 (234)).

Introduction

L'existence d'un tel mécanisme chez une classe spécifique de Prx et la découverte d'une enzyme capable de la rendre réversible (la Sulfirédoxine (Srx), Chapitre III.A.1.b) a conduit à soulever la question de l'importance biologique de ce phénomène. Cette sensibilité unique des 2-Cys Prx typiques eucaryotes et de cyanobactéries à l'inactivation par suroxydation ne serait pas une limitation du mécanisme catalytique mais une propriété sélectionnée au cours de l'évolution, qui correspondrait à un gain de fonction (Chapitre III.A.1.c et Chapitre III.A.2, p.43) (215,214).

b. La suroxydation, une modification réversible

L'acide sulfinique a d'abord été considéré comme une modification irréversible du résidu Cys dans des conditions physiologiques, étant donné que celui-ci ne peut être réduit par les réducteurs cellulaires classiques (GSH/Grx ou Txr/TR). Cependant, il a été observé que des 2-Cys Prx typiques suroxydées sous forme acide sulfinique sont graduellement réduites sous leur forme active *in vivo* (233, 234). En 2003, l'enzyme responsable de la réduction des 2-Cys Prx typiques suroxydées a été identifiée chez *S. cerevisiae* par l'équipe de M. Toledano (241). Il s'agit de la Srx. Son expression induite par l'exposition à H₂O₂ et la sensibilité à H₂O₂ de cellules de *S. cerevisiae* dont le gène *srx1* est invalidé ont permis d'associer Srx au métabolisme des peroxydes.

Les Srx sont une famille de protéines conservées chez certains organismes eucaryotes et cyanobactéries, possédant un résidu Cys conservé (242). Ces enzymes catalysent la réduction de l'acide sulfinique par un mécanisme à plusieurs étapes, nécessitant la présence d'ATP, de Mg²⁺ et d'un thiol comme donneur d'électron (Figure 18, p.41) (241).

La réversion de l'inactivation des 2-Cys Prx suroxydées par l'activité sulfinyl réductase des Srx représente un niveau supplémentaire de régulation des différentes fonctions des 2-Cys Prx impliquant les Srx dans la signalisation redox associée à H₂O₂ (Chapitre III.A.2.a, p.43) avec un impact potentiel dans le vieillissement cellulaire et le maintien du rythme circadien (Chapitre III.A.1.c). En plus de leur activité sulfinyl-réductase, les Srx auraient également un rôle dans la déglutathionylation des protéines (243) et pourraient présenter une activité nucléase (244).

c. La suroxydation comme gain de fonction

La suroxydation réversible des 2-Cys Prx typiques inhibe leur activité peroxydase mais favoriserait l'apparition d'une activité chaperon de type « holdase ». Mis en évidence *in vitro*, ce mécanisme d'action des 2-Cys Prx typiques reste à démontrer *in vivo*. Cette activité

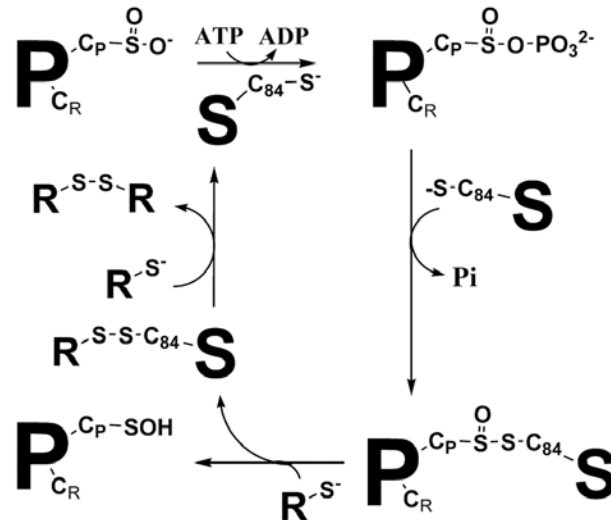


Figure 18. Suroxydation des Prx et réduction par la Srx.

P : Prx, S : Srx, R : réducteur à thiol. Au cours du mécanisme de réduction de la C_p-SO_2H par la Srx, l'acide sulfonique est activé par phosphorylation (transfert direct du γ -phosphate de l'ATP). L'anhydride phosphoryl sulfonique formé est ensuite réduit par attaque de la Cys catalytique de Srx pour former une liaison thiolsulfinate. Enfin, ce complexe est réduit directement ou indirectement par la Trx ou le GSH conduisant à la libération de la Srx sous forme réduite et de la Prx oxydée sous forme acide sulfénique (d'après Roussel et al., 2009 et Boukhenouna et al., 2015 (243,245)).

est liée à l'état d'oligomérisation des Prx qui dépend lui-même de l'état d'oxydation de la C_p (246). Sous forme réduite, les dimères de 2-Cys Prx s'associent majoritairement sous forme de décamères, en équilibre avec une faible proportion de dimères. Les décamères de Prx présentent une structure toroïdale, comprenant cinq dimères associés par des interactions hydrophobes (227, 244, 245) (Figure 19 A, p.42). Cet état d'oligomérisation des Prx a été visualisé dès les années 1960 par microscopie électronique sur des erythrocytes humains (249). Les structures visualisées ont alors été attribuées à une protéine nommée Torine qui en 2001 s'est révélée être la Prx2 (250). La formation du pont disulfure au cours du cycle catalytique des Prx induit une réorganisation conformationnelle (Chapitre III.A.1.a, p.39) qui a pour conséquence de déstabiliser les interfaces dimère-dimère au sein du décamère (251) : l'équilibre est déplacé vers la forme dimérique. Au contraire, la suroxydation de la C_p stabilise la forme décamerique et déplace l'équilibre vers la formation de complexes de haut poids moléculaire correspondant à l'empilement de décamères (Figure 19 B, p.42) (237,249,250,235).

D'autre part, il a été observé récemment que la suroxydation des 2-Cys Prx typiques est associée au rythme circadien. Les rythmes circadiens permettent aux organismes vivants de synchroniser les processus biologiques avec les conditions de l'environnement, comme par exemple le cycle jour/nuit. Ces rythmes, correspondant à des oscillations présentant une période d'environ vingt-quatre heures, participent à la coordination du comportement, de la

Introduction

physiologie et du métabolisme (256), et sont conservées dans tous les règnes du vivant. Chez l'Homme, il a été démontré que des dysfonctionnements des rythmes circadiens peuvent provoquer des désordres neurodégénératifs, et contribuer à l'apparition de pathologies comme la dépression, l'inflammation, les maladies du coeur, le diabète et les cancers (257–259). J. O'Neill et A. Reddy ont montré en 2011 que la suroxydation des 2-Cys Prx suit des oscillations d'une période de vingt-quatre heures dans des érythrocytes humains (Figure 20) (260), de manière indépendante de la transcription.

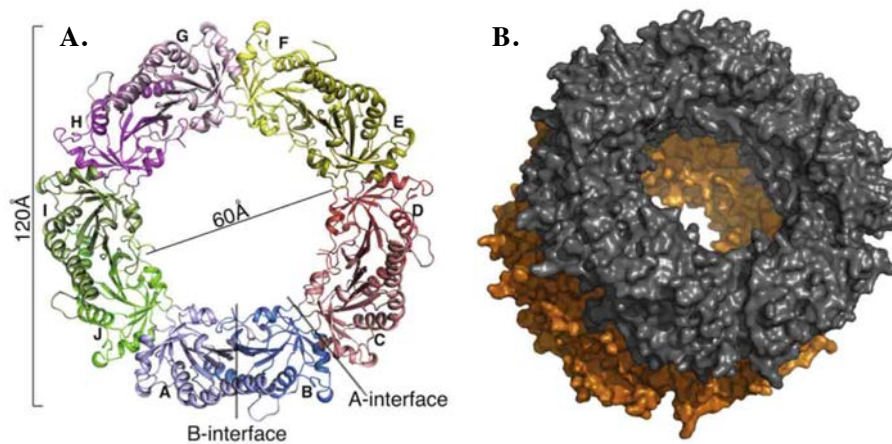


Figure 19. L'oligomérisation des Prx forment des structures de haut poids moléculaire.

A-interface : interface entre les dimères, B-interface : interface au sein d'un dimère.

A. Vue de dessus de la structure d'un pentamère de dimères de Prx1 (décamère). Chaque dimère est représenté par une couleur différente, et chaque monomère porte une lettre de A à J. **B.** Surface des structures de haut poids moléculaire formées par l'empilement de décimères de Prx. Ici, deux décimères sont représentés, l'un en gris, l'autre en orange, et qui présente une rotation de 18° par rapport à l'axe de symétrie à cinq (d'après Saccoccia et al., 2012 (255)).

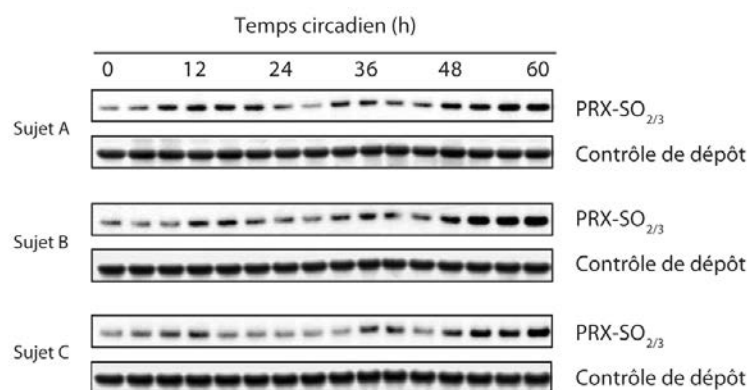


Figure 20. Oscillations circadiennes de l'oxydation de Prx2 dans des érythrocytes humains.

Des érythrocytes de trois sujets humains ont été placés dans des conditions stables (37°C – obscurité). Des échantillons ont été prélevés toutes les 4 heures et la proportion de Prx2 suroxydée a été appréhendée par Western blot avec un anticorps dirigé contre les Cys suroxydées (217). Tous les sujets présentent une suroxydation de la Prx2 qui suit une oscillation de 24h en accord avec le temps circadien (d'après O'Neill et Reddy, 2011 (260)).

Enfin, Les 2-Cys Prx typiques ont également été associées au vieillissement répliatif de la levure *S. cerevisiae*. Récemment, l'équipe de Nyström (261) a montré que la forme suroxydée de Tsa1 (« Thiol Specific Antioxidant 1 », la 2-Cys-Prx la plus abondante chez la levure *S. cerevisiae*) s'accumulait au cours du vieillissement de la levure *S. cerevisiae*. De plus, une copie supplémentaire du gène *srx1* chez la levure prolonge la durée de vie répliatif d'une manière dépendante de Tsa1. Cette fonction de Tsa1 pourrait être associée soit à son activité antioxydante, soit à ses propriétés de chaperon.

2. L'hypothèse du « floodgate »

a. Régulation des peroxyredoxines par suroxydation

Comme nous l'avons abordé précédemment, la concentration cellulaire de H_2O_2 est strictement limitée par l'arsenal cellulaire antioxydant (Chapitre I.B.2, p.11). Cependant, pour permettre l'oxydation des protéines de signalisation à Cys, la concentration de H_2O_2 doit nécessairement augmenter au delà d'un certain seuil et/ou doit pouvoir être soutenue dans le temps. La théorie de la vanne (ou « floodgate hypothetis »), formulée par l'équipe de P. Karplus en 2003 (234), propose que l'inactivation des 2-Cys Prx eucaryotes permette l'augmentation transitoire des niveaux intracellulaires de H_2O_2 . Les molécules de H_2O_2 évitant ainsi la dégradation par les Prx pourraient assurer leur fonction de second messager. La Srx, permettant la réversibilité du processus, empêcherait l'accumulation des peroxydes à des niveaux délétères pour la viabilité cellulaire.

Cependant, ce modèle de vanne par suroxydation présente certaines limitations non négligeables. Chez les mammifères, la suroxydation des Prx1 et 2 cytoplasmiques n'a pas été observée dans des cellules de mammifères stimulées avec différents facteurs de croissance (262–264). Les concentrations de H_2O_2 générées seraient trop faibles par rapport à celles requises pour permettre leur suroxydation (244–246). Des Prx suroxydées ont seulement été observées pour des cellules exposées à des niveaux dommageables de peroxydes (266, 267).

Néanmoins, ce modèle de la vanne a été récemment illustré par une première preuve expérimentale. Il a été démontré que l'inactivation de la Prx3 mitochondriale par suroxydation, accompagnée par l'accumulation transitoire de H_2O_2 dans des cellules du cortex surrénal de souris, serait à la base d'une boucle de régulation négative impliquant l'import mitochondrial de Srx, régulant la stéroïdogenèse (270) (Figure 21, p.44).

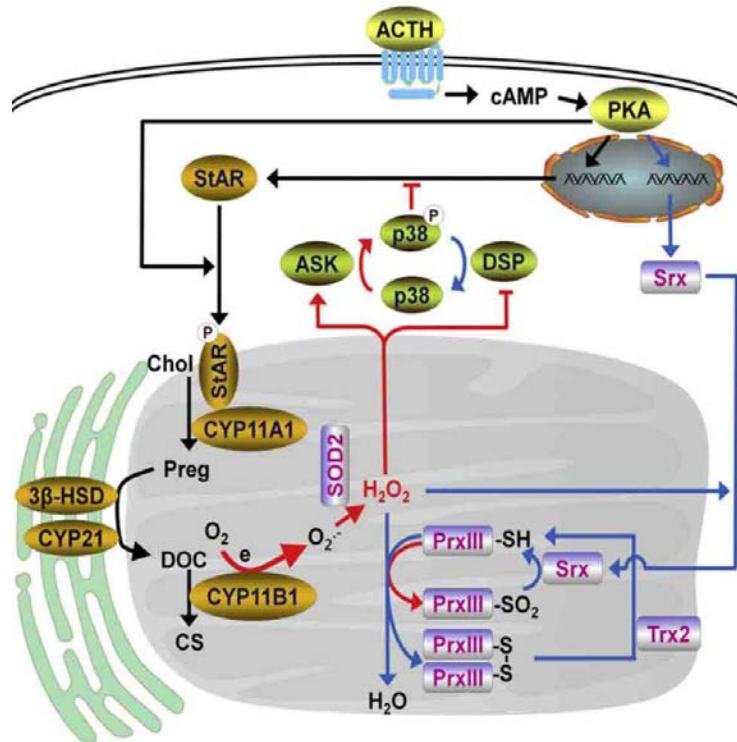


Figure 21. Modèle de la génération de H₂O₂, la suroxydation réversible de Prx3 et l'induction de Srx dans la stéroïdogénèse.

Les étapes menant à la synthèse de corticostérone sont indiquées par des flèches noires, les étapes menant à l'accumulation de H₂O₂ et à l'inhibition de la synthèse de StAR sont indiquées par des flèches rouges et les étapes menant à la diminution de la concentration de H₂O₂ sont indiquées par des flèches bleues. Chol : cholestérol, Preg : prégnénolone, DOC : désoxycorticostérone, CS : corticostérone.

La fixation de l'ACTH (Adrenocorticotropin hormone) à son récepteur déclenche la voie de signalisation cAMP-PKA qui induit la phosphorylation et l'activation de StAR. StAR permet de recruter le cholestérol de la membrane mitochondriale externe. CYP11A1 et CYP11B1 convertissent le cholestérol en corticostérone par des réactions d'oxydation. Ces réactions de transfert d'électrons produisent H₂O₂ par la dismutation de O₂^{•-}. Prx3 est engagée dans la dégradation des peroxydes et se suroxyde rapidement. La libération de H₂O₂ dans le cytoplasme conduit à l'inactivation de la stéroïdogénèse par le système ASK1/p38 et l'expression du gène *srx* permettant la réactivation de Prx3 (adapté de Kil et al., 2012 (270)).

b. Régulation des peroxyrédoxines par phosphorylation

La suroxydation de la C_p des 2-Cys Prx en acide sulfonique n'est pas la seule modification post-traductionnelle conduisant à l'inactivation de l'activité peroxydase. L'un des exemples les plus détaillés de la régulation de l'activité peroxydase des Prx par phosphorylation a été publié en 2010. L'équipe de S. Rhee a démontré que la 2-Cys Prx typique Prx1 peut être inactivée localement par phosphorylation, permettant la propagation du signal oxydant de H₂O₂ dans des zones cellulaires définies.

La stimulation de différents récepteurs tyrosine kinase (PDGFR, EGFR) de plusieurs types cellulaires humains induit la production de H₂O₂ par activation de Nox1. La protéine

tyrosine kinase c-Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase), est alors activée par H_2O_2 , par oxydation directe de son résidu Cys ou indirectement par inactivation des protéines phosphatases, et catalyse la phosphorylation du résidu Tyr194 de la fraction de Prx1 exclusivement confinée au compartiment sous-membranaire (Figure 22). Des essais *in vitro* ont permis de mettre en évidence que la phosphorylation du résidu Tyr 194 diminue significativement l'activité peroxydase de Prx1. Une modélisation structurale a permis de prédire que le phosphate de la phospho-tyrosine d'une sous-unité est positionné à 9 Å de l'atome de soufre de la C_p (Cys52) de l'autre sous-unité. Cette modification aurait pour conséquence de diminuer la réactivité de la C_p en limitant la déprotonation de la fonction thiol. Ces mécanismes conduiraient à l'augmentation locale de la concentration en H_2O_2 nécessaire pour la régulation des protéines de signalisation, en accord avec la théorie de la vanne. La fin de l'épisode de signalisation est assurée par la Prx1. Celle-ci resterait inactive tant que les niveaux de H_2O_2 confinés au compartiment sous-membranaire sont faibles. La stricte localisation de ces événements au compartiment sous-membranaire, où les protéines de signalisation sont colocalisées, empêche l'accumulation toxique des peroxydes. Ces mécanismes illustrent comment les Prx peuvent moduler finement le rôle signal de H_2O_2 tout en limitant la toxicité associée, dans les cellules de mammifères.

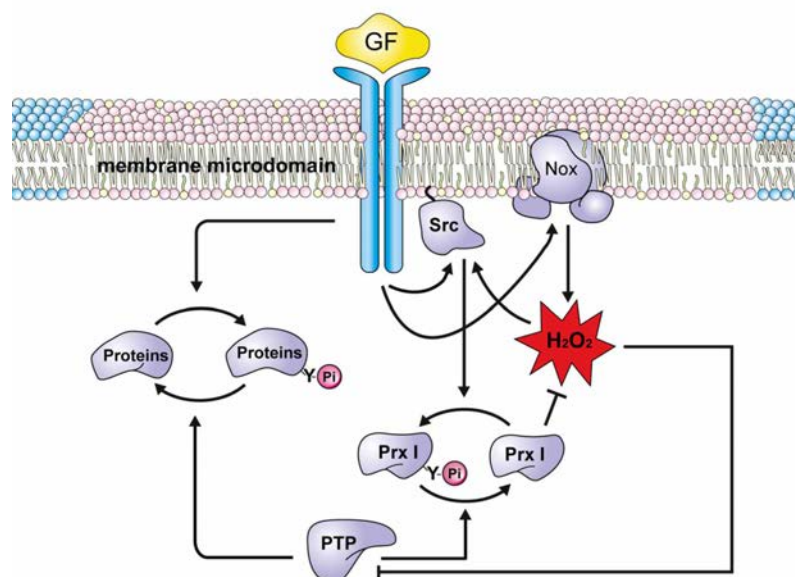


Figure 22. Modèle de l'hypothèse du « floodgate » par phosphorylation de Prx1.

GF : facteur de croissance.

L'inactivation de la Prx1 permet l'accumulation de H_2O_2 au niveau du compartiment sous-membranaire, qui permet en retour l'activation de deux boucles de régulation positive. D'une part, l'activation de la c-Src régulant négativement la Prx1 par phosphorylation et d'autre part, l'inhibition des protéines phosphatases, prolongeant ainsi l'inactivation de la Prx1 phosphorylée. Adapté de Woo et al., 2010 (264).

Introduction

Une autre étude a mis en évidence que l'activité peroxydase de Prx1 peut également être inhibée par phosphorylation de résidus Thr, contribuant à l'augmentation des niveaux intracellulaires de H₂O₂ (271). Des études d'interaction par double hybride et immuno-précipitation ont permis de démontrer l'association redox-dépendante de la Ser/Thr kinase Mst1 (Mammalian Sterile 20-like kinase 1) et de Prx1. L'activation de Mst1 en réponse à H₂O₂ induit l'inactivation de Prx1 par phosphorylation des résidus Thr 90 et Thr 183 et implique donc Mst1 dans une boucle de régulation positive.

B. Les peroxydases à thiol comme relais redox

Si les protéines de signalisation régulées par des événements redox ne sont pas les cibles directes de H₂O₂, une possibilité est que le signal oxydant soit transmis par les peroxydases à thiol. Des mécanismes initialement caractérisés chez la levure et plus récemment chez les mammifères impliquent des peroxydases à thiol en tant que détecteurs et relais, par la formation de complexes protéine-protéine et de ponts disulfure. Par ces mécanismes, le signal peroxyde serait concentré au sein d'une population restreinte d'effecteurs, les peroxydases à thiol, ce qui permettrait d'expliquer l'efficacité et la spécificité de la signalisation redox. Les principaux mécanismes découverts à ce jour impliquant une peroxydase à thiol en tant que détecteur et relai du signal peroxyde seront présentés selon leur niveau de caractérisation, en commençant par les mécanismes les moins caractérisés.

1. Chez les mammifères

Très peu d'exemple de mécanismes impliquant les peroxydases à thiol en tant que détecteur de H₂O₂ ont été mis en évidence chez les mammifères.

a. Le relai Prx1/ASK1

Alors que le rôle de l'activité Trx dans la réduction du complexe ASK1 multimérique était bien établi (Chapitre II.B.3, p.31), le mécanisme d'oxydation de ASK1 a été examiné seulement récemment (272). La MAP3K ASK1 est activée par formation de ponts disulfure intermoléculaires en réponse à H₂O₂, ce qui conduit à la phosphorylation des protéines kinases p38 et JNK (192, 296). L'équipe de E. Ledgerwood s'est intéressée au rôle de la Prx1 (une 2-Cys Prx typique) dans cette voie de signalisation (272). Cette étude a démontré que l'activation de la voie ASK1/p38 induite par H₂O₂ est inhibée par délétion de Prx1, en accord avec d'autres études rapportant le même effet suite à la diminution de

l'expression de Prx1 (274). Un suivi des cinétiques et de la dynamique des échanges thiol/pont disulfure pendant l'activation de ASK1 a permis de montrer que Prx1 catalyse l'oxydation de ASK1 par des échanges de ponts disulfure, permettant l'activation totale de cette voie de signalisation en réponse aux peroxydes. De plus, la formation de ponts disulfure intermoléculaires transitoires entre Prx1 et ASK1 a été mise en évidence. Ces résultats supportent un modèle dans lequel Prx1 joue le rôle de relai, catalysant la formation de pont disulfure dans une protéine cible spécifique.

Ainsi, cette étude correspond à la première preuve expérimentale supportant le fait que les modifications oxydatives des protéines de signalisation de type kinase peuvent passer par un mécanisme indirect chez les mammifères, comme l'avaient suggéré auparavant de nombreuses études (89, 203, 218).

b. Le relai Prx2/STAT3

Très récemment, la première démonstration de l'existence d'un relai de signalisation connectant les peroxydases à thiol à des facteurs de transcription a été découverte dans des cellules animales. L'équipe de T. Dick a démontré que la peroxydase à thiol Prx2 se comporte comme un détecteur primaire de H_2O_2 relayant le signal oxydant au facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) (275).

Dans ce mécanisme, Prx2 est une 2-Cys-Prx typique (276) et STAT3 est intégré dans la voie JAK/STAT, régulant la croissance, la survie, la différenciation cellulaire et qui est activée par différentes cytokines comme l'interleukine 6 (IL-6). L'exposition de cellules humaines embryonnaires de rein HEK293T à de faibles concentrations de peroxyde, suivie de la recherche des partenaires d'interaction de Prx2, a permis de détecter une espèce Prx2—STAT3 liée covalamment par un pont disulfure intermoléculaire. De plus, il a été observé que STAT3, qui contient 14 résidus Cys, est converti en espèces oligomériques (dimériques et tétramériques) par formation de ponts disulfure intermoléculaires qui ne sont pas observés lorsque le gène *prx2* est délété ou remplacé par un mutant insensible aux conditions redox. Ces résultats constituent une preuve directe de la transmission du signal oxydant entre la peroxydase et le facteur de transcription. Pour confirmer la pertinence physiologique de ce processus de signalisation, l'oxydation de STAT3 a été examinée après stimulation cellulaire par des cytokines. Les cytokines induisent effectivement l'oxydation de Prx2 mais également de STAT3 d'une manière dépendante du niveau d'expression de Prx2. La Trx catalyse la réduction de Prx2 et de STAT3, nécessaire à la terminaison de l'événement de signalisation. L'oligomérisation de STAT3 sous forme covalente provoque la diminution

de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription (277), qui serait due à la présence de ponts disulfure encombrant le domaine de fixation à l'ADN. Prx2 inhibe donc l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription STAT3 par oxydation en réponse à de faibles concentrations physiologiques de H_2O_2 .

Deux hypothèses ont été postulées concernant le mécanisme de transfert du signal oxydant entre Prx2 et STAT3 (Figure 23). L'oxydation de la C_p par H_2O_2 conduit à la formation d'un intermédiaire acide sulfénique. La formation du complexe disulfure mixte pourrait résulter de l'attaque directe d'une Cys de STAT3 sur cet intermédiaire sulfénique, ou indirecte sur la forme oxydée disulfure C_p-C_r de la Prx2.

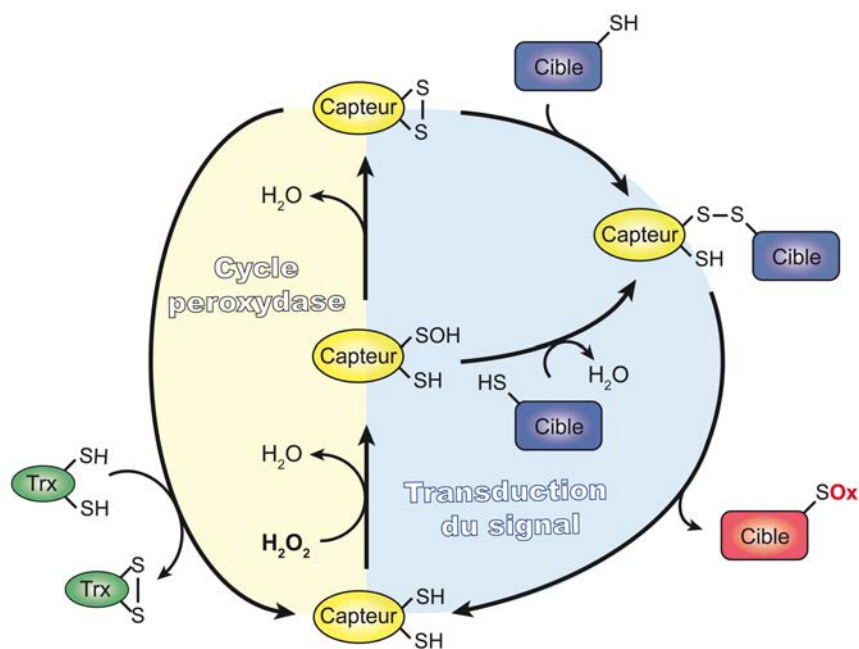


Figure 23. Mécanismes proposés de l'activation d'une protéine de régulation par H_2O_2 via un senseur de type peroxydase à thiol.

Capteur : peroxydase à thiol, cible : protéine de régulation, SOx : Cys oxydée (Adapté de Sobotta *et al.*, 2014 et Winterbourn et Hampton, 2014 (278)).

2. Chez les levures

L'un des régulateurs clefs de la réponse au stress oxydant chez les levures est la classe AP-1 de facteur de transcription à domaine bZip (Basic domain – Leucine Zipper). Le membre de cette classe qui a été le plus caractérisé est le facteur de transcription AP-1 de *S. cerevisiae* (Yap1). Des homologues de Yap1 ont été identifiés dans un certain nombre d'autres espèces de levure (279) avec en particulier Pap1 de *S. Pombe* et Cap1 de *C. Albicans* qui ont été caractérisés plus récemment (280–282). La régulation de ces protéines est assurée par l'import et l'export nucléaire, impliquant la formation de pont(s) disulfure

intramoléculaire(s) dissimulant un signal d'export nucléaire en condition de stress. Cette caractéristique reflète la conservation du domaine bZip, de deux domaines riches en Cys N- et C-terminal et de domaines d'import et d'export nucléaire. L'activation des facteurs de transcriptions Yap1, Pap1 et Cap1 est indirecte et fait intervenir une peroxydase à thiol en tant que détecteur de H₂O₂ selon un mécanisme qui est similaire pour Yap1 et Cap1 (282) et différent pour Yap1 et Pap1. Il n'est pas connu si ces mécanismes sont conservés dans d'autres espèces levures.

a. Le relai Tpx1/Pap1 de *Schizosaccharomyces pombe*

Pap1 (*pombe* AP-1) est un facteur de transcription possédant un domaine de liaison à l'ADN de type bZip, homologue aux facteurs AP-1 de mammifère (c-Jun, c-Fos, etc). Son activation est critique pour la réponse adaptative de *S. pombe* au stress oxydant (283). En réponse à H₂O₂, Pap1 induit l'expression de 40 à 80 gènes impliqués dans la défense antioxydante (*ntr1*, *catalase1*, etc) et la résistance à différents composés chimiques (283–286). Pap1 présente une organisation en plusieurs domaines fonctionnels (Figure 24 A) : un domaine NLS (Nuclear Localisation Signal) reconnu par une importine ; un domaine Leucine-zipper de liaison à l'ADN, deux domaines CRD (Cys Rich Domain) qui contiennent chacun quatre et trois résidus Cys (Cys259, Cys278, Cys285 et Cys290 pour le n-CRD et Cys501, Cys523 et Cys532 pour le c-CRD) et un domaine NES (Nuclear Export Signal)

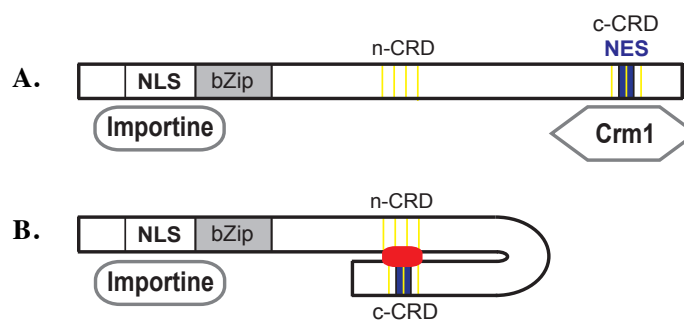


Figure 24. Régulation redox de la localisation nucléaire de Pap1.

NLS : domaine d'import nucléaire, bZip : domaine Leucine-Zipper, NES : domaine d'export nucléaire, n- et c- CRD : domaines riches en Cys N- et C-terminal. Les résidus Cys sont représentés par des traits jaunes.

A. Pap1 possède un domaine NLS, reconnu par une importine, ainsi qu'un domaine NES, reconnu par l'exportine Crm1. Dans des conditions basales, Pap1 est importé dans le noyau et exporté avec une localisation majoritairement cytoplasmique. **B.** En condition de stress induit par H₂O₂, Pap1 s'oxyde par la formation de pont(s) disulfure(s) intramoléculaire(s) impliquant les Cys des deux CRD (représenté(s) en rouge). Cet événement est responsable d'une modification de la conformation du facteur de transcription. L'exportine Crm1 ne peut alors plus reconnaître le domaine NES de Pap1 et le facteur de transcription s'accumule alors dans le noyau où il induit l'expression de ses gènes cibles (adapté selon Boronat *et al.*, 2014 (289)).

Introduction

reconnu par l'exportine Crm1 (« Chromosomal Maintenance 1 », aussi connue sous le nom de exportine 1) (288). Dans cette organisation, le domaine NES est superposé au domaine c-CRD.

La régulation de Pap1 dépend de sa localisation sub-cellulaire. En l'absence de stress, Pap1 est présent sous forme réduite. Les signaux NES et NLS sont respectivement accessibles à l'exportine et à l'importine (Figure 24 A, p.49). Pap1 est alors échangé entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire, avec une localisation globalement cytoplasmique. En condition de stress induit par H₂O₂, Pap1 s'oxyde par formation d'au moins un pont disulfure intramoléculaire entre les domaines CRD (n-CRD et c-CRD), conduisant à un changement de conformation de la protéine (Figure 24 B, p.49) (290–292). Ce changement de conformation a pour conséquence de dissimuler le domaine NES de Pap1 qui ne peut alors plus interagir avec l'exportine Crm1 : Pap1 s'accumule dans le noyau et induit l'expression de ses gènes cibles (290,291). Il a été démontré que les résidus Cys278, Cys285 et Cys523 sont essentiels pour l'activité du facteur de transcription, alors que la Cys501 n'est pas indispensable, mais nécessaire pour son activation totale (292).

L'oxydation de Pap1 par H₂O₂ est indirecte. Elle dépend à la fois de la peroxydase à thiol Tpx1 (Thioredoxin Peroxidase 1), et de la Trx1 (la Trx cytoplasmique majeure de *S. pombe*) (280,281) (Figure 25, p.51). Tpx1 est l'unique 2-Cys Prx typique de *S. pombe* et est essentielle pour la dégradation des peroxydes pendant la croissance aérobie normale (293,294). Il a été prouvé que les deux résidus Cys de Tpx1, C_p et C_R, sont requis au cours de l'activation de Pap1. Le modèle proposé postule que l'activation de Pap1 soit relayée directement par Tpx1 en tant que détecteur d'H₂O₂ par un mécanisme d'échange de ponts disulfure mais n'explique pas le rôle de la Trx1 dans ce relai redox (267,268, 270) (Figure 25, p.51). À des concentrations élevées de H₂O₂ (> 0,2 mM) Tpx1 se suroxyde par formation d'un acide sulfonique C_p–SO₂H, rendant l'enzyme temporairement inactive. À ces concentrations de H₂O₂ (295), la voie de réponse générale au stress MAPK contrôlée par Sty1 (aussi connu sous le nom de Spc1) est activée (274, pour revue). Cette voie aboutit à l'activation du facteur de transcription Atf1 (297,298) induisant l'expression de plus de 200 gènes dont plusieurs ont un rôle dans la protection contre le stress oxydant (299,300), parmi lesquels *srx1*, rendant possible la réduction de Tpx1 suroxydée (280,281).

Pap1 peut également être activé par plusieurs autres espèces chimiques réactives envers les thiols *via* un mécanisme indépendant de Tpx1 qui impliquerait la modification directe des résidus Cys du domaine c-CRD (290).

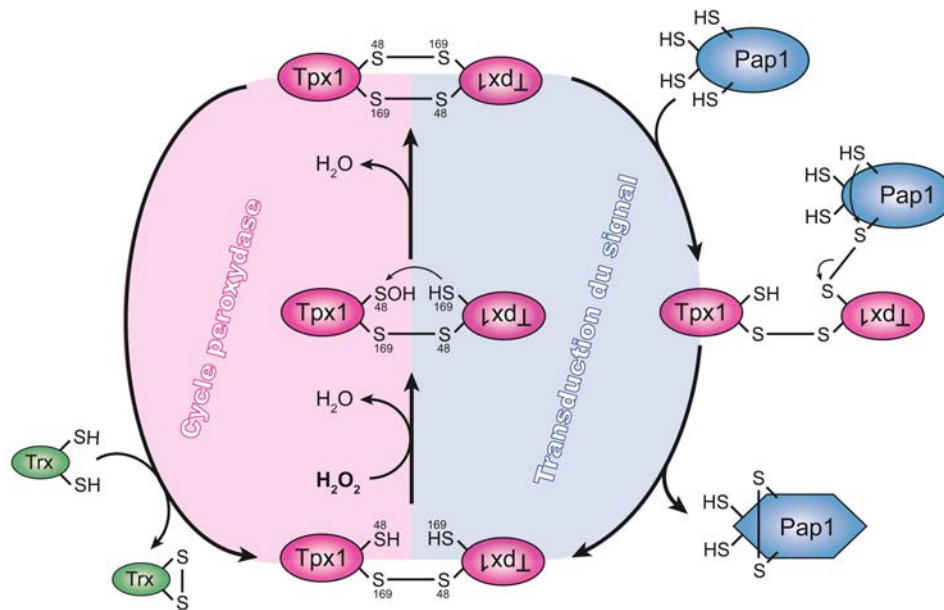


Figure 25. Modèle du relai H_2O_2 /Tpx1/Pap1.

Le mécanisme d'activation de Pap1 commence par la réaction entre la C_p (Cys48) de Tpx1 et H_2O_2 pour former un acide sulfénique, qui sera attaqué par la C_R (Cys169) de l'autre monomère de Tpx1, pour former un pont disulfure. Celui-ci est ensuite échangé en un pont disulfure intermoléculaire avec Pap1 par attaque de l'une des Cys essentielles d'un des deux CRD du facteur de transcription. Ce pont disulfure est ensuite échangé en un pont disulfure intramoléculaire par l'attaque d'une Cys essentielle de l'autre CRD de Pap1, cet événement conduisant à la libération de l'homodimère de Tpx1. La formation d'un second pont disulfure entre les CRD de Pap1 pourrait avoir lieu selon un mécanisme similaire par le recrutement d'un autre homodimère de Tpx1 oxydé par au moins un pont disulfure intermoléculaire. Le rôle de la Trx1 dans ce modèle n'est pas décrit (adapté selon Boronat *et al.*, 2014 (289)).

b. Le relai Orp1/Yap1 de *Saccharomyces cerevisiae*

Le facteur de transcription Yap1 est l'orthologue et l'équivalent fonctionnel et structural de Pap1 chez la levure *S. Cerevisiae*. Cependant, la réponse antioxydante induite par Yap1 est dépendante d'un système à trois composants impliquant Orp1, une CysGpx et Ybp1, une protéine dont la fonction était inconnue lorsque j'ai débuté mon projet de thèse.

i. Le facteur de transcription Yap1

Yap1 (Yeast AP-1) est activé par oxydation lorsque le niveau de H_2O_2 du cytoplasme augmente au dessus d'un certain seuil (301,302). Ce facteur de transcription induit alors l'expression de gènes codant pour la plupart pour des protéines antioxydantes et des composants des voies cellulaires de réduction des thiols (121,302–304). Yap1 présente la même organisation en domaines que Pap1, à l'exception du domaine n-CRD qui possède seulement trois résidus Cys (283,264) (254, pour revue). On retrouve dans le n-CRD les résidus Cys303, Cys310 et Cys315, et dans le c-CRD les résidus Cys598, Cys620 et Cys629. L'activation de Yap1 est dépendante de sa localisation sub-cellulaire selon un mécanisme

Introduction

identique au facteur de transcription Pap1 (288,306) (307) (231,283,306,308) (Figure 26). Le terminateur de cette voie de signalisation est également la Trx (231).

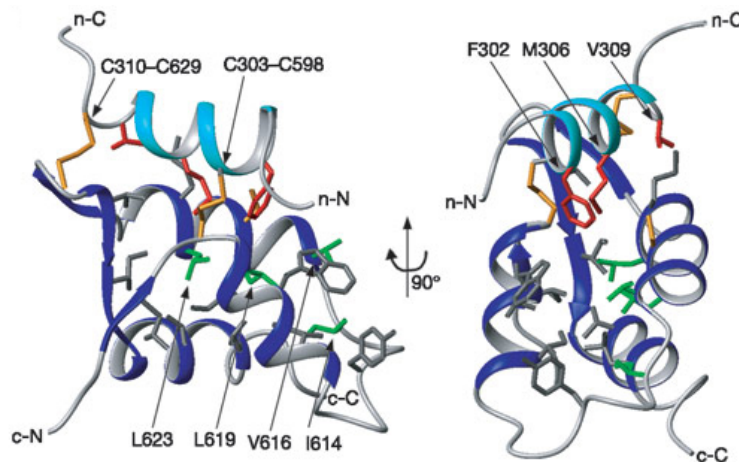


Figure 26. Masquage du domaine NES de Yap1 par interaction entre les domaines n- et c-CRD. Structure de la protéine Yap1-RD (Yap1 Redox Domain), correspondant à un domaine résistant aux protéases de la protéine Yap1 oxydée (258) par deux ponts disulfure (Cys303—Cys598 et Cys310—Cys629) représentés en jaune, de potentiel redox -330 mV pour le plus important, obtenue par résonance magnétique nucléaire en solution. Ce domaine est composé des acides aminés 279 à 313 et 565 à 650. Le domaine NES (superposé au domaine c-CRD) et le domaine n-CRD sont représentés en bleu et en cyan respectivement. Au niveau du domaine NES les résidus Ile614, Val616 et Leu623 sont d'importance modérée pour l'export nucléaire par l'exportine Crm1 alors que le résidu Leu619 joue un rôle critique (ces résidus sont représentés en vert) (257)(259). Sous cette forme oxydée de Yap1, les résidus Leu619 et Leu623 sont en interaction hydrophobe avec les résidus Phe302 et Met306 (représentés en rouge) et sont par conséquent inaccessibles au solvant ainsi qu'à l'exportine Crm1 (Adapté de Wood et al., 2004 (307)).

Il a été démontré que seuls les résidus Cys303 et Cys598 sont indispensables pour l'activation oxydative de Yap1 (231). Les autres résidus Cys des CRD pourraient néanmoins former deux autres ponts disulfure (Cys310—Cys629 et Cys315—Cys620) qui ont été impliqués dans le contrôle du niveau et de la durée d'activation du facteur de transcription (309).

ii. La peroxydase à thiol Orp1 : capteur et relai

Tout comme Pap1, l'oxydation de Yap1 par H_2O_2 est indirecte. Elle fait intervenir la peroxydase à thiol Orp1 (Oxidant Receptor Peroxidase 1, aussi connue sous le nom de Gpx3), en tant que capteur et relai du signal redox porté par H_2O_2 (310) (Figure 27, p.53). Orp1 est une CysGpx monomérique opérant par un mécanisme similaire aux 2-Cys Prx atypiques (Figure 27, p.53 et 28, p.54). Il a été prouvé que la réaction d'activation de Yap1 par Orp1 fait intervenir *in vivo* l'intermédiaire Orp1 oxydé sous forme acide sulfénique dans la formation d'un pont disulfure intermoléculaire avec la Cys598 de Yap1 (276,311) et que la C_R de Orp1 (Cys82) n'intervenait pas dans ce mécanisme (276) (Figure 27, p.53). Contrairement à Tpx1,

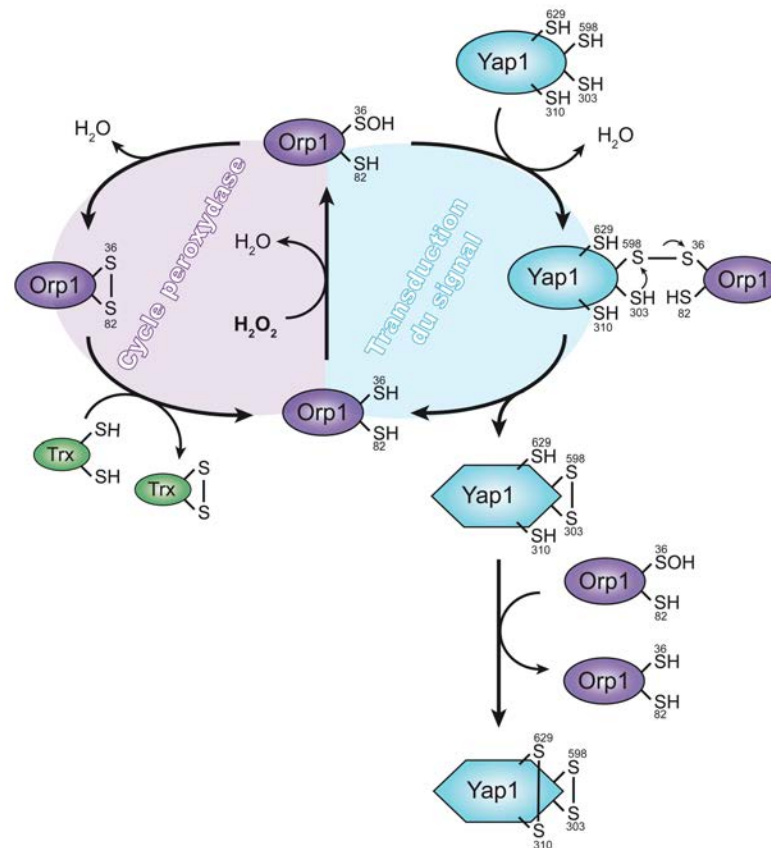


Figure 27. Modèle du relai H_2O_2 /Orp1/Yap1.

