

La réponse adaptative aux IRO

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

I. Le phénomène d'adaptation aux IRO

A. La capacité d'adaptation à un oxydant donné

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

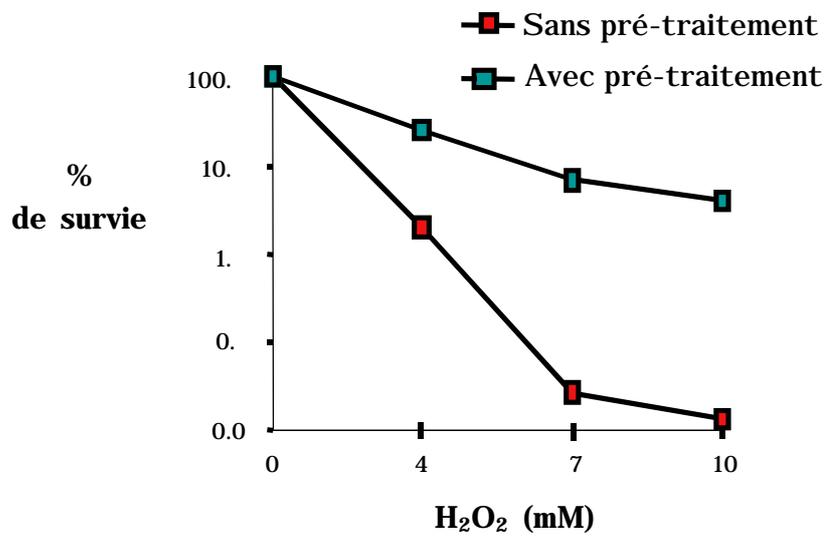


Figure 3. Mise en évidence du phénomène d'adaptation au H₂O₂ chez *S. cerevisiae*. Les cellules sont pré-traitées ou non pendant 15 minutes avec 0,2 mM de H₂O₂, puis exposées pendant une heure aux doses de H₂O₂ indiquées. Le pourcentage de survie est ensuite mesuré grâce au dénombrement des colonies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

B. Le phénomène d'adaptation croisée

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

II. Etude génomique de l'adaptation aux IRO

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

A. Les stimulons

1) Description générale

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

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

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

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

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

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

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

(1) Trois types de Superoxyde-dismutases

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

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

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

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

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

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

(1) les catalases

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

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

(i) Une activité catalytique reposant sur un thiol réactif

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

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

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

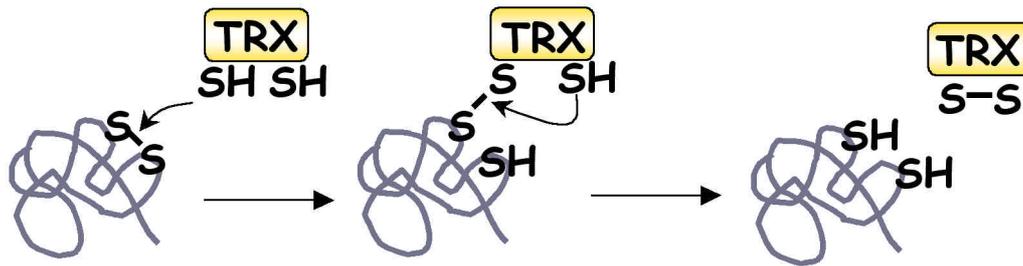
Une seule cystéine est responsable de la réduction des peroxydes. Cependant, l'acide sulfénique (ou séléninique) formé est ensuite conjugué à une autre cystéine pour former un pont disulfure, protégeant ainsi l'enzyme d'une inactivation éventuelle associée à l'oxydation irréversible de la cystéine catalytique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

