

Contrôle redox de l'activité de Yap1 par les peroxydes

I. Yap1 est activé par oxydation en réponse aux peroxydes

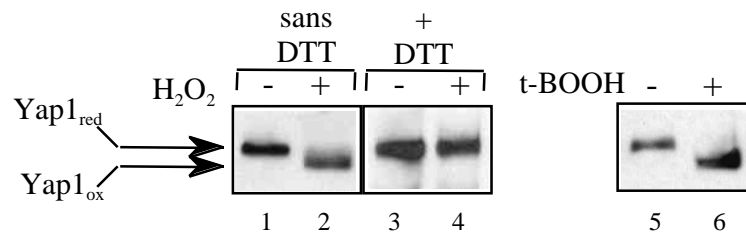
A. Mesure de l'activation de Yap1 en réponse au H₂O₂

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

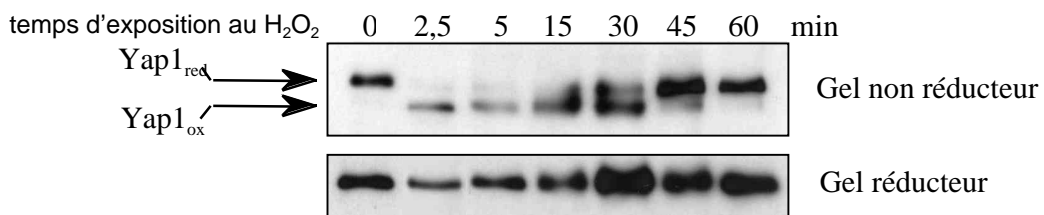
B. Yap1 est oxydé en réponse au H₂O₂

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

A



B



C

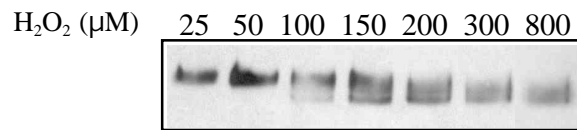


Figure 15. Yap1 est oxydé *in vivo* en réponse au H₂O₂. A. Des cellules exprimant myc-Yap1 ont été exposées ou non pendant 2,5 min à 0,4 mM d'H₂O₂ (lignes 1 à 4) ou à 1 mM de t-butyl-hydroperoxyde (lignes 5 et 6), puis lysées en présence de TCA. Après resuspension du précipitat en présence d'iodoacétamide,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