Le mécanisme d'activation de Yap1 commence par la réaction entre la C_p (Cys36) de Orp1 et H_2O_2 pour former l'intermédiaire acide sulfénique. Cet acide sulfénique réagit alors avec la Cys598 de Yap1, située dans le c-CRD, pour former un complexe covalent Orp1—S—S—Yap1 lié par un pont disulfure intermoléculaire Cys36—Cys598. Ce dernier est ensuite échangé en un pont disulfure intramoléculaire Cys303—Cys598 par attaque nucléophile de la Cys303 de Yap1, située dans le n-CRD. Cette étape s'accompagne de la libération de Orp1 sous forme réduite. La forme d'oxydation de Yap1 présentant un pont disulfure intramoléculaire entre les résidus Cys303 et Cys598 correspond à la forme activée du facteur de transcription. Le second pont disulfure Cys310—Cys629 se formerait selon un mécanisme similaire par le recrutement d'une autre molécule de Orp1 seulement après la formation du premier pont disulfure. La protéine Ybp1 est indispensable dans ces mécanismes par une fonction qu'il reste à définir. La CysGpx Orp1 présente également un cycle catalytique caractéristique des 2-Cys Prx atypique dans lequel la C_p , oxydée sous forme acide sulfénique après la réaction avec le peroxyde, est attaquée par la C_R (Cys82) de la même chaîne polypeptidique formant un pont disulfure intramoléculaire réduit par la Trx (265) (d'après D'Autreaux et Toledano, 2007 (312)).

les études menées par l'équipe de M. Toledano ont démontré que Orp1 jouait un rôle essentiel en tant que relai redox pour l'activation de Yap1, et non en tant que peroxydase, dans la résistance au stress induit par H_2O_2 . En effet, le mutant de la C_R de Orp1 (Cys82Ser) présente une sensibilité identique à celle d'une souche sauvage vis à vis de H_2O_2 (276). De plus, contrairement au relai Pap1/Tpx1 qui est inactivé à des concentrations élevées en peroxyde, l'activation maximale du relais Orp1/Yap1 a lieu à des doses de peroxydes très élevées, critiques pour la croissance cellulaire (231).

Introduction

Yap1 peut également être activé par plusieurs autres espèces chimiques réactives envers les thiols et par des métaux lourds, *via* un mécanisme indépendant de Orp1 qui impliquerait la modification directe des résidus Cys du domaine c-CRD (231,313).

iii. Ybp1 : facteur indispensable, fonction inconnue

La protéine Ybp1 (Yap1 Binding Protein 1) est le troisième composant indispensable dans le mécanisme d'activation de Yap1 par H₂O₂. La représentation du gène *ybp1* se limite de manière sporadique au règne des champignons (315). En particulier, il n'est pas présent chez *S. pombe*. La fonction moléculaire de la protéine Ybp1 était très peu définie lorsque j'ai débuté mon doctorat.

Il a été prouvé par la méthode du double hybride et par la méthode TAP (Tandem Affinity Precipitation) que la protéine Ybp1 forme un complexe non covalent avec le facteur de transcription Yap1 sous forme réduite (316,317). Cette interaction pourrait impliquer les résidus 379 à 650 de Yap1 (315) et les résidus 416 à 674 de Ybp1 (318), selon des résultats obtenus par la méthode du double hybride. Des études plus récentes ont démontré que la

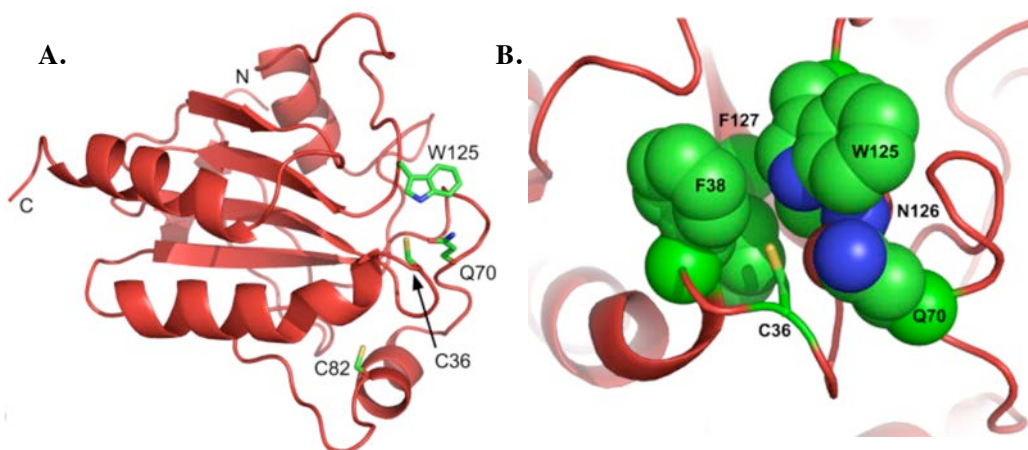


Figure 28. Représentation schématique de la structure de Orp1.

Structure basée sur un modèle par homologie sur la base des structures des protéines Gpx2 et Gpx5 humaines.

A. Structure de Orp1 en représentation « ribbon ». Orp1 adopte un repliement de type Trx (un feuillet β à 4 brins et 3 hélices α). Les résidus Cys36 (C_P), Gln70 et Trp125 composant le site actif sont représentés en « stick » (les atomes de Carbone, d'azote, d'oxygène et de soufre sont colorés respectivement en vert, rouge, bleu et orange). La zone portant les acides aminés 69 à 86 (incluant la C_R, Cys82), modélisée par une boucle, ne présente pas une densité électronique suffisante pour être résolue par cristallographie aux rayons X (275). Dans ce modèle, les résidus C_P (Cys 36) et C_R (Cys82) sont distants de 10 Å. **B.** Le site actif de Orp1 est formé par des résidus conservés. Les résidus Phe38 et Phe127 forment une face hydrophobe du site actif alors que les résidus Gln70, Trp125 et Asn126 forment une face polaire. Les chaînes latérales des résidus Gln70 et Trp125 stabilisent, par la formation de liaison hydrogène, la forme thiolate de la C_P et contribuent à la polarisation de la liaison peroxyde du substrat. Ces résidus du site actif ont été validés expérimentalement par mutagénèse dirigée (276). Le site actif de Orp1 ne serait pas assez volumineux pour accommoder l'acide sulfénique suite à la réaction entre la C_P et H₂O₂, si bien que celui-ci serait exposé au solvant (Adapté de Ma et al., 2007 (314)).

formation du complexe Yap1·Ybp1 protège Yap1 de la dégradation par les protéases, et est donc requise pour la stabilité de Yap1 *in vivo* (282). De plus, il a été établi que le niveau d'expression de Ybp1 détermine la fraction cellulaire de Yap1 répondant au stress induit par H₂O₂ (319). L'oxydation de Yap1 par Orp1 en présence de H₂O₂ provoquerait la dissociation de ce complexe (319).

De manière intéressante, il a été prouvé que dans la souche W303 de *S. cerevisiae* (souche couramment utilisée en laboratoire) exprimant un mutant naturel de l'allèle Ybp1, *ybp1-1* qui code une protéine Ybp1 tronquée (Ybp1-1 : acides aminés 1 à 243 de Ybp1), l'activation du facteur de transcription Yap1 n'est plus dépendante de Orp1 (315,320,321). Dans cette souche, l'oxydation de Yap1 est dépendante de Tsa1, la 2-Cys Prx typique majeure de cet organisme, par un mécanisme qui n'a pas encore été caractérisé mais qui comme dans le cas de Pap1, requiert les deux C_p et C_R de Tsa1, contrairement au relai Orp1/Yap1.

Le mécanisme d'activation de Yap1 présenté Figure 27 (p.53) fait apparaître que l'intermédiaire Orp1—SOH, espèce intrinsèquement réactive, occupe une position critique au carrefour entre au moins deux réactions : l'une avec la C_R et l'autre avec la Cys598 de Yap1. La réaction intramoléculaire avec la C_R étant favorisée du point de vue thermodynamique, la question se pose des mécanismes à l'origine de la spécificité de la réaction entre Orp1—SOH et sa cible Yap1. Cette problématique et le rôle de Ybp1 dans ces mécanismes ont constitué le cœur de mon projet de thèse.

Objectifs

Mon projet de thèse s'inscrit dans la problématique générale de la signalisation cellulaire redox impliquant le peroxyde d'hydrogène comme messager, dont un mécanisme clef est l'oxydation de la fonction thiol du résidu Cys. *In vivo*, l'efficacité et la spécificité de ce type de signalisation doivent dépendre de la coordination et donc des cinétiques relatives de cycles d'oxydation interdépendants, impliquant des protéines cible, relai et leurs partenaires redox cellulaires.

La voie $H_2O_2/Orp1/Yap1$ chez *S. cerevisiae* implique comme capteur et relai la peroxydase à thiol Orp1, dont l'intermédiaire oxydé sous forme acide sulfénique Orp1—SOH constitue un carrefour où plusieurs réactions sont potentiellement en compétition (Figure 27, p.53) : i) avec la Cys598 de Yap1, première étape de l'activation de ce dernier ; ii) avec la C_R de Orp1, une réaction qui doit être favorable car intramoléculaire ; iii) avec d'autres thiols cellulaires ; iv) ou encore avec une seconde molécule de H_2O_2 qui conduirait à la suroxydation de Orp1 sous forme acide sulfinique.

L'étude des mécanismes à l'origine de la spécificité de la réaction entre Orp1 et Yap1 constitue la question centrale de ma thèse. Notre modèle de travail s'est appuyé sur plusieurs hypothèses : la formation d'un complexe protéique permettant d'associer Orp1 et Yap1; la modulation des cinétiques relatives des réactions en compétition ; l'implication du partenaire Ybp1 dans ces mécanismes, une protéine indispensable à l'activation redox de Yap1, mais dont la fonction moléculaire était inconnue au début de mon doctorat.

Mon travail, dont la stratégie est résumée Figure 29 (p.58), s'est donc articulé autour de 4 axes impliquant la reconstitution *in vitro* du relai avec des protéines recombinantes :

I. La caractérisation des interactions protéiques entre Yap1, Ybp1 et Orp1, par des approches biophysico-chimiques comme la microcalorimétrie de titration isotherme (ITC) et l'anisotropie de fluorescence ;

II. La caractérisation cinétique du cycle peroxydase de Orp1, un pré-requis pour l'analyse de la compétition entre le cycle peroxydase, la réaction avec Yap1 et une éventuelle étape de suroxydation. Cette étude a impliqué l'utilisation d'une technique de cinétique rapide de type « stopped flow » ;

III. La caractérisation cinétique de la réaction entre Orp1 et Yap1, et de l'impact du partenaire Ybp1 sur ces cinétiques, qui a nécessité la mise au point d'une méthode utilisant une autre technique de cinétique rapide de type « quenched flow » combinée à l'analyse des produits de la réaction par spectrométrie de masse ;

IV. La caractérisation de l'influence de Yap1 et Ybp1 sur le cycle peroxydase de Orp1, également par une approche de type « quenched flow ».

Objectifs

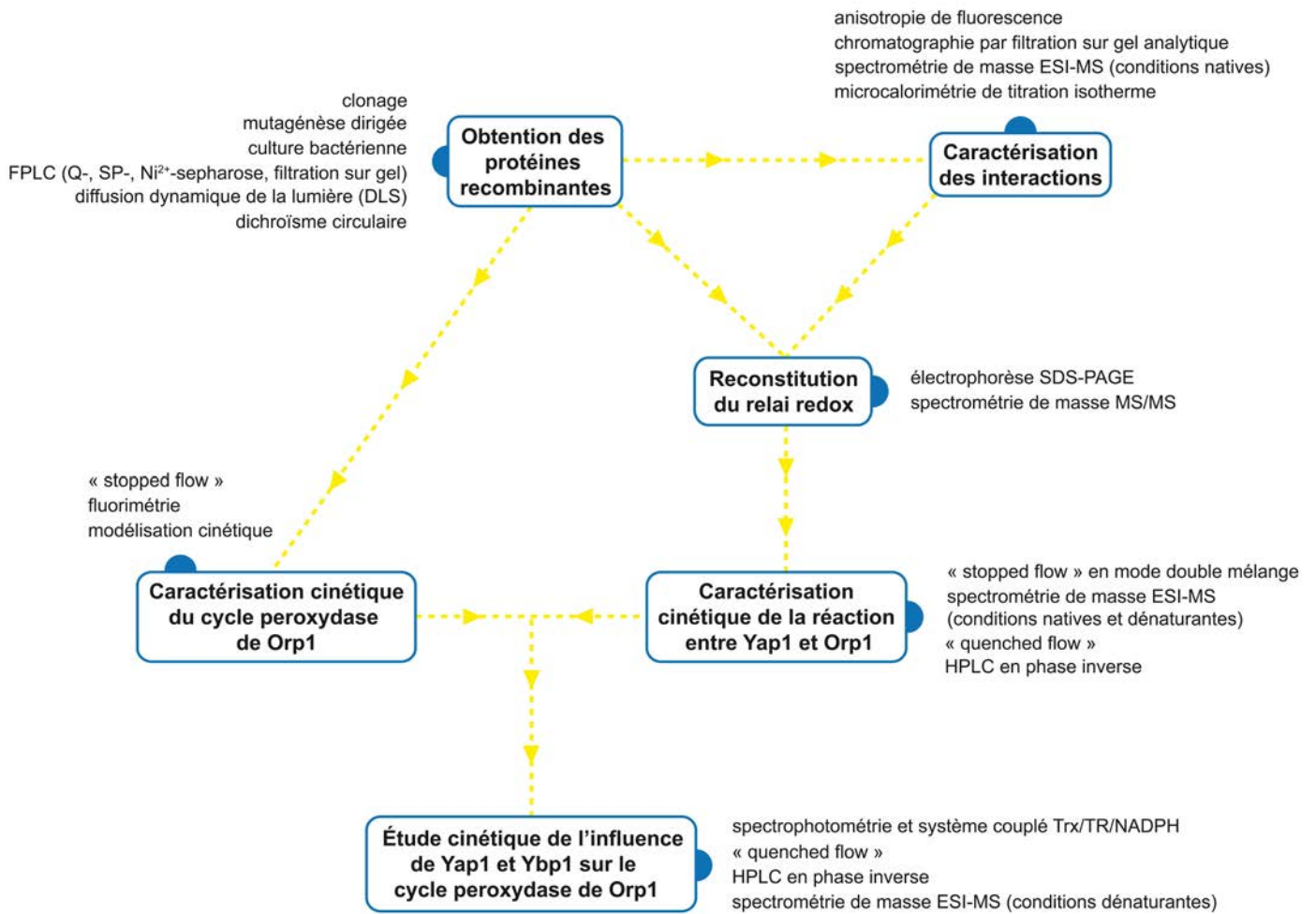


Figure 29. Stratégie d'étude du relai H₂O₂/Orp1/Yap1.

Résultats

Chapitre I. Production, purification et caractérisation des protéines recombinantes Yap1, Ybp1 et Orp1

A. Production et purification de la protéine Yap1

La protéine Yap1 de *S. cerevisiae* a été exprimée dans la souche *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) transformée par le vecteur plasmidique recombinant pET28b *yap1* codant la séquence de la protéine Yap1 fusionnée à l'étiquette 6xHis du côté N-terminal. La protéine est produite sous forme soluble et a été purifiée en deux étapes. La première étape consiste en une chromatographie d'affinité sur complexe Ni²⁺ immobilisé. La seconde étape correspond à une chromatographie d'échange d'anions de type Q-sepharose. La pureté de la protéine obtenue a été vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE (Figure 30). Après purification, 5 mg de protéine sont obtenus par litre de culture avec un rapport DO₂₈₀/DO₂₆₀ de 1,3 indiquant l'élimination de la plupart des contaminants nucléiques.

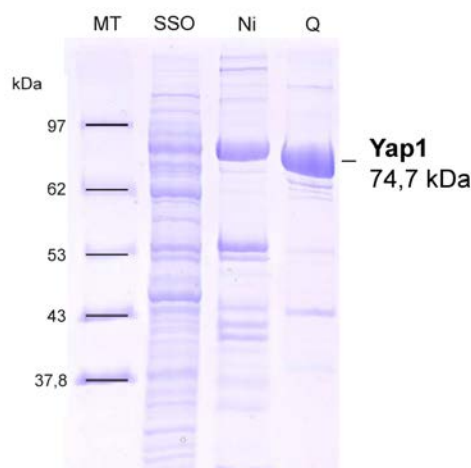


Figure 30. Gel bilan de purification de Yap1.

Le marqueur de taille utilisé (MT) comprend la MsrA (24 kDa), la glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase (GAPDH) (37,8 kDa), la protéine TruD (43 kDa), la rétinol déshydrogénase 2 (53 kDa), l'albumine de sérum bovin (62 kDa) et l'ARN polymérase T7 (97 kDa). SSO : surnageant de sonication, Ni : éluat de la chromatographie d'affinité sur complexe Ni²⁺ immobilisé, Q : éluat de la chromatographie échangeuse d'anions Q-sepharose.

B. Production et purification de la protéine Ybp1

La protéine Ybp1 de *S. cerevisiae* a été produite dans la souche *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) transformée par le plasmide recombinant pET28b *ybp1* codant la séquence de la protéine Ybp1 fusionnée à l'étiquette 6xHis du côté N-terminal. La protéine Ybp1 a été

Résultats

purifiée en deux étapes qui ont permis d'une part, l'élimination des contaminants nucléiques, attestée par l'augmentation du rapport DO_{280}/DO_{260} , et d'autre part l'élimination des contaminants protéiques, suivie par analyse sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Figure 31 A, p.61). La première étape consiste en une chromatographie d'affinité sur complexe Ni^{2+} immobilisé. La seconde étape correspond à une chromatographie par filtration sur gel.

Initialement, le protocole de production de la protéine Ybp1 consistait en une culture de 18 heures dans le milieu Graffinity supplémenté en Kanamycine (50 mg/mL) et Chloramphénicol (50 mg/mL). Ces antibiotiques sont utilisés respectivement comme moyen de sélection des cellules recombinantes pour le plasmide pET28b *ybp1* et le plasmide pRARE2 de la souche Rosetta™ 2 (DE3). Les cellules récoltées étaient ensuite reprises dans le tampon A (Tris 50 mM, KCl 150 mM, pH 7), lysées par sonication, puis la protéine d'intérêt était purifiée selon le protocole énoncé ci-dessus. Dans ces conditions, le rendement de purification de la protéine Ybp1 purifiée était égal à 0,8 mg de protéine par litre de culture, ce qui était trop faible pour permettre l'étude *in vitro* de cette protéine par des approches de cinétique rapide. On peut observer sur le gel bilan de purification qu'une majorité de la protéine d'intérêt était retrouvée dans la fraction cellulaire insoluble (Figure 31 A, p.61, piste CSO). De plus, le pic majoritaire obtenu par chromatographie par filtration sur gel préparatrice de type Superdex 200 (domaine de fractionnement de 10 à 600 kDa) (Figure 31 C, p.61, profil orange) est élué dans le volume mort de la colonne, et correspondait donc à des agrégats de haut poids moléculaire et/ou à des formes non repliées de la protéine. Les conditions de production ainsi que le tampon de solubilisation de Ybp1 ont alors été optimisés dans le but d'améliorer la solubilité et la quantité de protéine purifiée.

Dans un premier temps, le protocole de production a été modifié. Premièrement, la culture a été réalisée en milieu LB avec un choc thermique (1h à 47°C) et un choc osmotique (500 mM NaCl et 2 mM bétaïne) imposés juste avant l'étape d'induction (322). Le choc thermique permet l'expression d'un ensemble de gènes spécifiques dont la plupart codent des chaperons moléculaires (284). Ces derniers ont plusieurs actions : certains désagrègent les protéines agrégées mal repliées, d'autres présentent un rôle actif dans les processus de repliement et empêchent ainsi l'agrégation protéique (285). Le choc osmotique entraîne l'adaptation des bactéries à ces nouvelles conditions de haute pression osmotique en accumulant de petits composés organiques appelés osmolytes, ici, la bétaïne. Ces osmolytes jouent le rôle de chaperons chimiques : ils augmentent la stabilité des protéines natives (327) et assistent le repliement des protéines (328). Deuxièmement, les antibiotiques Kanamycine et Chloramphénicol ont été conservés dans l'étape de préculture dans le but de sélectionner les

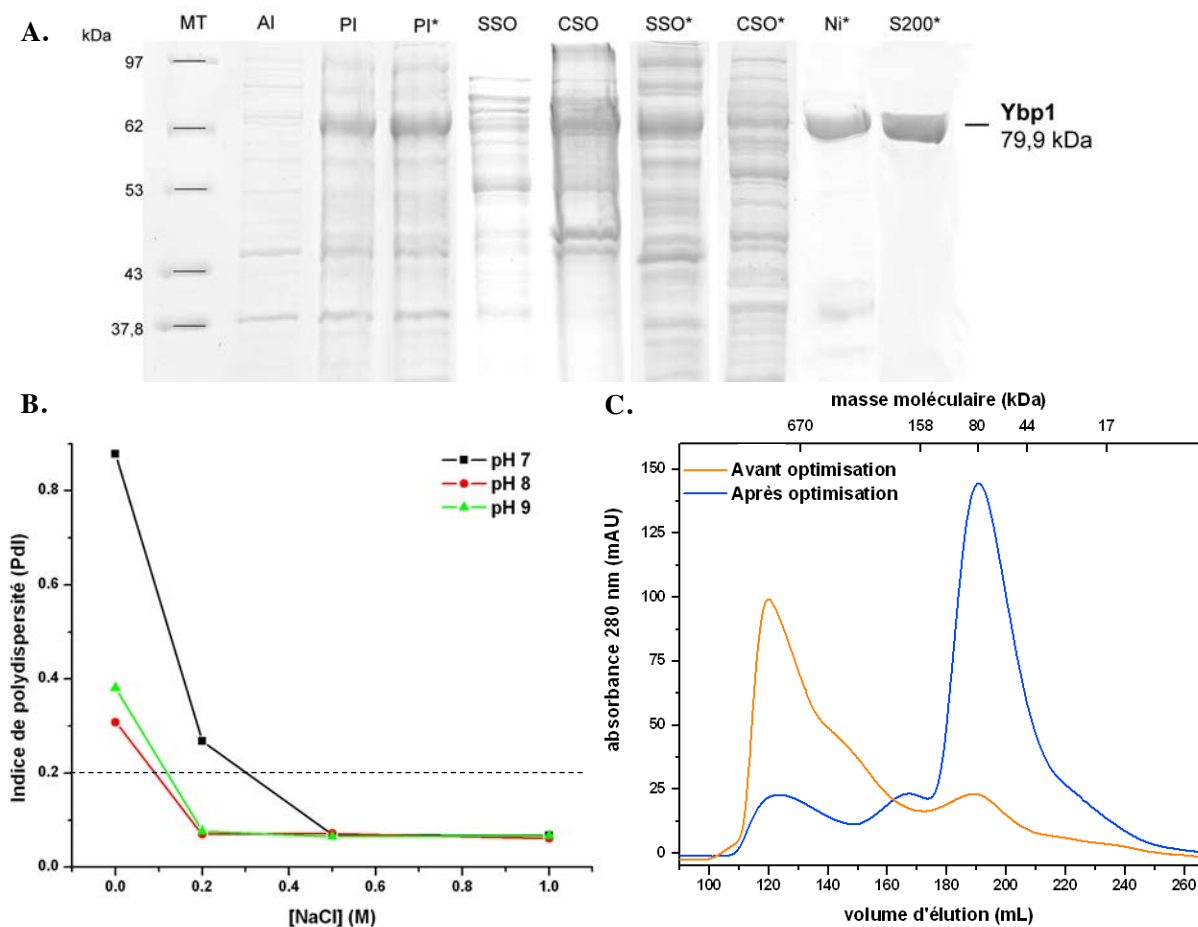


Figure 31. Optimisation de la production et de la solubilité de Ybp1.

A. Gel bilan comparatif de purification de la protéine Ybp1 avant et après optimisation du protocole de production et du tampon de solubilisation. Le marqueur de taille (MT) est identique à celui décrit Figure 30, p.59. AI : dépôt de cellules entières avant induction, PI : dépôt de cellules entières après induction, SSO : surnageant de sonication, CSO : culot de sonication, Ni²⁺ : éluat de l'étape de chromatographie d'affinité sur complexe Ni²⁺, S200 : éluat de l'étape de chromatographie par filtration sur gel de type Superdex 200. L'astérisque (*) indique un résultat obtenu dans des conditions optimisées. **B.** Caractérisation du Pdl d'une solution de protéine Ybp1 à 1 mg/mL en fonction du pH et de la concentration en NaCl. Les mesures ont été réalisées à 25°C, dans le tampon Na₂HPO₄ à 20 mM additionné de 0 ; 0,2 ; 0,5 ou 1 M de NaCl à pH 7, 8 ou 9. **C.** Chromatogrammes de l'étape de chromatographie par filtration sur gel de type Superdex 200 avant et après optimisation. L'éluat de l'étape de chromatographie sur complexe Ni²⁺ immobilisé est fractionné sur une colonne de filtration sur gel préparatrice de type Superdex 200 hiload 26/60 (GE Healthcare, domaine de fractionnement de 10 à 600 kDa) préalablement étalonnée à l'aide de marqueurs de masses moléculaires connues (Figure 64, p.125). Cette étape de purification est réalisée dans le tampon A avant optimisation et dans le tampon B après optimisation. Le volume mort de la colonne est de 115 mL. Le V_e de la protéine Ybp1 est de 196 mL, correspondant à une masse moléculaire apparente de 80 kDa identique à la masse moléculaire théorique pour cette protéine (80 kDa). Les masses moléculaires de 670, 158, 44 et 17 kDa correspondent respectivement aux marqueurs de masse moléculaire connue (Bio-Rad) thyroglobuline, γ -globuline, ovalbumine et myoglobine.

Résultats

cellules recombinantes d'intérêt, mais ont été supprimés dans l'étape de culture. Ces antibiotiques, qui font respectivement partie de la famille des aminoglycosides et des phénicolés, ont pour cible le ribosome bactérien et sont donc des inhibiteurs de la traduction et de la croissance des micro-organismes. Leur suppression a permis d'augmenter à la fois la biomasse et la quantité de protéine d'intérêt produite.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la solubilité de la protéine Ybp1 dans différentes conditions de pH et de force ionique. Le comportement en solution de la protéine Ybp1 purifiée a été étudié par DLS (pour « Dynamic Light Scattering » ou diffusion dynamique de la lumière) en suivant l'indice de polydispersité (PdI) de la solution protéique dans différentes solutions de pH et concentrations en NaCl variables. Une valeur de PdI inférieure à 0,2 signifie que la solution protéique est monodisperse et non agrégée (Figure 31 B, p.61). La protéine Ybp1 est donc monodisperse pour des valeurs de pH supérieures à 7 et des concentrations en NaCl supérieures à 200 mM. Cette étude nous a permis de définir une solution tampon de purification idéale pour la protéine Ybp1, le tampon B (Hepes 20 mM ; NaCl 400 mM ; pH 8,5) qui a remplacé le tampon A dans lequel la protéine Ybp1 était polydisperse.

Ces nouvelles conditions ont permis d'augmenter de plus de dix fois le rendement de purification de la protéine Ybp1 qui est passé de 0,8 à 8,1 mg de protéine purifiée par litre de culture. Cette augmentation peut être attribuée majoritairement à l'amélioration de la solubilité de la protéine Ybp1 et de façon minoritaire à l'augmentation de la quantité de protéine produite. En effet, la proportion de protéine d'intérêt présente dans le surnageant de sonication par rapport au culot de sonication avant et après optimisation est inversée au profit du surnageant de sonication (Figure 31 A, p.61, pistes SSO, CSO et SSO*, CSO*). Au niveau des chromatogrammes de chromatographie par filtration sur gel, alors que dans les conditions non optimisées le pic présentant un volume d'éluion (V_e) égal au volume mort de la colonne est largement majoritaire, celui-ci devient largement minoritaire après optimisation au profit d'un pic présentant un V_e correspondant à une protéine de 80 kDa de masse moléculaire apparente, la masse moléculaire de Ybp1 étant de 80 kDa. À partir de ces résultats, on peut conclure que la protéine Ybp1 est purifiée sous forme monomérique, soluble et repliée. Le rapport DO_{280}/DO_{260} mesuré à l'issue de l'étape de chromatographie par filtration sur gel est de 1,8 indiquant l'élimination de la plupart des contaminants nucléiques.

C. Production et purification de la protéine Orp1

La protéine Orp1 de *S. cerevisiae* a été exprimée dans la souche *E. coli* C41 (DE3) transformée par le vecteur plasmidique recombinant pET22b *orp1* codant la séquence de la protéine Orp1. Cette protéine, produite sous forme soluble, a été purifiée en trois étapes. La première étape consiste en une précipitation au sulfate d'ammonium à 65% de saturation, concentration à laquelle la quasi totalité de Orp1 précipite. Après centrifugation, la fraction correspondante au culot est reprise dans le tampon C (Tris 50 mM, EDTA 2mM, pH 8) puis est fractionnée sur une colonne de filtration sur gel de type ACA54 (domaine de fractionnement de 5 à 70 kDa). Cette étape permet d'éliminer la majorité des contaminants protéiques. Le reste des contaminants protéiques et nucléiques est éliminé par une étape de chromatographie échangeuse de cations de type SP-sepharose. La pureté des protéines obtenues a été vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE (Figure 32). Après purification, le rendement moyen est de 30 mg de protéine Orp1 par litre de culture avec un rapport DO_{280}/DO_{260} de 1,7 indiquant l'élimination de la plupart des contaminants nucléiques.

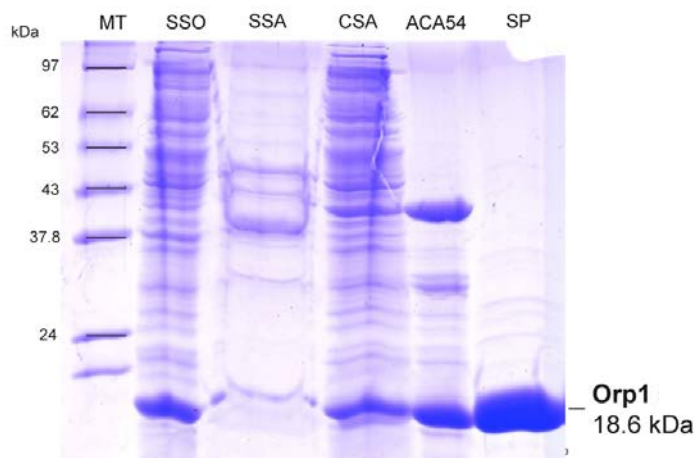


Figure 32. Gel bilan de purification de Orp1.

Le marqueur de taille utilisé (MT) est identique à celui décrit Figure 30, p.59. SSO : surnageant de sonication, SSA : surnageant de précipitation à 65% de saturation en sulfate d'ammonium, CSA : culot de précipitation à 65% de saturation en sulfate d'ammonium, ACA54 : éluat de l'étape de chromatographie par filtration sur gel de type ACA54, SP : éluat de l'étape de chromatographie échangeuse de cations SP-sepharose.

D. Détermination d'une solution tampon commune pour les protéines Yap1, Ybp1 et Orp1

Une solution tampon commune dans laquelle les trois protéines Yap1, Ybp1 et Orp1 sont stables sous forme non agrégée a été mise au point par des analyses de DLS, menées sur les protéines Yap1 et Orp1, similaires à celles réalisées pour la protéine Ybp1 (données non montrées). Le tampon D (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8) a ainsi été défini et a été utilisé dans toutes nos expériences.

Chapitre II. Caractérisation des interactions entre les protéines Yap1, Ybp1 et Orp1

La formation d'un complexe non covalent entre les protéines Yap1 et Ybp1 avait déjà été proposée *in vivo* et *in vitro* sur la base d'expériences de double hybride et d'immunoprécipitation (258,289,290) (Chapitre III.B.2.b.iii, p.54). Néanmoins, cette interaction n'avait jamais été observée directement ni caractérisée en termes de stoechiométrie et d'affinité. De plus, la protéine Orp1 était également susceptible d'interagir avec les protéines Yap1 et Ybp1. Les interactions entre ces différents partenaires ont donc été caractérisées *in vitro* par anisotropie de fluorescence, chromatographie par filtration sur gel, ITC et spectrométrie de masse en conditions natives en utilisant les protéines recombinantes purifiées.

A. Étude de l'interaction entre les protéines Yap1 et Ybp1

1. Par la technique d'anisotropie de fluorescence

Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction entre les protéines Yap1 sauvage et Ybp1. Les faibles rendements de purification des protéines Yap1 et Ybp1 ont imposé la sélection de méthodes expérimentales peu consommatrices en matériel biologique. La technique de titration par anisotropie de fluorescence permet de titrer le ligand fluorescent à des concentrations faibles, généralement sub-micromolaires. Bien que la concentration maximale d'analyte utilisée au cours de la titration dépende de l'affinité de l'interaction étudiée, les titrations réalisées par dilution en cascade permettent de balayer une large gamme de concentrations tout en limitant la quantité d'analyte consommée.

L'utilisation de l'anisotropie de fluorescence pour l'étude de complexes non-covalents repose sur le principe suivant : la polarisation du signal de fluorescence est sensible à l'état libre ou associé à un complexe du fluorophore utilisé comme sonde. L'anisotropie de fluorescence mesure l'intensité relative de l'émission de fluorescence dans les directions parallèles et perpendiculaires à celles d'une source de lumière polarisée. Tout changement de direction des moments dipolaires de transition d'un fluorophore, pendant la durée de vie de l'état excité (principalement par diffusion par rotation des fluorophores), entraîne une dépolarisation de la fluorescence et par conséquent une diminution de l'anisotropie de

fluorescence (Figure 33). Une molécule de petite taille fluorescente, tournant rapidement dans le milieu, émettra de la lumière fortement dépolarisée. Le taux de polarisation et donc l'anisotropie seront faibles. Par contre, si cette molécule fluorescente interagit avec une molécule de taille plus importante, le complexe tournera moins rapidement, et la lumière restera polarisée. Le taux de polarisation et donc l'anisotropie seront élevés. L'exploitation de cette différence d'anisotropie de fluorescence permet de déterminer la constante de dissociation du complexe (K_D) au cours d'expériences de titration.

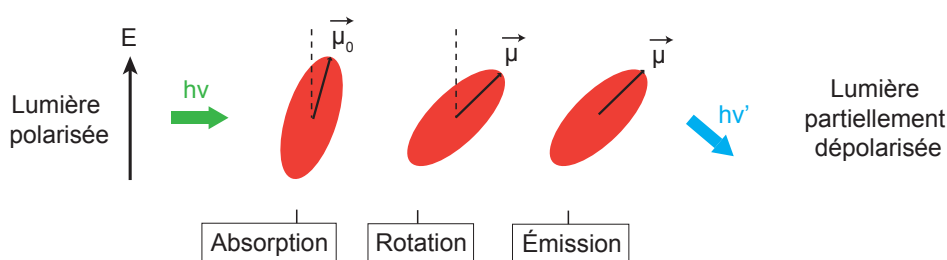


Figure 33. L'anisotropie comme mesure de la dépoliarisation de fluorescence.

Une lumière polarisée excite un fluorophore (en rouge). Lors de la phase d'absorption, l'énergie portée par le photon est absorbée par le fluorophore. Au cours de la phase d'émission, le fluorophore, soumis à un mouvement de diffusion par rotation pendant toute la durée de vie de l'état excité, a changé de direction et la lumière détectée sera donc partiellement dépolarisée, correspondant à une anisotropie de fluorescence plus faible. Plus la masse associée au fluorophore est faible, plus la lumière est dépolarisée et l'anisotropie faible (mouvement de rotation rapide). Plus la masse associée au fluorophore est élevée, plus la lumière est polarisée et l'anisotropie élevée (mouvement de rotation lent).

Dans notre cas, l'emploi de cette technique nécessitait de marquer l'un des deux partenaires avec une sonde fluorescente. La protéine Ybp1 a ainsi été marquée avec la sonde fluorescente Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester (Life technologies) (Figure 67, p.131). La réaction de conjugaison a été réalisée à pH 8, permettant un marquage préférentiel du groupement amine à l'extrémité N-terminale de la protéine par la formation d'une liaison amide avec le fluorophore (Ybp1—AF). La variation de la valeur de l'anisotropie de fluorescence a été mesurée sur un spectrofluorimètre SAFAS Xenius XC. Les titrations sont réalisées par dilution en cascade, en présence de TCEP (tris(2-carboxyéthyl)phosphine) à 2 mM comme réducteur, pour éviter toute oxydation des Cys de la protéine Yap1 sauvage.

En principe, au cours de la titration, le fluorophore existe sous deux états : libre et en complexe avec son partenaire. Dans le cas où l'intensité de fluorescence n'est pas affectée par l'interaction, le signal d'anisotropie correspond à la contribution de chacun de ces deux états en fonction de leurs concentrations (Équation 13, p.67 avec A , la valeur d'anisotropie mesurée, $[x_f]$ et A_f correspondant respectivement à la concentration et à l'anisotropie de la

protéine marquée à l'état libre et $[x_b]$ et A_b correspondant à la concentration et à l'anisotropie de la protéine marquée en complexe avec son partenaire).

$$A = [x_f] \cdot A_f + [x_b] \cdot A_b \quad \text{Équation 13}$$

Dans le cas où l'intensité de fluorescence de la protéine marquée diffère à l'état libre et en complexe avec son partenaire, un traitement correctif préalable des données est nécessaire afin d'extraire la fraction de protéine marquée en complexe (F_{cx}) (Équation 14 avec A , la valeur d'anisotropie mesurée, A_f , la valeur d'anisotropie de la protéine marquée à l'état libre, A_b la valeur d'anisotropie de la protéine marquée en complexe, I_f et I_b , l'intensité de fluorescence de la protéine marquée respectivement à l'état libre et en complexe).

$$F_{cx} = (A - A_f) / ((A_b - A_f) \cdot (I_b / I_f) + A - A_f) \quad \text{Équation 14}$$

La titration de Ybp1—AF avec Yap1 sauvage produit une augmentation d'anisotropie reproductible et saturable de 11%, qui révèle la formation d'un complexe entre les deux protéines. Dans ce cas, l'interaction de Yap1 avec Ybp1—AF induit une augmentation de l'émission de fluorescence d'un facteur 2,1 qui a été prise en compte selon l'Équation 14. Les données expérimentales obtenues sont décrites de façon adéquate par un modèle hyperbolique correspondant à une interaction simple à un site et ont été ajustées à l'Équation 15 par régression non linéaire (avec C correspondant à la concentration en protéine ajoutée (Yap1 sauvage) et K_D la constante thermodynamique de dissociation de l'interaction) (Figure 34 A, p.68). Cette titration révèle une constante d'affinité K_D de $1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ pour l'interaction entre Ybp1—AF et Yap1 sauvage.

$$F_{cx} = C / (K_D + C) \quad \text{Équation 15}$$

Afin de valider que la présence de la sonde fluorescente n'altérerait pas l'interaction de Ybp1 avec le partenaire Yap1 sauvage, la même expérience de titration a été réalisée en présence de Yap1 sauvage marquée par le fluorophore dans les mêmes conditions que précédemment (Yap1—AF) et de Ybp1 non marquée (titration « miroir ») (Figure 34 A, p.68). Le traitement des données expérimentales obtenues par titration de Yap1—AF avec Ybp1 donne une constante d'affinité K_D de $1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$, soit une valeur très similaire à celle déterminée en utilisant Ybp1—AF comme sonde, indiquant que la formation du complexe Yap1·Ybp1 n'est pas affectée par le marquage avec la sonde fluorescente.

L'absence d'effet du TCEP sur la formation du complexe a été confirmée par une expérience témoin réalisée sans TCEP (Figure 34 B, p.68). Une constante d'affinité K_D

Résultats

de $1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a été mesurée. De plus, la substitution de Yap1 sauvage par la forme mutante Yap1^{SSS SSS} (mutations des résidus Cys des domaines n-CRD et c-CRD : C303S, C310S, C315S, C598S, C620S et C629S), révèle une constante d'affinité K_D de $0,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ indiquant que les résidus Cys des CRD de Yap1 ne sont pas impliqués dans la reconnaissance entre les protéines Ybp1 et Yap1.

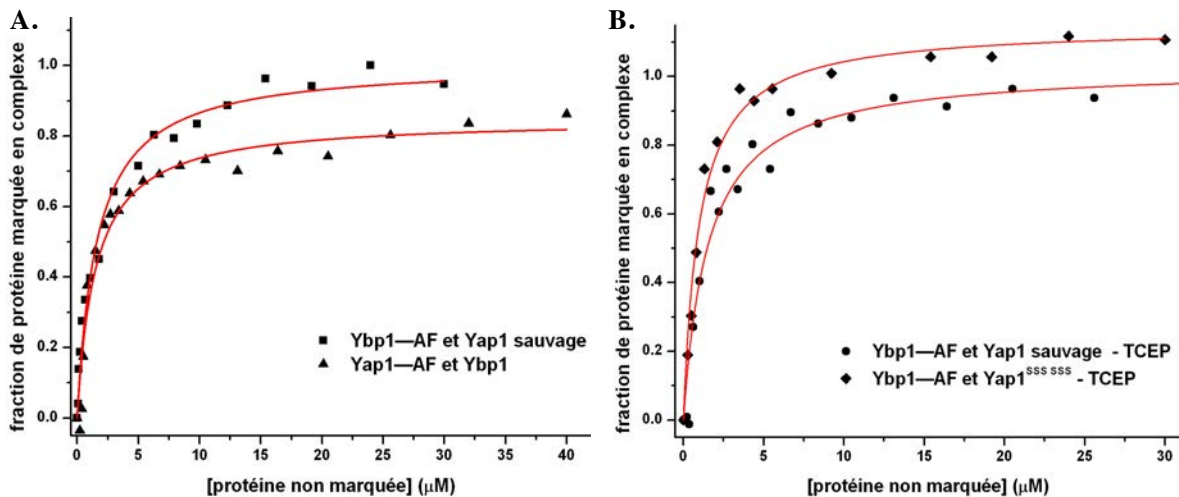


Figure 34. Suivi de l'interaction entre Yap1 et Ybp1 par anisotropie de fluorescence.

L'anisotropie de fluorescence a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre SAFAS Xenius XC. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 494 nm et les fentes à 10 nm. L'émission de fluorescence est collectée à 523 nm. Le mélange réactionnel est composé de 100 nM de protéine marquée et d'une concentration variable de partenaire non marqué dans le tampon D. Les données expérimentales ont été analysées selon un modèle hyperbolique simple (Équation 15, p.67). La température est fixée à 25°C en présence de TCEP 2mM.

A. Titration « miroir » des protéines Yap1 sauvage et Ybp1, **B.** Contrôles.

L'anisotropie de fluorescence ne permettant pas de définir la stoechiométrie des interactions, ce paramètre a été étudié par chromatographie par filtration sur gel.

2. Détermination de la stoechiométrie du complexe Yap1·Ybp1

a. Chromatographie par filtration sur gel

La stoechiométrie de l'interaction entre les protéines Yap1 sauvage et Ybp1 a été étudiée par chromatographie par filtration sur gel. Pour cela, nous avons utilisé une colonne Superdex 200 10/300 analytique (GE Healthcare, domaine de fractionnement de 10 à 600 kDa) préalablement étalonnée à l'aide de marqueurs de masses moléculaires connues (Figure 68, p.132). L'élution est suivie par la mesure de l'absorption à 280 nm.

Dans un premier temps, des quantités équivalentes de chaque protéine ont été fractionnées séparément sur la colonne (Figure 35, p.69, profils bleu et rouge).

Le chromatogramme de Ybp1 présente un pic majoritaire caractérisé par un V_e de 13,3 mL correspondant à une masse moléculaire apparente de 100 kDa, soit une valeur proche de la masse moléculaire théorique du monomère de cette protéine (80 kDa). Ce résultat suggère que Ybp1 existe majoritairement sous forme de monomère en solution. Le chromatogramme obtenu pour Yap1 sauvage présente un pic majoritaire caractérisé par un V_e de 9,9 mL, correspondant à une masse moléculaire apparente de 470 kDa. Cela implique que la protéine Yap1 sauvage, dont la masse moléculaire calculée pour un monomère est de 75 kDa, pourrait s'associer en oligomère et/ou adopterait une conformation non globulaire en solution. Cette dernière hypothèse est cohérente avec la faible proportion de structures secondaires mise en évidence pour la forme réduite de Yap1 révélée par des expériences de dichroïsme circulaire (Figure 66, p.129). Enfin, un pic minoritaire est élué dans le volume mort de la colonne, ce qui indique qu'une faible proportion de la protéine existe sous forme agrégée dans les conditions expérimentales utilisées.

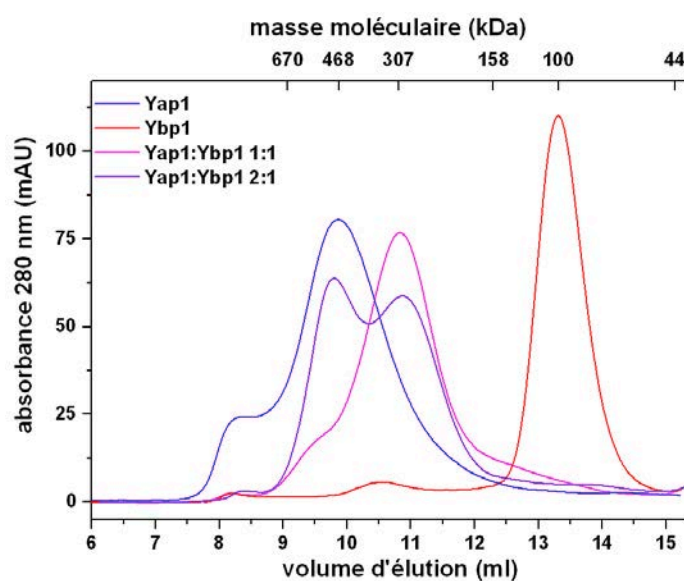


Figure 35. Profils d'élué de chromatographie par filtration sur gel de Yap1 sauvage et Ybp1.

Des volumes de 200 μ L d'une solution de protéine Yap1 sauvage à 30 μ M, Ybp1 à 30 μ M ou d'un mélange de ces deux protéines à un ratio de 1:1 et 2:1 ont été fractionnés sur une colonne de chromatographie par filtration sur gel de type Superdex 200 10/300 analytique (GE Healthcare) préalablement équilibrée dans le tampon D. L'élué des différentes espèces a été suivie par la mesure de la DO à 280 nm. Les masses moléculaires de 670, 158 et 44 kDa correspondent respectivement aux marqueurs de masses moléculaires connues (Bio-Rad) thyroglobuline, γ -globuline, et ovalbumine.