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

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

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

A



B

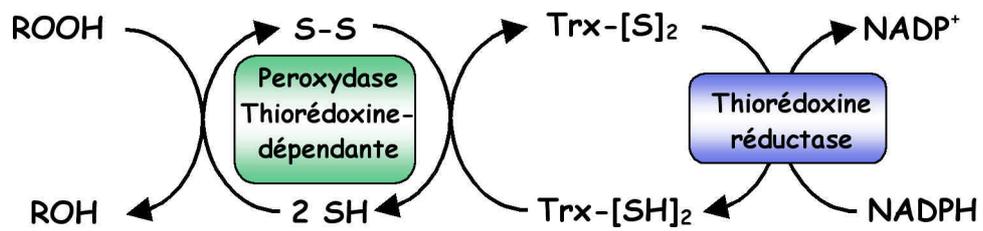


Figure 4. Réduction des ponts disulfures par les thiorédoxines A. Modèle illustrant l'activité thiol-transférase des thiorédoxines. B. Réduction des thiol-péroxydases thiorédoxine-dépendantes grâce au pouvoir réducteur du NADPH.

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

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

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

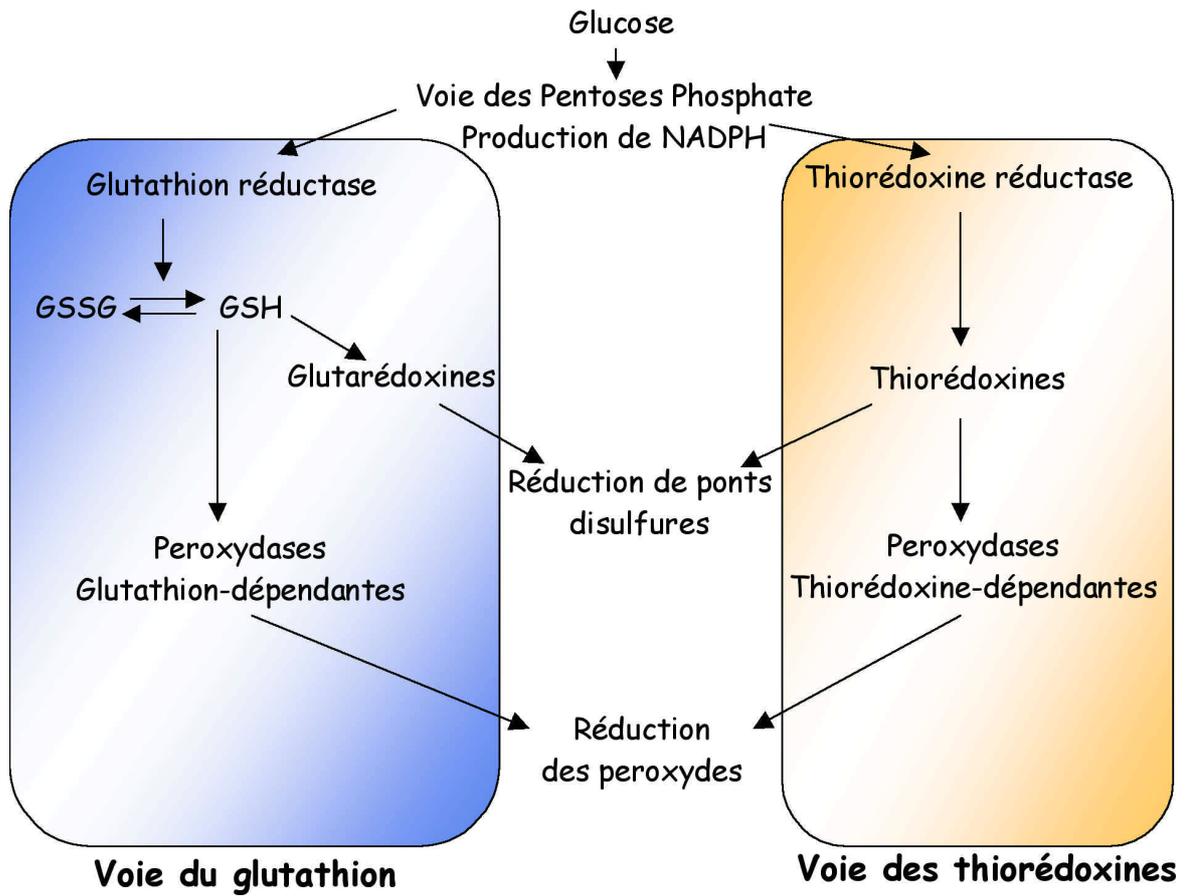


Figure 5. Les voies de réduction impliquant des enzymes à thiol réactif. Modèle décrit chez les microorganismes. Le pouvoir réducteur du NADPH, provenant de l'oxydation du glucose, est utilisé pour la réduction de ponts disulfures (illégitimes, régulateurs ou présents dans le cycle catalytique de certaines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

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

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

Conclusion