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

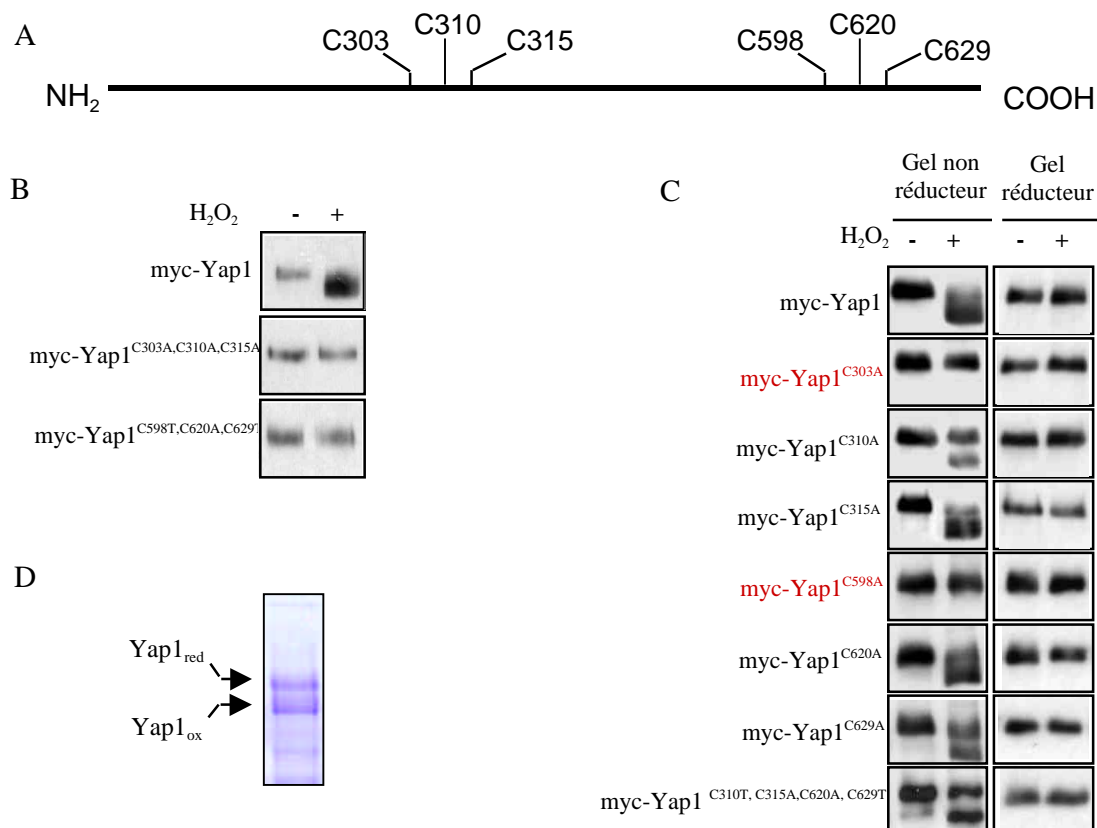


Figure 16. Identification des cystéines redox de Yap1. A. Représentation schématique des cystéines de Yap1. B. Des cellules *yap1* exprimant myc-Yap1^{C303A,C310A,C315A} et myc-Yap1^{C598T,C620A,C629T} ont été exposées ou non pendant 5 minutes à 0,4 mM de H₂O₂. Les extraits ont été réalisés comme décrit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

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

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

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

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

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

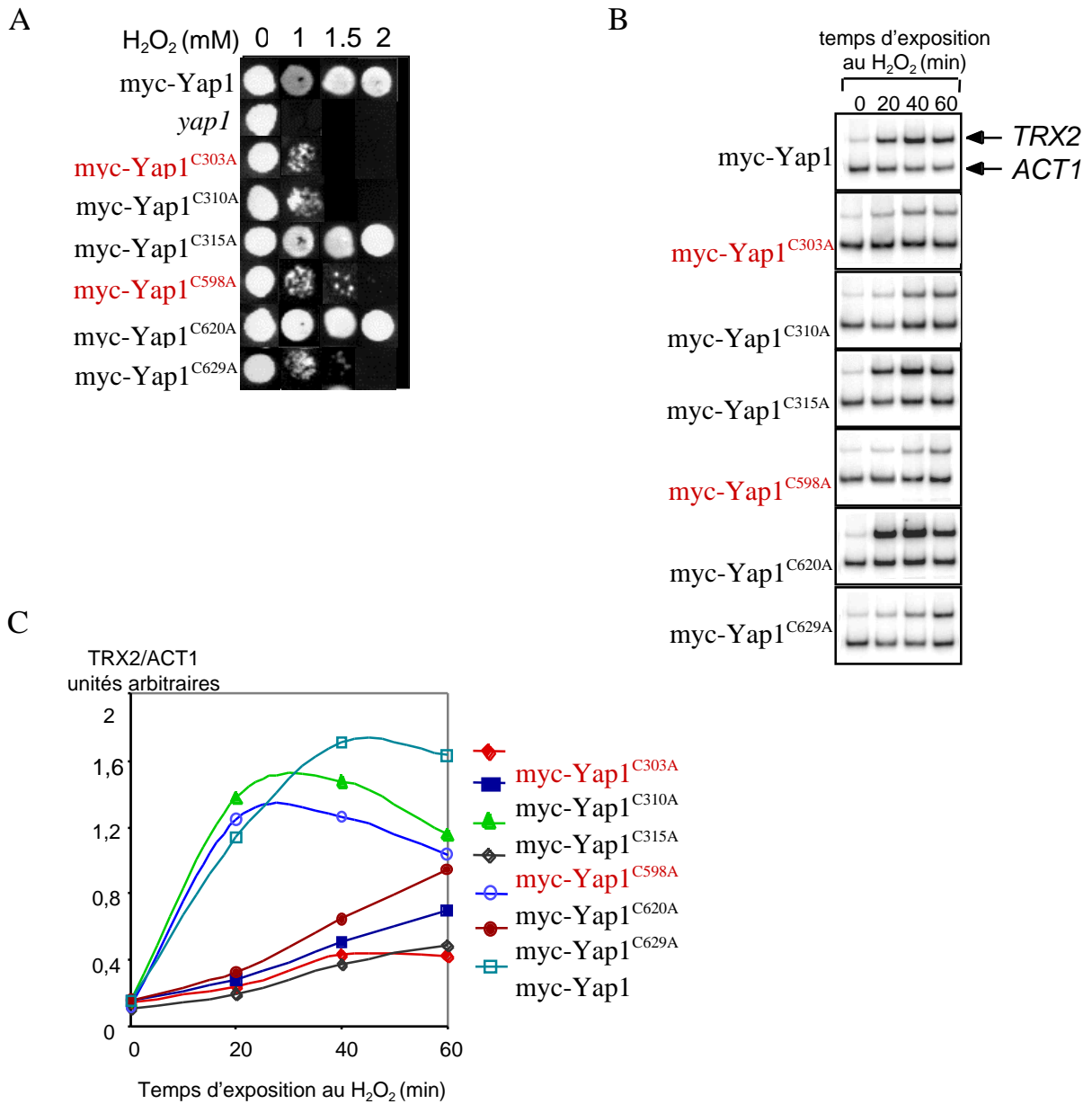


Figure 17. Activité des mutants de substitution des cystéines de Yap1. A. Sensibilité au H₂O₂ des mutants cystéine. Une souche *yap1*, transformée ou non avec les plasmides exprimant Myc-Yap1 ou les différents mutants cystéine est cultivée en phase stationnaire puis sa tolérance au H₂O₂ est mesurée sur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