Dans un deuxième temps, un mélange équimolaire des deux protéines a été fractionné sur la colonne (Figure 35, profil rose). Le chromatogramme présente un pic majoritaire caractérisé par un V_e de 10,8 mL correspondant à une masse moléculaire apparente de 307 kDa, et deux épaulements largement minoritaires correspondant aux

Résultats

protéines Yap1 sauvage et Ybp1 libre. Dans un troisième temps, un mélange contenant deux fois plus de Yap1 sauvage que de Ybp1 a été fractionné sur la colonne (Figure 35, profil violet, p.69). Le chromatogramme présente deux pics quasiment équivalents, l'un correspondant à Yap1 sauvage libre et l'autre correspondant à l'espèce de masse moléculaire apparente de 307 kDa.

La masse moléculaire théorique d'un complexe Yap1·Ybp1 1:1 étant de 153 kDa, l'ensemble de ces résultats suggère soit que les protéines Yap1 et Ybp1 s'associent en un complexe 2:2, soit en un complexe 1:1 de conformation non globulaire.

b. Par spectrométrie de masse en conditions natives

Afin de lever l'incertitude sur la stoechiométrie du complexe Yap1·Ybp1, des expériences ont été menées par spectrométrie de masse en conditions natives en collaboration avec le laboratoire LSMBO (Strasbourg) dirigé par S. Cianferani (Figure 36).

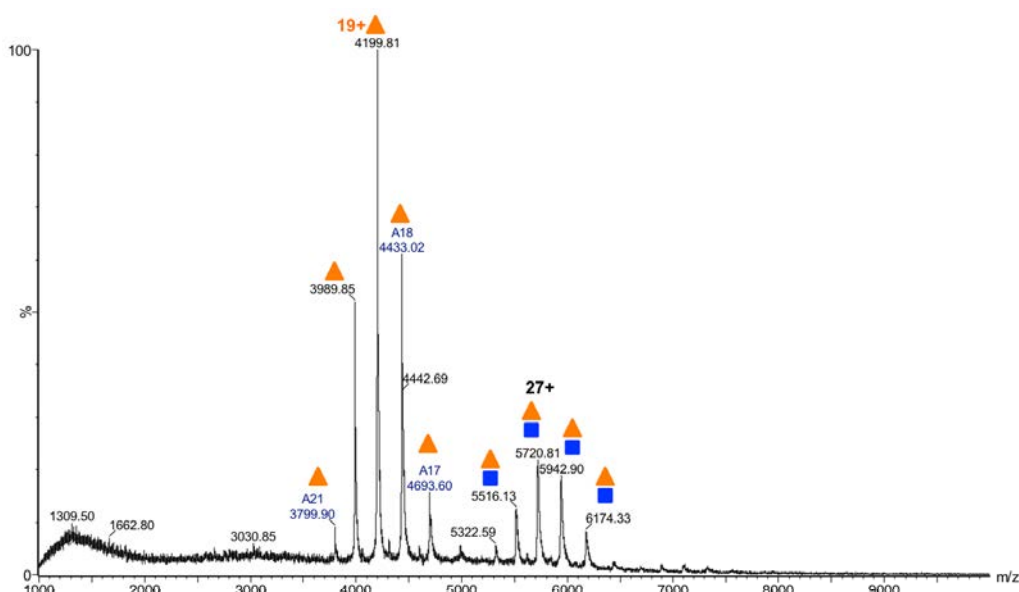


Figure 36. Analyse du complexe binaire copurifié Yap1·Ybp1 par spectrométrie de masse en conditions natives.

Spectre de masse non déconvolué du complexe binaire Yap1·Ybp1. Un mélange équimolaire des protéines Yap1^{SSS SSS} et Ybp1 à une concentration de 50 μ M a été fractionné sur une colonne de filtration sur gel de type Superdex 200 10/300 analytique (GE Healthcare) préalablement équilibrée en acétate d'ammonium 500 mM, pH 8. Le pic correspondant au complexe Yap1^{SSS SSS}·Ybp1 ($V_e = 10,8$ mL, Figure 35, p.69) est collecté puis stocké à une température de -80°C , après congélation par immersion en azote liquide. Cette espèce a ensuite été analysée par spectrométrie de masse en conditions natives à une concentration de 5 μ M après dilution dans le tampon acétate d'ammonium 500 mM, pH 8. L'analyse est réalisée sur un spectromètre de masse de type électrospray (Synapt G2, Waters). Triangle orange : distribution des états de charge (17+ à 21+) d'une espèce dont la masse de 79780 ± 6 Da correspondant à Ybp1 (masse moléculaire théorique de 79772,9 Da), triangle orange et carré bleu : distribution des états de charge d'une espèce dont la masse de 154296 ± 9 Da correspond à un complexe Yap1·Ybp1 de stoechiométrie 1:1 (masse moléculaire théorique de 154241 Da). Les masses moléculaires expérimentales ont été déterminées par le logiciel Mass lynx (Waters).

Le spectre de masse du complexe copurifié formé entre Yap1^{SSS SSS} et Ybp1 révèle la présence de deux espèces dont les masses moléculaires sont égales à 79780 ± 6 et à 154296 ± 9 Da, correspondant respectivement aux masses théoriques de la protéine Ybp1 (79772,9 Da) et du complexe Yap1^{SSS SSS}·Ybp1 de stoechiométrie 1:1 (154241 Da). Dans ces conditions natives, les différences entre les masses moléculaires expérimentales et théoriques peuvent s'expliquer par une désolvatation non totale de l'échantillon nécessaire afin d'éviter la dissociation du complexe non covalent entre les protéines Yap1 et Ybp1.

Ces résultats établissent sans ambiguïté que la stoechiométrie de l'interaction entre Yap1 et Ybp1 est de 1:1.

B. Étude des interactions entre la protéine Orp1 et les protéines Yap1, Ybp1 et le complexe Yap1·Ybp1

Nous avons ensuite étudié les interactions non covalentes entre la protéine Orp1 sauvage, sous forme réduite et oxydée sous forme pont disulfure (notée Orp1_{SS}), et les protéines Ybp1, Yap1 sauvage et le complexe Yap1·Ybp1. Pour cela, dans un premier temps nous avons utilisé la technique d'anisotropie de fluorescence dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, en utilisant la protéine Orp1 marquée par la sonde fluorescente Alexa Fluor® 488 5-SDP Ester (Life technologies) à son extrémité N-terminale (Orp1—AF).

La titration de Orp1—AF sous forme réduite avec Ybp1 a révélé une constante d'affinité K_D de $42,5 \pm 3,5$ μ M, soit une affinité relativement faible par rapport à celle obtenue pour l'interaction entre les protéines Yap1 et Ybp1 (Figure 37, p.72).

Afin de vérifier que la fixation du fluorophore sur Orp1 n'affectait pas l'interaction de Orp1—AF avec Ybp1, la même expérience de titration a été réalisée en présence de Ybp1—AF et de Orp1 sous forme réduite. Cette titration « miroir » produit une augmentation de l'anisotropie de fluorescence de moins de 1%. Ce résultat peut être expliqué par le faible poids moléculaire de la protéine Orp1 (19 kDa) par rapport à celui de la protéine Ybp1 (80 kDa) : la formation du complexe ne permettrait pas de polariser suffisamment la fluorescence émise par la protéine Ybp1—AF (principe de l'anisotropie de fluorescence, Figure 33, p.66). L'affinité obtenue avec Orp1—AF n'a donc pas pu être validée par une expérience de titration « miroir » comme pour l'interaction entre Yap1 et Ybp1.

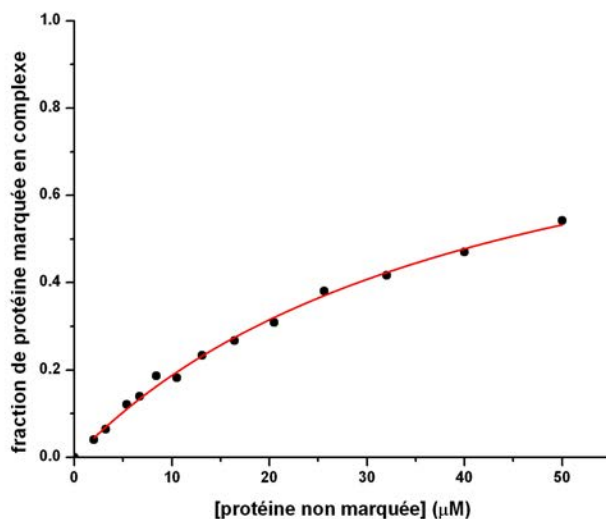


Figure 37. Suivi de l'interaction entre les protéines Orp1—AF et Ybp1 par anisotropie de fluorescence.

L'anisotropie de fluorescence a été mesurée sur un spectrofluorimètre SAFAS Xenius XC. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 494 nm et l'émission de fluorescence est collectée à 523 nm. Le mélange réactionnel est composé de 100 nM de Orp1—AF et de concentration variable de partenaire non marqué dans le tampon D. Les données expérimentales ont été analysées selon un modèle hyperbolique simple (Équation 15, p.67). La température est fixée à 25°C et la concentration de TCEP à 2 mM.

Par conséquent, l'interaction entre les protéines Ybp1 et Orp1 a été étudiée par ITC. L'emploi de cette technique a été rendu possible grâce à l'acquisition d'un appareil ITC 200 (GE Healthcare) par le service commun de biophysicochimie des interactions macromoléculaires (SCBIM) de l'Université de Lorraine. En effet, cet appareil consomme peu de matériel biologique grâce à une cellule de mesure de 200 µL.

Une solution de Ybp1 a d'abord été titrée par une solution de Orp1 sous forme réduite. Les données expérimentales ont été ajustées à un modèle de site de liaison unique. Contrairement au résultat obtenu par anisotropie de fluorescence, cette titration révèle une constante d'affinité K_D de $0,8 \pm 0,1$ µM et une stoechiométrie de $0,8 \pm 0,1$ (Figure 38 A, p.73, données et profil en noir). Cette affinité, meilleure que celle déterminée par anisotropie de fluorescence (K_D de $42,5 \pm 3,5$ µM), signifie que la présence du fluorophore à l'extrémité N-terminale de Orp1 affecte l'interaction entre Orp1 et Ybp1, invalidant l'expérience d'anisotropie (Figure 37). Les autres interactions ont donc été étudiées par ITC. Pour éviter la formation de ponts disulfure entre les protéines Orp1 et Yap1 sauvage pendant l'expérience, le mutant Yap1^{SSS SSS} a été utilisé. Nous avons démontré précédemment que l'utilisation de ce mutant n'avait aucune conséquence sur l'interaction entre Yap1 et Ybp1 (Figure 34 B, p.68).

Aucun signal calorimétrique significatif n'a été observé pour la titration de Yap1^{SSS SSS} avec Orp1 sous forme réduite, suggérant que Orp1 et Yap1 n'interagissent pas (Figure 38 B, p.73, données en noir). La titration de Orp1 sous forme réduite avec le

complexe Yap1^{SSS SSS}·Ybp1 a ensuite été étudiée. Pour cela, nous avons utilisé des concentrations équimolaires de Yap1^{SSS SSS} et Ybp1 de 50 μ M, conditions dans lesquelles 90% des deux protéines existent sous forme de complexe selon la constante de dissociation de 0,7 μ M déterminée auparavant (Figure 34 A, p.68). Dans ces conditions, l'ajustement des données expérimentales permet de déterminer une constante d'affinité de $0,7 \pm 0,2 \mu$ M et une stoechiométrie de $0,8 \pm 0,1$ (Figure 38 C, données et profil en noir).

Orp1 sous forme réduite interagirait donc avec le complexe Yap1^{SSS SSS}·Ybp1 et avec Ybp1 avec une stoechiométrie proche de 1 et des affinités similaires. Une hypothèse alternative serait que le signal calorimétrique observé résulterait de l'interaction entre Orp1 et Ybp1, qui induirait la dissociation du complexe Yap1^{SSS SSS}·Ybp1. Néanmoins, étant donné les constantes de dissociation des complexes Yap1^{SSS SSS}·Ybp1 et Orp1·Ybp1, aucune saturation n'aurait pu être observée dans les conditions de concentration utilisées. La protéine Orp1 sous forme réduite interagit donc bien avec le complexe Yap1^{SSS SSS}·Ybp1.

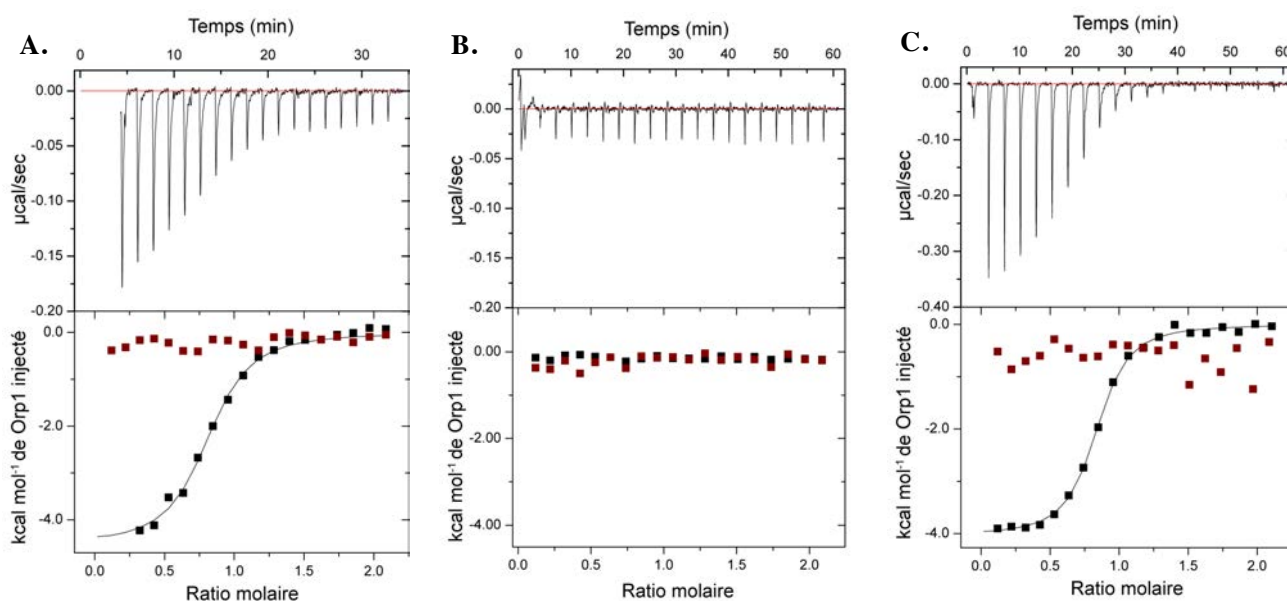


Figure 38. Caractérisation des interactions entre Orp1 et Yap1, Ybp1 et le complexe Yap1-Ybp1 par microcalorimétrie de titration isotherme.

L'acquisition des données a été réalisée à l'aide d'un appareil ITC 200 (GE Healthcare). Les données représentées en noir ont été obtenues en présence de Orp1 sous forme réduite. Les données représentées en rouge ont été obtenues en présence de Orp1_{SS}. L'agitation est fixée à 750 rpm et la température à 25°C. Les expériences sont réalisées dans le tampon D.

A. Caractérisation de l'interaction entre Ybp1 et Orp1 sous forme réduite et oxydée disulfure par ITC. La cellule contient Ybp1 (20 μ M) et la seringue Orp1 (200 μ M). **B.** Caractérisation de l'interaction entre Yap1^{SSS SSS} et Orp1 sous forme réduite et oxydée disulfure. La cellule contient Yap1^{SSS SSS} (50 μ M) et la seringue Orp1 (500 μ M). **C.** Caractérisation de l'interaction entre le complexe Yap1^{SSS SSS}·Ybp1 et Orp1 sous forme réduite et oxydée disulfure. La cellule contient un mélange équimolaire des protéines Yap1^{SSS SSS} et Ybp1 (50 μ M) et la seringue Orp1 (500 μ M).

Résultats

Une série de titrations similaires a été effectuée en présence de Orp1_{SS} (Figure 38, p. 73, données en rouge). Cependant, aucun signal calorimétrique significatif n'a pu être détecté, suggérant que la formation du pont disulfure intramoléculaire de Orp1 est associée à des réarrangements structuraux qui empêcheraient la reconnaissance de Orp1_{SS} par Ybp1 et par le complexe Yap1^{SSSSS}·Ybp1. Les spectres de dichroïsme circulaire de Orp1 réduite et Orp1_{SS} confirment cette hypothèse : la formation du pont disulfure intramoléculaire entraîne une modification majeure du contenu en structure secondaire (Figure 39).

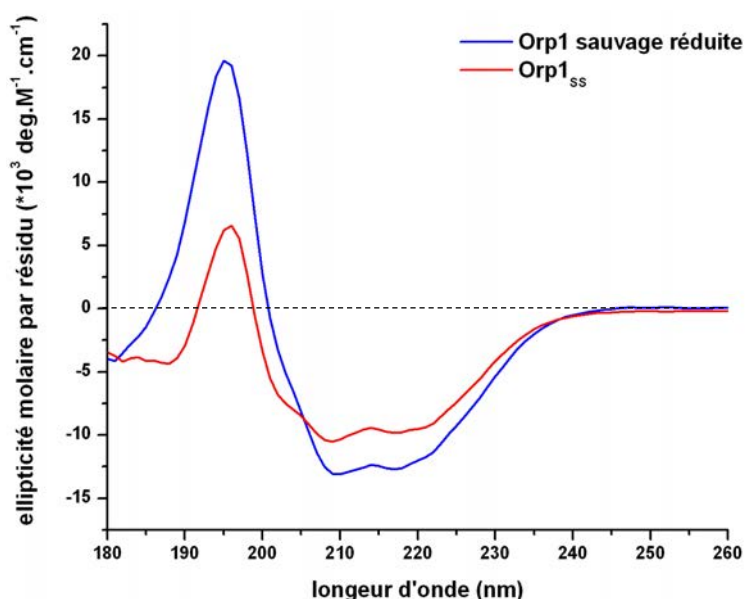


Figure 39. Spectres de dichroïsme circulaire des formes réduite et oxydée disulfure de Orp1 sauvage.

L'acquisition des mesures a été réalisée sur un appareil Chirascan-plus (Applied photophysics) de 180 à 260 nm avec un pas de 0,5 nm à une température de 25°C en tampon E (Na₂HPO₄ 20 mM, NaF 300 mM, pH 7). La concentration en protéine est de 50 μM. La cuve utilisée est une cuve en quartz présentant un trajet optique de 0,1 mm. Trois spectres ont été enregistrés pour chaque mesure et ont été moyennés pour augmenter le rapport signal/bruit.

C. Conclusions

Nous avons montré que Orp1 n'interagissait pas avec Yap1^{SSSSS} (Figure 38 B, p.73). Par conséquent, Orp1 ne devrait vraisemblablement pas interagir avec Yap1 sauvage. Étant donné que les constantes de dissociation des interactions entre Orp1 et Ybp1 et avec le complexe Yap1^{SSSSS}·Ybp1 sont très similaires (Figure 38 A et C, p.73), nous proposons qu'au sein du complexe binaire Yap1·Ybp1, Ybp1 recrute Orp1 pour former un complexe ternaire (Figure 40, p.75). Les conclusions des expériences d'ITC combinées à celles des expériences de spectrométrie de masse en conditions natives (Figure 36, p.70)

nous permettent de confirmer que le complexe ternaire comprend une molécule de chacun des partenaires Yap1, Ybp1 et Orp1.

Par conséquent, les expériences de reconstitution du relai H₂O₂/Orp1/Yap1 ont été conduites en présence de quantités équimolaires des protéines Yap1 et Ybp1, Orp1 étant ajouté en excès afin de favoriser la formation du complexe ternaire.

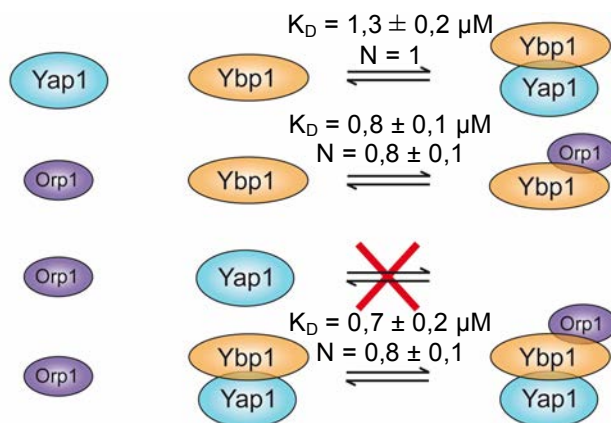


Figure 40. Schéma bilan des interactions entre Orp1, Yap1 et Ybp1.

Ce schéma est valable pour la forme Orp1 sauvage réduite uniquement, la forme Orp1_{ss} n'interagissant ni avec Yap1, ni avec Ybp1, ni avec le complexe Yap1·Ybp1.

Chapitre III. Reconstitution et caractérisation cinétique du relai H₂O₂/Orp1/Yap1 *in vitro*

A. Caractérisation cinétique du cycle peroxydase de Orp1

Au cours du mécanisme d'activation de Yap1 par H₂O₂, l'état d'oxydation sulfénique de la C_p de Orp1 (forme d'oxydation notée Orp1—SOH) est situé à un point critique entre le cycle peroxydase et le cycle d'activation de Yap1 (Figure 27 p. 53). En effet, cet acide sulfénique pourrait réagir non seulement avec la C_R de Orp1, la Cys598 de Yap1, mais également avec une seconde molécule de H₂O₂, conduisant à une forme suroxydée de la C_p, ou encore avec d'autres thiols présents dans le milieu cellulaire. L'étude cinétique des différentes étapes du cycle peroxydase de Orp1 était donc nécessaire avant d'entreprendre la caractérisation cinétique du relais H₂O₂/Orp1/Yap1, dans le but de déterminer les constantes de vitesse de formation de l'intermédiaire Orp1—SOH (constante de vitesse k_{SOH}), et du pont disulfure intramoléculaire (constante de vitesse k_{SS}) et de tester la pertinence d'une éventuelle étape de suroxydation (constante de vitesse k_{SO_2}).

1. Stratégie

La réaction peroxydase catalysée par Orp1 sauvage a été conduite à l'état pré-stationnaire en l'absence de réducteur (« presteady-state », condition de cycle unique). Dans ces conditions, le cycle catalytique est bloqué à la formation de l'espèce Orp1_{SS}. L'accumulation de cette espèce, dont l'intensité d'émission de fluorescence est supérieure d'un facteur deux à celle de la forme réduite de l'enzyme (Figure 42 A, p.77), est utilisée comme sonde spectroscopique pour suivre la cinétique réactionnelle à des concentrations variables en H₂O₂. En effet, Orp1 contient un résidu Trp (Trp125) situé dans l'environnement du site actif, dont le signal de fluorescence est affecté selon l'état d'oxydation de la C_p (Figure 42 B, p. 77).

La réaction a été suivie à l'aide d'un appareil de mélange rapide résolu en temps de type « stopped flow » (stopped flow SX20, Applied photophysics) qui permet de mélanger rapidement volume à volume deux solutions initialement contenues dans deux seringues, et de suivre l'émission de fluorescence du mélange dès les premiers instants de la réaction (Figure 41, p.77). Avec un temps mort très faible de l'ordre de 1 ms, cette technique permet de

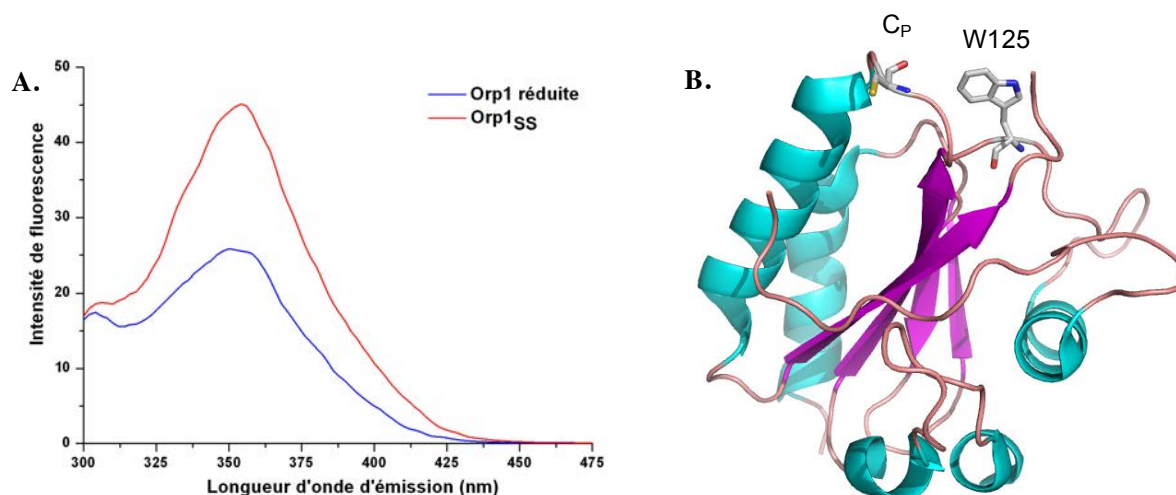


Figure 42. Propriétés de fluorescence de Orp1 sauvage.

A. Spectres d'émission de fluorescence de Orp1 sauvage sous forme réduite et oxydée disulfure (Orp1_{SS}). Les mesures ont été effectuées sur un fluorimètre Flx (SAFAS) dans le tampon D à une concentration en Orp1 de 10 μ M. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 282 nm. Le photomultiplicateur est réglé à 500 V. Le maximum d'émission de fluorescence est obtenu pour une longueur d'onde de 352 nm, pour Orp1 réduite et Orp1_{SS}. L'intensité d'émission de fluorescence est multipliée par un facteur d'environ deux pour Orp1_{SS}. **B.** Représentation schématique de la structure de la protéine Orp1 (Code PDB : 3CMI) obtenue par cristallographie aux rayons X. Le résidu C_P (Cys36) est représenté en « stick » et est identifiable par l'atome de soufre coloré en jaune. L'unique résidu Trp (W125) de Orp1 se trouve à proximité immédiate de la C_P. Les acides aminés 69 à 86 qui forment la boucle portant la C_R ne sont pas visibles sur cette structure car cette zone ne présente pas une densité électronique suffisante pour être résolue par cristallographie aux rayons X.

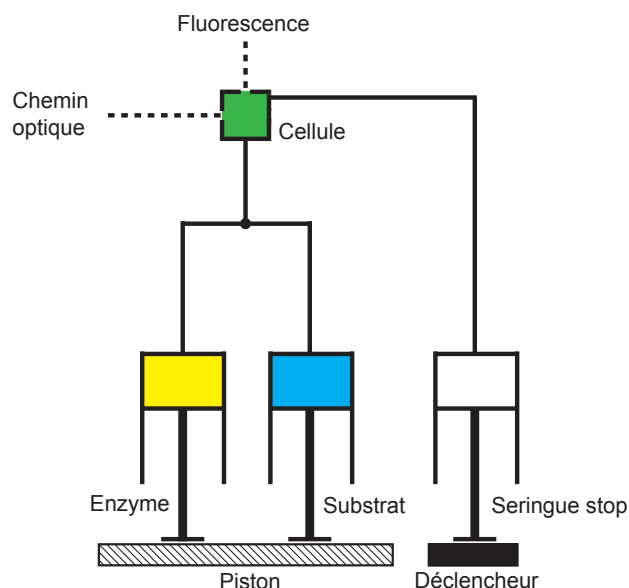


Figure 41. Représentation schématique d'un appareil de cinétique rapide de type « stopped flow ».

Le mouvement du piston provoque le mélange des solutions d'enzyme et de substrat, le déplacement de ce mélange dans la cellule de l'appareil et finalement le remplissage de la seringue stop qui déclenche l'acquisition du signal de fluorescence en fonction du temps avec un temps mort de l'ordre de 1 ms.

Résultats

mesurer des valeurs de constantes de vitesses maximales de l'ordre de 700 s^{-1} . Dans cette expérience, la première seringue contient l'enzyme Orp1, la deuxième seringue contient H_2O_2 . La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm afin d'exciter sélectivement le résidu Trp de Orp1, et un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'onde supérieures à 320 nm, en accord avec le spectre d'émission de la protéine (Figure 42 A, p.77). Le signal mesuré est croissant (Figure 44, p.79, données en noir), correspondant à la formation de l'espèce Orp1_{SS}. L'amplitude des tracés est constante quelle que soit la concentration en H_2O_2 et est proportionnelle à la concentration de Orp1 (données non montrées).

Les données expérimentales ont été interprétées à l'aide du logiciel KinTek Global Kintic Explorer™ qui est un outil d'analyse de cinétiques enzymatiques (329). Ce logiciel ajuste un ensemble de données cinétiques obtenues pour plusieurs concentrations en substrat de façon globale à un mécanisme modèle, décrit par un ensemble d'équations chimiques, caractérisées chacune par une constante de vitesse. L'objectif est de vérifier si le mécanisme modèle décrit fidèlement les données expérimentales, et de déterminer la valeur des constantes cinétiques de chaque étape. Le mécanisme modèle postulé est traduit sous forme d'équations différentielles et d'équations de conservation de masse, qui sont intégrées numériquement de façon simultanée pour décrire la cinétique réactionnelle. Les données expérimentales sont ensuite ajustées au modèle postulé par régression non linéaire selon l'algorithme de Levenberg-Marquardt, correspondant à une recherche itérative des paramètres inconnus (comme les constantes de vitesse) permettant l'obtention d'un χ^2 minimal².

2. Résultats et interprétations

Les tracés expérimentaux évoluent selon deux régimes en fonction de la concentration de H_2O_2 . Pour des concentrations inférieures à 1 mM, la vitesse apparente des cinétiques augmentent de manière proportionnelle à la concentration en substrat H_2O_2 , suggérant que l'étape limitante est associée à la réaction entre Orp1 et H_2O_2 (Figure 44 A, p.79). À des concentrations en substrat supérieures à 1 mM, les cinétiques deviennent indépendantes de la concentration en H_2O_2 , indiquant que le processus limitant est une réaction de premier ordre qui correspond à la formation du pont disulfure intramoléculaire (Figure 44 B et Figure 43, p.79).

² Méthode des moindres carrés pondérés : somme pour l'ensemble des points expérimentaux, du carré de la différence entre la donnée considérée et la valeur calculée prédite par la fonction d'ajustement.

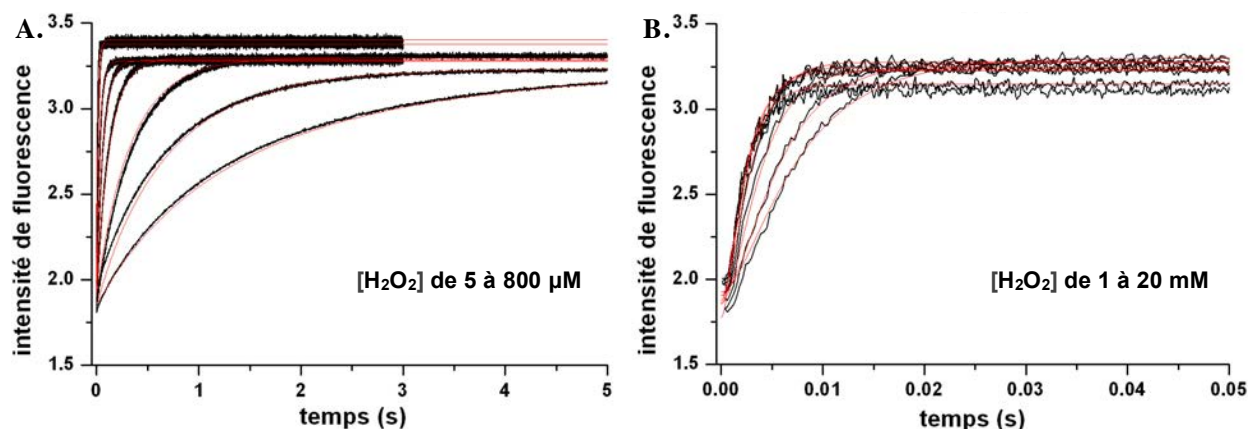


Figure 44. Cinétiques réactionnelles de Orp1 en absence de réducteur (état pré-stationnaire).

La réaction est suivie par la variation du message d'émission de fluorescence de l'enzyme Orp1, mesurée avec un appareil de cinétique rapide « stopped flow » SX20 (Applied photophysics). Les mesures sont réalisées à 25°C dans le tampon D. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm et l'émission de fluorescence est détectée pour des longueurs d'onde supérieures à 320 nm grâce à un filtre. Les cinétiques expérimentales sont représentées en noir et les courbes de régression obtenues par ajustement global des données par le logiciel KinTek Global Kinetic Explorer sont présentées en rouge.

A. La cellule réactionnelle contient Orp1 (2 μM) et H₂O₂ (de 5 μM à 800 μM), **B.** La cellule réactionnelle contient Orp1 (2 μM) et H₂O₂ (de 1 mM à 20 mM).

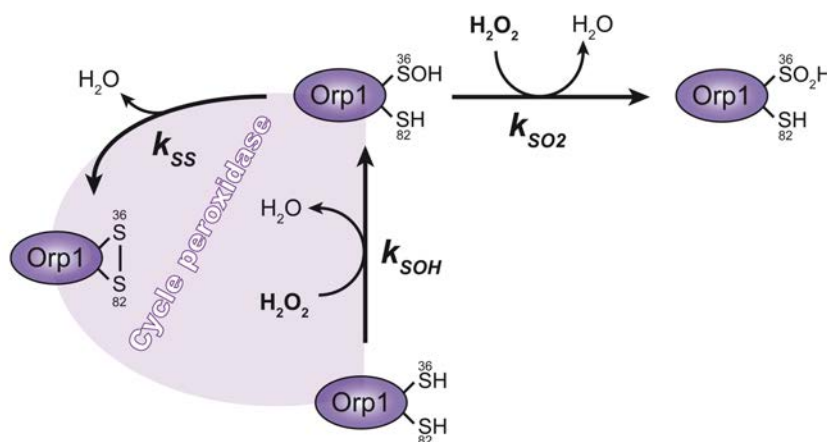


Figure 43. Modèle du cycle peroxydase de Orp1.

Les paramètres k_{SOH} , k_{SS} et k_{SO2} correspondent aux constantes de vitesse de chaque étape. Les étapes conduisant à la formation de l'acide sulfénique et de l'acide sulfonique sont de nature bimoléculaire (impliquant l'enzyme Orp1 et le substrat H₂O₂), les constantes de vitesses associées k_{SOH} et k_{SO2} sont donc de second ordre et sont exprimées en M⁻¹.s⁻¹. Par contre, l'étape correspondant à la formation du pont disulfure intramoléculaire, de constante de vitesse k_{SS} est monomoléculaire et donc est de premier ordre et exprimée en s⁻¹.

Le modèle minimal comprend deux étapes : l'étape peroxydasique caractérisée par la constante de vitesse k_{SOH} et l'étape de formation de Orp1_{SS} caractérisée par la constante de vitesse k_{SS} . Une étape de suroxydation de l'intermédiaire Orp1_{SOH} par H₂O₂ caractérisée par la constante de vitesse k_{SO2} a également été envisagée (Figure 43, p.79). Dans un premier temps, les paramètres du modèle complet, à savoir k_{SOH} , k_{SS} et k_{SO2} ont été ajustés aux données expérimentales. Avec ce modèle, l'ajustement converge, la ligne d'ajustement dévie peu par rapport aux points expérimentaux ce qui signifie que l'ajustement représente correctement les données (Figure 44, profils en rouge, p.79). Les valeurs des paramètres du modèle sont présentées dans le Tableau 4 (Ajustement 1).

Tableau 4. Valeurs des paramètres k_{SOH} , k_{SS} et k_{SO2} déterminées à l'aide du logiciel KinTek Global Kinetic Explorer™.

L'ajustement 1 correspond à l'ajustement des données expérimentales au modèle complet comprenant l'étape de suroxydation. L'ajustement 2 correspond à l'ajustement des données expérimentales au modèle minimal n'incluant pas l'étape de suroxydation. Les limites hautes et basses de chaque paramètre ont été calculées grâce à la fonction « Fitspace » du logiciel.

| | | $k_{SOH} (M^{-1}.s^{-1})$ | $k_{SS} (s^{-1})$ | $k_{SO2} (M^{-1}.s^{-1})$ |
|---------------------|--------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|
| Ajustement 1 | Valeur | $1,6.10^5 \pm 2,2.10^2$ | 492 ± 6 | $2.10^3 \pm 1.10^3$ |
| | Limite basse | $1,5.10^5$ | 324 | 0,107 |
| | Limite haute | $1,6.10^5$ | 633 | $1,2.10^4$ |
| Ajustement 2 | Valeur | $1,6.10^5 \pm 2,2.10^2$ | 507 ± 3 | - |
| | Limite basse | $1,5.10^5$ | 507 | - |
| | Limite haute | $1,6.10^5$ | 633 | - |

Néanmoins, la convergence de l'ajustement et l'obtention de paramètres associés à des erreurs standard raisonnables ne sont pas des critères suffisants pour affirmer la validité du modèle cinétique utilisé. En effet, les erreurs standards calculées sur chaque paramètre sont en général sous-estimées par rapport à l'erreur réelle à cause du processus d'ajustement qui suppose que toutes les erreurs expérimentales sont indépendantes et distribuées de façon homogène sur l'ensemble du jeu de données, ce qui souvent n'est pas le cas. L'analyse des contours de confiance à l'aide de la fonction « Fitspace » du logiciel permet d'obtenir une évaluation bien plus robuste des limites de chaque paramètre (330). Cette fonction « Fitspace » permet d'explorer l'espace dans lequel les paramètres peuvent varier tout en conservant un ajustement correct des données expérimentales et de tester si chaque paramètre est bien défini de façon indépendante des autres. La fonction « Fitspace » nous permet ainsi d'obtenir les limites de confiance basses et hautes de chaque paramètre qui sont présentées dans le Tableau 4 (Ajustement 1). De plus, le logiciel représente graphiquement le calcul des contours de confiance, ce qui permet une évaluation directe du niveau de contrainte de chaque paramètre étudié (Figure 45, p.81).

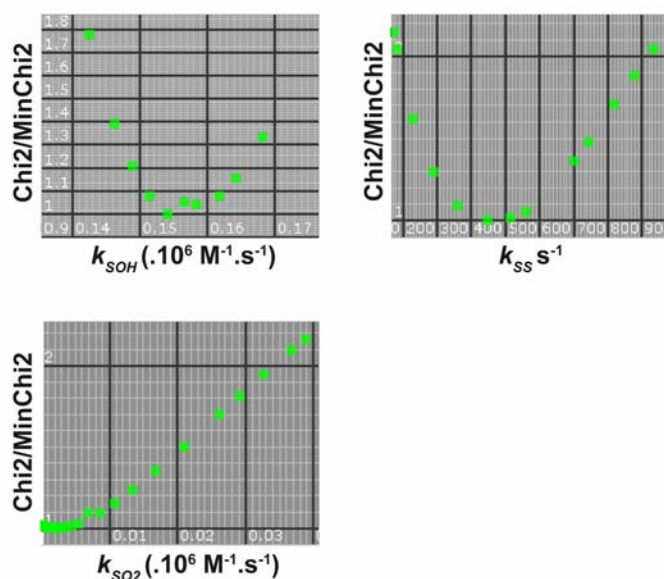


Figure 45. Représentation graphique du calcul des contours de confiance de chaque paramètre par la fonction « Fitspace » du logiciel KinTek Global Kinetic Explorer™.

La fonction « Fitspace » à une dimension (Fitspace 1D) explore l'espace dans lequel chaque paramètre peut évoluer tout en assurant un ajustement acceptable des données. Alors qu'un paramètre donné est maintenu constant, tous les autres paramètres sont autorisés à varier en cherchant le meilleur ajustement des données expérimentales. Le processus est répété sur la gamme de valeurs des paramètres afin de générer une courbe de valeurs de chi2 normalisées en fonction des valeurs du paramètre considéré.

A. Représentation du Chi2 normalisé en fonction du paramètre k_{SOH} . **B.** Représentation du Chi2 normalisé en fonction du paramètre k_{SS} . **C.** Représentation du Chi2 normalisé en fonction du paramètre k_{SO2} .

Alors que les paramètres k_{SOH} et k_{SS} sont correctement contraints, le paramètre k_{SO2} peut varier sur une gamme de valeur de plus de cinq ordres de grandeur (Tableau 4, p.80, ajustement 1 et Figure 45). Si un paramètre n'est pas correctement contraint, comme c'est le cas ici pour k_{SO2} , alors le modèle postulé doit être trop complexe. Par conséquent, nous avons testé dans un deuxième temps le modèle minimal n'incluant pas l'étape de suroxydation. Les données fournies par ce nouvel ajustement, comprenant seulement les deux paramètres k_{SOH} et k_{SS} sont présentées dans le Tableau 4, p.80 (Ajustement 2).

La prise en compte de l'étape de suroxydation correspond à un modèle « surparamétré », ne permettant ni d'améliorer l'ajustement, ni de définir une valeur de constante de vitesse de suroxydation k_{SO2} avec une précision raisonnable. Ceci signifie que dans les conditions expérimentales utilisées, l'enzyme Orp1 n'est pas significativement suroxydée et que le modèle minimal suffit à décrire les cinétiques réactionnelles de Orp1 avec H_2O_2 . Ainsi selon l'ajustement 2 (Tableau 4, p.80), pour des concentrations de H_2O_2 faibles de l'ordre de $100 \mu\text{M}$, la formation de l'acide sulfénique est limitante ($k_{SOH} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] = 1,6 \cdot 10^5 \cdot 100 \cdot 10^{-6} = 16 \text{ s}^{-1}$) alors que la formation du pont disulfure est un processus très rapide ($k_{SS} = 507 \text{ s}^{-1}$).

B. Reconstitution du relai *in vitro*

Le modèle actuel de l'activation de Yap1 par H_2O_2 implique, de façon séquentielle, l'oxydation du résidu C_p de Orp1 par H_2O_2 , l'attaque de la Cys598 de Yap1 sur l'intermédiaire Orp1—SOH formé, conduisant à l'espèce disulfure mixte Yap1—S—S—Orp1, et enfin l'échange de ce pont disulfure C_p—Cys598 par l'attaque de la Cys303 de Yap1 pour former l'espèce Yap1 oxydée par un pont disulfure intramoléculaire Cys303—Cys598

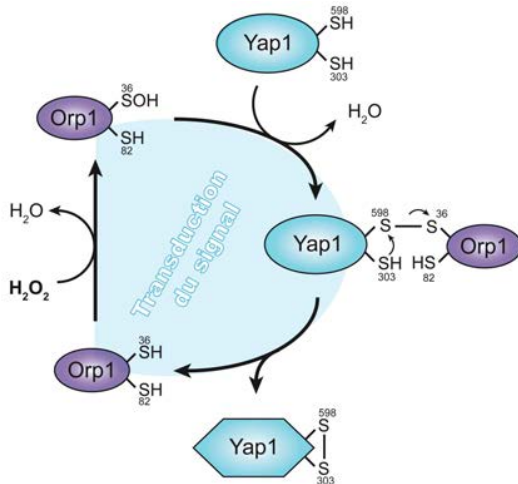


Figure 46. Modèle actuel du relai H_2O_2 /Orp1/Yap1.
(d'après D'Autreaux et Toledano, 2007 (312))

(Figure 46). Des étapes ultérieures conduisent à d'autres formes oxydées de Yap1 possédant au moins deux ponts disulfure entre les Cys en positions 598—303 et 629—310 (Figure 27 p. 53). Comprendre les mécanismes à l'origine de la spécificité de la réaction entre Orp1—SOH et Yap1 impliquait nécessairement d'être en mesure de reconstituer le relai complet, avec ses trois composants Yap1, Orp1 et Ybp1.

1. Stratégie

Le relai d'oxydation de Yap1 par H_2O_2 a donc été reconstitué *in vitro* en utilisant les protéines recombinantes purifiées. Concrètement, un mélange réactionnel composé d'une solution équimolaire des protéines Yap1 et Ybp1 est incubé avec un excès de la protéine Orp1, la réaction étant déclenchée par l'ajout de 100 μM de H_2O_2 . D'après la constante de vitesse k_{SOH} (de $1,6 \cdot 10^5 M^{-1} \cdot s^{-1}$, Chapitre III.A.2, p.78) cette concentration assure que la première étape du relai (la formation de l'intermédiaire Orp1—SOH), se produit avec une constante de vitesse de $16 s^{-1}$ non limitante par rapport aux étapes ultérieures du mécanisme (Chapitre III.C.2, p.92). De plus, cette concentration modérée permet d'éviter les événements d'oxydation non spécifiques, compte-tenu de l'échelle de temps utilisée inférieure à la min. Le relai d'oxydation de Yap1 par H_2O_2 a également été étudié en absence de la protéine Ybp1 dans le but d'identifier la fonction moléculaire de ce composant. La reconstitution du relai *in vitro* nous a servi de base pour suivre la réaction d'activation de Yap1 par électrophorèse de type SDS-PAGE (Chapitre III.B.2, p.83) et par une approche de cinétique rapide.

Dans ce relai, deux résidus Cys peuvent interférer avec la formation de l'intermédiaire Yap1—S—S—Orp1 : le résidu C_R de Orp1 (Cys82) et la Cys303 de Yap1 (Figure 46, p.82). Nous avons donc utilisé, en plus des protéines sauvages, des mutants de ces résidus notés Orp1^{CCS} (mutation de la C_R C82S) et Yap1^{SCC CCC} (mutation C303S). Afin d'éviter des réactions secondaires non spécifiques, des mutations des autres Cys de ces deux protéines ont été ajoutées en combinaison à ces variants, les mutants sont notés Orp1^{CSA} (mutations C64S, à noter que le résidu Cys64 n'intervient pas dans la catalyse de Orp1, et C82A) et Yap1^{SSS CSS} (mutations des résidus des domaines n- et c-CRD de Yap1 à l'exception de la Cys598 : mutations C303S, C310S, C315S, C620S et C629S).