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

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

(iii) Les différentes familles de thiol-peroxydases

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

- Les peroxyrédoxines ou la famille AhpC/Tsa

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

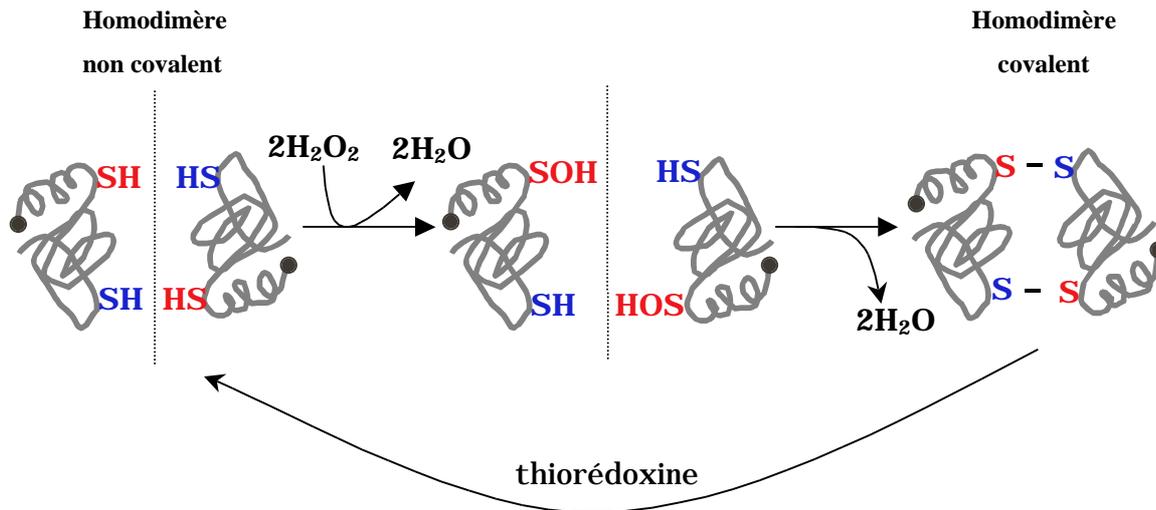


Figure 6. Modèle de réduction catalytique des peroxydes par les 2-Cys-peroxyrédoxines: l'exemple de Tsa1. La cystéine catalytique (en rouge) de chaque monomère réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former un acide sulfénique. Cette espèce réagit ensuite avec la deuxième cystéine conservée (en bleu)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

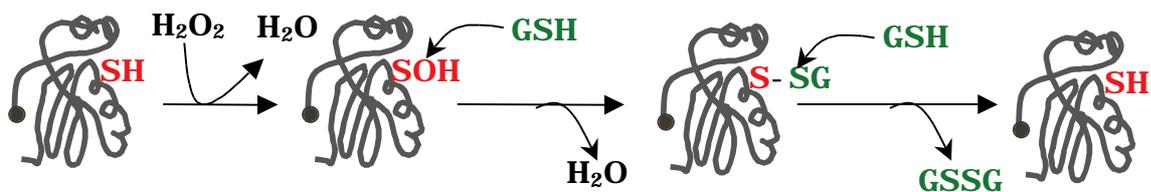


Figure 7. Modèle de réduction catalytique des peroxydes par les GPx (glutathion peroxydase). La cystéine (ou la sélénocystéine) catalytique réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former un acide sulfénique (séléninique). Cette espèce réagit ensuite avec une molécule de glutathion pour former un pont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