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

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

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

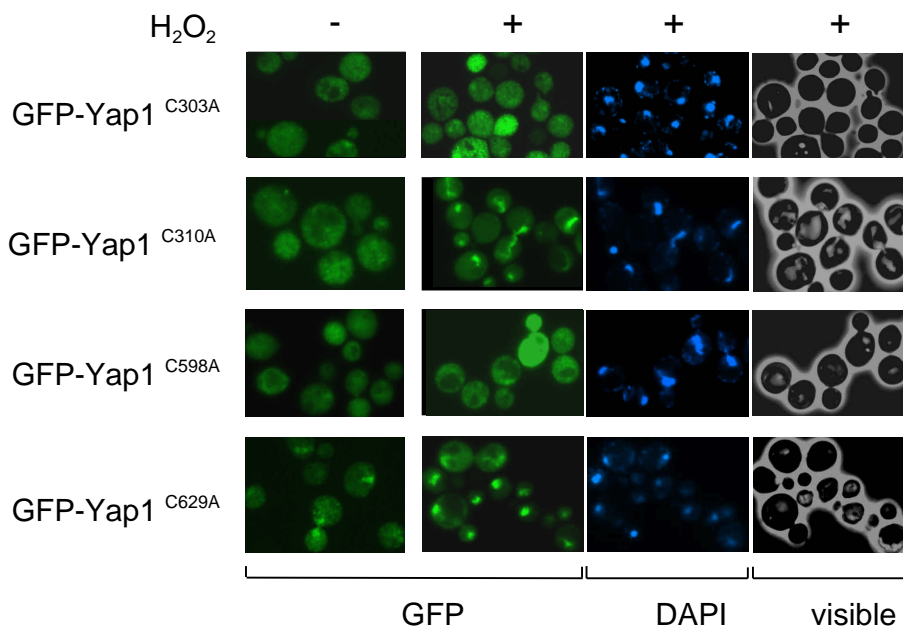


Figure 18. Les cystéines 303 et 598 sont essentielles à l'accumulation nucléaire de Yap1 en réponse au H₂O₂. La souche *yap1*, transformée avec un plasmide exprimant GFP-Yap1 ou les différents mutants cystéine est exposée pendant 12 minutes à 0,3 mM de H₂O₂ puis le marquage GFP est observé au microscope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

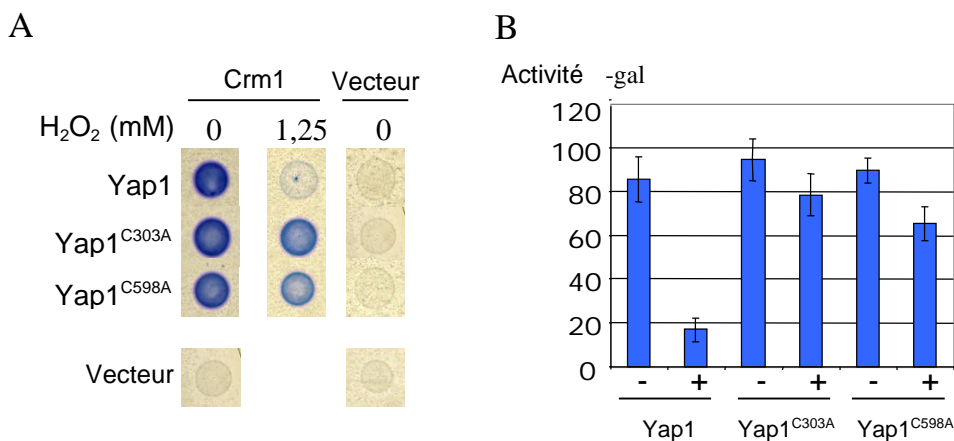


Figure 19. Les cystéines 303 et 598 ont un rôle essentiel dans la régulation de l'interaction entre Yap1 et Crml. A. L'interaction entre Yap1 et Crml est mesurée par double hybride au moyen d'un gène rapporteur LacZ. Yap1 est exprimé en fusion avec le domaine d'activation de LexA (pJG4-5-Yap1) et Crml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