2. Analyse par électrophorèse de type SDS-PAGE : premier indice sur le rôle de Ybp1

La formation des produits de la réaction a été suivie en absence de réducteur par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE. Pour cela, les réactions ont été stoppées après une minute d'incubation avec H₂O₂ par dénaturation (en présence de SDS) et blocage des résidus Cys libres par alkylation (par ajout de N-éthyl maléimide (NEM)). Les gels présentés Figure 47 (p.85), révélés au bleu de Coomassie, permettent d'observer les protéines de poids moléculaire supérieur à 50 kDa, le monomère de Orp1 (18 kDa) migrant hors du gel. Il est à noter que les protéines Yap1 et Ybp1 migrent de manière inversée par rapport à l'ordre attendu d'après leurs poids moléculaires, Ybp1 (80 kDa) migrant légèrement plus rapidement que Yap1 (75 kDa).

En présence des protéines Yap1 sauvage et Orp1 sauvage (Figure 47 A, p.85), l'addition de H₂O₂ induit la formation de deux bandes supplémentaires, l'une légèrement plus mobile électrophorétiquement que Yap1 sauvage et l'autre migrant plus lentement. La nature de ces bandes, validées par spectrométrie de masse MS/MS après digestion trypsique, correspond à une forme oxydée de Yap1 et à un complexe covalent Yap1—Orp1, respectivement (données non montrées). Par comparaison à des études précédentes réalisées *in vitro* et *in vivo* (231,276,331), ces bandes peuvent être attribuées respectivement à une espèce Yap1 oxydée par la formation de pont(s) disulfure intramoléculaire(s) avec au moins un pont disulfure entre les Cys303 et Cys598 (notée Yap1_{OX}) et à l'espèce disulfure mixte impliquant la C_P de Orp1 et la Cys598 de Yap1 (noté Yap1—S—S—Orp1 d'une masse moléculaire de 93 kDa). De façon attendue, l'espèce Yap1_{OX} n'est pas observée pour le mutant de Yap1 présentant seulement la mutation Cys303Ser (mutant Yap1^{SCC CCC},

Résultats

Figure 47 B, E, H, p.85), confirmant que le pont disulfure intramoléculaire Cys303—Cys598 est le premier à être formé dans la séquence d'activation de Yap1 par H₂O₂. En l'absence de la Cys303, l'intermédiaire Yap1—S—S—Orp1 peut donc s'accumuler (mutant Yap1^{SCC CCC}, Figure 47 B, E, H et mutant Yap1^{SSS CSS}, Figure 47 C, F, I, p.85).

Dans toutes les expériences où Orp1 sauvage a été utilisé, l'intermédiaire Yap1—S—S—Orp1 n'est observé qu'en présence du partenaire Ybp1 (Figure 47 A, B et C, p.85). Par contre, dans toutes les expériences mettant en jeu un mutant de Orp1 dans lequel la C_R a été substituée (mutants Orp1^{CCS} et Orp1^{CSA}), l'espèce Yap1—S—S—Orp1 est observée en présence mais également en l'absence de Ybp1 (Figure 47 D à I, p.85). Ce résultat est particulièrement évident pour le mutant Yap1^{SSS CSS} pour lequel la quasi-totalité de la protéine Yap1 réduite s'accumule sous cette forme. Ces résultats suggèrent que Ybp1 joue un rôle critique dans la réaction entre Orp1—SOH et la Cys598 de Yap1 en présence du résidu C_R de Orp1. Compte-tenu du fait que la constante de vitesse de la réaction intramoléculaire de la C_R sur Orp1—SOH est très élevée ($k_{SS} = 507 \text{ s}^{-1}$, Chapitre III.A.2, p.78), il est très probable que la C_R entre en forte compétition avec la Cys598 de Yap1. Par conséquent, une fonction essentielle de Ybp1 pourrait être de contrôler la vitesse de l'étape de formation du pont disulfure intramoléculaire de Orp1 (k_{SS}).

D'autre part, en présence des mutants de la C_R de Orp1 (Orp1^{CCS} et Orp1^{CSA}) et des formes Yap1 sauvage et Yap1^{SCC CCC} (Figure 47 D, E, G et H, p.85), l'addition de H₂O₂ produit de nombreuses espèces de hauts poids moléculaires et conduit à la consommation de la quasi-totalité de l'espèce Yap1 réduite. Ces espèces correspondent vraisemblablement à de multiples adduits de Orp1 avec Yap1 ou à des multimères de Yap1, résultant de la réaction initiale entre Orp1—SOH et les Cys de Yap1. En présence de Ybp1, une fraction limitée de Yap1 est redirigée vers la formation des espèces Yap1_{ox} ou Yap1—S—S—Orp1. La substitution des résidus Cys de Yap1, à l'exception de la Cys598, mutant Yap1^{SSS CSS}, abolit la formation de ces espèces et conduit à l'accumulation de près de 100% de Yap1 sous forme Yap1—S—S—Orp1 (Figure 47 F et I, p.85).

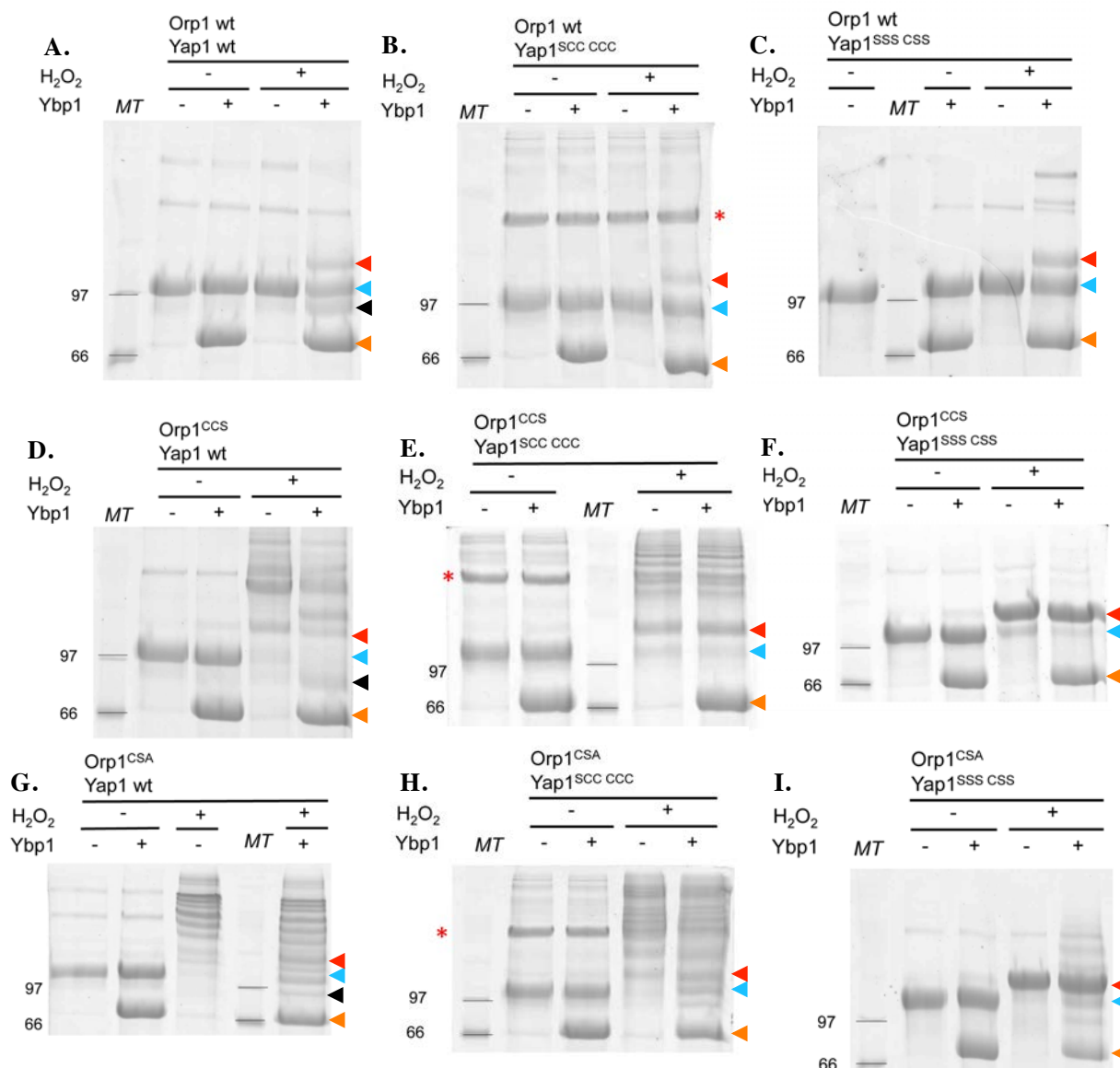


Figure 47. Analyse de la formation des espèces Yap1_{ox} et Yap1–S–S–Orp1 par électrophorèse de type SDS-PAGE en conditions non réductrices.

Les concentrations des protéines Yap1, Ybp1 et Orp1 sont fixées respectivement à 2 μM, 2μM et 10 μM. Le volume réactionnel est de 100 μL et la réaction est conduite à température ambiante dans le tampon D. La réaction, déclenchée par H₂O₂ à 100 μM, évolue pendant 1 min, puis est stoppée par addition de SDS 5%, NEM 50 mM suivie d’une incubation à 30°C pendant 1h. Après séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes de type SDS-PAGE (gel 10% acrylamide/bisacrylamide 30/0,44), les protéines sont colorées spécifiquement par coloration colloïdale au bleu de Coomassie (295). Les espèces Yap1_{ox} et Yap1–S–S–Orp1 ont été vérifiées par spectrométrie de masse MS/MS. L’astérisque rouge (*) correspond à un contaminant associé à la protéine Yap1^{SCC CCC}. Les triangles rouges, bleus, noirs et oranges indiquent respectivement l’espèce Orp1–S–S–Yap1 et les protéines Yap1 réduite, Yap1_{ox} et Ybp1.

C. Analyse cinétique de la réaction entre Orp1 et Yap1

1. Test d'une méthode cinétique par compétition au 2-thiopyridine

a. Stratégie expérimentale

L'étude cinétique de la réaction entre Orp1 et Yap1 implique de disposer d'une méthode permettant de suivre la formation de Yap1—S—S—Orp1 au cours du temps. Cette espèce peut être observée sur gel, mais cette méthode ne permet pas d'obtenir de résultats quantitatifs précis. De plus, cette réaction n'impliquant pas de sonde spectroscopique, nous avons envisagé de suivre les cinétiques réactionnelles par l'intermédiaire d'une réaction « témoin » entre l'acide sulfénique de Orp1—SOH et le thiol d'une sonde chimique chromophore, le 2-thiopyridine (2TP), possédant un message spectroscopique caractéristique à 343 nm (Figure 48).

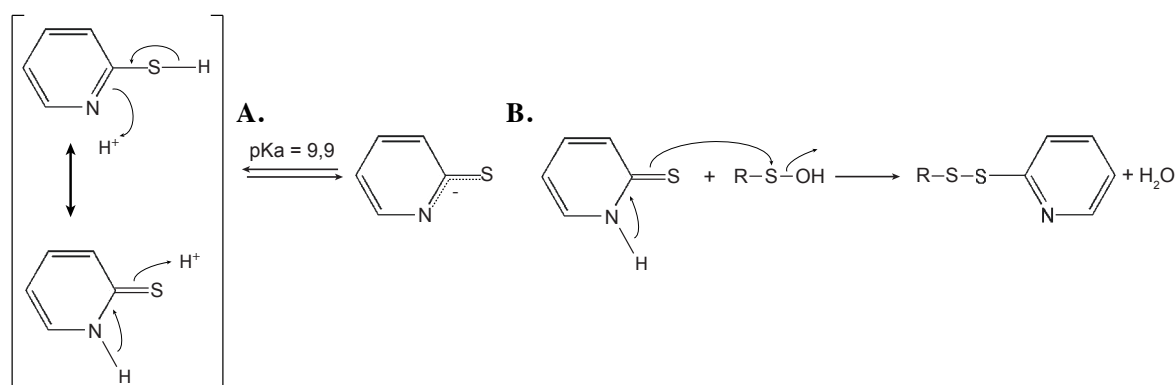


Figure 48. Le 2-thiopyridine, une sonde chimique chromophore des acides sulfénique.

R—SOH : chaîne polypeptidique portant une Cys dont la fonction thiol est oxydée sous forme acide sulfénique. Le 2TP libre présente un message spectroscopique à 343 nm ($\epsilon_{343} = 8080 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

A. Formes mésomères et d'ionisation du 2TP. **B.** Schéma de la réaction entre le 2TP et un acide sulfénique.

L'analyse cinétique des réactions entre le 2TP et Orp1—SOH, en compétition avec Yap1 devait nous permettre de déterminer la constante de vitesse de la réaction entre Orp1—SOH et Yap1 (332).

b. Adaptation de la méthode par compétition au système Orp1/Yap1 et ses limitations

Afin de pouvoir mettre en oeuvre cette méthode nous avons entrepris d'étudier la cinétique de la réaction de Orp1—SOH avec le 2TP. Un pré-requis était de générer l'intermédiaire Orp1—SOH. Pour cela, il était nécessaire d'utiliser un mutant de Orp1 dans

lequel seule la C_p est conservée (Orp1^{CSA}). De plus, l'acide sulfénique généré avec ce mutant est une fonction réactive et peu stable. Il était donc nécessaire de générer Orp1-SOH « *in situ* ». Pour cela, nous avons utilisé un appareil de cinétique rapide de type « stopped flow » monté en double mélange (Figure 49). Dans un premier temps, les espèces H_2O_2 et Orp1^{CSA} contenues initialement dans deux seringues sont incubées pendant une durée définie nommée temps de « pré-incubation », permettant de générer l'espèce Orp1-SOH. Dans un second temps, le 2TP contenu dans une troisième seringue est ajouté en excès afin de garantir des conditions cinétiques de pseudo-premier ordre. L'absorption du mélange à 343 nm caractéristique du 2TP permet de suivre la réaction en fonction du temps dès ses premiers instants.

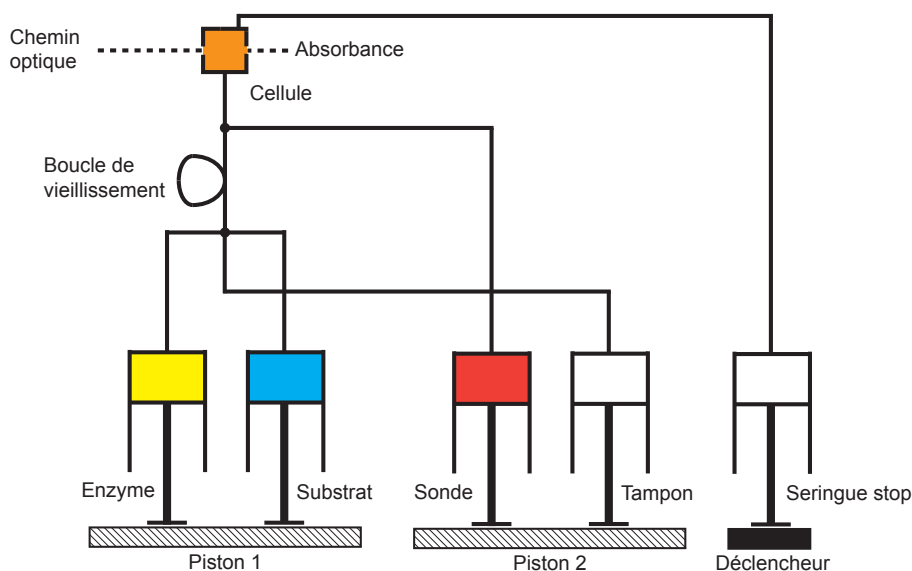


Figure 49. Représentation schématique d'un appareil de cinétique rapide de type « stopped flow » monté en double mélange.

Le mouvement du piston 1 provoque le mélange des solutions d'enzyme et de substrat dans la boucle de vieillissement. Le piston 2 se déclenche après le temps de « pré-incubation » défini et entraîne le mélange de la solution de sonde avec le contenu de la boucle de vieillissement, déplacé par le tampon, dans la cellule de l'appareil, et finalement le remplissage de la seringue stop qui déclenche l'acquisition du signal de fluorescence en fonction du temps avec un temps mort de l'ordre de 1 ms.

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer le temps de pré-incubation pour lequel on obtient une amplitude maximale du signal correspondant à la formation d'une quantité maximale d'espèce Orp1 oxydée. En absence de la protéine Yap1 et pour un temps de pré-incubation supérieur à 10 s, la cinétique de la réaction entre Orp1 oxydée et un excès de 2TP est décrite de façon adéquate par une phase exponentielle décroissante, correspondant à l'attaque du 2TP sur l'espèce Orp1 oxydée selon une cinétique de pseudo-premier ordre, suivie par un signal linéaire lent et non spécifique (Figure 50 A, p.88) (Équation 16, p.88,

Résultats

avec B la pente correspondant à un bruit de fond non spécifique). Comme attendu, la constante de vitesse de l'attaque du 2TP dépend linéairement de la concentration en 2TP, en accord avec la nature bimoléculaire de la réaction. La constante de vitesse de second ordre de la réaction est déterminée à partir de la pente de la droite : $k_{2TP} = 6.10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Le produit de la réaction a été caractérisé par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes et présente une masse de +109 Da par rapport à la masse moléculaire de l'enzyme Orp1 réduite, correspondant au produit attendu de la réaction, Orp1—S—S—2TP (Figure 51, p.89).

$$DO_{343} = A * e^{-k_{obs}t} + B * t + C$$

Équation 16

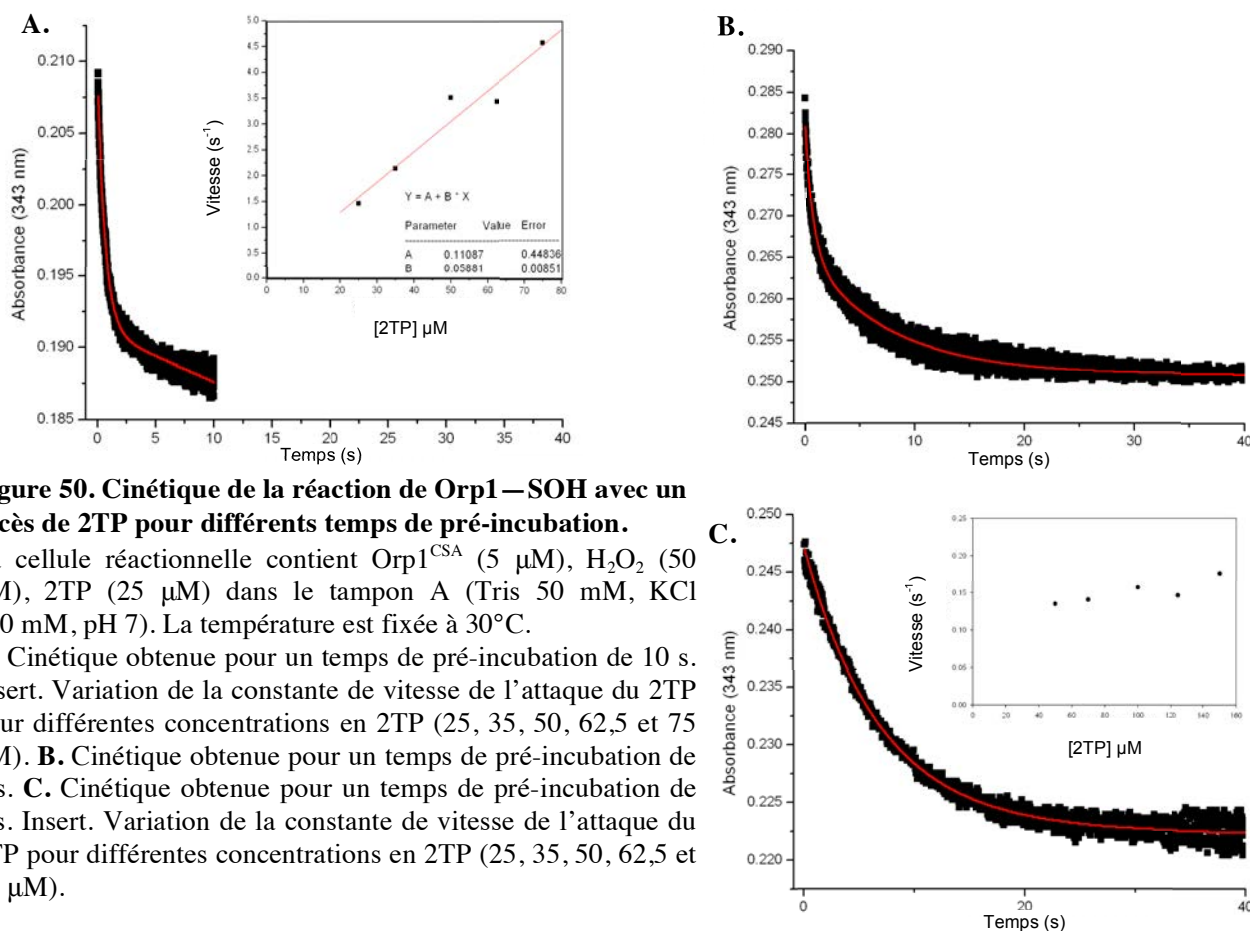


Figure 50. Cinétique de la réaction de Orp1—SOH avec un excès de 2TP pour différents temps de pré-incubation.

La cellule réactionnelle contient Orp1^{CSA} (5 μM), H₂O₂ (50 μM), 2TP (25 μM) dans le tampon A (Tris 50 mM, KCl 150 mM, pH 7). La température est fixée à 30°C.

A. Cinétique obtenue pour un temps de pré-incubation de 10 s. Insert. Variation de la constante de vitesse de l'attaque du 2TP pour différentes concentrations en 2TP (25, 35, 50, 62,5 et 75 μM). **B.** Cinétique obtenue pour un temps de pré-incubation de 5 s. **C.** Cinétique obtenue pour un temps de pré-incubation de 1 s. Insert. Variation de la constante de vitesse de l'attaque du 2TP pour différentes concentrations en 2TP (25, 35, 50, 62,5 et 75 μM).

En revanche, pour un temps de pré-incubation de 1 s, on observe une cinétique décrite par une phase exponentielle décroissante (Équation 16) correspondant à une réaction indépendante de la concentration en 2TP avec une constante de vitesse de 0,2 s⁻¹ (Figure 50 C). Enfin, pour un temps de pré-incubation de 5 s, on observe la contribution de deux phases exponentielles décroissantes (Figure 50 B) (Équation 17, p.89). La phase rapide est caractérisée par une constante de vitesse de 1,6 s⁻¹ correspondant à l'attaque du 2TP sur l'espèce oxydée de Orp1 formée au cours des 5 s de pré-incubation ($k = k_{2TP} * [2TP] =$

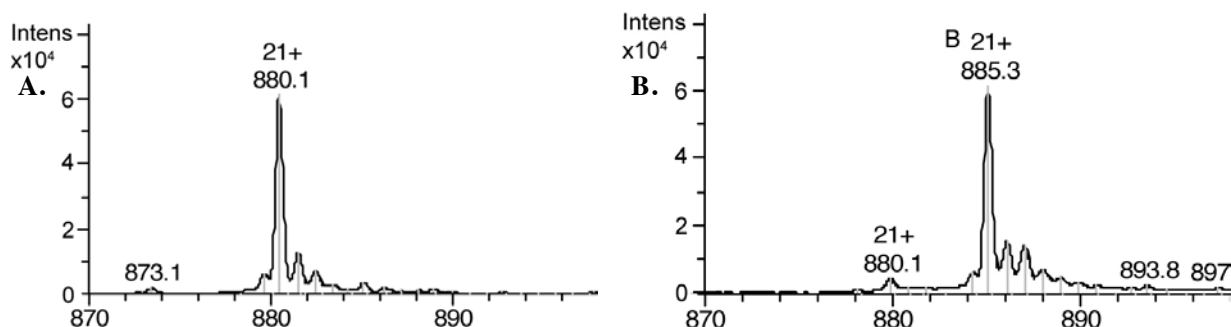


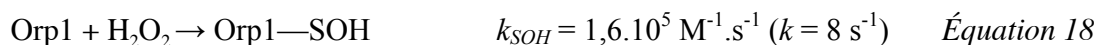
Figure 51. État de charge $[M+21H]^{21+}$ de la protéine Orp1^{CSA} avant et après modification par le 2TP.

La masse moléculaire de Orp1 modifiée par le 2TP a été obtenue par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes. Pour cela, la protéine Orp1 réduite a été dessalée sur une colonne Econo-Pac® 10 DG (Bio-Rad) dans le tampon F. Avant l'analyse par spectrométrie de masse, dans un premier temps, la protéine Orp1^{CSA} (10 μ M) a été incubée 10 s avec H₂O₂ (50 μ M) (concentrations finales), dans un second temps le 2TP (50 μ M) a été rajouté à la réaction et laissé incubé 20 s. Le mélange a ensuite été dilué dans un solvant acétonitrile/H₂O/acide formique 50/49/1 et analysé à l'aide d'un spectromètre de masse à ionisation électrospray (MicrOTOF-Q Bruker Daltonics).

Spectres de masse non déconvolués de la protéine Orp1^{CSA} réduite (A) et du produit de la réaction entre Orp1^{CSA} activé par H₂O₂ et le 2TP (B). Les masses moléculaires déterminées par le logiciel Data analysis (Bruker) sont respectivement de $18461,4 \pm 0,7$ et de $18570,4 \pm 0,5$ Da, la différence correspondant à la masse moléculaire d'une molécule de 2TP liée covalamment à Orp1^{CSA} (109 Da).

$6.10^4 * 25.10^{-6} = 1,5 \text{ s}^{-1}$). La phase plus lente, de constante de vitesse $0,2 \text{ s}^{-1}$ est similaire à celle observée pour un temps de pré-incubation plus court. Ces observations suggèrent que l'espèce qui réagit effectivement avec le 2TP se forme durant l'étape de pré-incubation avec une constante de vitesse relativement faible de $0,2 \text{ s}^{-1}$. Cette espèce pourrait être Orp1—SOH. Cependant, d'après la constante de vitesse de formation de l'acide sulfénique déterminée auparavant ($k_{SOH} = 1,6.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, Chapitre III.A.2, p.78) et dans les conditions de l'expérience ($[H_2O_2] = 50 \mu\text{M}$), la formation de l'intermédiaire Orp1—SOH nécessite un temps d'incubation entre H₂O₂ et Orp1^{CSA} inférieur à 1s ($k = 1,6.10^5 * 50.10^{-6} = 8 \text{ s}^{-1}$ donc un temps de demi-réaction de l'ordre de 90 ms). Il apparaît donc que ce n'est pas directement le produit de la réaction de H₂O₂ avec Orp1^{CSA}, Orp1—SOH, qui réagit avec le 2TP mais une autre forme de l'enzyme, notée Orp1*, générée par une réaction qui présente une constante de vitesse de $0,2 \text{ s}^{-1}$ (Équation 18 à 20).

$$DO_{343} = A * e^{-k_1 t} + A * e^{-k_2 t} + B * t + C \quad \text{Équation 17}$$



Afin d'identifier cette espèce, nous avons utilisé la spectrométrie de masse électrospray en conditions natives (ESI-QTOF). Dans le but d'obtenir une résolution temporelle compatible avec notre système enzymatique, nous avons utilisé un montage dynamique nous permettant d'observer les produits de la réaction entre Orp1^{CSA} et H₂O₂ pour des temps de réaction de l'ordre de la seconde (Figure 52).

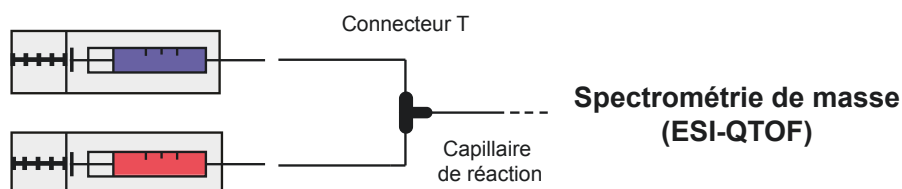


Figure 52. Schéma du montage dynamique résolu en temps couplé à la spectrométrie de masse en conditions natives.

Deux seringues sont poussées simultanément par un double pousse seringue réglé à un débit noté D. Les seringues sont reliées à un capillaire de réaction par un connecteur T monté sur le spectromètre de masse par l'intermédiaire d'un capillaire de réaction présentant un volume noté V. Le temps de réaction (t) est contrôlé par D selon l'équation $t = V/D$.

On observe dès 4 s de temps de réaction une espèce minoritaire à +16 Da par rapport à la masse moléculaire de la forme réduite de Orp1^{CSA} ainsi qu'une espèce majoritaire à -2 Da par rapport à la masse moléculaire de la forme réduite de Orp1^{CSA} (Figure 53, p.91). De plus, l'espèce à +16 Da disparaît au cours du temps au profit de l'espèce à -2 Da comme le montre l'évolution des proportions relatives de chaque espèce Orp1 (Figure 53, p.91, insert). L'espèce à +16 Da pourrait être attribuée dans cette gamme de temps, en considérant la concentration de H₂O₂ et la constante de vitesse k_{SOH} , à la formation de Orp1-SOH. L'espèce à -2 Da correspondrait à une espèce dérivant de Orp1-SOH et un événement plausible serait la formation d'un cycle sulfénylamide au sein de l'enzyme par la cyclisation intramoléculaire de l'azote de la fonction amide de la chaîne principale du résidu 37 sur le soufre de l'acide sulfénique porté par la C_p (Cys36), rendu possible en l'absence de la C_R de l'enzyme (Figure 54, p.91 et Chapitre II.A.1.d, p.24). Cette réaction, favorisée en conditions acides (Chapitre III.C.2.b.i, p.93) pourrait être activée à pH neutre dans le site actif de Orp1.

Ainsi, même si la structure de l'espèce Orp1* capable de réagir avec le 2TP n'a pas été formellement établie, il est clair que ce n'est pas Orp1-SOH qui réagit directement avec le 2TP bien que le 2TP soit une sonde réactive avec les acides sulféniques. Par ailleurs, nous avons déterminé lors d'études préliminaires que la constante de vitesse de la réaction du 2TP avec un acide sulfénique porté par un mutant de la Méthionine sulfoxyde réductase A de *E. coli* où seule la Cys catalytique est présente et le 2TP est de $170 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, soit 350 fois plus faible que celle que nous avons déterminé avec Orp1*. Ainsi, si l'on considère que cette

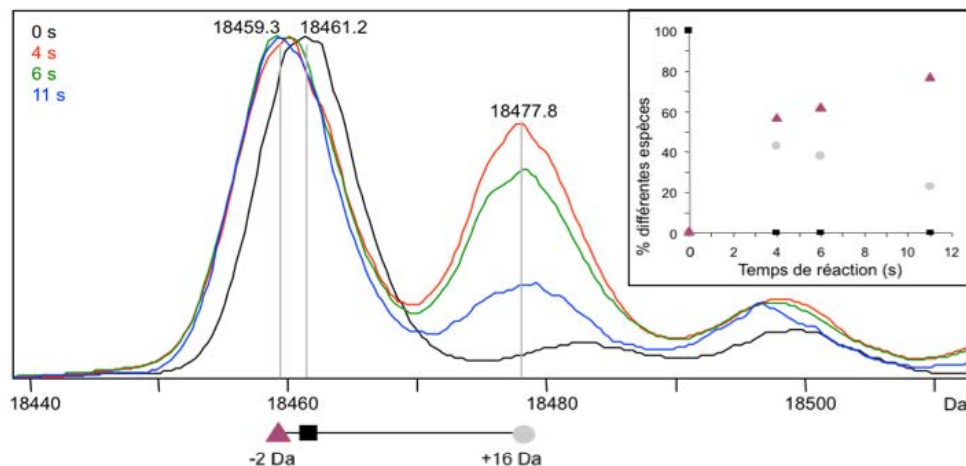


Figure 53. Évolution des produits de la réaction entre Orp1^{CSA} et H₂O₂ observée par spectrométrie de masse en conditions natives.

Spectres de masse déconvolués de la forme Orp1^{CSA} réduite (0 s) et après 4, 6 et 11 s de réaction avec H₂O₂ enregistrés sur un spectromètre de masse de type électrospray (MicroTOF-Q Bruker Daltonics). Les spectres sont normalisés par rapport au pic majoritaire. Insert. Proportion relative des espèces formées par la réaction entre Orp1^{CSA} et H₂O₂ au cours du temps. Les carrés noirs correspondent à une espèce de masse moléculaire 18461,2 ± 0,9 Da soit à l'espèce Orp1^{CSA} réduite (masse moléculaire théorique de 18642,1 Da), les triangles violets et les ronds gris correspondent respectivement à des espèces présentant des masses moléculaires de 18459,3 ± 0,9 et 18477,8 ± 0,5 Da soit de -2 et +16 Da par rapport à la forme réduite de Orp1^{CSA}. Les masses moléculaires expérimentales ont été déterminées par le logiciel Data analysis (Bruker). La réaction est réalisée dans le tampon F (acétate d'ammonium 50 mM ; pH 6,8). Les concentrations finales sont pour Orp1^{CSA} de 10 μM et de 20 μM pour H₂O₂.

constante de vitesse s'applique dans le cas de Orp1, selon nos conditions expérimentales, la constante de vitesse de la réaction entre le 2TP et Orp1—SOH serait de l'ordre de 4,25.10⁻³ s⁻¹ (170 * [2TP] = 170 * 25.10⁻⁶ = 4,25.10⁻³ s⁻¹) soit inférieure d'un facteur 50 par rapport à la constante de vitesse de formation du cycle sulfénylamide (k = 0,2 s⁻¹). Une hypothèse pourrait donc être que la réaction entre le 2TP et Orp1—SOH ne peut rentrer en compétition avec la formation du cycle sulfénylamide.

Compte-tenu de ces incertitudes, la méthode par compétition avec le 2TP, a été abandonnée et une seconde stratégie fondée sur la quantification directe du produit Yap1—S—S—Orp1 a été mise au point.

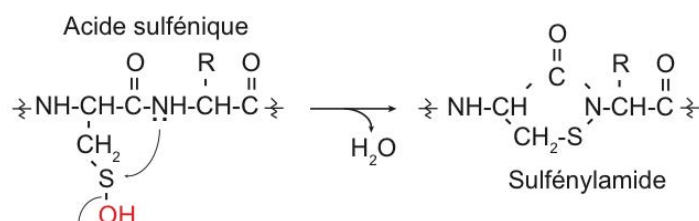


Figure 54. Formation d'un cycle sulfénylamide.

Le cycle sulfénylamide est généré par l'attaque de l'atome d'azote du groupement amide de la chaîne principale du résidu N+1 sur l'atome de soufre oxydé sous forme acide sulfénique. Cette réaction pourrait être favorisée en condition acide, l'excès de proton facilitant le départ du groupement hydroxyle de l'acide sulfénique sous forme d'eau.

2. Analyse cinétique par la méthode de « quenched flow »

Afin de quantifier directement le produit Yap1—S—S—Orp1, nous avons envisagé de suivre la cinétique de la réaction entre Orp1 et Yap1 par une approche de cinétique rapide de type « quenched flow » couplée à la chromatographie HPLC en phase inverse.

a. Stratégie expérimentale

Les cinétiques réactionnelles étant rapides (temps de réaction inférieurs à 1 min : Figure 47 F et I, p.85), un appareil de mélange rapide résolu en temps de type « quenched flow » a été utilisé (quenched flow RQF3, KinTek Corporation, Austin). En effet, cet appareil présente un temps mort de 2,5 ms compatible avec l'étude de réactions caractérisées par des constantes de vitesse maximales de 280 s^{-1} . Ce dernier nous a permis de mélanger rapidement une solution contenant les protéines Orp1 sauvage ou Orp1^{CSA} et Yap1^{SSSCSS}, en absence et en présence de Ybp1, avec H₂O₂, de laisser la réaction évoluer pendant un temps donné (allant de la ms à la min) puis de bloquer cette dernière par acidification (acide trifluoroacétique (TFA)) (Figure 55). Cet appareil a également permis de minimiser la quantité de matériel biologique

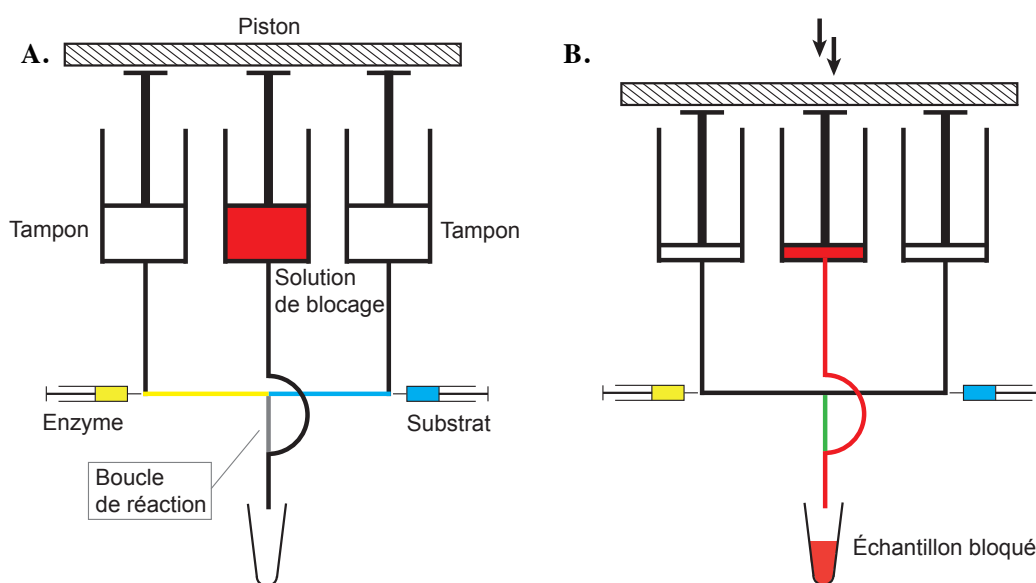


Figure 55. Représentation schématique d'un appareil de cinétique rapide de type « quenched flow » à trois seringues.

Pour un temps de réaction défini, le piston se déplace à deux reprises. Le premier mouvement du piston provoque le déplacement des solutions d'enzyme et de substrat par la solution tampon et leur mélange dans la boucle de réaction. À la fin du temps défini, le deuxième mouvement du piston provoque le déplacement du contenu de la boucle de réaction (toujours par la solution tampon) et le mélange avec la solution de blocage acide. L'échantillon acidifié est récupéré à l'issue de ce deuxième mouvement du piston. Pour une vue plus détaillée voir Figure 69, p.138.

Schéma de l'appareil avant (A) et après réaction (B).

consommé. En effet, celui-ci dispose de boucles échantillons de seulement 15 μL (représentées en jaune et en bleu Figure 55 A, p.92), ce qui signifie qu'une cinétique réactionnelle de 10 points a pu être réalisée avec un volume minimal de 150 μL de solution protéique. La quantification du produit de la réaction a été réalisée dans un deuxième temps par chromatographie HPLC en phase inverse sur une colonne de type C8. La nature des pics a été déterminée par spectrométrie de masse à ionisation électrospray. La quantité relative de l'espèce Yap1—S—S—Orp1 a été suivie au cours du temps par intégration du pic chromatographique correspondant.

L'objectif étant également d'étudier le rôle de Ybp1, il était nécessaire de pouvoir comparer les résultats obtenus en présence et en absence de cette protéine. Nous avons donc utilisé le mutant Orp1^{CSA} porteur de la mutation Cys82Ala, qui permet d'observer la formation de Yap1—S—S—Orp1 en absence et en présence de Ybp1 (Figure 47 G, H et I, p.85). Le mutant Yap1^{SSS CSS} a été utilisé dans le but d'accumuler des quantités mesurables de Yap1—S—S—Orp1 grâce à la mutation C303S et d'éviter toute réaction non désirée avec les Cys 310, 315, 620 et 629 (Figure 47 C, F et I, p.85). Les concentrations ont été fixées respectivement à 10, 10, 50 et 100 μM pour les protéines Yap1^{SSS CSS}, Ybp1 et Orp1^{CSA} et pour H₂O₂ (concentrations finales après mélange). Ces concentrations ont été choisies afin de travailler en présence de quantité équimolaire des protéines Yap1^{SSS CSS} et Ybp1, et d'un excès de protéine Orp1^{CSA} afin de favoriser la formation du complexe ternaire Yap1·Ybp1·Orp1.

b. Étude de la cinétique de la réaction entre Orp1 et Yap1

i. Résultats obtenus avec le mutant Orp1^{CSA}

Dans un premier temps, les résultats obtenus avec le mutant Orp1^{CSA} en présence et en absence de Ybp1 sont considérés. Le profil d'élution chromatographique du mélange réactionnel avant addition de H₂O₂ (temps 0 s, Figure 56 A, p.94) comprend deux pics, correspondant aux protéines Yap1^{SSS CSS} (pic 1) et Orp1^{CSA} (pic 4) sous forme réduite. Suite à l'addition de H₂O₂ (temps 0,1 à 10 s, Figure 56 A, p.94), on peut observer que les pics 1 et 4 diminuent en amplitude au cours du temps au profit de trois nouvelles espèces (pics 2, 3 et 5). Ces espèces ont été caractérisées par spectrométrie de masse et présentent des masses compatibles avec une forme oxydée de Orp1^{CSA} sous forme sulfénylamide (pic 3) (notée Orp1^{CSA}—SNH), une forme dimérique de Orp1^{CSA} liée par un pont disulfure (pic 5) (notée Orp1^{CSA}—S—S—Orp1^{CSA}) et le produit attendu de la réaction à savoir l'espèce Yap1—S—S—Orp1 (pic 2) (Tableau 5, p.95).

Résultats

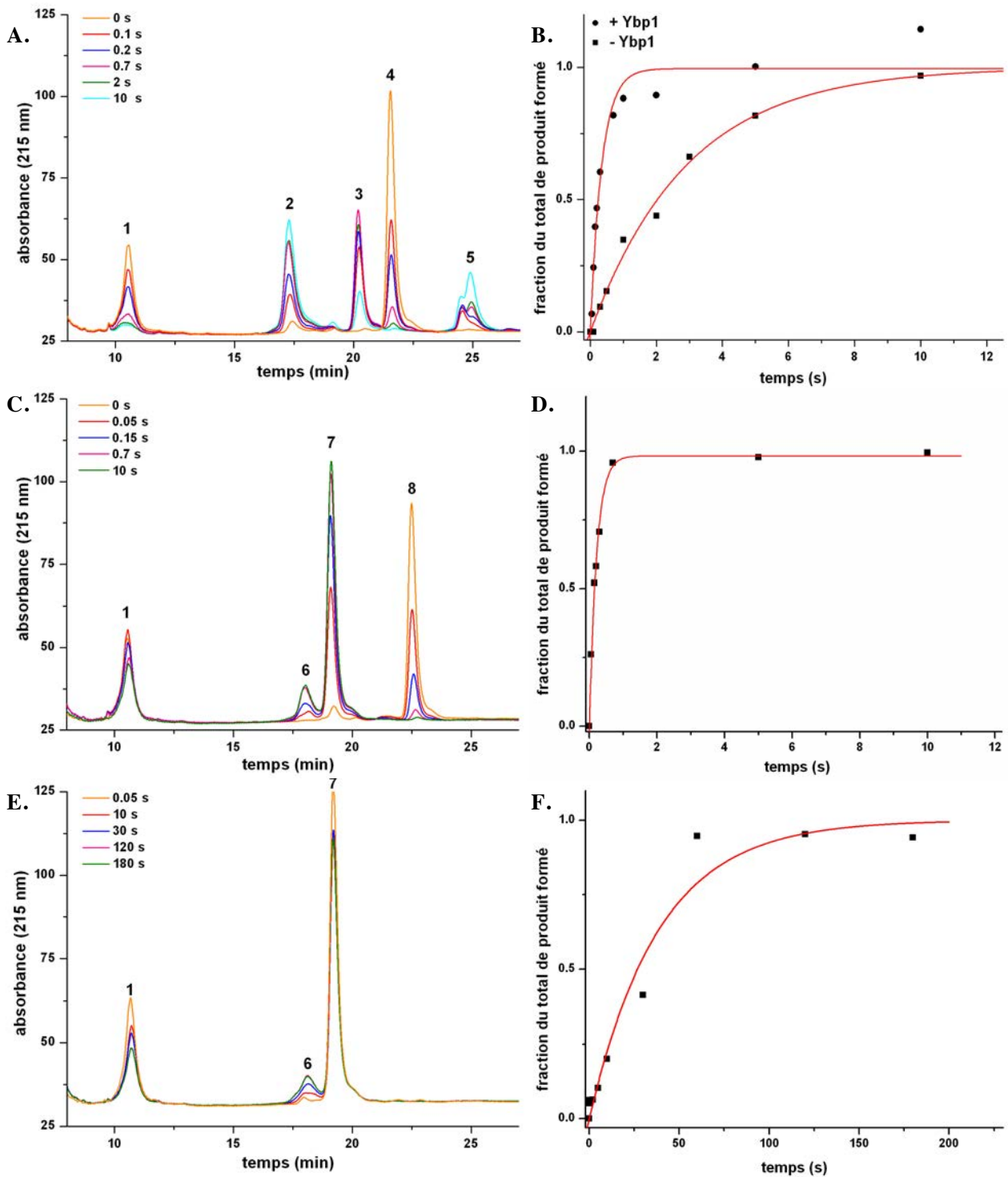


Figure 56. Cinétiques de la réaction entre Orp1 et Yap1^{SSS}CS^S.