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

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

- Les glutathion-peroxydases

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

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

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

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

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

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

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

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

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe trois types d'enzymes capable de réduire les peroxydes : les peroxyrédoxines, les glutathion-péroxydases et les catalases. L'importance physiologique de chacune de ces activités a été testée: des souches invalidées pour chacun des gènes correspondants ont été créés et leur sensibilité aux peroxydes a été mesurée par test en gouttes. Il en résulte que trois enzymes contribuent de façon prédominante à la résistance aux peroxydes. Les souches invalidées pour *TSA1* et *AHP1* sont hypersensibles au H_2O_2 et au t-butyl-hydroperoxyde respectivement [63, 71]. De plus, l'invalidation simultanée de ces deux gènes altère très sévèrement la capacité de la souche mutante à croître en conditions aérobies (Biteau et Toledano, données non publiées). Ces deux peroxyrédoxines jouent donc un rôle majeur dans le contrôle de la concentration en peroxydes. Parallèlement, l'invalidation simultanée des trois glutathion-péroxydases [67, 68] entraîne une hypersensibilité au H_2O_2 et aux hydroperoxydes de lipides. Ce phénotype est essentiellement associé à l'invalidation de *GPX3* [67, 68].

L'analyse du rôle des catalases chez la levure repose sur un nombre très restreint d'études. En particulier, aucune étude phénotypique de type test en gouttes n'a été réalisée chez des mutants acatalasémiques. En revanche, la survie d'un mutant acatalasémique est compromise après exposition à de fortes doses de H_2O_2 , et dans ce cas, sa capacité à mettre en place une réponse d'adaptation est altérée [72]. Une autre étude montre que l'activité catalase ne semble requise chez *S. cerevisiae*, que lorsque les autres activités anti-oxydantes, en particulier le glutathion, font défaut [73].

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

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

L'invalidation de la thiorédoxine réductase (*TRR1*) (données du laboratoire ; [74]) et l'invalidation simultanée des deux thiorédoxines cytoplasmiques (*TRX1* et *TRX2*) (données du laboratoire ; [55]) entraînent une hypersensibilité très marquée des mutants au H_2O_2 . La voie des thiorédoxines joue donc un rôle central en réponse aux peroxydes. Quel est ce rôle ? La surexpression d'Ahp1 permet d'augmenter la résistance de la cellule aux peroxydes organiques, sauf en l'absence de *TRX1* et *TRX2* [63] et Tsa1 et Ahp1 sont décrites comme des enzymes thiorédoxine-dépendantes *in vitro* et *in vivo* [44, 62, 63]. Ces données suggèrent donc que le rôle essentiel joué par les thiorédoxines dans la tolérance aux peroxydes est au moins en partie relayé par ces deux thiol-péroxydases.

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

Le caractère essentiel du glutathion chez *S. cerevisiae* a rendu son étude difficile et a souvent engendré des résultats contradictoires. La construction dans le laboratoire d'une souche contenant une quantité très réduite de glutathion, ySOG [50]; voir résultats) a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de ce dernier en cas de stress aigu. A la différence des mutants de la voie des thiorédoxines, les mutants de la voie du glutathion ne présentent qu'une sensibilité très modérée aux peroxydes en test en gouttes [50]. En revanche, la survie d'une souche ySOG est significativement diminuée après exposition des cellules à de fortes doses de H_2O_2 . Le rôle physiologique du glutathion en tant que réducteur des peroxydases glutathion-dépendantes reste mal connu.

(4) Le rôle essentiel du NADPH

Comme nous l'avons vu auparavant, le dénominateur commun des thiol-péroxydases est leur dépendance vis-à-vis du NADPH. La principale voie de réduction du $NADP^+$ en NADPH est le cycle des pentoses phosphate. Or, l'inactivation de certaines enzymes de la voie des pentoses, en particulier la G6PDH [75, 76] entraîne une augmentation de la sensibilité des mutants au H_2O_2 . Il a été montré par la suite que l'inactivation de chacune des enzymes de la voie des pentoses confère une hyper-sensibilité aux oxydants [77]. Les profils d'expression génique en réponse au H_2O_2 , suggèrent une redistribution des activités en faveur de la voie

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

(5) Conclusion

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

(6) Le phénomène de compensation

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

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

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

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

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

faibles doses de H_2O_2 alors que KatG peut réduire des doses plus importantes. Ainsi, AhpR est responsable de la réduction des faibles doses de peroxyde d'hydrogène produites par le métabolisme cellulaire [80]. A de plus fortes doses, le défaut d'activité d'AhpR est compensé par KatG, dont l'activité est stimulée lorsque les doses de peroxyde d'hydrogène augmentent [80]. Ainsi, l'inactivation de katG (combinée ou non avec l'inactivation de katE, la deuxième catalase existant chez *E. coli*) entraîne une hypersensibilité marquée au H_2O_2 [36, 37, 81]. Parallèlement, l'inactivation d'AhpR ne présente qu'un faible défaut de tolérance au H_2O_2 . Ce phénotype peu marqué observé pour la souche *ahpR*⁻ est lié à l'utilisation de doses d' H_2O_2 trop fortes, l'induction de katG compensant alors l'absence d'AhpR [80]. L'expression de KatG [82] et d'AhpR [17] est induite en réponse au H_2O_2 et le rôle complémentaire essentiel d'AhpR et de KatG dans le contrôle de la concentration en H_2O_2 est souligné par l'observation d'un important défaut de croissance en aérobiose lorsque ces deux activités sont absentes simultanément [80]. Parallèlement, AhpR est impliqué dans la résistance aux alkyl-hydroperoxydes [57, 79], La réduction des alkyl-hydroperoxydes par AhpR et non KatG est compatible avec le mode d'action de ces enzymes (en particulier, le site actif des catalases ne permet pas la réduction des peroxydes complexes).

(2) Quel rôle pour la voie des thiorédoxines ?

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

quant au rôle physiologique de cette voie chez *E. coli*. A la différence de *S. cerevisiae*, la double délétion des deux thiorédoxines cytoplasmiques, *trxA* et *trxC* n'entraîne pas d'hyper-sensibilité au H₂O₂ ; le double mutant est paradoxalement hyper-résistant au H₂O₂ [85, 86]. Ce phénotype peut être expliqué par un phénomène de compensation. En effet, l'hyper-résistance observée chez un mutant *trxB*⁻ (invalidé pour la thiorédoxine reductase) est entre-autres liée à l'induction des catalases [85].

(3) Quel rôle pour le glutathion ?

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

B. les régulons

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

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

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

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

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

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

^c Zheng et col., 2001 [25]

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

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

(a) Le régulon OxyR (Tableau 1)

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

(b) Le régulon SoxRS (Tableau 2)

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

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

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

^b Greenberg et col., 1990 [98]

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

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

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

(c) Spécificité des réponses peroxyde et superoxyde

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

(d) Existence d'autres régulateurs

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

^b Godon et al., 1998 [23]

^c Gasch et al., 2000 [22]

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

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

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

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

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

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

- Les régulateurs Msn2 et Msn4

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

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

- Hsf1, Met4 et Rpn4

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

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

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

C. Contrôle de la concentration en peroxydes endogènes

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

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