A, C et E. Profils d'éluion de mélanges réactionnels obtenus respectivement en présence du mutant Orp1^{CSA}, Orp1 sauvage ou Orp1^{SS}. Les concentrations ont été fixées respectivement à 10, 10, 50 et 100 μ M pour les protéines Yap1^{SSS}CS^S, Ybp1 et Orp1 et pour H₂O₂ (concentrations finales). Les échantillons préparés au « quenched flow », dans le tampon D à une température de 25°C, et bloqués par une solution de TFA 1% ont été injectés sur une colonne de chromatographie en phase inverse de type C8 préalablement équilibrée en H₂O 0,1% TFA. Les différents espèces du mélange sont séparées par un gradient linéaire d'acétonitrile 0,1% de TFA à une température de 30°C. Les différents temps de réaction sont indiqués. Les masses et la nature de chaque pic sont renseignées au niveau du Tableau 5, p.96. B, D et F. La quantité de produit Yap1–S–S–Orp1 déterminée par intégration du pic correspondant (pic 2 pour B et pic 6 pour D et F) est représentée en fonction du temps. Les données expérimentales sont représentées en noir. L'ajustement des données expérimentales à une équation mono-exponentielle croissante est représenté en rouge.

Tableau 5. Masses observées et théoriques des espèces séparées par chromatographie en phase inverse.

| Pic | Masse observée (Da) | Espèces | Masse théorique (Da) |
|-----|---------------------|--|----------------------|
| 1 | 74507,0 ± 10,6 | Yap1 ^{SSS CSS} | 74498,6 |
| 2 | 92961,1 ± 12,9 | Yap1 ^{SSS CSS} —S—S—Orp1 ^{CSA} | 92958,7 |
| 3 | 18460,0 ± 0,5 | Orp1 ^{CSA} —SNH | 18460,1 |
| 4 | 18461,8 ± 0,4 | Orp1 ^{CSA} | 18462,1 |
| 5 | 36922,2 ± 0,5 | Orp1 ^{CSA} —S—S—Orp1 ^{CSA} | 36922,2 |
| 6 | 93008,6 ± 8,0 | Yap1 ^{SSS CSS} —S—S—Orp1 | 93006,9 |
| 7 | 18508,1 ± 0,4 | Orp1 _{SS} | 18508,2 |
| 8 | 18510,0 ± 0,3 | Orp1 | 18510,2 |
| 9 | 74486,9 ± 2,6 | Yap1 ^{SSS SSS} | 74482,6 |

La formation d'un cycle sulfénylamide au niveau de la protéine Orp1^{CSA} peut être expliquée, dans les conditions de blocage acide imposées par l'expérience (Chapitre III.C.1.b, p.86). Le dimère de Orp1 résulterait vraisemblablement de la condensation sous forme disulfure des espèces Orp1 oxydée sous forme sulfénylamide et/ou acide sulfénique avec la forme Orp1^{CSA} réduite. Ybp1 étant éluée à des concentrations plus élevées d'acétonitrile, cette protéine n'apparaît sur aucun chromatogramme.

L'évolution de l'aire du pic 2, correspondant au produit de la réaction (Yap1—S—S—Orp1), en fonction du temps, indique que la présence de la protéine Ybp1 augmente significativement la vitesse de formation du produit Yap1—S—S—Orp1 (Figure 56 B, p.94). En l'absence de la protéine Ybp1, Orp1^{CSA} et Yap1^{SSS CSS} n'interagissent pas (Chapitre II.B, p.71). La réaction entre les deux est donc bimoléculaire et doit obéir à une cinétique de deuxième ordre (Figure 57 A, p.96). Dans les conditions de l'expérience, la protéine Orp1^{CSA} (50 µM) est présente en excès par rapport à Yap1^{SSS CSS} (10 µM), la réaction doit alors obéir à une cinétique de pseudo-premier ordre dont la constante de vitesse dépend de la concentration de Orp1^{CSA}. Les données expérimentales ont effectivement pu être ajustées à une équation de premier ordre (Équation 21, p.96, avec A correspondant à l'amplitude du signal et k_{obs} à la constante de vitesse de la phase exponentielle), caractérisée par une constante de vitesse de pseudo-premier ordre de 0,3 s⁻¹ (Figure 56 B, p.95). La constante de vitesse de deuxième ordre de la réaction peut être déduite par division avec la concentration de Orp1^{CSA}. On obtient alors une constante de vitesse pour la réaction entre Orp1—SOH et la Cys598 de Yap1 (notée k_{Yap1}) de 6.10³ M⁻¹.s⁻¹ en absence de Ybp1.

$$y = A*(1-e^{-k_{obs}*t}) \quad \text{Équation 21}$$

Résultats

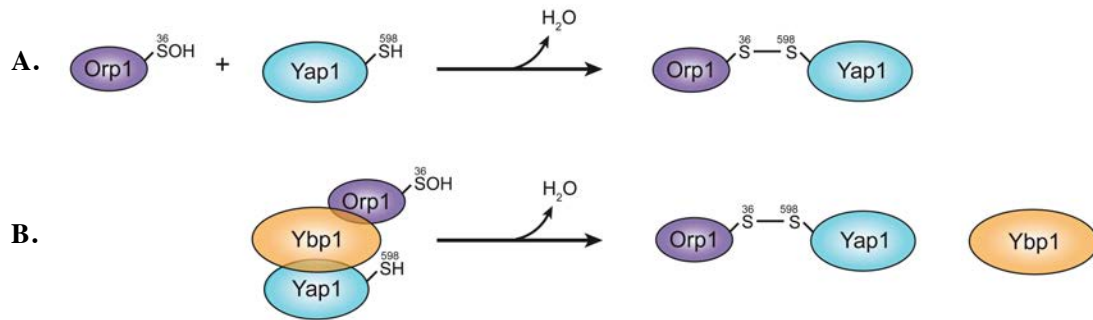


Figure 57. Schéma représentant l'influence de Ybp1 sur l'ordre des réactions étudiées.

A. La réaction entre Orp1 et Yap1 est bimoléculaire et doit donc obéir à une cinétique de deuxième ordre exprimée en $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, **B.** La réaction entre Orp1 et Yap1 est monomoléculaire et doit donc obéir à une cinétique de premier ordre exprimée en s^{-1} .

En présence de la protéine Ybp1, les protéines Orp1^{CSA} et Yap1^{SSS CSS} sont associées au sein d'un complexe ternaire (Chapitre II.B, p.71). D'après les constantes de dissociation déterminées au niveau du Chapitre II.B (p.71), 80% des protéines Yap1 et Ybp1 sont complexées dans les conditions expérimentales utilisées. Si l'on considère que l'équilibre de l'interaction entre le complexe Yap1^{SSS CSS}·Ybp1 et Orp1^{CSA} est rapide, la cinétique réactionnelle représente alors la réaction entre Orp1^{CSA}—SOH et la Cys598 de Yap1 au sein du complexe ternaire Yap1·Ybp1·Orp1 et les données expérimentales peuvent être analysées selon une cinétique de premier ordre (Figure 57 B). Les données expérimentales ont effectivement pu être ajustées à une équation monoexponentielle croissante, caractérisée par une constante de vitesse de $2,6 \text{ s}^{-1}$ (Figure 56 B, p.95). La constante de dissociation K_D de l'interaction entre Orp1 et le complexe Yap1·Ybp1 étant de $0,7 \mu\text{M}$ (Chapitre II.B, p.71), le calcul de la constante de vitesse de second ordre de cette réaction donne une valeur k_{Yap1} de $3,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en présence de Ybp1 ($k_{Yap1} = 2,6 / K_D = 2,6 / 0,7 \cdot 10^{-6} = 3,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

L'interprétation de nos résultats par la comparaison des constantes de vitesse de second ordre k_{Yap1} permet de montrer qu'au sein du complexe ternaire Yap1·Ybp1·Orp1, la réaction entre Orp1—SOH et Yap1^{SSS CSS} est activée de plus de 600 fois par rapport à la réaction bimoléculaire. En d'autres termes, sans ce mécanisme d'activation, la constante de vitesse de premier ordre mesurée en présence de Ybp1 aurait été de $6 \cdot 10^3 * 0,7 \cdot 10^{-6}$, soit de l'ordre de $4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, très inférieure à celle de $2,6 \text{ s}^{-1}$ que nous avons mesurée. Seules les conditions expérimentales utilisées en l'absence de Ybp1, avec une concentration très élevée de Orp1 de $50 \mu\text{M}$, ont permis d'atteindre une constante de vitesse de $0,3 \text{ s}^{-1}$.

ii. Résultats obtenus avec la forme sauvage de Orp1

Nous avons ensuite réalisé la même expérience avec la forme sauvage de Orp1. La présence de Ybp1 était obligatoire dans ces conditions pour pouvoir observer le produit

Yap1—S—S—Orp1 (Figure 47 A, B et C, p.85). Le profil d'éluion chromatographique obtenu pour le mélange réactionnel avant addition de H₂O₂ (temps 0 s, Figure 56 C, p.95) comprend deux pics, correspondant aux protéines Yap1^{SSS^{CS}} (pic 1) et Orp1 sauvage réduite (pic 8) (Tableau 5, p.96). Après addition de H₂O₂ (temps 0,05 à 10 s, Figure 56 C, p.95), on peut observer que les pics 1 et 8 diminuent en amplitude au cours du temps au profit de deux nouvelles espèces (pics 6 et 7). Ces espèces présentent des masses compatibles respectivement avec la forme oxydée de Orp1 disulfure (Orp1_{SS}) (pic 7) et le produit Yap1—S—S—Orp1 (pic 6) (Tableau 5, p.96). La cinétique d'évolution de l'aire du pic 6 a été interprétée de la même manière que pour le mutant Orp1^{CSA} en présence de Ybp1 (Figure 56 D, p.95). On obtient alors une constante de vitesse de premier ordre de 4,6 s⁻¹, soit une constante de vitesse de deuxième ordre k_{Yap1} de $6,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($k_{Yap1} = 4,6 / K_D = 4,6 / 0,7 \cdot 10^{-6} = 6,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), comparable à celle obtenue en présence du mutant Orp1^{CSA} en présence de Ybp1 ($3,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Afin de démontrer que la réaction entre Orp1—SOH et la Cys598 de Yap1 a lieu effectivement au sein du complexe ternaire Yap1·Ybp1·Orp1, nous avons suivi la cinétique de formation du produit Yap1—S—S—Orp1 à des concentrations variables de Orp1 sauvage, proche de la saturation (de 10 à 80 μM). Dans ces conditions, si le mécanisme de la réaction met effectivement en jeu un complexe, sa cinétique devrait dépendre de la concentration de Orp1 à saturation. De fait, la constante de vitesse de premier ordre observée ne varie pas significativement en fonction de la concentration de Orp1 sauvage et reste proche de 4,6 s⁻¹ (Figure 58). Ce résultat confirme que la réaction a bien lieu au niveau du complexe ternaire Yap1·Ybp1·Orp1.

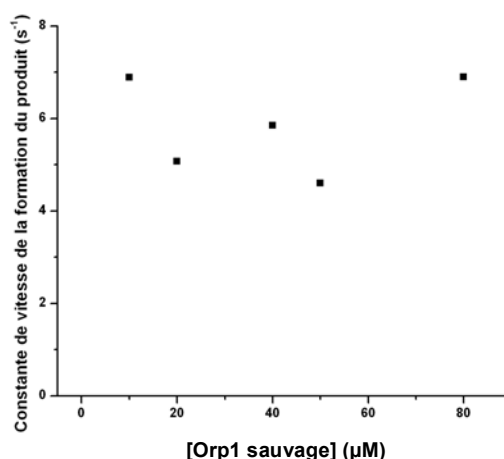


Figure 58. Évolution de la constante de vitesse observée de la réaction entre Orp1 et Yap1 en fonction de la concentration de Orp1 sauvage.

La constante de vitesse de premier ordre de formation du produit Yap1—S—S—Orp1 a été déterminée pour différentes concentrations de Orp1 sauvage (les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 56, p.95).

iii. Résultats obtenus avec la forme sauvage de Orp1 oxydée sous forme pont disulfure

Étant donné les conditions expérimentales utilisées (Orp1 en excès à 50 μM), une grande quantité d'espèce Orp1_{SS} est formée après addition de H₂O₂ pour la protéine Orp1 sauvage (Figure 56 C, p.95, pic 7). Nous avons donc évalué si cette forme d'oxydation pouvait réagir de manière significative avec la protéine Yap1^{SSS CSS} pour former l'espèce Yap1—S—S—Orp1 par simple échange de pont disulfure. La réaction est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, par mélange rapide de Orp1_{SS} avec le complexe Yap1^{SSS CSS}.Ybp1. Le profil d'élution du mélange réactionnel comprend trois pics, correspondant aux protéines Yap1^{SSS CSS} (pic 1), Orp1_{SS} (pic7) et au produit de la réaction Yap1—S—S—Orp1 (pic 6) (Figure 56 E, p.95 et Tableau 5, p.96).

Les données expérimentales sont traitées de la même manière que pour le mutant Orp1^{CSA} en absence de Ybp1, étant donné que nous avons démontré que la forme Orp1_{SS} n'interagissait pas avec le complexe Yap1.Ybp1 (Chapitre II.B, p.71) (Figure 56 F, p.95). On obtient alors une constante de vitesse de pseudo-premier ordre de 0,03 s⁻¹, correspondant à une constante de vitesse de deuxième ordre de 600 M⁻¹.s⁻¹ ($k_{Yap1} = 0,03/[\text{Orp1}_{SS}] = 0,03 \cdot 50 \cdot 10^{-6} = 600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Cette constante de vitesse est inférieure de quatre ordres de grandeur par rapport à celle mesurée en présence de la forme réduite de Orp1 sauvage dans les mêmes conditions ($k_{Yap1} = 6,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Cette réaction est donc négligeable par rapport à celle engageant Orp1—SOH, démontrant que Orp1_{SS} n'est pas un intermédiaire dans la voie d'activation de Yap1 par H₂O₂. Cette conclusion est en parfait accord avec les expériences réalisées *in vivo*, montrant que la mutation C82S n'affecte pas l'activation de Yap1 dans des cellules de *S. cerevisiae* (310).

iv. Conclusion sur les constantes de vitesse k_{SS} et k_{Yap1}

On peut observer par simple comparaison des chromatogrammes A, C et E (Figure 56, p.95), que la quantité de l'espèce Yap1—S—S—Orp1 formée en utilisant le mutant Orp1^{CSA} est nettement supérieure à celle observée en utilisant la forme sauvage de Orp1. Cette différence reflète la compétition qui s'établit entre les deux voies réactionnelles de Orp1—SOH, conduisant soit à Orp1_{SS} (constante de vitesse k_{SS}), soit à Yap1—S—S—Orp1 (constante de vitesse k_{Yap1}). Néanmoins, k_{SS} (507 s⁻¹) est supérieure de plus de 2 ordres de grandeur par rapport à la constante de vitesse de premier ordre de la réaction entre Orp1—SOH et Yap1 (4,6 s⁻¹). Une telle compétition prédit que l'espèce Yap1—S—S—Orp1 ne devrait pas se former en quantité observable par rapport à Orp1_{SS}, ce qui n'est pas le cas.

Pour expliquer ce paradoxe, une hypothèse serait que l'étape de formation du pont disulfure intramoléculaire de Orp1 caractérisée par la constante de vitesse k_{SS} pourrait être affectée par la formation du complexe binaire avec Ybp1 ou du complexe ternaire avec Yap1·Ybp1. Cette hypothèse sera testée dans le prochain chapitre.

Chapitre IV. Caractérisation de la régulation du cycle peroxydase de Orp1 par Ybp1 et le complexe Yap1·Ybp1

A. Influence de la protéine Ybp1 et du complexe Yap1·Ybp1 sur l'activité peroxydase de Orp1

1. Stratégie expérimentale

Dans l'hypothèse où soit Ybp1, soit le complexe Yap1·Ybp1 affecterait la formation du pont disulfure intramoléculaire de Orp1, cette étape pourrait devenir l'étape limitante du cycle peroxydase de l'enzyme. Nous avons donc cherché à déterminer l'effet de Ybp1 et du complexe Yap1·Ybp1 sur l'activité peroxydase de Orp1. La protéine Yap1 a également été testée à titre de contrôle. Afin d'éviter la formation de l'espèce Yap1—S—S—Orp1, le mutant Yap1^{SSS SSS} a été utilisé. L'activité peroxydase de l'enzyme Orp1 sauvage a été mesurée à l'état stationnaire (« steady state », condition de cycles catalytiques multiples) en utilisant le système couplé Trx/TR/NADPH. Dans ce système, l'espèce Orp1_{ss} est réduite par la Trx, ce qui permet de suivre la réaction grâce au couplage avec le système TR/NADPH, en suivant la consommation de NADPH par spectrophotométrie à 340 nm.

2. Détermination des conditions optimales du test d'activité de l'enzyme Orp1

Les conditions optimales pour le suivi de l'activité peroxydase de Orp1 sauvage avec le système couplé Trx/TR/NADPH ont été déterminées en mesurant l'évolution de la constante de vitesse observée pour la réaction catalysée par Orp1 en fonction des concentrations en TR et en Trx (Figure 59, p.101). La concentration optimale de TR, au delà de laquelle la vitesse mesurée ne varie plus, est de 0,5 μM . Dans ces conditions, la valeur de K_M apparente déterminée pour la Trx est de $6,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$ selon l'équation de Michaelis-Menten (Équation 22, p.101, avec k_{max} la constante de vitesse maximale et K_M la constante de Michaelis-Menten) et la valeur maximale de la constante de vitesse de la réaction peroxydase catalysée par Orp1 (k_{max}) est de $9 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$.

$$k_{obs} = (k_{max} * [Trx]) / (K_M + [Trx])$$

Équation 22

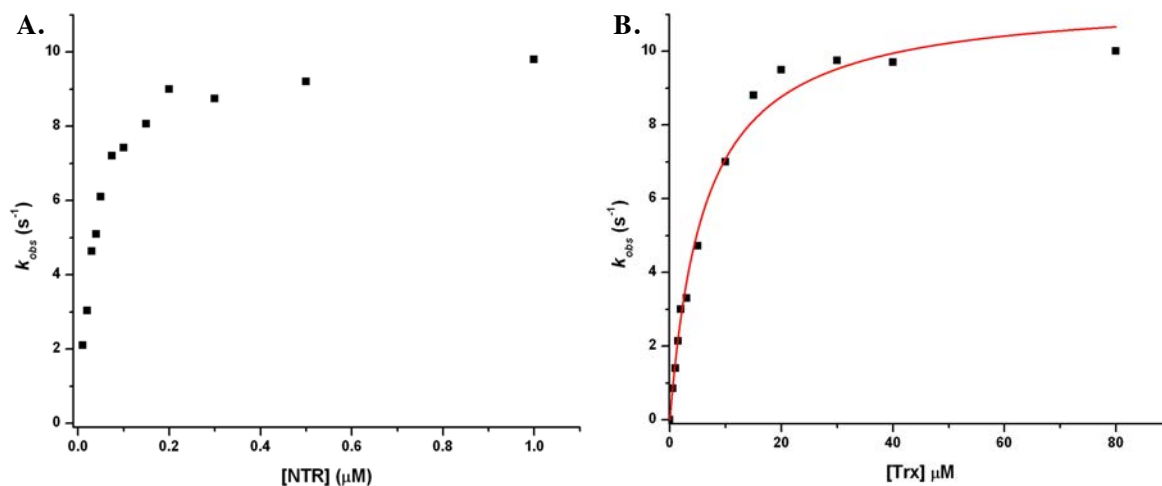


Figure 59. Détermination des conditions optimales du test d'activité de Orp1.

L'activité peroxydase de Orp1 sauvage est mesurée à 25°C dans le tampon D, avec comme réducteur la Trx couplée au système TR/NADPH, en suivant la consommation de NADPH à 340 nm.

A. Les concentrations sont fixes pour H₂O₂ (100 μM), Trx (16 μM), NADPH (240 μM), la concentration en TR variant de 0 à 1 μM. La vitesse maximale atteinte est obtenue pour une concentration de TR de 0,5 μM. **B.** Les concentrations sont fixes pour H₂O₂ (100 μM), la TR (0,5 μM), NADPH (240 μM), la concentration de Trx variant de 0,5 à 100 μM. Selon le modèle de Michaelis-Menten, un K_M apparent de 6,2 ± 0,7 μM pour la Trx et un k_{max} de 9 ± 0,2 s⁻¹ sont obtenus.

3. Mesure de l'activité peroxydase de Orp1 en présence de Yap1 et de Ybp1

L'activité peroxydase de l'enzyme Orp1 sauvage a été suivie en fonction de la concentration des protéines Yap1^{SSSSS} ou Ybp1 seules ou de ces deux protéines ajoutées en stoechiométrie 1:1 (Figure 60 A, p.102). Individuellement, les protéines Yap1^{SSSSS} et Ybp1 n'affectent pas significativement l'activité peroxydase de Orp1. Par contre la présence des deux protéines en stoechiométrie 1:1 diminue de manière significative l'activité peroxydase de Orp1 sauvage jusqu'à inhibition quasi-complète pour une concentration de 10 à 20 μM.

Étant donné que l'espèce Orp1_{SS} n'interagit ni avec Yap1 ni avec Ybp1, le recyclage de Orp1_{SS} par la Trx ne doit pas être affecté. D'autre part, nous avons vérifié que la présence des protéines Yap1 et Ybp1 n'inhibait pas le système couplé Trx/TR/NADPH en mesurant l'activité de deux enzymes dépendantes de la Trx, dans les mêmes conditions, à savoir la 2-Cys Prx Tsa1 de *S. cerevisiae* et la MsrA de *E. coli* (Figure 60 B, p.102).

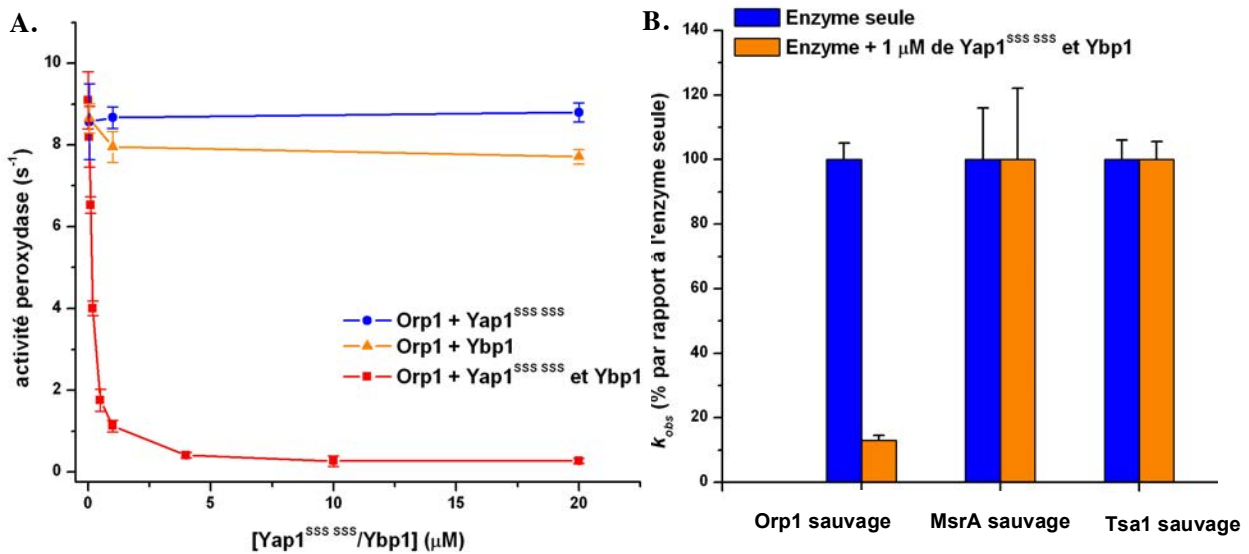


Figure 60. Mesure de l'activité peroxydase de Orp1 en présence de Yap1^{SSSSSS} et Ybp1.

L'activité peroxydase de Orp1 sauvage est mesurée dans le tampon D à 25°C. Le mélange réactionnel contient Orp1 sauvage à 50 nM, H₂O₂ (100 μM), Trx (50 μM), NTR (0,5 μM) et NADPH (250 μM), l'ajout de Orp1 déclenchant la réaction.

A. Mesure de l'activité peroxydase de Orp1 sauvage en présence de concentrations croissantes de la protéine Yap1^{SSSSSS} (50 nM à 20 μM), Ybp1 ou des deux protéines ajoutées en stoechiométrie 1:1. **B.** Contrôles. Représentation des activités relatives des enzymes seules et en présence de 1 μM des protéines Yap1^{SSSSSS} et Ybp1 (1:1).

D'après les K_D déterminées pour les interactions non covalentes entre Orp1, Yap1 et Ybp1 (Figure 40, p.75), et selon les conditions expérimentales utilisées (faible concentration de Orp1, ajout de Yap1 et Ybp1 en stoechiométrie), la proportion de Orp1 sauvage engagée dans le complexe ternaire est supérieure à 70% pour des concentrations de Yap1 et Ybp1 supérieures à 8 μM. L'inhibition de l'activité peroxydase de Orp1 sauvage semble donc corrélée à la formation du complexe ternaire. À partir de ces résultats, on peut postuler que l'interaction de Orp1 avec le complexe Yap1·Ybp1 affecte l'une des deux étapes du cycle peroxydase de Orp1 : soit la formation de l'acide sulfénique (de constante de vitesse k_{SOH}), soit la formation du pont disulfure intramoléculaire (de constante de vitesse k_{SS}).

B. Influence du complexe Yap1·Ybp1 sur les deux étapes du cycle peroxydase de Orp1

1. Stratégie

Afin de caractériser l'influence du complexe Yap1·Ybp1 sur les deux étapes du cycle peroxydase de Orp1, nous avons cherché à déterminer les constantes de vitesse k_{SOH} et k_{SS} , correspondant respectivement aux étapes de formation de l'intermédiaire Orp1—SOH et de

l'espèce Orp1_{SS}, en présence de concentrations croissantes du complexe Yap1·Ybp1. Nous savons que ces constantes de vitesse, déterminées au Chapitre III.A.2 (p.78) pour l'enzyme Orp1 seule, sont très rapides : pour une concentration de 100 μM de H₂O₂, l'étape de formation de l'intermédiaire Orp1—SOH est limitante et présente une constante de vitesse k_{SOH} de 16 s⁻¹ correspondant à un temps de demi-réaction de 44 ms. Nous avons donc utilisé la même méthodologie que celle développée pour déterminer la constante de vitesse de la réaction entre Orp1—SOH et Yap1 (Chapitre III.C.2, p.92). Un appareil de cinétique rapide de type « quenched flow » (quenched flow RQF3, KinTek Corporation, Austin) a été utilisé afin de mélanger rapidement Orp1 avec H₂O₂ en présence de quantité stoechiométrique des protéines Yap1 et Ybp1 (1:1). Les concentrations de Yap1 et Ybp1 sont fixées à 15 μM à minima, concentration à laquelle ces protéines sont à 80% sous forme de complexe Yap1·Ybp1 (Figure 40, p.75). Les concentrations de Orp1 et du substrat H₂O₂ sont fixées respectivement à 15 et 100 μM. Dans ces expériences, on a cherché à quantifier les espèces Orp1—SOH et Orp1_{SS} au cours du temps. Le mutant Yap1^{SSS SSS} est utilisé afin d'éviter la formation de l'espèce Yap1—S—S—Orp1.

Dans le but de tester si le complexe Yap1·Ybp1 affecte la première étape du cycle peroxydase de Orp1, à savoir la formation de l'intermédiaire Orp1—SOH, le mutant Orp1^{CSA} a été utilisé afin de bloquer la réaction à la formation de l'espèce Orp1—SOH. Dans les conditions de blocage acide que nous avons utilisées, l'espèce Orp1—SOH est convertie très rapidement en espèce Orp1^{CSA}—SNH. Par conséquent, la cinétique de formation de cette espèce suivie par chromatographie en phase inverse sur une colonne de type C8, reflète bien celle de l'intermédiaire Orp1—SOH.

De la même façon, le complexe Yap1·Ybp1 pouvait influencer la vitesse de la seconde étape du cycle peroxydase de Orp1, correspondant à la formation du pont disulfure intramoléculaire. Pour tester cette hypothèse, la forme sauvage de l'enzyme a été utilisée et dans ce cas, la formation de l'espèce Orp1_{SS} a été suivie au cours du temps par chromatographie en phase inverse sur une colonne de type C8.

2. Influence du complexe Yap1·Ybp1 sur la première étape du cycle peroxydase de Orp1

Les chromatogrammes des mélanges réactionnels obtenus avec Orp1^{CSA} sont similaires à ceux présentés Figure 56 (p.95). Avant addition de H₂O₂ (temps 0, Figure 61 A, p.104), on peut observer un pic majeur correspondant à l'espèce Yap1^{SSS SSS} (pic 9) avec une

Résultats

masse moléculaire théorique de 74482,6 Da et une masse moléculaire expérimentale de $74486,9 \pm 2,6$ (Tableau 5, p.96) et un pic correspondant à l'espèce Orp1^{CSA} réduite (pic 4). Après addition de H₂O₂ (temps 2,5 à 300 ms, Figure 61 A) l'espèce Orp1—SNH apparaît (pic 3). L'évolution de cette espèce au cours du temps, quantifiée par intégration du pic correspondant, en absence et en présence d'une stoechiométrie 1:1 et d'un excès de cinq fois du complexe Yap1^{SSSSS}·Ybp1 est présentée Figure 61 B.

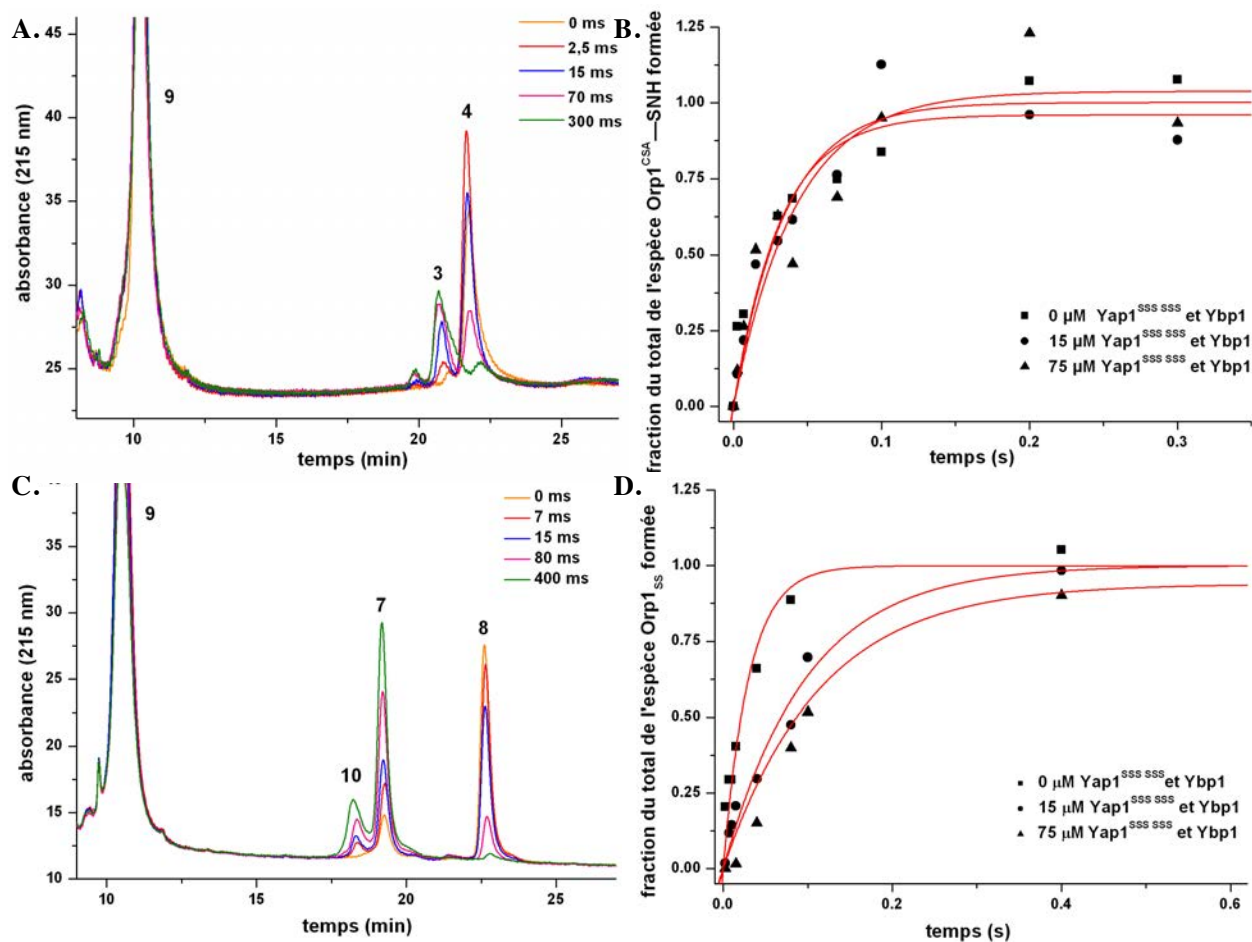


Figure 61. Détermination des constantes de vitesse k_{SOH} et k_{SS} en présence du complexe Yap1^{SSSSS}·Ybp1.

A et C. Profils d'élution de mélanges réactionnels obtenus en présence du mutant Orp1^{CSA} et de la forme sauvage de Orp1. Les concentrations sont fixées respectivement à 15 et 100 μM pour la protéine Orp1 et pour H₂O₂, les concentrations de Yap1^{SSSSS} et Ybp1 étant variables. Les échantillons préparés au « quenched flow », dans le tampon D à une température de 25°C, ont été bloqués par une solution de TFA 1% puis injectés sur une colonne de chromatographie en phase inverse de type C8 préalablement équilibrée à 0,1% TFA. Les différents espèces du mélange sont séparées par un gradient linéaire d'acétonitrile 0,1% de TFA à une température de 30°C. Les différents temps de réaction sont indiqués. Les masses et la nature de chaque pic sont renseignées (Tableau 5, p.96), **B et D.** La quantité des espèces Orp1^{CSA}—SNH ou Orp1_{SS}, déterminée par intégration du pic correspondant, est représentée en fonction du temps. Les données expérimentales sont représentées en noir. L'ajustement des données expérimentales à une équation mono-exponentielle croissante est représenté en rouge.

Dans les conditions de l'expérience, le substrat H_2O_2 (100 μM) est présent en excès par rapport à la protéine Orp1^{CSA} (15 μM), la réaction doit donc obéir à une cinétique de pseudo-premier ordre. Les données expérimentales ont effectivement pu être ajustées à une équation monoexponentielle croissante (Équation 21, p.96) et sont caractérisées respectivement par des constantes de vitesse de premier ordre de $28,9 \pm 7,6 s^{-1}$, $31,7 \pm 7,9 s^{-1}$ et $24 \pm 5,6 s^{-1}$ en absence et en présence d'une stoechiométrie 1:1 et d'un excès de cinq fois en complexe. Ces valeurs, compte-tenu des marges d'erreurs expérimentales, sont proches de la constante de vitesse de formation de Orp1—SOH déterminées pour l'enzyme seule qui est dans ces conditions de $16 s^{-1}$.

Aux concentrations de 15 μM de Orp1 et 75 μM de Yap1 et Ybp1, les valeurs des constantes de dissociation déterminées au Chapitre II.B (p.71) indiquent que la quasi-totalité de la protéine Orp1 est associée au complexe Yap1·Ybp1. On peut donc conclure de ces résultats que le complexe Yap1·Ybp1 n'affecte pas la cinétique de la première étape du cycle peroxydase de Orp1 correspondant à la formation de l'intermédiaire Orp1—SOH. Ainsi, c'est la seconde étape du cycle peroxydase de Orp1 qui doit être affectée par le complexe Yap1·Ybp1.

3. Influence du complexe Yap1·Ybp1 sur la deuxième étape du cycle peroxydase de Orp1

Nous avons suivi dans un deuxième temps la formation de l'espèce Orp1_{SS} en utilisant la même approche. Les chromatogrammes des mélanges réactionnels obtenus avec Orp1 sauvage par chromatographie en phase inverse sont présentés Figure 61 C (p.104). Le chromatogramme comprend quatre pics dont les masses correspondent à Yap1^{SSSS} (pic 9) (Tableau 5, p.96), Orp1 sous forme réduite et Orp1_{SS} (respectivement pics 8 et 7) et à un pic minoritaire dont la nature n'a pas pu être établie (pic 10). L'évolution de l'espèce Orp1_{SS} au cours du temps, quantifiée par intégration du pic correspondant, en absence et en présence d'une stoechiométrie 1:1 et d'un excès de cinq fois du complexe Yap1^{SSSS}·Ybp1 est utilisée pour suivre la cinétique de la seconde étape du cycle peroxydase de Orp1.

Les données expérimentales sont traitées de la même manière que précédemment (Figure 61 D, p.104). Dans les conditions expérimentales utilisées, l'étape de formation de Orp1—SOH ($k_{SOH} = 16 s^{-1}$) est limitante par rapport à celle de Orp1_{SS} ($k_{SS} = 507 s^{-1}$). Par conséquent, la constante de vitesse observée pour la formation de Orp1_{SS} ne peut pas être supérieure à $16 s^{-1}$. En absence du complexe Yap1^{SSSS}·Ybp1, nous avons obtenu une valeur

Résultats

de constante de vitesse de premier ordre de $37,3 \pm 7,7 \text{ s}^{-1}$. Bien que cette valeur soit deux fois supérieure à la valeur attendue de 16 s^{-1} , elle doit correspondre à la constante de vitesse mesurée pour l'étape de formation de l'intermédiaire Orp1_{SOH} . Par contre, en présence de quantité équimolaire ou d'un excès de cinq fois du complexe $\text{Yap1}^{\text{SSSS}} \cdot \text{Ybp1}$, on obtient des constantes cinétiques de premier ordre significativement plus faibles respectivement de $10 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ et de $6 \pm 1,3 \text{ s}^{-1}$.

Comme indiqué précédemment, aux concentrations de $15 \mu\text{M}$ de Orp1 et $75 \mu\text{M}$ de Yap1 et Ybp1, la quasi-totalité de la protéine Orp1 est associée au complexe Yap1·Ybp1. Ces données impliquent donc qu'au niveau du complexe ternaire Yap1·Ybp1·Orp1, la constante de vitesse k_{SS} , correspondant à la formation du pont disulfure intramoléculaire, est affectée, passant de 507 s^{-1} pour la forme libre de Orp1 à $6 \pm 1,3 \text{ s}^{-1}$ pour l'enzyme au niveau du complexe ternaire. Dans ces conditions, cette étape devient limitante par rapport à l'attaque de H_2O_2 ($k_{\text{SOH}} = 16 \text{ s}^{-1}$).

*Discussion
et perspectives*

La signalisation associée à une petite molécule à caractère oxydant et potentiellement toxique telle que H_2O_2 soulève la question de ses mécanismes d'action au niveau moléculaire, qui requièrent un niveau de réactivité et de spécificité suffisants pour être pertinents sur une échelle de temps biologique. Les protéines à Cys tiennent une place prépondérante comme acteurs de ces voies de signalisation, à la faveur de la chimie redox du groupement thiol du résidu Cys, qui peut exister sous de multiples oxoformes, et peut jouer le rôle de « commutateur redox ». Cependant, tous les résidus Cys ne sont pas significativement réactifs avec H_2O_2 , et bien que certaines protéines puissent être oxydées directement, la famille des peroxydases à Cys, a émergé depuis une dizaine d'années, avec la découverte de la fonction de Orp1 dans l'activation du facteur de transcription Yap1, comme détecteur « spécialisé » de peroxydes permettant de relayer le message redox à d'autres cibles cellulaires. Ainsi, ces enzymes traditionnellement considérées comme antioxydantes, joueraient un rôle déterminant dans les mécanismes de la signalisation redox. Dans notre équipe, l'un des thèmes de recherche développés concerne l'étude des mécanismes moléculaires de l'action de H_2O_2 via les peroxydases à thiol, en adoptant la perspective de l'enzymologie et en utilisant en particulier des approches cinétiques.

Ubiquitaires et souvent abondantes, les peroxydases à thiol possèdent une réactivité exacerbée avec les peroxydes qui leur confère une grande sensibilité vis-à-vis de H_2O_2 , avec des constantes de vitesse de second ordre supérieures à $10^5 M^{-1}s^{-1}$ (Tableau 3, p.37). Dans ce travail, nous avons déterminé une constante de vitesse de réaction entre Orp1 et H_2O_2 de $1,6.10^5 M^{-1}.s^{-1}$ qui représente un exemple supplémentaire à l'appui de ce concept. En outre, l'intermédiaire issu de cette réaction, l'espèce Orp1—SOH oxydée sous forme sulfénique sur la Cys C_p , présente elle-même une forte réactivité intrinsèque, en particulier vis-à-vis des thiols. Ce sont les mécanismes permettant de réguler cette réactivité qui déterminent l'orientation de Orp1 vers une fonction antioxydante ou une fonction de relai de signalisation, avec la formation d'un intermédiaire disulfure mixte transitoire entre Yap1 et Orp1. En effet, compte-tenu de la compétition potentielle entre la Cys598 de Yap1, la Cys C_R de Orp1 ou encore les thiols présents dans l'environnement cellulaire, l'activation de Yap1 requiert des mécanismes permettant d'en assurer la spécificité. La possibilité d'une compétition avec H_2O_2 lui-même, conduisant à la suroxydation de Orp1 à l'instar des Prx à 2 Cys typiques, a été écartée par la modélisation des cinétiques d'oxydation de Orp1 obtenues en conditions de cycle catalytique unique. Même à des concentrations très élevées de H_2O_2 , le phénomène de suroxydation de Orp1 s'est révélé non significatif, en raison de la formation très rapide du pont disulfure C_p-C_R au sein de l'intermédiaire Orp1_{SS}.

Dans ce travail, nous avons examiné plusieurs hypothèses permettant d'expliquer la spécificité de l'activation redox de Yap1 par Orp1. Le premier moyen d'assurer cette spécificité serait de favoriser la réaction entre Orp1—SOH et Yap1 par formation d'un complexe protéique permettant d'associer les deux partenaires au sein d'une même entité. Un second moyen serait de diminuer la compétition avec d'autres thiols, et en particulier avec la Cys de recyclage C_R, dont la réaction intramoléculaire avec l'acide sulfénique est particulièrement favorisée d'un point de vue entropique. Ceci impliquerait la modulation des cinétiques relatives des réactions en compétition. Dans ces mécanismes hypothétiques, nous avons considéré le rôle de Ybp1, partenaire indispensable de l'activation de Yap1, mais dont la fonction moléculaire était inconnue au début de mon doctorat. Pour explorer ces différentes hypothèses, il était donc essentiel de disposer d'un système permettant de reconstituer *in vitro* le relai H₂O₂/Orp1/Yap1 et de caractériser les vitesses des étapes réactionnelles en compétition par des techniques de cinétiques rapides, ainsi que les propriétés d'interaction des trois partenaires protéiques Yap1, Orp1 et Ybp1. L'apport d'une approche cinétique pour l'étude de la coordination des cycles d'oxydation interdépendants mis en jeu devrait permettre d'envisager la dynamique du relai redox *in vivo* en tenant compte des concentrations intracellulaires des protéines et en H₂O₂ (211).

1. Ybp1 : une protéine à activité de type enzyme ?

En explorant l'hypothèse de reconnaissance moléculaire entre les partenaires protéiques par la technique d'ITC, nous avons montré dans un premier temps que Orp1 et Yap1 n'interagissent pas. Cependant, comme l'avaient suggéré de précédentes études (Chapitre III.B.2.b.iii, p.54), Ybp1 est capable de former un complexe avec Yap1 avec une constante de dissociation dans la gamme du micromolaire. Ybp1 est également capable de former un complexe avec la forme réduite de Orp1 avec une affinité similaire, permettant le recrutement de Orp1 et de Yap1 au sein d'un complexe ternaire. Nous avons testé la pertinence de la formation de ce complexe au cours de la réaction entre Orp1 et Yap1, en mesurant l'impact de la concentration de Orp1 sur la vitesse de formation de l'espèce Yap1—S—S—Orp1 en présence de Ybp1. La variation de la concentration de Orp1 proche de la saturation n'affecte pas significativement la constante de vitesse k_{Yap1} mesurée, ce qui démontre que le mécanisme réactionnel implique le complexe ternaire Yap1·Ybp1·Orp1 (Figure 58, p.98). En effet, dans le cas contraire, la cinétique de la réaction entre les espèces Orp1 et Yap1 non complexées aurait suivi un comportement de second ordre avec une variation proportionnelle de k_{Yap1} en fonction de la concentration en Orp1.

Il est à noter que cette étude a été réalisée avec les formes étiquetées 6xHis des protéines recombinantes Yap1 et Ybp1, ce qui a permis d'optimiser leur purification et de préserver les quantités de ces protéines présentant des taux de production faibles (Résultats, Chapitre I, p.59). Bien qu'il ne puisse être exclu que la présence de cette étiquette interfère avec les propriétés d'interaction de ces protéines, l'étiquette 6xHis est de taille relativement faible et ne se dimérise pas en solution (333). De plus, l'impact d'une modification N-terminale a été testé indirectement par le marquage de chacune des protéines par l'analogue fluorescent AlexaFluor lors des expériences de titration « miroir » par anisotropie de fluorescence. Les deux expériences de titration entre Yap1 et Ybp1 conduites avec la forme marquée de l'une ou l'autre des protéines ont permis de déterminer des valeurs de constantes de dissociation très similaires, indiquant que la modification de l'extrémité N-terminale de ces protéines n'affecte pas leurs propriétés d'interaction.

Du point de vue structural, le relais redox de Yap1 a été peu caractérisé, à l'exception de Orp1 dont la structure cristallographique a été résolue (334), et de la structure de la fusion des régions CRD de Yap1 obtenue sous forme oxydée par RMN (Chapitre III.B.2.b.i, p.51) (307). Le comportement atypique de Yap1 en filtration sur gel (Figure 35, p.69) et le faible taux de structures secondaires mis en évidence par dichroïsme circulaire (Figure 66, p.129) suggèrent que, sous forme réduite, Yap1 est peu structurée et adopte une conformation non-globulaire. Ces résultats sont en accord avec le fait que la protéine est particulièrement sensible à la protéolyse ménagée (307). L'interaction avec Ybp1 pourrait permettre d'augmenter le niveau de structures secondaires et de stabiliser Yap1 dans une conformation favorable à la réaction avec Orp1 et à la formation des ponts disulfure entre les Cys 598 et 303, et les Cys 629 et 310. Ces hypothèses sont abordées dans une étude structurale entreprise dans notre équipe avec le Dr. Arnaud Gruez, combinant des approches de dichroïsme circulaire, protéolyse ménagée, radiocristallographie et diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Des résultats préliminaires utilisant le trifluoroéthanol, un agent qui permet d'induire et de stabiliser les hélices α dans une séquence protéique (335), suggèrent que la présence de trifluoroéthanol induit la formation d'hélices au sein de la forme réduite de Yap1, qui présenterait donc une tendance intrinsèque à adopter ce type de repliement. L'étude de Yap1 et de ses complexes par SAXS, une technique particulièrement intéressante pour l'étude de protéines peu structurées en solution, est actuellement en cours et sera combinée à l'étude de structure de la protéine Ybp1 par cristallographie des rayons X, également en cours.

La formation du complexe Yap1·Ybp1·Orp1 est-elle suffisante pour rendre compte de l'activation de la vitesse de formation de Yap1—S—S—Orp1 ? Grâce à l'utilisation du mutant Orp1^{CSA}, pour lequel la formation de cette espèce peut être observée en l'absence et en présence de Ybp1, l'impact réel de Ybp1 sur cette cinétique a pu être évalué par la comparaison des constantes de vitesses de second ordre. Ce paramètre évalue la vitesse de la réaction entre les deux partenaires considérés sous forme libre, c'est-à-dire sans les effets associés à la formation de complexe. Ainsi, nous avons pu montrer (Chapitre III.C.2.b, p.93) que la réaction entre Orp1—SOH et Yap1^{SSSCSS} est activée de plus de 600 fois en présence de Ybp1 par rapport à la réaction bimoléculaire. Dans les conditions de concentrations élevées que nous avons dû utiliser *in vitro* pour pouvoir détecter la formation de l'espèce Yap1—S—S—Orp1, l'effet cinétique de Ybp1 pourrait sembler limité, avec une constante de vitesse observée supérieure d'un facteur seulement 9 ($2,6/0,3 \text{ s}^{-1}$). Néanmoins, d'après l'estimation du nombre de molécules de Orp1 et du volume cytoplasmique d'une cellule de *S. cerevisiae*, la concentration intracellulaire de Orp1 peut être évaluée à $0,5 \mu\text{M}$, Yap1 et Ybp1 étant présents à des niveaux plus faibles de l'ordre de 80 et 150 nM (336–338). Dans ces conditions, la concentration effective de Orp1 *in vivo* est probablement largement non saturante et l'effet de Ybp1 sur la cinétique de la réaction Orp1—SOH et Yap1 prend tout son sens, avec un écart réel d'un facteur 600 : en effet la constante de vitesse observée en l'absence de Ybp1 tomberait alors dans la gamme de 10^{-3} s^{-1} (avec un temps de demi-réaction de l'ordre de la dizaine de minutes), contre une valeur de l'ordre de 2 s^{-1} en présence d'Ybp1.

La fonction de la protéine Ybp1 ne serait donc pas uniquement de recruter Orp1 et Yap1 à proximité l'une de l'autre, ce qui permet d'augmenter leur concentration locale. Au sein du complexe ternaire, l'attaque de la Cys598 de Yap1 sur la C_p de Orp1—SOH est aussi fortement activée, ce qui peut s'expliquer par plusieurs types de mécanismes : la stabilisation de la forme thiolate de la Cys598 de Yap1, l'optimisation de l'alignement du thiolate de la Cys598 et de l'acide sulfénique et/ou l'existence d'un résidu jouant le rôle de catalyseur acide permettant d'activer le départ du groupement partant OH⁻. Nos résultats sont à comparer avec l'étude de l'équipe de T. Dick obtenue sur une protéine de fusion de Orp1^{CCS} avec un variant de la GFP sensible à l'oxydation, la roGFP. Un tel système est capable de transférer les équivalents d'oxydation de H₂O₂ par un mécanisme analogue au relai Orp1/Yap1, avec toutefois une constante de vitesse estimée de l'ordre de 0.1 s^{-1} , comparable à celle que nous avons mesurée avec Yap1 en l'absence de Ybp1 (339). Ceci montre que dans le système artificiel de la fusion Orp1^{CCS}/roGFP, la forme sulfénique de la C_p présente une réactivité intrinsèque similaire à celle de Orp1 libre vis-à-vis de Yap1.

2. Rôle du complexe Yap1·Ybp1 dans le contrôle de la Cys de recyclage de Orp1

Un rôle essentiel de la formation d'un complexe entre les trois protéines est d'activer la réaction entre Orp1 et Yap1. Cependant, la réaction intramoléculaire du résidu C_R sur l'acide sulfénique formé sur la C_P impose une forte compétition vis-à-vis de la Cys598 de Yap1. Nous avons déterminé pour la forme Orp1 libre que la constante de vitesse de formation du pont disulfure C_P—C_R, k_{SS} , est en effet au moins 100 fois supérieure à la constante de vitesse de formation du produit Yap1—S—S—Orp1 en présence de Ybp1 (507 contre 2,6/4,6 s⁻¹). Ainsi, lorsqu'Orp1 sauvage est utilisé, l'espèce Orp1_{SS} constitue le produit très largement majoritaire formé à l'issue de la réaction initiée par H₂O₂, au détriment de l'intermédiaire Yap1—S—S—Orp1 qui n'est observé qu'en présence d'Ybp1 (Figure 47, p.85). De plus, grâce la méthode du « quenched flow », nous avons établi que la formation du complexe ternaire résulte en la diminution de k_{SS} d'un facteur de au moins 80, de 507 à 6 s⁻¹. Cet effet se traduit par une inhibition quasi-totale de l'activité peroxydase de Orp1 mesurée à l'état stationnaire en conditions de cycles catalytiques multiples. Il faut cependant noter que l'activité peroxydase de Orp1 est inhibée avec une constante d'inhibition apparente de 0,12 μM, inférieure d'un facteur 6 par rapport à la constante de dissociation de l'interaction entre Orp1 et Yap1·Ybp1 (0,7 ± 0,2 μM) (Figure 60, p.102). Cette différence peut s'expliquer par le fait que la constante apparente d'inhibition reflète non seulement l'interaction de Orp1 avec le complexe Yap1·Ybp1, mais inclut également d'autres événements associés au système couplé Trx/NTR utilisé, comme par exemple la dissociation de l'espèce Orp1_{SS} qui doit être nécessaire pour permettre la réduction par la Trx.

Considéré globalement, ces résultats suggèrent qu'au sein du complexe ternaire Yap1·Ybp1·Orp1, Ybp1 contraint la région de Orp1 portant la Cys C_R, hautement flexible (Figure 28, p.54) (334), dans une conformation qui restreint l'attaque du thiol de la C_R sur l'acide sulfénique. Cela aurait pour conséquence de réduire la constante de vitesse de formation du pont disulfure intramoléculaire C_P—C_R, et ainsi de permettre la réaction avec la Cys598. La formation d'un complexe ternaire permettrait également d'empêcher l'attaque de thiols « externes » sur l'acide sulfénique formé sur la C_P. Ces hypothèses sont étayées par le fait que suite à la formation du pont disulfure C_P—C_R, la conformation de Orp1 doit être modifiée de telle sorte à empêcher l'interaction avec Ybp1 et avec le complexe Yap1·Ybp1, comme le montrent les résultats des expériences d'ITC. La titration de Ybp1 par Orp1 par microcalorimétrie montre également que l'interaction présente une composante entropique significative, en accord avec l'hypothèse d'une réorganisation structurale accompagnant

l'interaction. De plus, la faible efficacité de Orp1_{SS} dans la réaction avec Yap1 (avec une constante de vitesse mesurée de 0,03 s⁻¹, (Figure 56, p.95) peut être expliquée par l'impossibilité de former un complexe avec Ybp1, combinée à une réactivité intrinsèque plus faible que celle de Orp1—SOH.

Nous avons montré qu'en l'absence de la Cys C_R, Orp1—SOH peut évoluer vers une espèce Orp1* correspondant probablement à une forme sulfénylamide (Chapitre III.C.1.b, p.86). Une telle espèce a également été observée dans le cas de mutants de la Cys C_R des 2-Cys Prx typiques, Prx2 et Prx3 humaines (144). Dans le cas de Orp1, la propriété du complexe Yap1·Ybp1 de limiter l'attaque de la Cys C_R, pourrait donc permettre la formation de cette espèce au sein du complexe ternaire. Ceci soulève la question de la nature de l'espèce de Orp1 qui joue le rôle d'intermédiaire dans la réaction avec Yap1. La constante de vitesse de formation de Orp1*, qui est égale à 0,2 s⁻¹, est inférieure d'un facteur 10 à 20 à celle de l'attaque de la Cys598 de Yap1 mesurée au sein du complexe ternaire (4,6 s⁻¹ pour la forme sauvage de Orp1). Or Si Yap1 réagissait avec cette espèce, la cinétique de formation de Yap1—S—S—Orp1 serait limitée par celle de Orp1* et nous aurions observé des cinétiques 10 à 20 fois plus lentes. Nos résultats tendent donc à prouver que la Cys598 réagit plutôt avec la forme sulfénique de Orp1. Cependant, on ne peut pas exclure que la formation du cycle sulfénylamide soit activée au sein du site actif défini dans le complexe ternaire, et puisse jouer le rôle d'intermédiaire dans la cascade d'activation de Yap1.

Pour quel avantage sélectif le résidu C_R de Orp1 a-t-il été conservé au cours de l'évolution ? *In vivo*, l'activité peroxydase de Orp1 n'est pas vitale pour la cellule en situation de stress oxydant (310) et la présence du résidu C_R n'est pas indispensable pour l'activation de Yap1 *in vivo* (ref delaunay 2002) et *in vitro* (nos résultats). Dans la cellule, sur la base des concentrations estimées et des constantes de dissociation des complexes (Figure 62, p.115), nous pouvons prédire qu'une large fraction de Orp1 reste sous forme de protéine libre, avec environ 10% engagé dans le complexe Ybp1·Orp1 et seulement 1 % dans le complexe Yap1·Ybp1·Orp1. La majorité de l'acide sulfénique formé sur la C_P ne sera donc pas en situation de réagir efficacement avec la Cys598 de Yap1. En l'absence de la C_R, Orp1—SOH serait alors exposé à des réactions non spécifiques avec d'autres thiols cellulaires. Cette situation est illustrée *in vitro* par la formation de multiples adduits de Orp1^{CSA} (utilisé en excès) avec les résidus de Yap1, observés sur gel SDS-PAGE (Figure 47, p.85). Par conséquent, la présence de la Cys C_R de Orp1 permettrait l'évolution rapide de Orp1—SOH sous forme Orp1_{SS}, assurant un recyclage efficace par le système Trx et un niveau optimal de Orp1 disponible pour l'activation de Yap1.

3. Ybp1, une protéine « charpente » de signalisation ?

La capacité de Ybp1 à catalyser l'oxydation de Yap1 par Orp1 *via* la formation d'un complexe, l'activation de la réaction entre Orp1—SOH et Yap1, et le contrôle de l'activité peroxydase de Orp1 suggère que Ybp1 joue un rôle de protéine « scaffold » ou « charpente ». Selon la définition de A. Shaw et E. Filbert, on définit une protéine « scaffold » comme une molécule qui lie au moins deux autres protéines de signalisation et contribue à guider le flux de l'information, ici transmise par oxydation (340). Les protéines « scaffold » ont été largement impliquées dans l'organisation des cascades MAPK (pour revue : 341). Le premier exemple de protéine « scaffold » décrit correspond aux récepteurs à activité protéine Tyrosine kinase, comme les récepteurs du PDGF et de l'EGF. De nombreux exemples de « signalosomes » ont par la suite été décrits dans les voies de signalisation dépendant d'événements de phosphorylation/déphosphorylation. Certaines de ces protéines « charpente », en plus de leur capacité à lier des effecteurs de cascades de signalisation, peuvent activer ou inhiber le processus de signalisation (342), comme nous l'avons montré dans le cas de Ybp1.

L'activation de Yap1 requiert plusieurs étapes consécutives à la formation de l'intermédiaire Yap1—S—S—Orp1. La protéine Ybp1 joue-t-elle un rôle au-delà de cette première étape critique ? La formation du premier pont disulfure entre les Cys 598 et 303 est un événement intramoléculaire, qui nécessite néanmoins que Yap1 soit stabilisée dans une conformation permettant de rapprocher les domaines n- et c-CRD dans un alignement favorable à l'attaque de la Cys303. Il est probable que l'interaction Ybp1·Yap1 participe à ce mécanisme, comme déjà mentionné ci-dessus. Il est également probable que Ybp1 soit requis au cours du second cycle d'oxydation nécessaire à l'activation complète de Yap1, qui est aussi catalysé par la formation d'une espèce disulfure mixte entre Orp1 et Yap1 (M. Toledano, communication personnelle). En effet, comme pour le premier cycle d'oxydation, la compétition imposée par la Cys C_R de Orp1 doit à minima être contrôlée par la formation d'un complexe ternaire entre les trois partenaires.

Conclusion

Dans le cas de l'activation redox du facteur de transcription Yap1 par le peroxyde d'hydrogène, la spécificité de la transmission du signal redox repose sur des mécanismes qui combinent une réactivité chimique élevée (de la C_p de Orp1 pour H₂O₂ et de l'intermédiaire Orp1—SOH avec Yap1), avec la reconnaissance moléculaire et l'activation apportées par

Ybp1. Ceci confère probablement l'efficacité nécessaire à la cellule de *S. cerevisiae* dans la réponse contre le stress associé à H_2O_2 . Cependant, parmi les champignons ascomycètes qui possèdent le système Yap1, la protéine Ybp1 n'est présente que chez certaines espèces des genres *Candida* et *Saccharomyces* (343). Chez *S. pombe* par exemple, en l'absence de Ybp1, la voie d'activation de Pap1 serait dépendante de la Trx1 et de la 2-Cys Prx typique Tpx1, les deux Cys C_p et C_R étant requises (Chapitre III.B.2.a, p.49). Ceci suggère que le mécanisme d'activation de Pap1 se ferait par échange de ponts disulfure. La question de la spécificité de réaction d'un intermédiaire de type acide sulfénique ne se poserait donc pas. En l'absence d'une protéine de charpente, l'efficacité limitée de la réaction bimoléculaire d'échange de ponts disulfure pourrait être compensée par les concentrations cellulaires élevées de Trx1 et/ou Tpx1. Ce type de raisonnement s'applique potentiellement aux autres systèmes identifiés impliquant une peroxydase à thiol comme relais d'oxydation, et ces hypothèses pourraient être testées *in vitro* par le même type d'approche cinétique que nous avons utilisée.

Chez les organismes multicellulaires, la signalisation redox apparaît comme un niveau supplémentaire de régulation de multiples voies de signalisation (Chapitre II.C, p.33) (312). Dans ce cas, la réactivité chimique de l'espèce jouant le rôle de détecteur de H_2O_2 , une peroxydase à thiol par exemple, pourrait contribuer à la spécificité de transfert du message oxydant (Chapitre III, p.38). De plus, en particulier dans les cas où la réactivité du « détecteur » vis-à-vis de H_2O_2 est limitée (Chapitre II.B, p.28), la formation préalable d'un complexe entre l'élément sensible à l'oxydation et les autres protéines de signalisation permettrait d'assurer l'efficacité de la « cascade redox », grâce à la spécificité inhérente aux interactions moléculaires.

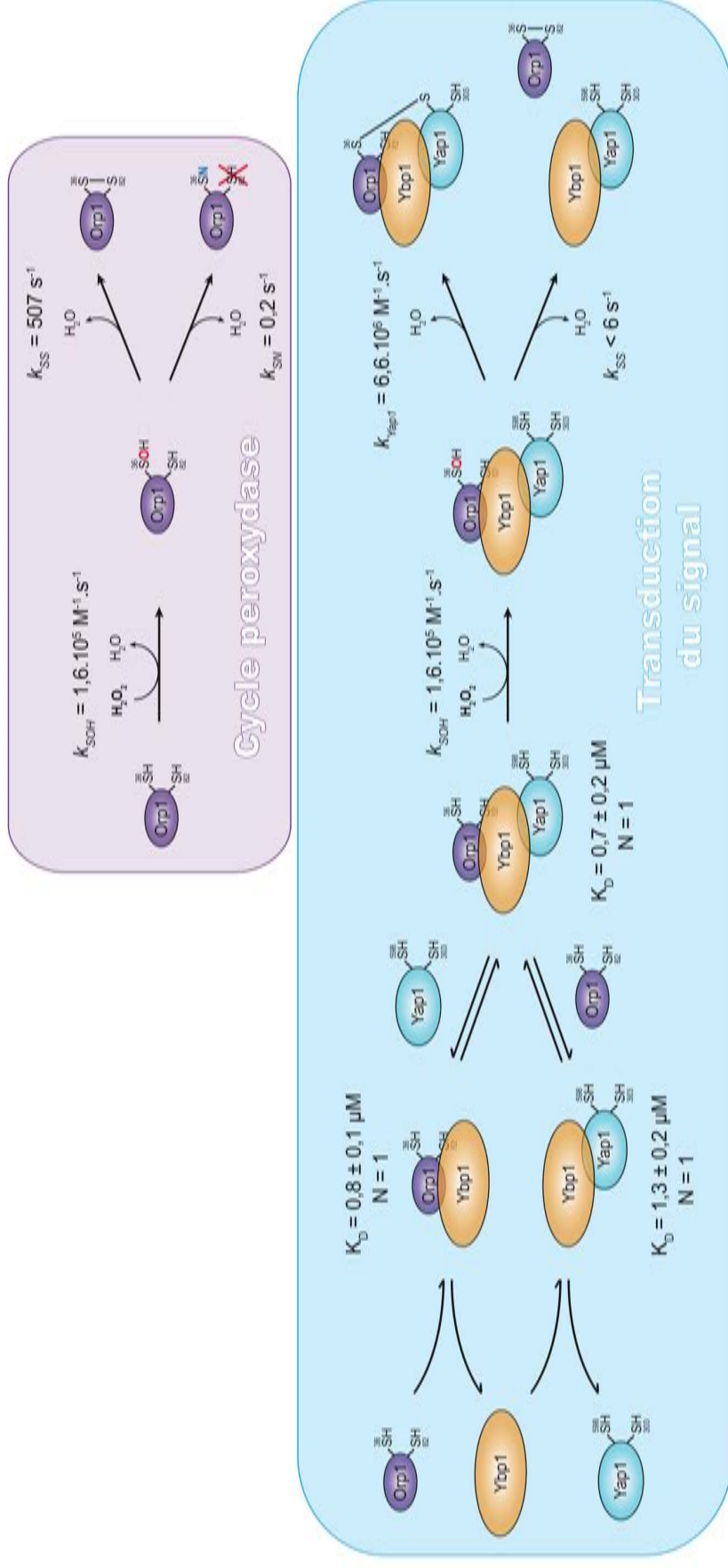


Figure 62. Bilan de l'étude du relais $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Orp1}/\text{Yap1}$

Les constantes de vitesse et les paramètres des interactions (constante thermodynamique de dissociation et stoechiométrie) sont indiquées.

*Matériels
et
méthodes*

I. Matériels biologiques, milieux de cultures et tampons

1. Milieux et solutions tampons

Les milieux utilisés dans les techniques décrites ci-dessous sont indiqués dans le Tableau 6. Les solutions tampons d'usage courant sont présentées dans le Tableau 7, p.117.

Tableau 6. Milieux utilisés pour la production des protéines d'intérêt.

Le milieu LB est utilisé pour la réalisation des minipréparations d'ADN plasmidique, pour les précultures préalables à la production des différentes protéines et pour la production de Ybp1. Le milieu Graffinity est utilisé pour la production de la protéine Yap1. Le milieu autoinductible ZYM5052 est utilisé pour la production de la protéine Orp1. Ces milieux sont autoclavés 20 min à 120°C sous une pression de 1 bar avant utilisation.

| | |
|--|--|
| Milieu riche LB (Luria Bertani) | tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH ajusté à 7,5 par ajout de NaOH (agar 20 g/L pour les milieux solides) |
| Milieu Graffinity | milieu LB, glucose 0,5%, hepes (20 mM), lactose 0,6% pH 7,5 |
| Milieu ZYM5052 | tryptone 1%, extrait de levure 0,5%, Na ₂ HPO ₄ 25 mM, KH ₂ PO ₄ 25 mM, NH ₄ Cl 50 mM, Na ₂ SO ₄ 5 mM, glycérol 0,5%, lactose 0,2%, glucose 0,05%, MgSO ₄ 1 mM, pH 7,5 (283) |
| Milieu LBNB | Milieu LB, NaCl 0,5 M, bétaïne 2 mM |

2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans les techniques décrites ci-dessous sont présentées dans le Tableau 8, p.117.

3. Plasmides

Les plasmides utilisés sont présentés (Figure 63, p.119). Les plasmides pET28b *yap1* et pET22b *orp1* dérivent de constructions fournies par Benoît D'Autreaux. Le plasmide pET28b *ybp1* nous a également été fourni par Benoît D'Autreaux.

Tableau 7. Les solutions tampon d'usage courant.

| Solutions tampon | |
|--|--|
| Tampon A | Tris 50 mM, KCl 150 mM, pH 7 |
| Tampon B | Hepes 20 mM, NaCl 400 mM, pH 8,5 |
| Tampon C | Tris 50 mM, EDTA 2mM, pH 8 |
| Tampon D | Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 300 mM, pH 7 Dégazé systématiquement sous flux d'azote gazeux pendant 30 min à 4°C |
| Tampon E | Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaF 300 mM, pH 7 |
| Tampon F | Acétate d'ammonium 50 mM, pH 6,8 |
| Tampon G | Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 400 mM, pH 8 |
| Tampon H | Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8 |
| Tampon I | Mes 20 mM, EDTA 2 mM, pH 6,1 |
| Solutions de traitement des gels SDS-PAGE | |
| Tampon de migration | Glycine 14,25 g/L ; Tris 3 g/L ; SDS 1 g/L |
| Bleu de dépôt | Tris-HCl 80 mM pH 6,8 ; SDS 3% ; glycérol 10% ; bleu de bromophénol 0,1% (DTT 100 mM en condition réductrice) |
| Solution de fixation | Ethanol 50% ; acide acétique 10% |
| Solution de coloration classique | Ethanol 5% ; acide acétique 7,5% ; bleu de coomassie R250 0,2% |
| Solution de coloration bleu colloïdale | bleu de coomassie G250 0,08% ; acide phosphorique 1,6% ; sulfate d'ammonium 8% ; méthanol 20% |
| Solution de décoloration bleu colloïdale (284) | Acide acétique 1% |

Tableau 8. Souches bactériennes utilisées pour les étapes de clonage et de surproduction des protéines d'intérêts.

| | |
|---------------------------------|---|
| <i>E. coli</i> DH5α | supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1. Cette souche est utilisée pour la préparation de l'ADN plasmidique. |
| <i>E. coli</i> C41 (DE3) | Souche dérivée de la souche BL21 (DE3) : F ⁻ dcm ompT hsdS _B (r _B -m _B -) gal λ (DE3) et deux mutations non caractérisées (285). Elle contient une copie chromosomique de la séquence codant l'ARN polymérase du bactériophage T7 placée sous le contrôle du promoteur lacUV5 inductible par l'IPTG, permettant l'expression de protéines dont la séquence codante est placée sous le contrôle du promoteur T7. Cette souche est utilisée pour la surproduction de la protéine recombinante Orp1. |
| <i>E. coli</i> Rosetta™ 2 (DE3) | Souche dérivée de la souche BL21 (DE3) conçue pour permettre l'expression de protéines eucaryotes qui contiennent des codons rarement utilisés chez <i>E. coli</i> : cette souche fournit les ARNt pour les codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA et CGG codés à partir d'un plasmide pRARE2 qui porte un gène de résistance au Chloramphénicol. Les gènes des ARNt sont placés sous le contrôle de leurs promoteurs natifs. Cette souche est utilisée pour la surproduction des protéines recombinantes Yap1 et Ybp1. |

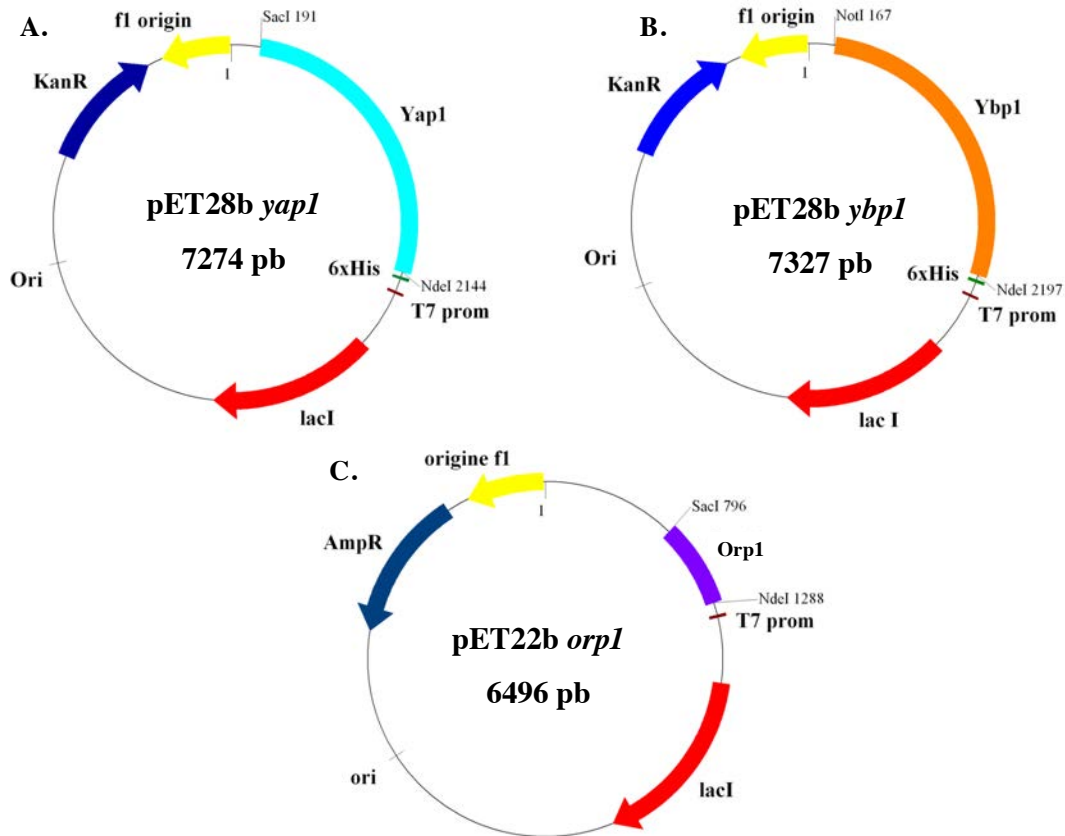


Figure 63. Représentation schématique des plasmides pET28b *yap1*, pET28b *ybp1* et pET22b *orp1*.

KanR : gène de résistance à la Kanamycine ; AmpR : gène de résistance à l'Ampicilline ; origine fl : origine de répllication du phage filamenteux fl ; ori : origines de répllication du plasmide ; lacI : gène du répresseur de l'opéron lactose, T7 prom : promoteur du phage T7 reconnu par la T7 polymérase ; 6xHis : étiquette formée d'une séquence de 6 résidus His ; NdeI, SacI, NotI : sites de restriction.

A. et B. Les plasmides pET28b *yap1* et pET28b *ybp1* permettent l'expression des protéines Yap1 et Ybp1 fusionnées à l'étiquette 6xHis à l'extrémité N-terminale. **C.** Le plasmide pET22b *orp1* permet l'expression de la protéine Orp1. Les ORF de Yap1, Ybp1 et Orp1 sont placées sous le contrôle du promoteur du phage T7.

II. Techniques de génie génétique

1. Clonage

Les constructions plasmidiques fournies par Benoît D'Autreaux (Matériels et méthodes, I.3, p.117) ne permettaient ni l'expression de Yap1 sous forme taguée 6xHis ni l'expression de Orp1 sous forme native. Ces constructions ont alors été utilisées pour cloner les ORF (Open Reading Frame) de Yap1 et de Orp1 à l'aide d'oligodésoxyribonucléotides permettant d'introduire un site NdeI (5'-CATATG-3') au niveau du codon ATG du premier résidu Met et un site SacI (5'-GAGCTC-3') après le codon stop. Les fragments d'ADN amplifiés par PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% coloré au GelRed™ et ont été extraits à l'aide du kit NucleoSpin® Extract II (Macherey et Nagel).

Ces fragments, ainsi que les plasmides pET28b et pET22b ont été digérés par les enzymes de restriction NdeI et SacI pendant 2h à 37°C dans les conditions recommandées par le fournisseur puis ont été purifiés par le protocole décrit ci-dessus. Le fragment correspondant à l'ORF de Yap1 a été inséré par ligation aux sites de restriction NdeI et SacI du vecteur pET28b tandis que le fragment correspondant à l'ORF de Orp1 a été inséré, de la même manière, dans le vecteur pET22b. Ces réactions de ligation, catalysées par l'ADN ligase du phage T4, sont réalisées sur un mélange présentant un ratio insert:vecteur de 3:1 pendant une nuit à 16°C.

Une fraction du produit de ces étapes de ligation a ensuite été utilisée pour transformer des cellules *E. coli* DH5 α compétentes. Les cellules transformées sont cultivées pendant une nuit sur milieu solide sélectif, puis l'ADN plasmidique de certains clones est extrait par la technique de mini-préparation et analysé par séquençage (GATC Biotech) afin de s'assurer de la qualité des vecteurs obtenus. Les minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de 5 mL de culture bactérienne (milieu LB) en utilisant le kit NucleoSpin® plasmid (Macherey et Nagel).

Les plasmides pET28b *yap1* et pET22b *orp1* obtenus dans ces conditions permettent l'expression de la protéine Yap1 fusionnée à l'étiquette 6xHis à l'extrémité N-terminale, et de la protéine Orp1 native (Figure 63, p.119).

2. Mutagenèse dirigée

Les réactions de mutagenèse dirigées par PCR sont réalisées en présence de l'ADN polymérase thermostable *Pfu*® de *Pyrococcus furiosus* (Fermentas), de deux oligodésoxyribonucléotides complémentaires d'un des deux brins du plasmide et portant la mutation à introduire, du plasmide à muter et de dNTP (Fermentas). Pour chaque réaction, les durées de chaque cycle et la température d'hybridation sont ajustées selon la température de fusion des oligodésoxyribonucléotides et la taille du plasmide. L'ADN polymérase *Pfu*® est utilisée ici en raison de sa haute fidélité due à son activité 3'-exonucléase qui permet la correction des erreurs de répliation. Le produit amplifié par les réactions de PCR est alors traité par l'endonucléase *DpnI* (Fermentas) afin de sélectionner l'ADN néosynthétisé portant la mutation. L'enzyme *DpnI*, qui présente une spécificité pour l'ADN méthylé et hémiméthylé (séquence cible 5'-G^{m6}ATC-3'), va digérer l'ADN parental issu de la souche *E. coli* DH5 α qui est *dam* méthylé. Une fraction du mélange de digestion est utilisée pour transformer des bactéries *E. coli* DH5 α compétentes. Après une étape de culture sur milieu solide sélectif, l'ADN plasmidique de certains clones bactériens est extrait par la technique de

mini-préparation et analysé par séquençage afin de s'assurer de la présence de la mutation désirée.

Les plasmides pET22b *orp1*^{CSA} (mutations C64A et C82S), pET28b *yap1*^{SSS CSS} (mutation C303S, C310S, C315S, C620S et C629S) et pET28b *yap1*^{SSS SSS} (mutation C303S, C310S, C315S, C598S C620S et C629S) ont été générés selon ce protocole.

3. Transformation des bactéries compétentes

La méthode classique du choc thermique est utilisée pour transformer les bactéries compétentes *E. coli* DH5 α , C41 (DE3) et RosettaTM 2 (DE3) avec le produit de ligation. Les cellules bactériennes ont subi un traitement provoquant une augmentation de la perméabilité de leur membrane : des micro-pores sont induits par l'action de sels comme le CaCl₂ sur la membrane bactérienne. Un mélange constitué de 1 à 100 ng de plasmide et de 50 μ L de bactéries compétentes est refroidi 30 minutes dans la glace puis est soumis à un choc thermique à 42°C, suivi d'un refroidissement de 2 min sur glace. Enfin, une étape de régénération des cellules contenant les plasmides est préconisée avant étalement sur milieu solide ; pour ce faire, du milieu LB supplémenté en glucose 20 mM est ajouté et les cellules sont incubées 1 h à 37°C. Après transformation, la sélection des bactéries ayant intégrées le(s) plasmide(s) se fait sur milieu LB solide additionné de(s) l'antibiotique(s) de résistance approprié(s) au plasmide utilisé.

III. Obtention des protéines recombinantes Yap1, Ybp1 et Orp1.

Les protéine Yap1^{SCC CCC} et Orp1^{CCS} nous ont généreusement été fournies par Benoit D'Autreaux.

1. Production et purification de la protéine recombinante Yap1

a. Production et extraction de la protéine recombinante Yap1

La protéine Yap1 sauvage de *S. cerevisiae* ainsi que les mutants Yap1^{SSS SSS}, Yap1^{SSS CSS} sont produits dans la souche *E. coli* RosettaTM 2 (DE3) transformée par le vecteur plasmidique pET28b *yap1* (ou les plasmides mutants correspondants) dans le milieu Graffinity. Les cultures sontensemencées à une densité cellulaire de 0,1 DO₆₀₀ à partir d'une préculture réalisée en milieu LB supplémentée en Kanamycine (50 mg/L) et en chloramphénicol (50 mg/L). Dans un premier temps, les cultures sont réalisées en milieu LB supplémenté en glucose 0,5% et incubées à 37°C sous agitation (180 rpm) jusqu'à une DO₆₀₀

comprise entre 1,2 et 1,5. Les cultures sont ensuite diluées par un facteur deux par ajout de LB froid (4°C) supplémenté en lactose 0,6%, Hepes 20 mM et IPTG 1 mM et sont incubées à 20°C sous agitation pendant 18 h. Le milieu Graffinity permet d'induire l'expression de la protéine Yap1 par un double mécanisme : l'induction naturelle par le lactose après levée de la répression catabolique par le glucose³ et l'induction par l'IPTG, analogue de l'allolactose. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 4000 g pendant 30 min.

Les culots cellulaires sont resuspendus dans 15 mL de tampon G supplémenté de PMSF 1 mM, d'une tablette de cocktail d'inhibiteur de protéase sans EDTA (Roche Applied Science, Indianapolis), de benzonase 20 U/mL et de MgSO₄ 2 mM. Les cellules sont alors lysées par sonication sur glace par deux cycles de deux minutes, avec une période de 1 s d'ultrasons pour 1 s d'arrêt. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 17000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant de sonication correspond à l'extrait brut débarrassé des débris cellulaires insolubles.

b. Chromatographie d'affinité sur complexe Ni²⁺

Le surnageant de sonication est d'abord filtré sur une membrane d'acétate de cellulose de 0,45 µm puis injecté sur une colonne de résine Ni-sepharose HP (15 mL, Amersham Biosciences) couplée au système FPLC ÄKTA™ Avant (GE Healthcare®), préalablement équilibrée avec le tampon G supplémenté en imidazole 60 mM. La protéine d'intérêt est alors retenue sur la colonne par des interactions spécifiques entre les ions Ni²⁺, chélatée par des groupements iminodiacétate greffés à la résine, et l'étiquette 6xHis fusionnée à l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt. Ces interactions s'expliquent par la nature du noyau imidazole qui présente un atome d'azote avec un doublet d'électrons libres (à pH > pKa) qui peut interagir avec les ions métalliques divalents. La présence d'une faible quantité d'imidazole lors de l'injection du surnageant de sonication permet d'éliminer un nombre important de ligands non spécifiques.

Les protéines sont éluées par un gradient linéaire de 60 mM à 500 mM d'imidazole en 5 volumes colonne. L'imidazole rentre en compétition avec l'étiquette 6xHis pour la fixation aux ions Ni²⁺. Cette étape permet de séparer la protéine Yap1 de la majorité des contaminants protéiques et nucléiques. Les fractions contenant la protéine Yap1, identifiées

³ En présence de glucose, la répression catabolique empêche l'entrée du lactose dans la cellule par la lactose perméase. Lorsque le glucose est totalement consommé, le lactose peut être pris en charge pour être converti en allolactose par la bêta-galactosidase, l'inducteur naturel du promoteur lac dont dépend l'expression de l'ARN polymérase T7 et donc de la protéine d'intérêt.

par l'absorbance à 260 et 280 nm, sont rassemblées et l'ensemble est dialysé pendant 12h contre le tampon H supplémenté en DTT 20 mM.

c. Chromatographie échangeuse d'anions

La solution protéique issue de l'étape de dialyse est injectée sur une colonne Q-sepharose couplée au système FPLC ÄKTA™ Avant (GE Healthcare®), préalablement équilibrée avec le tampon H. La résine de ce type de colonne est modifiée avec des groupements triméthylammonium, chargés positivement et donc capables d'interagir avec les anions. L'élution est réalisée par un gradient de NaCl linéaire de 0,1 à 1 M. Cette étape permet de séparer la protéine d'intérêt des derniers contaminants protéiques et nucléiques grâce à son caractère acide (pI théorique de 5). Les fractions contenant la protéine Yap1 sont rassemblées.

2. Production et purification de la protéine recombinante Ybp1

a. Production et extraction de la protéine recombinante Ybp1

La protéine Ybp1 de *S. cerevisiae* est produite dans la souche *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) transformée par le vecteur plasmidique pET28b *ybp1*. Les cultures sont ensemencées à une densité cellulaire de 0,1 DO₆₀₀ à partir d'une préculture réalisée en milieu LB supplémentée en Kanamycine (50 mg/L) et en Chloramphénicol (50 mg/L). Dans un premier temps, les cultures sont réalisées en milieu LB et incubées à 37°C sous agitation (180 rpm) jusqu'à une DO₆₀₀ comprise entre 0,5 et 0,6. Les cultures sont ensuite supplémentées en NaCl 500 mM et bétaïne 2 mM et sont incubées à 47°C sous agitation (180 rpm) pendant 1 h. Une fois refroidies à 20°C, l'expression de Ybp1 est induite par ajout d'IPTG 1 mM par incubation à 20°C sous agitation (180 rpm) pendant 12h. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 4000 g pendant 30 min.

Les culots cellulaires sont resuspendus dans 15 mL de tampon B supplémenté de PMSF 1 mM, d'une tablette de cocktail d'inhibiteur de protéase sans EDTA (Roche Applied Science, Indianapolis), de benzonase 20 U/mL et de MgSO₄ 2 mM. Les cellules sont alors lysées par sonication puis les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (Matériels et méthodes, III.1.a, p.121).

b. Chromatographie d'affinité sur complexe Ni²⁺

Le même protocole que celui présenté paragraphe III.1.b, (p.122) est utilisé à la seule différence que le tampon G est remplacé par le tampon B. Cette étape permet de séparer la protéine Ybp1 de la majorité des contaminants protéiques et nucléiques.

Les fractions contenant la protéine Ybp1 sont rassemblées et l'ensemble est concentré par centrifugation sur Amicon Ultra 15 mL (Millipore, limite d'exclusion de 10 kDa). Les fractions concentrées sont traitées par 20 mM de DTT pendant 1h à 4°C.

c. Chromatographie par filtration sur gel de type superdex 200

La solution traitée au DTT est fractionnée sur une colonne préparative Superdex 200 hiload 26/60 (GE healthcare) couplée au système ÄKTA™ FPLC (GE Healthcare), préalablement équilibrée avec le tampon B. La colonne Superdex 200 présente un domaine de fractionnement de 10 à 600 kDa et permet de séparer les molécules selon leur masse moléculaire apparente. Cette étape permet de séparer la protéine Ybp1 présentant une masse de 80 kDa des derniers contaminants protéiques. Les fractions contenant la protéine Ybp1 sont rassemblées.

La colonne Superdex 200 hiload 26/60 est étalonnée à l'aide d'un mélange de marqueurs de poids moléculaires connus (Bio-Rad) et la courbe étalon spécifique de la colonne est obtenue selon l'Équation 23 (avec PM le poids moléculaire et Ve le volume d'élution) (Figure 64, p.125).

$$\text{Log}(\text{PM}) = a \cdot \text{Ve} + b \quad \text{Équation 23}$$

3. Production et purification de la protéine recombinante Orp1

a. Production et extraction de la protéine recombinante Orp1

La protéine Orp1 sauvage de *S. cerevisiae* ainsi que le mutant Orp1^{CSA} sont produits dans la souche *E. coli* C41 (DE3) transformée par le vecteur plasmidique pET22b *orp1* (ou le plasmide portant les mutations correspondantes) dans le milieu auto-inductible ZYM5052. Les cultures sont ensemencées à une densité cellulaire de 0,1 DO₆₀₀ à partir d'une préculture réalisée en milieu LB supplémentée en Ampicilline (200 mg/L), puis sont incubées à 37°C sous agitation (180 rpm) pendant 18h. L'auto-induction de l'expression de la protéine Orp1 repose sur les mécanismes bactériens permettant de réguler l'utilisation des sources d'énergie carbonée du milieu de culture. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 4000 g pendant 30 min.

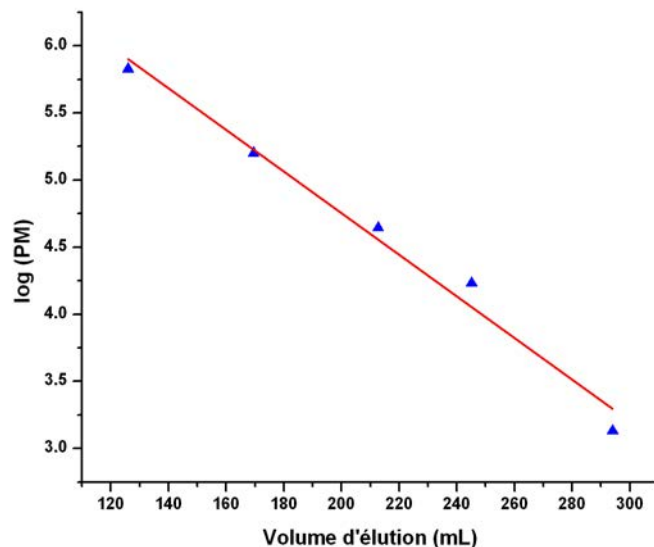


Figure 64. Droite étalon de la colonne préparative Superdex 200 hiload 26/60.

La colonne Superdex 200 hiload 26/60 (GE Healthcare) a un domaine de fractionnement de 10 à 600 kDa. Elle est étalonnée par des marqueurs de masses moléculaires connues (Bio-Rad) : thyroglobuline (670 kDa), γ -globuline (158 kDa), ovalbumine (44 kDa), myoglobine (17 kDa), vitamine B12 (1350 Da). L'équation de la droite étalon déterminée à l'aide de ces marqueurs est : $\log PM = -0,016 * Ve + 7,85$.

Les culots cellulaires sont resuspendus dans 15 mL de tampon C supplémenté de PMSF 1 mM, de benzonase 20 U/mL et de $MgSO_4$ 2 mM. Les cellules sont alors lysées par sonication puis les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation selon le protocole décrit paragraphe III.1.a (p.121). Le surnageant de sonication est amené à 65% de saturation en sulfate d'ammonium et précipité pendant 1h à 4°C sous agitation douce. À cette concentration de sulfate d'ammonium, la protéine d'intérêt précipite et est récupérée dans le culot après 30 min de centrifugation à 12 000 g. Le culot de précipitation est repris dans le tampon C additionné de 50 mM de DTT.

b. Chromatographie par filtration sur gel de type ACA54

La solution de protéine récupérée est fractionnée sur une colonne de filtration sur gel de type ACA54 (acrylamide 5%, agarose 4%, BIOSEPPRA) (domaine de fractionnement compris entre 5 et 70 kDa) couplée à une pompe péristaltique et à un collecteur Frac920 (GE Healthcare), préalablement équilibré avec le tampon C. Cette étape permet de séparer la protéine Orp1, présentant une masse de 18,6 kDa, d'une grande partie des contaminants protéiques. Les fractions contenant Orp1, identifiées par électrophorèse en conditions dénaturantes de type SDS-PAGE, sont rassemblées.

c. Chromatographie échangeuse de cations

Les fractions contenant Orp1 issues de l'étape de filtration sur gel sont concentrées par quatre cycles d'ultrafiltration sur membrane Amicon YM10 (Millipore™, limite d'exclusion de 10 kDa), réajustées au volume initial par ajout de tampon I, puis injectées sur une colonne échangeuse de cations de type SP-sepharose HP de 25 mL (Amersham Biosciences), couplée au système FPLC (Pharmacia) préalablement équilibrée avec le tampon I. La résine contenue dans ce type de colonne est fonctionnalisée par des groupements sulfopropyl, chargés négativement et donc capables d'interagir avec les cations. La protéine d'intérêt est alors éluée par un gradient linéaire en KCl de 0 à 1 M. Cette étape permet de séparer Orp1 des derniers contaminants protéiques et nucléiques grâce à son caractère basique (pI théorique de 8,3). Les fractions contenant la protéine Orp1 identifiées par lecture du chromatogramme (DO_{260} et DO_{280}) sont rassemblées.

4. Degré de pureté, stockage et préparation des protéines recombinantes

a. Gels bilan de purification des protéines

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) permet de suivre l'évolution du degré de pureté des protéines d'intérêt au cours des différentes étapes de purification. Les protéines sont colorées spécifiquement par le bleu de Coomassie R-250.

b. Stockage

Les protéines recombinantes purifiées sont stockées dans leur tampon final de purification respectif à -80°C après concentration par ultrafiltration sur membrane Amicon YM10 (Millipore™, limite d'exclusion de 10 kDa) à une concentration finale comprise entre 8 et 10 mg/mL, et congelées immédiatement par immersion dans de l'azote liquide. Les protéines d'intérêt sont stables pendant plusieurs semaines dans ces conditions.

Les concentrations molaires en protéines sont déterminées spectrophotométriquement en utilisant les coefficients d'extinction molaire à 280 nm de $30285 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, $69680 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et $19300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ respectivement pour Yap1, Ybp1 et Orp1 (Matériels et méthodes, IV.1, p.127).

c. Préparation des protéines recombinantes

Immédiatement avant utilisation, toutes les protéines (sauvages et mutantes) sont incubées en présence de 50 mM de DTT à 4°C pendant 1h. Les échantillons sont ensuite

désalés contre le tampon D, fraîchement préparé et préalablement dégazé, en utilisant une colonne de dessalage Econo-Pac® 10DG (Bio-Rad).

La forme oxydée disulfure de Orp1 (Orp1_{SS}) est préparée par incubation de la protéine en présence d'un ratio molaire H₂O₂/protéine de 1,2 pendant 15 min à température ambiante. L'excès de H₂O₂ est éliminé par dessalage contre le tampon D.

IV. Caractérisation biochimique des protéines recombinantes

1. Détermination des coefficients d'extinction molaire des protéines recombinantes

Le coefficient d'extinction molaire à 280 nm des protéines recombinantes a été déterminé par la méthode de Lewis (346). Cette méthode repose sur le calcul de la concentration en protéine par une relation empirique (Équation 24).

$$\frac{(\text{DO}_{280} - 10^{(2,5 * \text{LogDO}320 - 1,5 * \text{LogDO}350)})}{(5'540 * \text{nombre de Trp par monomère} + 1'480 * \text{nombre de Tyr par monomère})} \quad \text{Équation 24}$$

La valeur du coefficient d'extinction molaire est ensuite déduite par la relation de Beer Lambert.

2. Dosage des groupements thiols libres par le 5,5'-dithiobis(2-nitro)benzoate

Le contenu en thiol libre (—SH) des protéines recombinantes a été déterminé par réaction avec le 5,5'-dithiobis (2-nitro) benzoate (DTNB) à 0,3 mM en suivant l'apparition du thionitrobenzoate libéré à 412 nm ($\epsilon_{412} = 13'600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figure 65). La concentration en protéine (7,35 μM) est choisie pour donner un signal de 0,1 DO à 412 nm par fonction thiol libre. En conditions dénaturantes (Urée 1 M final), l'expérience permet de doser la totalité des résidus Cys sous forme réduite. Le tampon utilisé pour le dosage est le tampon C.

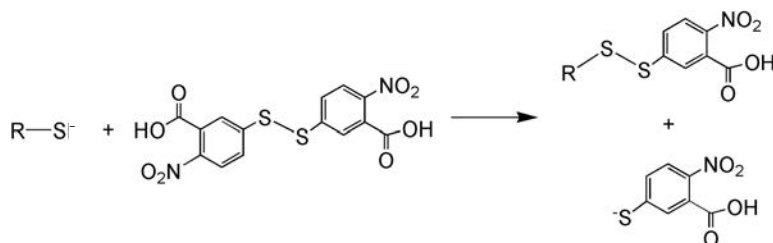


Figure 65. Dosage des groupements thiols libres par le DTNB.

Le contenu en thiol libres des protéines est déterminé par réaction avec le DTNB en suivant par spectrophotométrie à 412 nm l'apparition du thionitrobenzoate libéré ($\epsilon_{412} = 13'600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3. Évaluation du rayon hydrodynamique et de la polydispersité des solutions protéiques

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique non invasive de mesure du rayon hydrodynamique et de la polydispersité de molécules en solution. Cette technique permet d'appréhender le comportement d'une protéine, solubilité contre agrégation, dans une solution tampon donnée. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un appareil Zetasizer Nano S (Malvern). Un crible de solution tampon à 12 conditions intégrant 4 conditions de force ionique (NaCl 0 ; 0,2 ; 0,5 ou 1 M) et 3 conditions de pH (tampon Na₂HPO₄ 20 mM pH 7, 8 ou 9) a été testé. Les mesures sont réalisées sur un volume de 15 µL de solution protéique à une concentration de 1 mg/mL. Les échantillons sont centrifugés 1h à 4°C à 12000 g avant la mesure.

4. Évaluation du contenu en structures secondaires des protéines recombinantes

Le dichroïsme circulaire est une technique qui permet d'analyser la structure secondaire des macromolécules, et notamment des protéines, en solution. Des spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés sur les protéines recombinantes purifiées, sauvage et mutées (Yap1 et Orp1) afin de vérifier que la présence de ces mutations n'affectait pas le contenu en structures secondaires de la protéine considérée. Les mesures ont été enregistrées à l'aide d'un appareil Chirascan-plus (Applied photophysics) de 180 à 260 nm (UV lointain) avec un pas de 0,5 nm et une température de 25°C. La cuve utilisée est une cuve en quartz présentant un trajet optique de 0,1 mm et le tampon de mesure est le tampon E. La mesure du spectre du tampon est soustraite aux valeurs des données des échantillons. Trois spectres sont effectués pour chaque mesure et sont moyennés pour augmenter le rapport signal/bruit.

Les spectres de dichroïsme circulaire des protéines sauvages et mutées (protéines Orp1 et Yap1) sont quasiment superposables, indiquant que les mutants Orp1^{CSA}, Orp1^{CCS}, Yap1^{SCC CCC}, Yap1^{SSS CSS} et Yap1^{SSS SSS} présentent un repliement identique à leur équivalent sauvage (Figure 66, p.129).

5. Détermination de la masse moléculaire des protéines recombinantes par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique qui nécessite l'utilisation d'un échantillon ne présentant aucune trace de sels non volatils. Les protéines recombinantes ont été dessalées par chromatographie en phase inverse sur une colonne de type C8 (Vydac 208TP54, 4,6x250 mm 300 Å et 5 µm, Grace) couplée au système HPLC Äkta explorer

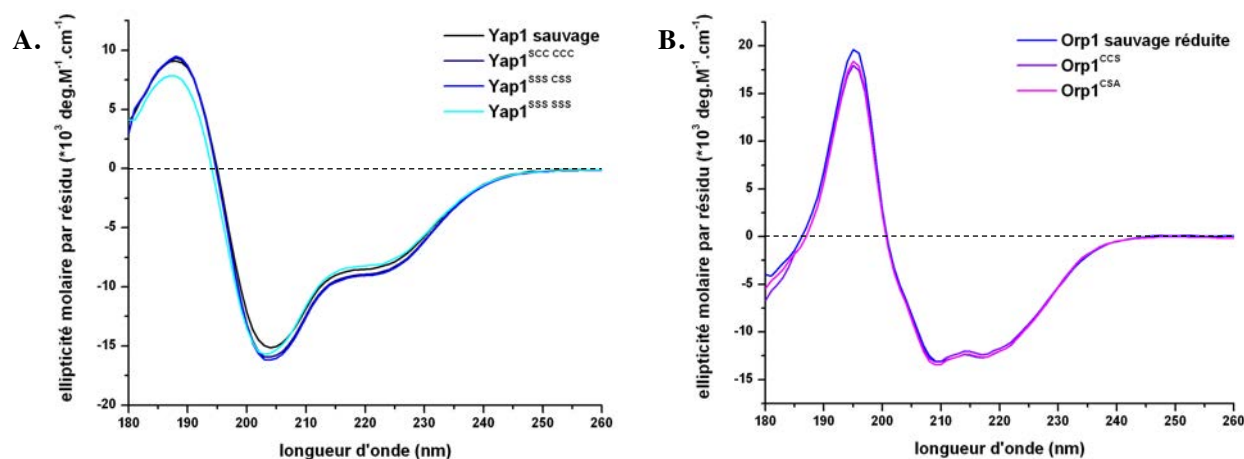


Figure 66. Spectres de dichroïsme circulaire des formes sauvage et mutantes des protéines Orp1 et Yap1.

Les mesures ont été enregistrées à l'aide d'un appareil Chirscan-plus (Applied photophysics) de 180 à 260 nm avec un pas de 0,5 nm et à une température de 25°C. Les concentrations en protéines sont respectivement de 20 μM et 50 μM pour les protéines Yap1 et Orp1. La cuve utilisée est une cuve en quartz présentant un trajet optique de 0,1 mm et le tampon de mesure est le tampon E. La mesure du spectre du tampon est soustraite aux valeurs des données des échantillons. Trois spectres sont effectués pour chaque mesure et sont moyennés pour augmenter le rapport signal/bruit.

Spectres dichroïques des protéines Yap1 (A) et Orp1 (B) sauvage et mutées.

(Amersham Biosciences). Les protéines ont été éluées par un gradient de 0 à 80% d'acétonitrile additionné de TFA 0,1% en 10 volumes colonne, et la fraction la plus concentrée a été directement analysée à l'aide d'un spectromètre de masse de type électrospray (MicroTOF-Q Bruker Daltonics) en conditions dénaturantes afin de déterminer les masses moléculaires des protéines sauvage et mutées. Les analyses ont été réalisées par H. Mazon au sein du service commun de spectrométrie de masse et des techniques chromatographiques couplées de l'UMR 7565 CNRS UL, Institut Jean Barriol.

L'identification de bandes d'intérêt, obtenues après séparation de mélanges complexes sur gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE, a été réalisée par spectrométrie de masse de type MS/MS à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI TOF/TOF à haute fréquence (Bruker). L'identification des espèces d'intérêt a été réalisée par J.-B. Vincourt au sein de la plateforme de protéomique du Biopole (UMR 7365 CNRS Université de Lorraine).

6. Spectres de fluorescence de Orp1 réduite et oxydée

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la protéine Orp1 sauvage sous forme réduite et oxydée disulfure ont été réalisés à l'aide d'un spectrofluorimètre SAFAS Flx-Xenius à une concentration en enzyme de 10 μM dans le tampon D. Les spectres d'émission sont obtenus pour une longueur d'onde d'excitation fixe de 282 nm et une

longueur d'onde d'émission variant de 300 à 500 nm par incrément de 1 nm. Le photomultiplicateur est réglé à 500 V.

V. Électrophorèse de type SDS-PAGE en conditions non réductrices et coloration colloïdale

Des mélanges réactionnels contenant 10 μ M de Yap1 (forme sauvage et mutantes), 50 μ M de Orp1 (forme sauvage et mutantes) sont incubés dans le tampon D en présence et en absence de 10 μ M de Ybp1, 100 μ M de H₂O₂ pendant 1 min à température ambiante.

Les réactions sont stoppées par incubation en présence de NEM 50 mM et SDS 5% (concentrations finales) pendant 1h à 30°C. Les échantillons sont ensuite analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes de type SDS-PAGE (gel 10%, acrylamide/bisacrylamide 30/0,44) en conditions non réductrices, suivie d'une coloration colloïdale (345). Cette technique de coloration permet à la fois une meilleure reproductibilité, une coloration de fond minimale, et une meilleure sensibilité due à la présence de sulfate d'ammonium qui augmente la force des interactions hydrophobes et donc favorise les interactions entre le bleu de coomassie et les acides aminés basiques et aromatiques (limite de détection proche de 100 ng).

VI. Techniques d'étude des complexes protéiques

1. Anisotropie de fluorescence

L'anisotropie de fluorescence représente un outil particulièrement bien adapté à l'étude des équilibres d'association protéine-protéine. La fonction amine à l'extrémité N-terminale des protéines Ybp1 et Orp1 sauvage a été modifiée par incubation en présence d'un excès molaire de 10 fois de la sonde fluorescente Alexa Fluor® 488 5-SDP ester (Molecular probes, Life technologies) (Figure 67, p.131) pendant 30 min à température ambiante et en absence de lumière. Les protéines Orp1 sauvage et Ybp1 sont en solution dans le tampon D à pH 8, la sonde fluorescente est diluée dans du DMSO. Le milieu réactionnel à pH 8 permet de favoriser la réaction du groupement amine N-terminal par rapport aux fonctions amines des chaînes latérales des résidus Lys. La protéine marquée est séparée de l'excès de sonde par dessalage sur colonne Econo-Pac® 10DG (Bio-Rad) contre le tampon D. Les concentrations de protéine et le degré de marquage sont déterminés selon les instructions du fournisseur.

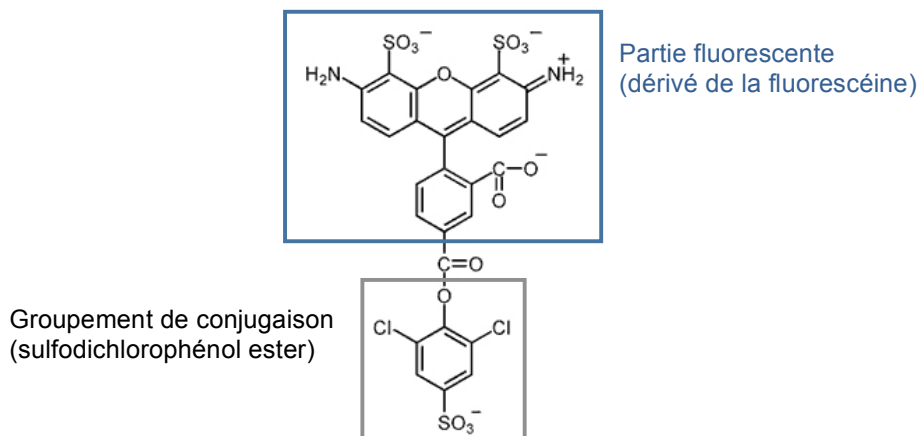


Figure 67. Représentation de la sonde fluorescente Alexa Fluor 488 5-SDP ester.

Le groupements de conjugaison et la partie fluorescente sont indiqués. La modification de protéine a lieu sur des fonctions amines des chaînes latérales des résidus Lys ou de la fonction amine présente à l'extrémité N-terminale (favorisée à pH 8). La réaction de condensation conduit à la formation d'une fonction amide et à la libération du groupement de conjugaison (encadré gris).

L'intensité de fluorescence et les mesures d'anisotropie de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre SAFAS Flx-Xenius. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 494 nm, la longueur d'onde d'émission à 523 nm et la bande passante à 10 nm. Les constantes de dissociation des interactions sont déduites d'expériences de titration réalisée dans le tampon D additionné de TCEP 2 mM, par dilution en cascade d'un mélange ligand marqué en excès avec une solution de partenaire à concentration fixe.

L'appareil détermine l'anisotropie de l'échantillon excité par une source polarisée verticalement selon l'Équation 25 (avec I_{VV} l'intensité de fluorescence enregistrée avec une polarisation d'excitation et d'émission dans la position verticale, I_{VH} l'intensité de fluorescence enregistrée avec une polarisation d'émission dans la position horizontale, G le facteur qui représente le ratio de la sensibilité du détecteur pour la lumière polarisée verticalement et horizontalement, calculé à chaque mesure).

$$A = (I_{VV} - G \cdot I_{VH}) / (I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}) \quad \text{Équation 25}$$

Les données obtenues sont exprimées selon la fraction de complexe formée affectée d'un facteur qui permet de prendre en compte la différence entre l'émission de fluorescence de la protéine marquée libre et en complexe avec son partenaire (effet appelé communément « brillance » de l'échantillon) selon l'Équation 14 (p.67).

2. Chromatographie de filtration sur gel analytique

Le complexe Yap1-Ybp1 a été étudié à l'aide d'une colonne de chromatographie par filtration sur gel analytique Superdex 200 10/300 (GE HealthCare) présentant un domaine de

fractionnement de 10 à 600 kDa. Les protéines Yap1 et Ybp1 dans le tampon D et à une concentration de 30 ou 60 μM sont injectées seules, en mélange à concentration égale ou à différents ratios d'une protéine par rapport à l'autre sur la colonne préalablement équilibrée avec le même tampon et couplée au système Äkta Purifier (GE HealthCare). L'élution est réalisée à température ambiante et suivie par lecture des absorbances à 260 et 280 nm.

La colonne Superdex 200 10/300 est étalonnée à l'aide d'un mélange de marqueurs de masses moléculaires connues (Bio-Rad) et la courbe étalon de la colonne est obtenue selon l'Équation 23, p.124 (Figure 68).

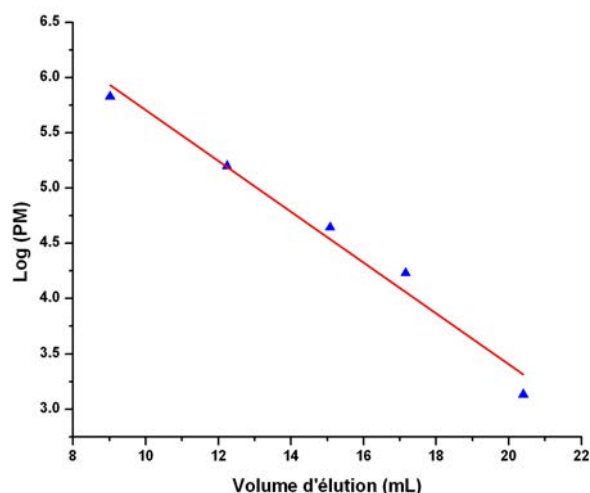


Figure 68. Droite étalon de la colonne analytique Superdex 200 10/300.

La colonne Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) a un domaine de fractionnement de 10 à 600 kDa. La colonne est étalonnée par des marqueurs de masses moléculaires connues (Bio-Rad) décrits dans la légende de la Figure 64 (p.125). L'équation de la droite étalon déterminée à l'aide de ces marqueurs est : $\log \text{PM} = -0,2 * V_e + 7,6$.

3. Microcalorimétrie de titration isotherme

Un appareil de microcalorimétrie de titration isotherme (ITC pour « Isothermal Titration Calorimetry ») permet de déterminer les grandeurs thermodynamiques caractéristiques des interactions intermoléculaires en solution en suivant les échanges de chaleur associés à la formation du complexe. Le microcalorimètre contient deux cellules isolées de l'environnement externe par une enceinte adiabatique maintenue à température constante. La première cellule contenant la solution tampon est la cellule de référence. La seconde cellule est la cellule de mesure contenant l'analyte à tester. Une seringue d'injection permet l'ajout d'aliquotes de ligand dans la cellule de mesure à intervalles réguliers jusqu'à saturation du système. Cette seringue est munie d'une pale permettant d'homogénéiser le contenu de la cellule de mesure. Le temps entre chaque injection est défini de manière à

permettre au système d'atteindre l'équilibre thermique. À chaque injection, l'interaction entre les deux molécules s'accompagne d'un dégagement ou d'une absorption de chaleur (réaction qualifiée respectivement d'exo- et d'endothermique) entraînant une variation de la température de la cellule de mesure. L'appareil équilibre alors la température de la cellule de mesure par rapport à celle de référence en fonction de cette variation en appliquant une faible énergie thermique par le biais de résistances. La puissance fournie ($\mu\text{cal}/\text{sec}$) est représentée en fonction du temps puis intégrée pour donner la quantité de chaleur échangée à chaque injection.

Les titrations sont réalisées à l'aide d'un appareil ITC200 de Microcal™ (GE Healthcare) à une température de 25°C avec 20 injections de 2 μL (à l'exception de la première injection de 0,4 μL) de ligand et un délai de 3 min entre chaque injection. L'agitation est fixée à 750 rpm. La concentration de la protéine Orp1 sous forme réduite ou oxydée disulfure dans la seringue d'injection est fixée à 200 ou à 500 μM . La cellule de mesure de l'appareil contient soit la protéine Yap1^{SSS SSS}, soit la protéine Ybp1, soit un mélange équimolaire de ces deux protéines à une concentration de 20 ou 50 μM . L'ensemble des expériences est mené dans le tampon D. Des expériences témoins menées en remplaçant le contenu de la seringue par le tampon D ont été réalisées pour mesurer les échanges de chaleur libérés par effet de dilution, et ce signal a été soustrait des données expérimentales après intégration.

Les données expérimentales sont ajustées à un modèle de site de liaison unique permettant de déterminer la constante d'association K_A , l'enthalpie de l'interaction ΔH et la stoechiométrie. Les variations de l'énergie libre (ΔG) et de l'entropie (ΔS) associées à l'interaction ont été déterminées en utilisant les Équation 26 et Équation 27 (avec T la température et R la constante universelle des gaz parfaits).

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad \text{Équation 26}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Équation 27}$$

VII. Caractérisation cinétique du cycle peroxydase de Orp1

1. Technique d'étude des propriétés enzymatiques de Orp1 à l'état pré-stationnaire

Cette technique est fondée sur la variation d'intensité de la fluorescence intrinsèque de Orp1 sauvage en fonction de son état d'oxydation. Les mesures ont été effectuées à l'aide

d'un appareil de cinétique rapide « stopped flow » SX20 (Applied photophysics) (Figure 41, p.77). Cet appareil permet de mélanger rapidement volume à volume deux solutions contenues initialement dans deux seringues et de suivre l'émission de fluorescence du mélange en fonction du temps avec un temps mort de l'ordre de 1 ms. La première seringue contient H₂O₂ (de 10 µM à 40 mM), dans du tampon D, la deuxième seringue contient Orp1 sauvage (4 µM) dans le même tampon. La température est maintenue à 25°C. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm et un filtre permet de mesurer l'émission de fluorescence aux longueurs d'onde supérieures à 320 nm. Les données expérimentales obtenues sont analysées par ajustement global des données par le logiciel KinTek Global Kinetic Explorer™.

2. Utilisation du logiciel KinTek Global Kinetic Explorer™

Le logiciel KinTek Global Kinetic Explorer™ (KinTek Corporation) est un outil d'analyse de cinétique enzymatique (329). Ce logiciel ajuste de façon globale un ensemble de données brutes correspondant à la cinétique d'évolution du signal obtenu, pour plusieurs concentrations en substrat, directement à un mécanisme modèle décrit par un ensemble d'équations chimiques caractérisées chacune par une constante de vitesse. L'objectif est de vérifier si le mécanisme modèle décrit fidèlement les données expérimentales, et de déterminer la valeur des constantes cinétiques de chaque étape. Le mécanisme modèle postulé est traduit sous forme d'équations cinétiques différentielles et d'équations de conservation de masse, qui sont intégrées numériquement pour décrire la cinétique réactionnelle. Les données expérimentales sont ensuite ajustées au modèle postulé par régression non linéaire selon l'algorithme de Levenberg-Marquardt, correspondant à une recherche itérative des paramètres inconnus (comme les constantes de vitesse) permettant la minimisation de la variance ou du paramètre Chi² (Variance normalisée par rapport à la déviation standard pour chaque point).

Ce logiciel permet également d'estimer si les paramètres ajustés, correspondant aux constantes de vitesse, sont correctement contraints par les données expérimentales. Cette fonction du logiciel, nommée « fit space », est un algorithme qui permet d'explorer l'espace dans lequel chaque paramètre peut varier (330). Pour chaque valeur d'un paramètre individuel (Fispace 1D) ou d'une paire de paramètres (FitSpace 2D), tous les autres paramètres évoluent (ne sont pas contraints) pour trouver le meilleur ajustement par régression non linéaire. La valeur normalisée du chi² (chi²/chi² minimum) résultante est alors représentée graphiquement en fonction du paramètre variable/de la paire de paramètres, ce qui permet une évaluation immédiate du niveau de contrainte des paramètres par les données expérimentales.

Cet algorithme permet ainsi de définir les limites haute et basse de chaque paramètre individuel mais également de définir si certains paramètres sont interdépendants (Espace 2D). Ces limites de confiance définissent une marge d'erreur sur chaque paramètre beaucoup plus fiable que l'erreur standard issue de l'ajustement lui-même.

3. Étude de l'activité de Orp1 à l'état stationnaire

L'activité peroxydase de Orp1 sauvage est mesurée dans le tampon D à 25°C en utilisant la Trx d'*E. coli* comme réducteur, qui permet de coupler la réaction au système TR d'*E. coli*/NADPH et de suivre la réaction au cours du temps à 340 nm via la consommation de NADPH à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption UVMc2 (Safas, Monaco) (Figure 9 A, p.25). La Trx et la TR d'*E. coli* ont été produites et purifiées au laboratoire selon les protocoles décrits précédemment (289, 290). Le mélange réactionnel contient Orp1 sauvage à 50 nM, H₂O₂ à 100 µM, Trx à 50 µM, TR à 0,5 µM et NADPH à 250 µM, l'ajout de Orp1 déclenchant la réaction. Une mesure à blanc est enregistrée systématiquement avant l'ajout de Orp1 et est déduite de la mesure finale.

Les conditions optimales de ce couplage ont été déterminées en mesurant : (a) la concentration optimale de TR, au delà de laquelle la vitesse mesurée ne varie plus, (b) les paramètres cinétiques à l'état stationnaire de Orp1 sauvage pour la Trx d'*E. Coli*, dans les conditions du test d'activité en faisant varier la concentration de TR ou de Trx une à une, la concentration des autres acteurs du système couplé restent fixe. Dans le cas de la Trx, la variation de la constante de vitesse mesurée k_{obs} est ajustée par régression non linéaire à l'équation de Michaelis-Menten (Équation 22, p.101).

L'activité peroxydase de Orp1 est suivie en présence de concentrations croissantes de 50 nM à 20 µM de la protéine Yap1^{SSSSS}, Ybp1 ou d'un mélange équimolaire de ces deux protéines. Les activités peroxydases de la Tsa1 et la MsrA sauvage (*E. coli*) sont mesurées à titre de témoin. La même stratégie est utilisée sur un mélange Tsa1 sauvage 0,5 µM, H₂O₂ 100 µM, Trx 50 µM, TR 1 µM et NADPH 200 µM et sur un mélange MsrA sauvage 1 µM, méthionine sulfoxyde (MetO) 100 mM, Trx 100 µM, TR 4,8 µM et NADPH 200 µM.

VIII. Caractérisation enzymatique de la réaction entre Yap1 et Orp1

1. Étude de la réactivité entre Orp1 et le 2-thiolpyridine

La réactivité des acides sulféniques avec thiol est mise à profit avec l'utilisation d'une sonde cinétique chromophore, le 2-thiolpyridine (2TP). En effet, le 2TP possède un

message d'absorption caractéristique à 343 nm dû à la résonance d'un doublet d'électrons libre du soufre avec le cycle pyridine. Le message disparaît lorsque l'atome de soufre du 2TP est engagé dans la formation d'un pont disulfure (Figure 48, p.86).

La réaction du 2TP avec Orp1^{CSA} est suivie à l'aide d'un appareil de cinétique rapide « stopped flow » réglé en mode double mélange (Figure 49, p.87). Ce mode permet dans un premier temps de mélanger la protéine Orp1^{CSA} (5 μ M) avec H₂O₂ (50 μ M) (concentration finales) contenu initialement dans deux seringues, et de laisser la réaction évoluer pendant un temps défini, noté temps de pré-incubation, dans une boucle de vieillissement. Dans un deuxième temps, un second mélange a lieu entre le contenu de la boucle de vieillissement et le 2TP (de 25 à 75 μ M), et l'absorbance à 343 nm est suivie dès les premiers instants de la réaction avec un temps mort de 2 ms. La température est fixée à 30°C et tout les réactants sont présents dans le tampon A. La variation de l'absorbance à 343 nm est suivie au cours du temps et les tracés expérimentaux obtenus sont ajustés par régression non linéaire à une équation exponentielle décroissante monophasique (Équation 16, p.88), ou biphasique (Équation 17, p.89).

Le produit de la réaction entre Orp1^{CSA} et H₂O₂ a été caractérisé par spectrométrie de masse en conditions natives. Pour obtenir une résolution en temps compatible avec l'enzyme Orp1, un montage de cinétique rapide a été réalisé (Figure 52, p.90). Celui-ci correspond à un double pousse seringue portant deux seringues reliées par un connecteur T relié lui-même à une boucle de réaction connectée à l'aiguille d'un spectromètre de masse à ionisation électrospray (MicrOTOF-Q Bruker Daltonics). La première seringue contient Orp1^{CSA} à 20 μ M dans le tampon F et la seconde contient H₂O₂ à 40 μ M dans le même tampon. Différents temps de réaction sont définis par le débit appliqué au pousse seringue, permettant de moduler le temps de passage du mélange dans la boucle de réaction, avant l'analyse par spectrométrie de masse. Les masses moléculaires de la protéine d'intérêt ont été déterminées par H. Mazon au sein du service commun de spectrométrie de masse et des techniques chromatographiques couplées de l'UMR 7565 CNRS UL, Institut Jean Barriol.

La masse moléculaire de Orp1 modifiée par le 2TP a été obtenue par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes. Pour cela, la protéine Orp1 réduite a été dessalée sur une colonne Econo-Pac® 10 DG (Bio-Rad) dans le tampon F. Avant l'analyse par spectrométrie de masse, dans un premier temps, la protéine Orp1^{CSA} (10 μ M) a été incubée 10 s avec H₂O₂ (50 μ M) (concentrations finales), dans un second temps le 2TP (50 μ M) a été rajouté à la réaction et laissé incubé 20 s. Le mélange a été ensuite dilué dans un solvant

Acétonitrile/H₂O/acide formique 50/49/1 et analysé à l'aide d'un spectromètre de masse à ionisation électrospray (MicroTOF-Q Bruker Daltonics).

2. Cinétique rapide : « quenched flow »

Pour suivre la formation de l'adduit disulfure Yap1—S—S—Orp1, 10 µM de la protéine Yap1^{SSS CSS} et 50 µM ou différentes concentrations de Orp1 sauvage (sous forme réduite et oxydée) ou Orp1^{CSA} en présence et en absence de 10 µM de Ybp1 sont mélangées avec H₂O₂ à 100 µM (concentrations finales après mélange) à l'aide d'un appareil de cinétique rapide à 3 seringues de type « quenched flow » (RQF3, KinTek Corporation, Austin) (Figure 69, p.138). La réaction se déroule à température ambiante dans le tampon D.

Le « quenched flow » RQF3 permet de mélanger rapidement deux solutions, de laisser évoluer le mélange pendant un temps défini compris entre 2,5 et 200000 ms puis de bloquer la réaction par acidification (1% TFA). Au niveau de cet appareil, les réactifs sont chargés dans deux boucles d'échantillon présentes de part et d'autre d'une boucle de réaction (Figure 69 A, p.138). Les seringues d'entraînement A et B contiennent seulement du tampon D, alors que la seringue C contient la solution de blocage acide (TFA 1%). Au cours d'une expérience, une première poussée du plateau a lieu. Cette poussée est responsable de l'activation des seringues d'entraînement : le tampon pousse les réactifs dans la boucle de réaction où le mélange évolue pendant le temps défini par l'utilisateur (Figure 69 C, p.138). Lors de cette première poussée, la seringue C contenant la solution acide est également activée mais la solution est alors dirigée vers la boucle de sortie. Une fois le temps défini écoulé, une deuxième poussée du plateau a lieu. Les seringues d'entraînement poussent le mélange réactionnel vers la boucle de sortie où ce dernier rencontre la solution acide à la jonction de la boucle de réaction et de la boucle de sortie par l'activation concomitante de la seringue C (Figure 69 D, p.138). La réaction est alors arrêtée et le produit de la réaction peut être récupéré à l'extrémité de la boucle de sortie. Le mélange final présente un volume de 150 µL et contient 15 µL de chaque réactif (le mélange de protéine et H₂O₂), 70 µL de tampon D et 50 µL de solution acide (TFA 0,33% final). La technique de « quenched flow » est une méthode point par point : pour obtenir une cinétique réactionnelle, de multiples mélanges réactionnels bloqués à différents temps, sont nécessaires et chacun doit être analysé « *ex situ* ».

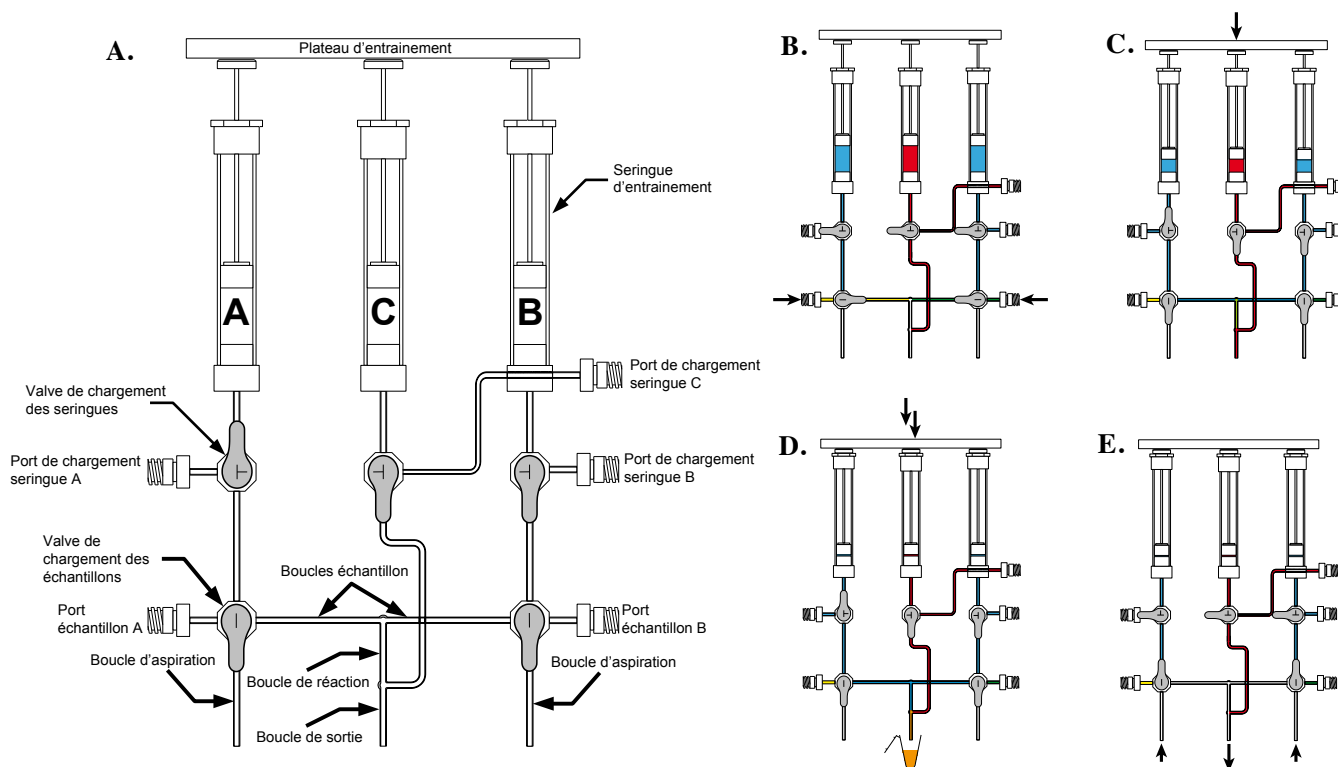


Figure 69. Schéma de fonctionnement du système « quenched flow » à trois seringues RQF3 (KinTek Corporation).

A. Schéma du système « quenched flow » RQF3. Le plateau d'entraînement est déplacé par un moteur de type servo précis et puissant par un mécanisme de vis sans fin. L'appareil dispose de 8 boucles de réaction interchangeables à modifier selon le temps de réaction défini par le manipulateur via le terminal de commande. **B. à E.** Déroulement d'un cycle expérimental. **B.** Les seringues A et B sont chargées avec du tampon par leurs ports de chargements respectifs. La seringue C est chargée en solution de blocage acide (TFA 1%). Les réactifs sont injectés dans les boucles de chargement (enzyme d'une part et substrat d'autre part) à l'aide d'une seringue. **C. et D.** Une fois les valves placées dans la bonne position, l'expérience peut être lancée par l'expérimentateur *via* le terminal. Deux mouvements consécutifs du plateau d'entraînement déplaçant le tampon contenu dans les seringues d'entraînement conduisent au mélange des réactifs et au vieillissement de ce dernier dans la boucle de réaction, suivie par l'arrêt de la réaction en conditions acide à la jonction entre la boucle de réaction et la boucle de sortie et à l'expulsion du produit de la réaction. **E.** Le cycle se termine par le nettoyage des boucles échantillons, de réaction et de sortie, en appliquant l'entrée d'une pompe à vide à l'extrémité de la boucle de sortie et une solution de tampon puis de méthanol aux extrémités des boucles d'aspiration. Ce cycle, terminé par un temps d'attente de 20 à 60 s nécessaire à l'évaporation du méthanol, dure autour de deux minutes si bien qu'une série de données de 10 points peut être réalisée en 20 minutes environ. Les boucles échantillon présentant un volume de seulement 15 μL chacune, cette série de 10 points peut être acquise avec un volume minimal inférieur à 150 μL de solution de protéine.

3. Quantification par chromatographie en phase inverse

La quantification des espèces présentes dans le mélange réactionnel est réalisée par chromatographie liquide HPLC en phase inverse. Un volume de 50 μL de chaque échantillon obtenu au « quenched flow » est injecté sur une colonne de chromatographie de type C8 (Vydac 208TP54, 4,6x250 mm 300 Å et 5 μm , Grace) couplée au système HPLC UltiMate®

3000 (Dionex) préalablement équilibré en H₂O 0.1% TFA. Les différentes espèces du mélange injecté sont séparées par un gradient linéaire de 35 à 41% d'acétonitrile 0.1% de TFA en 25 volumes colonnes. L'intégration des pics d'intérêt est réalisée à 215 nm. Chaque espèce isolée est identifiée par spectrométrie de masse électrospray en conditions dénaturantes. La vitesse de formation de l'adduit Yap1—S—S—Orp1 a été déterminée par ajustement des données expérimentales à l'équation d'une mono-exponentielle croissante (Équation 21, p.96). Ces expériences ont été réalisées au laboratoire nGERE (UMR U954 INSERM) avec l'aimable participation de J.M. Alberto.

IX. Définition des paramètres cinétiques du cycle peroxydase de Orp1 en présence du complexe Yap1·Ybp1

Les paramètres cinétiques de formation du pont disulfure intramoléculaire (constante de vitesse k_{SS}) et de formation de l'intermédiaire acide sulfénique (constante de vitesse k_{SOH}) de Orp1 sont définis en présence du complexe Yap1·Ybp1 selon un protocole identique à celui présenté aux paragraphes VIII.2 (p.137) et 0 (p.138). L'expérience est menée en présence d'un mélange équimolaire de Yap1^{SSS SSS} et de Ybp1, avec des concentrations de 0, 15 et 75 μ M, la concentration de Orp1 est fixée à 15 μ M (forme sauvage et Orp1^{CSA}) (concentrations finales). Les pics correspondants aux espèces Orp1 oxydée sous forme acide sulfénique et oxydée sous forme disulfure sont intégrés à 215 nm.

Bibliographie

1. Chance B. The state of catalase in the respiring bacterial cell. *Science*. 1952;116(3008):202-3.
2. Plaine HL. The effect of oxygen and of hydrogen peroxide on the action of a specific gene and on tumor induction in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1955;40(2):268.
3. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. 1973;(53):741-4.
4. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. *Oxidative Stress*. 1985;1-8.
5. Varma SD, Chand D, Sharma YR, Kuck JFJ, Richards RD. Oxidative stress on lens and cataract formation: role of light and oxygen. *Curr Eye Res*. 1984;1(3):35-57.
6. Roth EJ, Raventos-Suarez C, Gilbert H, Stump D, Tanowitz H, Rowin KS, et al. Oxidative stress and falciparum malaria: a critical review of the evidence. *Prog Clin Biol Res*. 1984;155:35-43.
7. Olson RD, Boerth RC, Gerber JG, Nies AS. Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress. *Life Sci*. 1981;29(14):1393-401.
8. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res*. sept 1992;275(3-6):257-66.
9. Czech MP, Lawrence JC, Lynn WS. Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin. *Proc Natl Acad Sci*. 1974;71(10):4173-7.
10. White AA, Crawford KM, Patt CS, Lad PJ. Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1976;251(23):7304-12.
11. Heffetz D, Zick Y. H₂O₂ potentiates phosphorylation of novel putative substrates for the insulin receptor kinase in intact Fao cells. *J Biol Chem*. 1989;264(17):10126-32.
12. burdon R, Rice-Evans C. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. 1989;345-58.
13. Staal FJ, Roederer M, Herzenberg LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci*. 1990;87(24):9943-7.
14. Schreck R, Rieber P, A.Baeuerle P. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*. 1991;10(8):2247-58.
15. Sundaresan M, Yu Z-X, J. Ferrans V, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 1995;270:296-9.
16. Meier B, Cross AR, Hancock JT, Kaup FJ, Jones OT. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J*. 1991;275:241-5.
17. Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, Edens WA. Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(10):459-61.
18. Cheng G, Cao Z, Xu X, Van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 2001;269(1):131-40.
19. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. mars 2004;4(3):181-9.
20. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005;293(11):1338-47.

Bibliographie

21. Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Meyskens FL, Omenn GS, et al. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: Incidence of Lung Cancer and Cardiovascular Disease Mortality During 6-Year Follow-up After Stopping β -Carotene and Retinol Supplements. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1 déc 2004;96(23):1743-50.
22. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(9-10):1865-79.
23. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* mai 2008;4(5):278-86.
24. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. 1978;201:875-80.
25. Winterbourn, Christine C CC, Metodiewa D. Reaction of superoxide with glutathione and other thiols. *Methods Enzym.* 1995;251:81-6.
26. Forman HJ, Fridovich I. Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. *Arch Biochem Biophys.* 1973;158(1):396-400.
27. Gutteridge J, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899(1):136-47.
28. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol.* 2002;3(12):1129-34.
29. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59:527-605.
30. Bonini MG, Augusto O. Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. *J Biol Chem.* 30 mars 2001;276(13):9749-54.
31. Winterbourn CC, Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* août 1999;27(3-4):322-8.
32. Pattison DI, Davies MJ. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem Res Toxicol.* oct 2001;14(10):1453-64.
33. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 1 févr 1993;300(2):535-43.
34. Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzym Relat Areas Mol Biol.* 1990;63:69-172.
35. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The Neutrophil NADPH Oxidase. *Arch Biochem Biophys.* janv 2002;397(2):342-4.
36. Suh Y-A, Arnold RS, Lassègue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature.* 1999;401:79-82.
37. Bibersine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Bauseef WM, Dinauer MC. Heme-ligating histidines in flavocytochromes b558. Identification of specific histidines in gp91phox. *J Biol Chem.* 2001;276:31105-12.
38. Banfi B, Molinar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demareux N, et al. A Ca²⁺ activated NADPH oxidase in testis, spleen and lymph nodes. *J Bio Chem.* 2001;276:37594-601.
39. Edens WA. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol.* 20 août 2001;154(4):879-92.

40. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med.* 1 août 2007;43(3):319-31.
41. Paulsen CE, Truong TH, Garcia FJ, Homann A, Gupta V, Leonard SE, et al. Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity. *Nat Chem Biol.* janv 2012;8(1):57-64.
42. Krieger-Brauer HI, Kather H. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest.* mars 1992;89(3):1006-13.
43. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutase (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001;276:38388-93.
44. Lee WK, Thévenod F. A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions ? *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291:C195-202.
45. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2002;277:44784-90.
46. Koza RA, Kozak UC, Brown LJ, Leither EH, MacDonald MJ, Kozak LP. Sequence and tissue-dependent RNA expression of mouse FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 1996;336:97-104.
47. Tretter L, Adam-Vizi V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalysed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci.* 2004;24:7771-8.
48. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, et al. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci.* 2004;24:7779-88.
49. Kaludercic N, Carpi A, Menabo R, Di Lisa F, Paolocci N. Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813:1323-32.
50. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, et al. Electron Transfer between Cytochrome c and p66Shc Generates Reactive Oxygen Species that Trigger Mitochondrial Apoptosis. *Cell.* juill 2005;122(2):221-33.
51. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature.* 18 nov 1999;402(6759):309-13.
52. Gertz M, Steegborn C. The lifespan-regulator p66Shc in mitochondria: redox enzyme or redox sensor? *Antioxid Redox Signal.* 2010;13:1417-28.
53. Chung YM, Kim JS, Yoo YD. A novel protein, Romo1, induces ROS production in the mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347:649-55.
54. Kim JJ, Lee SB, Park JK, Yoo YD. TNF alpha induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. *Cell Death Differ.* 2010;17:1420-34.
55. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism : Implications for human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822:1363-73.
56. Reddy JK, Mannaerts GP. Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1994;14:343-70.

Bibliographie

57. Li Y, Tharappel JC, Cooper S, Glenn M, Glauert HP, Spear BT. Expression of the hydrogen peroxide-generating enzyme fatty acyl CoA oxidase activates NF-kappaB. *DNA Cell Biol.* févr 2000;19(2):113-20.
58. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* déc 2006;1763(12):1755-66.
59. Reddy JK. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: biotic and xenobiotic sensing. *Am J Pathol.* 2004;164:2305-21.
60. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J.* 2008;275:3278-89.
61. Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 1970;245:4053-7.
62. Bindoli A, Cavallini L, Rigobello MP, Coassin M, Di Lisa F. Modification of the xanthine-converting enzyme of perfused rat heart during ischemia and oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1988;4:163-7.
63. Bayne ACV, Mockett RJ, Orr WC, Sohal RS. Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and aging in transgenic. *Drosophila.* *Biochem J.* 2005;391:277-84.
64. Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, et al. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem.* 2007;282:24407-15.
65. Fita I, Rossmann MG. The active center of catalase. *J Mol Biol.* 1985;185:21-37.
66. Kato S, Ueno T, Fukuzumi S, Watanabe Y. Catalase reaction by myoglobin mutants and native catalase: mechanistic investigation by kinetic isotope effect. *J Biol Chem.* 2004;279:52376-81.
67. Chance B, Greenstein DS, Roughton FJW. The mechanism of catalase action. I. Steady-state analysis. *Arch Biochem Biophys.* juin 1952;37(2):301-21.
68. Yano S, Arroyo N, Yano N. Catalase binds GRB2 in tumor cells when stimulated with serum or ligand for integrin receptors. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:1542-54.
69. Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* janv 2006;13(1):211-20.
70. Sen CK, Khanna S, Babior BM, Hunt TK, Ellison EC, Roy S. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J Biol Chem.* 6 sept 2002;277(36):33284-90.
71. Sen CK. Redox signal in wound healing. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(11):1348-61.
72. Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SC. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (GPx) superfamily. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1501-14.
73. Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0.2-nm Resolution. *Wild.* 1983;69:51-69.
74. Tosatto V, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, et al. The catalytic site of glutathione peroxidase. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1515-26.

75. Maiorino M, Roche C, Kiess M, Koenig K, Gawlik D, Matthes M, et al. A selenium-containing phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in *Schistosoma mansoni*. *Eur J Biochem.* 1996;238:838-44.
76. Gladyshev VN. Selenoproteins and selenoproteoms, in: D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium. Its Molecular Biology and Role in Human Health.* Springer N Y. 2006;99-110.
77. Flohé L. *Changing Paradigms in Thiology.* Elsevier 2010;1-39
78. Mills GC. Hemoglobin catabolism I. Glutathion peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 1957;229:189-97.
79. Christophersen BO. Reduction of X-ray-induced DNA and thymine hydroperoxides by rat liver glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1969;186:387-9.
80. Little C, O'Brien PJ. An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1968;31:145-50.
81. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1985;839:62-70.
82. Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem.* 2006;387:1329-35.
83. Kim IH, Kim K, Rhee SG. Induction of an antioxidant protein of *Saccharomyces cerevisiae* by O₂, Fe³⁺, or 2-mercaptoethanol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* août 1989;86(16):6018-22.
84. Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract.* sept 1999;45(2-3):101-12.
85. Koh CS, Didierjean C, Navrot N, Panjikar S, Mulliert G, Rouhier N, et al. Crystal structures of a poplar thioredoxin peroxidase that exhibits the structure of glutathione peroxidases: insights into redox-driven conformational changes. *J Mol Biol.* juill 2007;370(3):512-29.
86. Schlecker T, Comini MA, Melchers J, Ruppert T, Krauth-Siegel RL. Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type trypanoxin peroxidase of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* 1 août 2007;405(3):445-54.
87. Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* janv 2003;28(1):32-40.
88. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem.* févr 2012;287(7):4403-10.
89. Fourquet S, Huang M-E, D'Autreaux B, Toledano MB. The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling. *Antioxid Redox Signal.* sept 2008;10(9):1565-76.
90. Mishina NM, Tyurin-Kuzmin PA, Markvicheva KN, Vorotnikov AV, Tkachuk VA, V. Laketa, et al. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(1):1-7.
91. Lukyanov KA, Belousov VV. Genetically encoded fluorescent redox sensors. *Biochim Biophys Acta.* févr 2014;1840(2):745-56.
92. Seaver LC, Imlay JA. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* déc 2001;183(24):7182-9.

Bibliographie

93. Makino N, Sasaki K, Hashida K, Sakakura Y. A metabolic model describing the H₂O₂ elimination by mammalian cells including H₂O₂ permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes: comparison with experimental data. *Biochim Biophys Acta*. 4 août 2004;1673(3):149-59.
94. Sousa-Lopes A, Antunes F, Cyrne L, Marinho HS. Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Lett*. 3 déc 2004;578(1-2):152-6.
95. Antunes F, Cadenas E. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett*. 16 juin 2000;475(2):121-6.
96. Branco MR, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F. Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 20 févr 2004;279(8):6501-6.
97. Pedroso N, Matias AC, Cyrne L, Antunes F, Borges C, Malhó R, et al. Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med*. 15 janv 2009;46(2):289-98.
98. Henzler T, Steudle E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H(2)O(2) across water channels. *J Exp Bot*. déc 2000;51(353):2053-66.
99. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*. 17 avr 1992;256(5055):385-7.
100. Wu B, Beitz E. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cell Mol Life Sci*. sept 2007;64(18):2413-21.
101. Bienert GP, Moller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Moller IM, Schjoerring JK, et al. Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. *J Biol Chem*. 12 janv 2007;282(2):1183-92.
102. Bienert GP, Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. mai 2014;1840(5):1596-604.
103. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*. août 2006;1758(8):994-1003.
104. Ohba M, Shibnuma M, Kuroki T, Nose K. Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of *egr-1* in mouse osteoblastic cells. *J Cell Biol*. août 1994;126(4):1079-88.
105. Thannickal VJ, Fanburg BL. Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem*. 22 déc 1995;270(51):30334-8.
106. Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, et al. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J*. 15 oct 1989;263(2):539-45.
107. Lo YY, Wong JM, Cruz TF. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH₂-terminal kinases. *J Biol Chem*. 28 juin 1996;271(26):15703-7.
108. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, et al. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 3 janv 1997;272(1):217-21.

109. Krieger-Brauer HI, Kather H. Antagonistic effects of different members of the fibroblast and platelet-derived growth factor families on adipose conversion and NADPH-dependent H₂O₂ generation in 3T3 L1-cells. *Biochem J.* 15 avr 1995;307 (Pt 2):549-56.
110. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* août 1991;10(8):2247-58.
111. Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, et al. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 oct 1997;94(21):11233-7.
112. Natarajan V, Taher MM, Roehm B, Parinandi NL, Schmid HH, Kiss Z, et al. Activation of endothelial cell phospholipase D by hydrogen peroxide and fatty acid hydroperoxide. *J Biol Chem.* 15 janv 1993;268(2):930-7.
113. Min DS, Kim EG, Exton JH. Involvement of tyrosine phosphorylation and protein kinase C in the activation of phospholipase D by H₂O₂ in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* 6 nov 1998;273(45):29986-94.
114. Hecht D, Zick Y. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 oct 1992;188(2):773-9.
115. Sullivan SG, Chiu DT, Errasfa M, Wang JM, Qi JS, Stern A. Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells. *Free Radic Biol Med.* mars 1994;16(3):399-403.
116. Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 19 juin 1998;273(25):15366-72.
117. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* 18 nov 1994;79(4):583-93.
118. Shirasu K, Dixon RA, Lamb C. Signal transduction in plant immunity. *Curr Opin Immunol.* févr 1996;8(1):3-7.
119. Rosner JL, Storz G. Regulation of bacterial responses to oxidative stress. *Curr Top Cell Regul.* 1997;35:163-77.
120. Zheng M. Activation of the OxyR Transcription Factor by Reversible Disulfide Bond Formation. *Science.* mars 1998;279(5357):1718-22.
121. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-harel O, Eisen MB, Storz G, et al. Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Mol Biol Cell.* 2000;11(December):4241-57.
122. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem.* 1987;22(2):111-80.
123. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 10 nov 1968;243(21):5753-60.
124. Reddie KG, Carroll KS. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr Opin Chem Biol.* déc 2008;12(6):746-54.
125. Nagy P, Karton A, Betz A, Peskin AV, Pace P, O'Reilly RJ, et al. Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with hydrogen peroxide: a kinetic and computational study. *J Biol Chem.* 20 mai 2011;286(20):18048-55.

Bibliographie

126. Nordstrand K, Aslund F, Meunier S, Holmgren A, Otting G, Berndt KD. Direct NMR observation of the Cys-14 thiol proton of reduced Escherichia coli glutaredoxin-3 supports the presence of an active site thiol-thiolate hydrogen bond. *FEBS Lett.* 23 avr 1999;449(2-3):196-200.
127. Guddat LW, Bardwell JC, Martin JL. Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization. *Struct Lond Engl* 1993. 15 juin 1998;6(6):757-67.
128. Wang P-F, Flynn AJ, Naor MM, Jensen JH, Cui G, Merz KM, et al. Exploring the role of the active site cysteine in human muscle creatine kinase. *Biochemistry (Mosc).* 26 sept 2006;45(38):11464-72.
129. Salsbury FR, Knutson ST, Poole LB, Fetrow JS. Functional site profiling and electrostatic analysis of cysteines modifiable to cysteine sulfenic acid. *Protein Sci.* févr 2008;17(2):299-312.
130. Czech MP, Lawrence JC, Lynn WS. Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* oct 1974;71(10):4173-7.
131. Hamann M, Zhang T, Hendrich S, Thomas JA. Quantitation of protein sulfinic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cysteine sites in cellular proteins. *Methods Enzymol.* 2002;348:146-56.
132. Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(1):32-40.
133. Yang K-S, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, et al. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J Biol Chem.* 11 oct 2002;277(41):38029-36.
134. Nidetzky B. Stability and stabilization of D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis*. *Biochem Soc Trans.* déc 2007;35(Pt 6):1588-92.
135. Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, et al. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J Biol Chem.* 21 avr 2006;281(16):10816-24.
136. Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 juin 2004;101(24):9103-8.
137. Murakami T, Nojiri M, Nakayama H, Odaka M, Yohda M, Dohmae N, et al. Post-translational modification is essential for catalytic activity of nitrile hydratase. *Protein Sci Publ Protein Soc.* mai 2000;9(5):1024-30.
138. Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Meng T-C, Hinks J a, Tonks NK, et al. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature.* juin 2003;423(6941):769-73.
139. van Montfort RLM, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature.* 12 juin 2003;423(6941):773-7.
140. Sivaramakrishnan S, Keerthi K, Gates KS. A chemical model for redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) activity. *J Am Chem Soc.* août 2005;127(31):10830-1.
141. Tanner JJ, Parsons ZD, Cummings AH, Zhou H, Gates KS. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases: structural and chemical aspects. *Antioxid Redox Signal.* juill 2011;15(1):77-97.

142. Salmeen A, Barford D, Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(5-6):560-77.
143. Yang J, Groen A, Lemeer S, Jans A, Slijper M, Roe SM, et al. Reversible oxidation of the membrane distal domain of receptor PTPalpha is mediated by a cyclic sulfenamide. *Biochemistry (Mosc)*. 23 janv 2007;46(3):709-19.
144. Haynes AC, Qian J, Reisz JA, Furdui CM, Lowther WT. Molecular Basis for the Resistance of Human Mitochondrial 2-Cys Peroxiredoxin 3 to Hyperoxidation. *J Biol Chem*. 3 sept 2013;288(41):29714-23.
145. Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 21 mai 2010;396(1):120-4.
146. Arnér ESJ. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta*. juin 2009;1790(6):495-526.
147. Krause G, Lundström J, Barea JL, Pueyo de la Cuesta C, Holmgren A. Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin. *J Biol Chem*. 25 mai 1991;266(15):9494-500.
148. Kallis GB, Holmgren A. Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 10 nov 1980;255(21):10261-5.
149. Cheng Q, Sandalova T, Lindqvist Y, Arnér ESJ. Crystal structure and catalysis of the selenoprotein thioredoxin reductase 1. *J Biol Chem*. 6 févr 2009;284(6):3998-4008.
150. Fernandes AP, Holmgren A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal*. févr 2004;6(1):63-74.
151. Goldman R, Stoyanovsky DA, Day BW, Kagan VE. Reduction of Phenoxyl Radicals by Thioredoxin Results in Selective Oxidation of Its SH-Groups to Disulfides. An Antioxidant Function of Thioredoxin. *Biochemistry (Mosc)*. 1 avr 1995;34(14):4765-72.
152. Toledano MB, Kumar C, Le Moan N, Spector D, Tacnet F. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Lett*. 31 juill 2007;581(19):3598-607.
153. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*. 25 août 1989;264(24):13963-6.
154. Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem*. 20 juin 1997;272(25):15661-7.
155. Kumar C, Igbaria A, D'Autreaux B, Planson A-G, Junot C, Godat E, et al. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J*. 18 mai 2011;30(10):2044-56.
156. Kumar C, Igbaria A, D'Autreaux B, Planson A-G, Junot C, Godat E, et al. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J*. 8 avr 2011;30(10):2044-56.
157. Spector D, Labarre J, Toledano MB. 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*. 9 mars 2001;276(10):7011-6.

Bibliographie

158. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, et al. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* nov 2004;10(11):1200-7.
159. Cross JV, Templeton DJ. Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain. *Biochem J.* 1 août 2004;381(Pt 3):675-83.
160. Hurd TR, Requejo R, Filipovska A, Brown S, Prime TA, Robinson AJ, et al. Complex I within oxidatively stressed bovine heart mitochondria is glutathionylated on Cys-531 and Cys-704 of the 75-kDa subunit: potential role of CYS residues in decreasing oxidative damage. *J Biol Chem.* 5 sept 2008;283(36):24801-15.
161. Christman MF, Storz G, Ames BN. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* mai 1989;86(10):3484-8.
162. Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS, Ames BN. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell.* juill 1985;41(3):753-62.
163. Tao K, Makino K, Yonei S, Nakata A, Shinagawa H. Molecular cloning and nucleotide sequencing of oxyR, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. *Mol Gen Genet MGG.* sept 1989;218(3):371-6.
164. Schell MA. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol.* 1993;47:597-626.
165. Lee C, Lee SM, Mukhopadhyay P, Kim SJ, Lee SC, Ahn W-S, et al. Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol.* déc 2004;11(12):1179-85.
166. Aslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25 mai 1999;96(11):6161-5.
167. Choi H, Kim S, Mukhopadhyay P, Cho S, Woo J, Storz G, et al. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell.* 6 avr 2001;105(1):103-13.
168. Toledano MB, Kullik I, Trinh F, Baird PT, Schneider TD, Storz G. Redox-Dependent Shift of OxyR-DNA Contacts along an Extended DNA-Binding Site: A Mechanism for Differential Promoter Selection. *Cell.* 1994;78:897-909.
169. Seth D, Hausladen A, Wang Y-J, Stamler JS. Endogenous protein S-Nitrosylation in *E. coli*: regulation by OxyR. *Science.* 27 avr 2012;336(6080):470-3.
170. Kim SO, Merchant K, Nudelman R, Beyer WF, Keng T, DeAngelo J, et al. OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell.* 3 mai 2002;109(3):383-96.
171. Dubbs JM, Mongkolsuk S. Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *J Bacteriol.* oct 2012;194(20):5495-503.
172. Kundu JK, Surh Y-J. Nrf2-Keap1 signaling as a potential target for chemoprevention of inflammation-associated carcinogenesis. *Pharm Res.* juin 2010;27(6):999-1013.
173. Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochem Biokhimiia.* avr 2011;76(4):407-22.

174. Adams J, Kelso R, Cooley L. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol.* janv 2000;10(1):17-24.
175. Zipper LM, Mulcahy RT. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem.* 27 sept 2002;277(39):36544-52.
176. Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y. Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol.* nov 2003;5(11):1001-7.
177. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1 janv 1999;13(1):76-86.
178. Kang M-I, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim S-G, Yamamoto M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 févr 2004;101(7):2046-51.
179. Velichkova M, Guttman J, Warren C, Eng L, Kline K, Vogl AW, et al. A human homologue of *Drosophila* kelch associates with myosin-VIIa in specialized adhesion junctions. *Cell Motil Cytoskeleton.* mars 2002;51(3):147-64.
180. Fourquet S, Guerois R, Biard D, Toledano MB. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *J Biol Chem.* 2010;285(11):8463-71.
181. Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol.* nov 2003;23(22):8137-51.
182. Zhang DD, Lo S-C, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol.* déc 2004;24(24):10941-53.
183. Rachakonda G, Xiong Y, Sekhar KR, Stamer SL, Liebler DC, Freeman ML. Covalent modification at Cys151 dissociates the electrophile sensor Keap1 from the ubiquitin ligase CUL3. *Chem Res Toxicol.* mars 2008;21(3):705-10.
184. Gao L, Wang J, Sekhar KR, Yin H, Yared NF, Schneider SN, et al. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J Biol Chem.* 26 janv 2007;282(4):2529-37.
185. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* 2014;2:535-62.
186. Fourquet S, Guerois R, Biard D, Toledano MB. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *J Biol Chem.* 12 mars 2010;285(11):8463-71.
187. Chiarugi P. PTPs versus PTKs: the redox side of the coin. *Free Radic Res.* avr 2005;39(4):353-64.
188. Truong TH, Carroll KS. Redox regulation of protein kinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* août 2013;48(4):332-56.
189. Nakashima I, Takeda K, Kawamoto Y, Okuno Y, Kato M, Suzuki H. Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases. *Arch Biochem Biophys.* 1 févr 2005;434(1):3-10.
190. Korn SH, Wouters EF, Vos N, Janssen-Heininger YM. Cytokine-induced activation of nuclear factor-kappa B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of I κ B kinase. *J Biol Chem.* 21 sept 2001;276(38):35693-700.

Bibliographie

191. Reynaert NL, van der Vliet A, Guala AS, McGovern T, Hristova M, Pantano C, et al. Dynamic redox control of NF-kappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 août 2006;103(35):13086-91.
192. Jaspers I, Zhang W, Fraser A, Samet JM, Reed W. Hydrogen peroxide has opposing effects on IKK activity and IkappaBalpha breakdown in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. juin 2001;24(6):769-77.
193. Kamata H, Manabe T, Oka S ichi, Kamata K, Hirata H. Hydrogen peroxide activates IkappaB kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Lett*. 22 mai 2002;519(1-3):231-7.
194. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 3 janv 1997;275(5296):90-4.
195. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*. 1 mai 1998;17(9):2596-606.
196. Liu H, Nishitoh H, Ichijo H, Kyriakis JM. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol*. mars 2000;20(6):2198-208.
197. Nadeau PJ, Charette SJ, Toledano MB, Landry J. Disulfide Bond-mediated multimerization of Ask1 and its reduction by thioredoxin-1 regulate H(2)O(2)-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis. *Mol Biol Cell*. oct 2007;18(10):3903-13.
198. Taberner L, Aricescu AR, Jones EY, Szedlacsek SE. Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. *FEBS J*. mars 2008;275(5):867-82.
199. Tonks NK. PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett*. 3 juill 2003;546(1):140-8.
200. Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem*. 15 juin 2001;276(24):21938-42.
201. Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry (Mosc)*. 21 avr 1998;37(16):5633-42.
202. Maehama T, Taylor GS, Dixon JE. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:247-79.
203. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*. 29 oct 1999;99(3):323-34.
204. Lee S-R, Yang K-S, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H2O2. *J Biol Chem*. 7 juin 2002;277(23):20336-42.
205. Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta*. nov 2009;1790(11):1486-500.
206. Hall A, Nelson K, Poole LB, Karplus PA. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(3):795-815.

207. Ferrer-Sueta G, Manta B, Botti H, Radi R, Trujillo M, Denicola A. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem Res Toxicol.* 18 avr 2011;24(4):434-50.
208. Adimora NJ, Jones DP, Kemp ML. A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(6):731-43.
209. Oakley FD, Smith RL, Engelhardt JF. Lipid rafts and caveolin-1 coordinate interleukin-1beta (IL-1beta)-dependent activation of NFkappaB by controlling endocytosis of Nox2 and IL-1beta receptor 1 from the plasma membrane. *J Biol Chem.* 27 nov 2009;284(48):33255-64.
210. Hampton MB, Stamenkovic I, Winterbourn CC. Interaction with substrate sensitises caspase-3 to inactivation by hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 24 avr 2002;517(1-3):229-32.
211. Ferrer-Sueta G, Manta B, Botti H, Radi R, Trujillo M, Denicola A. Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide Reduction. *Chem Res Toxicol.* 18 avr 2011;24(4):434-50.
212. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 1 sept 2008;45(5):549-61.
213. Hugo M, Turell L, Manta B, Botti H, Monteiro G, Netto LES, et al. Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry (Mosc).* oct 2009;48(40):9416-26.
214. Moore RB, Mankad MV, Shriver SK, Mankad VN, Plishker GA. Reconstitution of Ca(2+)-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J Biol Chem.* 5 oct 1991;266(28):18964-8.
215. Cho C-S, Kato GJ, Yang SH, Bae SW, Lee JS, Gladwin MT, et al. Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. *Antioxid Redox Signal.* 1 juill 2010;13(1):1-11.
216. Trujillo M, Clippe A, Manta B, Ferrer-Sueta G, Smeets A, Declercq J-P, et al. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1 nov 2007;467(1):95-106.
217. Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem.* 7 juill 2000;275(27):20346-54.
218. LaButti JN, Chowdhury G, Reilly TJ, Gates KS. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by peroxyphosphate (=O₃POOH). *J Am Chem Soc.* 2 mai 2007;129(17):5320-1.
219. Denu JM, Zhou G, Guo Y, Dixon JE. The catalytic role of aspartic acid-92 in a human dual-specific protein-tyrosine-phosphatase. *Biochemistry (Mosc).* 14 mars 1995;34(10):3396-403.
220. Sohn J, Rudolph J. Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction. *Biochemistry (Mosc).* 2 sept 2003;42(34):10060-70.
221. Chen W, Wilborn M, Rudolph J. Dual-specific Cdc25B phosphatase: in search of the catalytic acid. *Biochemistry (Mosc).* 5 sept 2000;39(35):10781-9.
222. Flohé L, Loschen G, Günzler WA, Eichele E. Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Hoppe-Seylers Z Für Physiol Chem.* juin 1972;353(6):987-99.

Bibliographie

223. Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, et al. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem*. 25 oct 2002;277(43):41254-8.
224. Regino C, Richardson D. Bicarbonate-catalyzed hydrogen peroxide oxidation of cysteine and related thiols. *Inorg Chim Acta*. 2007;360:3971-7.
225. Barrett WC, DeGnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB. Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*. 3 déc 1999;274(49):34543-6.
226. Peskin AV, Low FM, Paton LN, Maghzal GJ, Hampton MB, Winterbourn CC. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *J Biol Chem*. 20 avr 2007;282(16):11885-92.
227. Rhee SG, Woo HA. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxid Redox Signal*. 1 août 2011;15(3):781-94.
228. Park J, Lee S, Lee S, Kang SW. 2-cys peroxiredoxins: emerging hubs determining redox dependency of Mammalian signaling networks. *Int J Cell Biol*. 2014;2014:715867.
229. Trotter EW, Rand JD, Vickerstaff J, Grant CM. The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. *Biochem J*. 15 mai 2008;412(1):73-80.
230. Veal EA, Findlay VJ, Day AM, Bozonet SM, Evans JM, Quinn J, et al. A 2-Cys Peroxiredoxin Regulates Peroxide-Induced Oxidation and Activation of a Stress-Activated MAP Kinase. *2004*;15:129-39.
231. Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J*. 2 oct 2000;19(19):5157-66.
232. Wen ST, Van Etten RA. The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev*. 1 oct 1997;11(19):2456-67.
233. Woo HA, Kang SW, Kim HK, Yang K-S, Chae HZ, Rhee SG. Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *J Biol Chem*. 28 nov 2003;278(48):47361-4.
234. Wood ZA. Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling. *Science*. 25 avr 2003;300(5619):650-3.
235. Hofmann B, Hecht HJ, Flohé, L. Peroxiredoxins. *Biol Chem*. 2002;383:347-64.
236. Schröder E, Littlechild JA, Lebedev AA, Errington N, Vagin AA, Isupov MN. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Struct Lond Engl* 1993. 15 juin 2000;8(6):605-15.
237. Alpey MS, Bond CS, Tetaud E, Fairlamb AH, Hunter WN. The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J Mol Biol*. 21 juill 2000;300(4):903-16.
238. Wood ZA, Poole LB, Hantgan RR, Karplus PA. Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry (Mosc)*. 30 avr 2002;41(17):5493-504.

239. Hirotsu S, Abe Y, Okada K, Nagahara N, Hori H, Nishino T, et al. Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 oct 1999;96(22):12333-8.
240. Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang K-S, Kang SW, Kim K, et al. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science*. 25 avr 2003;300(5619):653-6.
241. Biteau B, Labarre J, Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*. 30 oct 2003;425(6961):980-4.
242. Chang T-S, Jeong W, Woo HA, Lee SM, Park S, Rhee SG. Characterization of Mammalian Sulfiredoxin and Its Reactivation of Hyperoxidized Peroxiredoxin through Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in the Active Site to Cysteine. *J Biol Chem*. 2004;279(49):50994-1001.
243. Boukhenouna S, Mazon H, Branlant G, Jacob C, Toledano MB, Rahuel-Clermont S. Evidence that glutathione and the glutathione system efficiently recycle 1-cys sulfiredoxin in vivo. *Antioxid Redox Signal*. 20 mars 2015;22(9):731-43.
244. Chi YH, Kim SY, Jung IJ, Shin MR, Jung YJ, Park JH, et al. Dual functions of Arabidopsis sulfiredoxin: acting as a redox-dependent sulfinic acid reductase and as a redox-independent nuclease enzyme. *FEBS Lett*. 21 sept 2012;586(19):3493-9.
245. Roussel X, Kriznik A, Richard C, Rahuel-Clermont S, Branlant G. Catalytic mechanism of Sulfiredoxin from *Saccharomyces cerevisiae* passes through an oxidized disulfide sulfiredoxin intermediate that is reduced by thioredoxin. *J Biol Chem*. 27 nov 2009;284(48):33048-55.
246. Wood ZA, Poole LB, Hantgan RR, Karplus PA. Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry (Mosc)*. 30 avr 2002;41(17):5493-504.
247. Matsumura T, Okamoto K, Iwahara S, Hori H, Takahashi Y, Nishino T, et al. Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxiredoxin: disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization. *J Biol Chem*. 4 janv 2008;283(1):284-93.
248. Schröder E, Littlechild JA, Lebedev AA, Errington N, Vagin AA, Isupov MN. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Struct Lond Engl* 1993. 15 juin 2000;8(6):605-15.
249. Harris JR. Some negative contrast staining features of a protein from erythrocyte ghosts. *J Mol Biol*. 14 déc 1969;46(2):329-35.
250. Harris JR, Schröder E, Isupov MN, Scheffler D, Kristensen P, Littlechild JA, et al. Comparison of the decameric structure of peroxiredoxin-II by transmission electron microscopy and X-ray crystallography. *Biochim Biophys Acta*. 11 juin 2001;1547(2):221-34.
251. Dietz K-J. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxid Redox Signal*. 15 août 2011;15(4):1129-59.
252. Hall A, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *J Mol Biol*. 10 sept 2010;402(1):194-209.
253. Lim JC, Choi H-I, Park YS, Nam HW, Woo HA, Kwon K-S, et al. Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. *J Biol Chem*. 24 oct 2008;283(43):28873-80.

Bibliographie

254. Angelucci F, Saccoccia F, Ardini M, Boumis G, Brunori M, Di Leandro L, et al. Switching between the alternative structures and functions of a 2-Cys peroxiredoxin, by site-directed mutagenesis. *J Mol Biol.* 15 nov 2013;425(22):4556-68.
255. Saccoccia F, Di Micco P, Boumis G, Brunori M, Koutris I, Miele AE, et al. Moonlighting by different stressors: crystal structure of the chaperone species of a 2-Cys peroxiredoxin. *Struct Lond Engl* 1993. 7 mars 2012;20(3):429-39.
256. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell.* 22 janv 1999;96(2):271-90.
257. Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S, Verma IM. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 juill 2012;109(31):12662-7.
258. Hansen J, Stevens RG. Case-control study of shift-work and breast cancer risk in Danish nurses: impact of shift systems. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. juill 2012;48(11):1722-9.
259. Staels B. When the Clock stops ticking, metabolic syndrome explodes. *Nat Med.* janv 2006;12(1):54-5; discussion 55.
260. O'Neill JS, Reddy AB. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature.* 27 janv 2011;469(7331):498-503.
261. Molin M, Yang J, Hanzén S, Toledano MB, Labarre J, Nyström T. Life span extension and H(2)O(2) resistance elicited by caloric restriction require the peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 2 sept 2011;43(5):823-33.
262. Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han YH, Yu DY, et al. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature.* 19 mai 2005;435:347-53.
263. Phalen TJ, Weirather K, Deming PB, Anathy V, Howe AK, van der Vliet A, et al. Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlate with cell cycle arrest and recovery. *J Cell Biol.* 4 déc 2006;175(5):779-89.
264. Woo HA, Yim SH, Shin DH, Kang D, Yu D-Y, Rhee SG. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H(2)O(2) accumulation for cell signaling. *Cell.* 19 févr 2010;140(4):517-28.
265. Flohé L, Toppo S, Cozza G, Ursini F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid Redox Signal.* 1 août 2011;15(3):763-80.
266. Groeger G, Quiney C, Cotter TG. Hydrogen Peroxide as a Cell-Survival Signaling Molecule. 2009;11(11).
267. Hall A, Karplus PA, Poole LB. Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* mai 2009;276(9):2469-77.
268. Bae SH, Woo HA, Sung SH, Lee HE, Lee SK, Kil IS, et al. Induction of sulfiredoxin via an Nrf2-dependent pathway and hyperoxidation of peroxiredoxin III in the lungs of mice exposed to hyperoxia. *Antioxid Redox Signal.* mai 2009;11(5):937-48.
269. Planson A-G, Palais G, Abbas K, Gerard M, Couvelard L, Delaunay A, et al. Sulfiredoxin protects mice from lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Antioxid Redox Signal.* juin 2011;14(11):2071-80.
270. Kil IS, Lee SK, Ryu KW, Woo HA, Hu M-C, Bae SH, et al. Feedback control of adrenal steroidogenesis via H2O2-dependent, reversible inactivation of peroxiredoxin III in mitochondria. *Mol Cell.* 8 juin 2012;46(5):584-94.

271. Rawat SJ, Creasy CL, Peterson JR, Chernoff J. The tumor suppressor Mst1 promotes changes in the cellular redox state by phosphorylation and inactivation of peroxiredoxin-1 protein. *J Biol Chem.* 22 mars 2013;288(12):8762-71.
272. Jarvis RM, Hughes SM, Ledgerwood EC. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 1 oct 2012;53(7):1522-30.
273. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* 3 janv 1997;275(5296):90-4.
274. Conway JP, Kinter M. Dual role of peroxiredoxin I in macrophage-derived foam cells. *J Biol Chem.* 22 sept 2006;281(38):27991-8001.
275. Sobotta MC, Liou W, Stöcker S, Talwar D, Oehler M, Ruppert T, et al. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat Chem Biol.* janv 2015;11(1):64-70.
276. Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell.* 15 nov 2002;111(4):471-81.
277. Li L, Cheung S-H, Evans EL, Shaw PE. Modulation of gene expression and tumor cell growth by redox modification of STAT3. *Cancer Res.* 15 oct 2010;70(20):8222-32.
278. Winterbourn CC, Hampton MB. Redox biology: signaling via a peroxiredoxin sensor. *Nat Chem Biol.* janv 2015;11(1):5-6.
279. Cartwright GM, Scott B. Redox regulation of an AP-1-like transcription factor, YapA, in the fungal symbiont *Epichloe festucae*. *Eukaryot Cell.* oct 2013;12(10):1335-48.
280. Vivancos AP, Castillo E a, Biteau B, Nicot C, Ayté J, Toledano MB, et al. A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juin 2005;102(25):8875-80.
281. Bozonet SM, Findlay VJ, Day AM, Cameron J, Veal E a, Morgan B a. Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* juin 2005;280(24):23319-27.
282. Patterson MJ, McKenzie CG, Smith DA, da Silva Dantas A, Sherston S, Veal EA, et al. Ybp1 and Gpx3 Signaling in *Candida albicans* Govern Hydrogen Peroxide-Induced Oxidation of the Cap1 Transcription Factor and Macrophage Escape. *Antioxid Redox Signal.* 9 juill 2013;130709075914004.
283. Toone WM, Kuge S, Samuels M, Morgan BA, Toda T, Jones N. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev.* 15 mai 1998;12(10):1453-63.
284. Toda T, Shimanuki M, Yanagida M. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev.* janv 1991;5(1):60-73.
285. Chen D, Wilkinson CRM, Watt S, Penkett CJ, Toone WM, Jones N. Multiple Pathways Differentially Regulate Global Oxidative Stress Responses in Fission Yeast. 2008;19(January):308-17.

Bibliographie

286. Calvo I a, García P, Ayté J, Hidalgo E. The transcription factors Pap1 and Prr1 collaborate to activate antioxidant, but not drug tolerance, genes in response to H₂O₂. *Nucleic Acids Res.* févr 2012;1-9.
287. Toone WM, Morgan BA, Jones N. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene.* 2001;1:2336-46.
288. Kuge S, Toda T, Iizuka N, Nomoto A. Crm1 (XpoI) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells.* 1998;1:521-32.
289. Boronat S, Domènech A, Paulo E, Calvo IA, García-Santamarina S, García P, et al. Thiol-based H₂O₂ signalling in microbial systems. *Redox Biol.* 2014;2:395-9.
290. Castillo EA, Ayté J, Chiva C, Moldón A, Carrascal M, Abián J, et al. Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol Microbiol.* juill 2002;45(1):243-54.
291. Vivancos AP, Castillo EA, Jones N, Ayté J, Hidalgo E. Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol.* juin 2004;52(5):1427-35.
292. Calvo IA, Ayté J, Hidalgo E. Reversible thiol oxidation in the H₂O₂-dependent activation of the transcription factor Pap1. *J Cell Sci.* 15 mai 2013;126(Pt 10):2279-84.
293. Jara M, Vivancos AP, Calvo IA, Moldón A, Sansó M, Hidalgo E. The peroxiredoxin Tpx1 is essential as a H₂O₂ scavenger during aerobic growth in fission yeast. *Mol Biol Cell.* juin 2007;18(6):2288-95.
294. Calvo IA, Boronat S, Domènech A, García-Santamarina S, Ayté J, Hidalgo E. Dissection of a redox relay: H₂O₂-dependent activation of the transcription factor Pap1 through the peroxidatic Tpx1-thioredoxin cycle. *Cell Rep.* 12 déc 2013;5(5):1413-24.
295. Quinn J, Findlay VJ, Dawson K, Millar JBA, Jones N, Morgan BA, et al. Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell.* mars 2002;13(3):805-16.
296. Ikner A, Shiozaki K. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat Res.* janv 2005;569(1-2):13-27.
297. Shiozaki K, Russell P. Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev.* 15 sept 1996;10(18):2276-88.
298. Wilkinson MG, Samuels M, Takeda T, Toone WM, Shieh JC, Toda T, et al. The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev.* 15 sept 1996;10(18):2289-301.
299. Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, et al. Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. 2003;14(January):214-29.
300. Rodríguez-Gabriel MA, Burns G, McDonald WH, Martín V, Yates JR, Bähler J, et al. RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *EMBO J.* 1 déc 2003;22(23):6256-66.
301. Schnell N, Krems B, Entian KD. The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet.* avr 1992;21(4-5):269-73.

302. Kuge S, Jones N. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* 1 févr 1994;13(3):655-64.
303. Carmel-Harel O, Stearman R, Gasch AP, Botstein D, Brown PO, Storz G. Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* févr 2001;39(3):595-605.
304. Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Labarre J, Toledano MB. Yap1 and Skn7 Control Two Specialized Oxidative Stress Response Regulons in Yeast *. *Biochemistry (Mosc).* 1999;274(23):16040-6.
305. Moye-Rowley WS, Harshman KD, Parker CS. Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev.* mars 1989;3(3):283-92.
306. Yan C, Lee LH, Davis LI. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. 1998;17(24):7416-29.
307. Wood MJ, Storz G, Tjandra N. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature.* 2004;917-21.
308. Kuge S, Jones N. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Regulation.* 1997;16(7):1710-20.
309. Okazaki S, Tachibana T, Naganuma A, Mano N, Kuge S. Multistep disulfide bond formation in Yap1 is required for sensing and transduction of H₂O₂ stress signal. *Mol Cell.* août 2007;27(4):675-88.
310. Delaunay, Pflieger D, Vinh J, Toledano MB. A Thiol Peroxidase Is an H₂O₂ Receptor and Redox-Transducer in Gene Activation. 2002;111:471-81.
311. Paulsen CE, Carroll KS. Chemical dissection of an essential redox switch in yeast. *Chem Biol.* 2009;16(2):217-25.
312. D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):813-24.
313. Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, et al. Regulation of the Yeast Yap1p Nuclear Export Signal Is Mediated by Redox Signal-Induced Reversible Disulfide Bond Formation. *Society.* 2001;21(18):6139-50.
314. Ma L-H, Takanishi CL, Wood MJ. Molecular mechanism of oxidative stress perception by the Orp1 protein. *J Biol Chem.* 26 oct 2007;282(43):31429-36.
315. Veal EA, Ross SJ, Malakasi P, Peacock E, Morgan BA. Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem.* 15 août 2003;278(33):30896-904.
316. Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* avr 2001;98(8):4569-74.
317. Gavin A-C, Bösch M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature.* janv 2002;415(6868):141-7.

Bibliographie

318. Gulshan K, Rovinsky SA, Scott W, Moye-rowley WS. Influence Oxidative-Stress Tolerance by Nonidentical Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* YBP1 and Its Homologue YBP2 / YBH1 Influence Oxidative-Stress Tolerance by Nonidentical Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. Society. 2004;
319. Gulshan K, Lee SS, Moye-Rowley WS. Differential oxidant tolerance determined by the key transcription factor Yap1 is controlled by levels of the Yap1-binding protein, Ybp1. *J Biol Chem*. sept 2011;286(39):34071-81.
320. shusuke kuge Okazaki S. Peroxiredoxin-Mediated Redox Regulation of the Nuclear Localization of Yap1, a Transcription Factor in Budding Yeast. *Yeast*. 2005;7.
321. Tachibana T, Okazaki S, Murayama A, Naganuma A, Nomoto A, Kuge S. A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. *J Biol Chem*. févr 2009;284(7):4464-72.
322. Oganessian N, Ankoudinova I, Kim S-H, Kim R. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein Expr Purif*. avr 2007;52(2):280-5.
323. Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*. oct 1998;170(5):319-30.
324. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 6 févr 1998;92(3):351-66.
325. Chen J, Acton TB, Basu SK, Montelione GT, Inouye M. Enhancement of the solubility of proteins overexpressed in *Escherichia coli* by heat shock. *J Mol Microbiol Biotechnol*. nov 2002;4(6):519-24.
326. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. nov 2004;22(11):1399-408.
327. Yang DS, Yip CM, Huang TH, Chakrabarty A, Fraser PE. Manipulating the amyloid-beta aggregation pathway with chemical chaperones. *J Biol Chem*. 12 nov 1999;274(46):32970-4.
328. de Marco A, Vigh L, Diamant S, Goloubinoff P. Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(4):329-39.
329. Johnson KA, Simpson ZB, Blom T. Global kinetic explorer: a new computer program for dynamic simulation and fitting of kinetic data. *Anal Biochem*. 1 avr 2009;387(1):20-9.
330. Johnson KA, Simpson ZB, Blom T. FitSpace explorer: an algorithm to evaluate multidimensional parameter space in fitting kinetic data. *Anal Biochem*. 1 avr 2009;387(1):30-41.
331. Wood MJ, Andrade EC, Storz G. The Redox Domain of the Yap1p Transcription Factor Contains Two Disulfide. Society. 2003;11982-91.
332. Freeman BA, Radi R, Alvarez B. Reactivity of Sulfenic Acid in Human Serum Albumin †. 2008;358-67.
333. Bell MR, Engleka MJ, Malik A, Strickler JE. To fuse or not to fuse: What is your purpose?: Protein Fusion Technology. *Protein Sci*. nov 2013;22(11):1466-77.

334. Zhang W-J, He Y-X, Yang Z, Yu J, Chen Y, Zhou C-Z. Crystal structure of glutathione-dependent phospholipid peroxidase Hyr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins*. déc 2008;73(4):1058-62.
335. Shanmugam G, Reddy SMM, Natarajan V, Madhan B. 2,2,2-Trifluoroethanol disrupts the triple helical structure and self-association of type I collagen. *Int J Biol Macromol*. mars 2013;54:155-9.
336. Jorgensen P, Edgington NP, Schneider BL, Rupeš I, Tyers M, Futcher B. The size of the nucleus increases as yeast cells grow. *Mol Biol Cell*. 2007;18(9):3523-32.
337. Webster MT, McCaffery JM, Cohen-Fix O. Vesicle trafficking maintains nuclear shape in *Saccharomyces cerevisiae* during membrane proliferation. *J Cell Biol*. 13 déc 2010;191(6):1079-88.
338. Ghaemmaghami S, Huh W-K, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, et al. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 2003;425(6959):737-41.
339. Gutscher M, Sobotta MC, Wabnitz GH, Ballikaya S, Meyer AJ, Samstag Y, et al. Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases. *J Biol Chem*. nov 2009;284(46):31532-40.
340. Shaw AS, Filbert EL. Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nat Rev Immunol*. janv 2009;9(1):47-56.
341. Langeberg LK, Scott JD. Signalling scaffolds and local organization of cellular behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 18 mars 2015;16(4):232-44.
342. Burack WR, Shaw AS. Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12(2):211-6.
343. Nikolaou E, Agrafioti I, Stumpf M, Quinn J, Stansfield I, Brown AJP. Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol*. janv 2009;9:44.
344. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif*. mai 2005;41(1):207-34.
345. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. juin 1988;9(6):255-62.
346. Mach H, Middaugh CR, Lewis RV. Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Anal Biochem*. janv 1992;200(1):74-80.
347. Mulrooney SB. Application of a single-Plasmid Vector for Mutagenesis and high-Level Expression of Thioredoxin Reductase and Its Use to Examine Flavin Cofactor Incorporation. *Protein Expr Purif*. 11 nov 1996;9(PT960698):372-8.
348. Mössner E, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R. Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci*. 1998;7(5):1233-44.

Les peroxydases à thiol jouent un rôle central dans la physiologie du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un oxydant possédant une fonction de messenger cellulaire. Ces enzymes catalysent la réduction de H_2O_2 par réaction avec une Cys catalytique, ce qui leur confère la capacité de jouer le rôle de détecteur et relais du message redox. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'activation H_2O_2 -dépendante du facteur de transcription Yap1, un régulateur clef de la réponse au stress oxydant, dépend de la formation de ponts disulfure intramoléculaires catalysés par la peroxydase à thiol Orp1, via la réaction de l'intermédiaire acide sulfénique avec une Cys de Yap1 pour former un complexe disulfure mixte. L'étude des mécanismes à l'origine de la spécificité de la réaction entre Orp1 et Yap1, et du rôle de la protéine Ybp1 comme partenaire essentiel de l'activation de Yap1, constitue la question centrale de ce travail.

Nos résultats montrent que Ybp1 permet de recruter Yap1 et Orp1 au sein d'un complexe ternaire au sein duquel (i) la cinétique de la réaction entre les deux partenaires est fortement activée, et (ii) la compétition avec la formation d'un pont disulfure intramoléculaire dans Orp1 est inhibée. La spécificité de l'activation de Yap1 par H_2O_2 repose donc sur des mécanismes qui combinent à la fois la réactivité chimique intrinsèque de l'acide sulfénique, et la reconnaissance moléculaire entre Yap1, Orp1 et Ybp1 qui jouerait un rôle de protéine « de charpente ». Ces principes, assurant une activation rapide et spécifique des défenses antioxydantes de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, pourraient s'appliquer à d'autres voies de signalisation dépendantes des peroxydases à thiol.

| | |
|------------------|---|
| Mots clés | Peroxydase à thiol, acide sulfénique, signalisation redox, peroxyde d'hydrogène, cinétique rapide |
|------------------|---|

Thiol-peroxidases play a central role in the physiology of hydrogen peroxide, an oxidant which can act as a cellular messenger. They catalyze H_2O_2 reduction by the very efficient reaction of a catalytic Cys residue, responsible for their ability to act as an H_2O_2 sensor and relay. In *Saccharomyces cerevisiae*, the H_2O_2 -activation of the transcription factor Yap1, a key regulator of oxidative stress response, depends on the formation of intramolecular disulfide bonds catalyzed by the thiol peroxidase Orp1, through the reaction of the sulfenic acid intermediate with a Cys of Yap1 to form a mixed disulfide complex. Due to the high reactivity of the sulfenic acid species, several reactions can compete with Yap1. The study of the mechanisms underlying the specificity of the reaction between Orp1 and Yap1, and of the role of the Ybp1 protein as an essential partner of Yap1 activation, is the central question of this work.

Our results show that Ybp1 can recruit Yap1 and Orp1 within a ternary complex that allows (i) strong activation of the reaction between the two partners and (ii) inhibition of the competition raised by the formation of an intramolecular disulfide bond within Orp1. The specificity of the activation of Yap1 by H_2O_2 therefore relies on mechanisms that combine intrinsic chemical reactivity of the sulfenic acid species and molecular recognition between Yap1, Orp1 and Ybp1, which would act as a scaffold. These principles, which afford rapid and specific activation of antioxidant defenses in *Saccharomyces cerevisiae*, could apply to other redox signaling pathways dependent on thiol peroxidase as a H_2O_2 sensor.

| | |
|------------------|--|
| Key words | Thiol peroxidase, sulfenic acid, redox signaling, hydrogen peroxide, rapid kinetic |
|------------------|--|