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

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

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

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

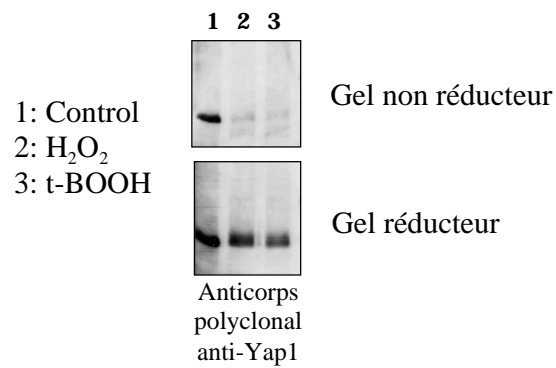


Figure 20. Un anticorps polyclonal dirigé contre la partie C-terminale de Yap1 ne reconnaît plus la forme oxydée. Une souche sauvage a été exposée ou non pendant 5 minutes à 0,4 mM de H₂O₂ ou 1 mM de t-BOOH. Les extraits sont réalisés comme décrit dans la figure 15A.

F. Conclusion/ Discussion

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

1) Validité des techniques d'investigation

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

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

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

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

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

3) Rôle des autres cystéines de Yap1

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

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

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

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

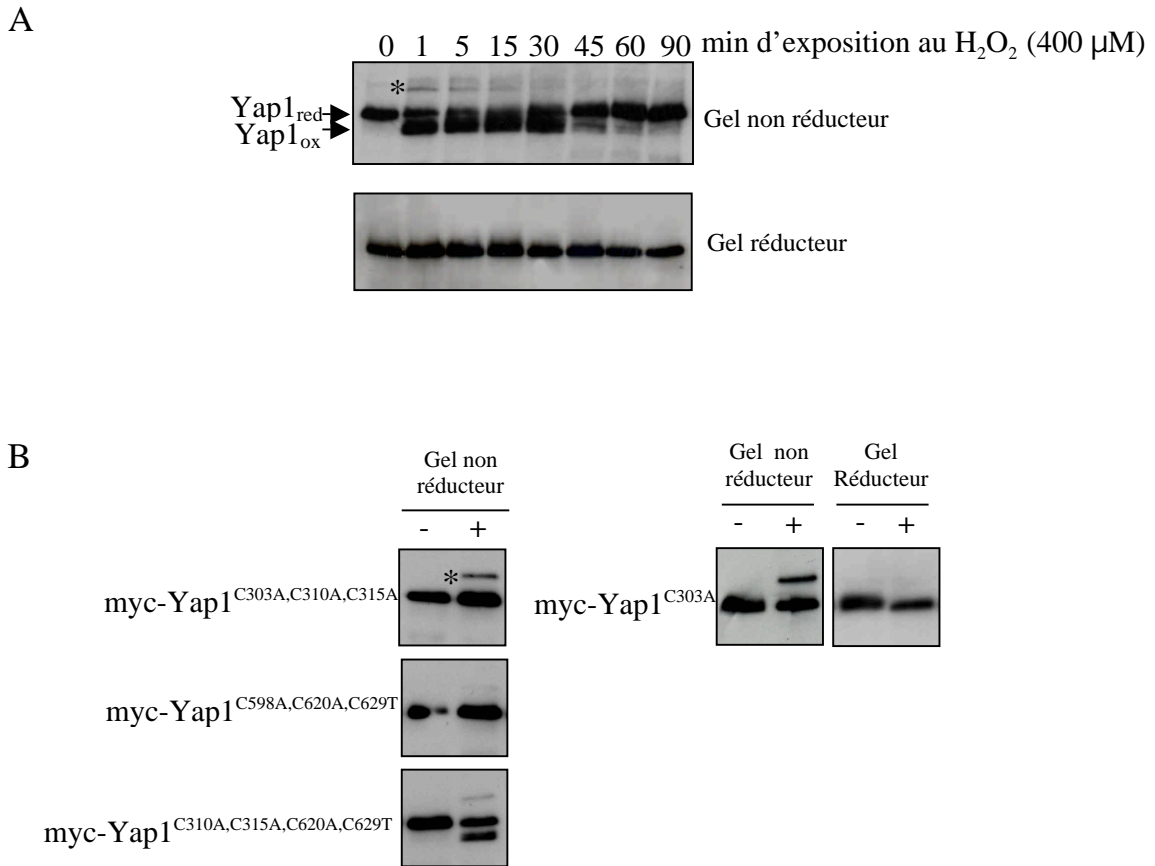


Figure 21. En réponse au H₂O₂, Yap1 interagit de façon transitoire avec une petite protéine d'environ 20 kD. A. Analyse *in vivo* de l'état redox de Yap1. La souche *yap1* exprimant myc-Yap1 est exposée à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués. Les extraits, réalisés comme décrit dans la figure 15A, sont ensuite séparés sur gel dénaturant non réducteur ou réducteur et révélés au moyen de l'anticorps anti-myc 9^E10. La bande de haut poids moléculaire correspondant à Yap1 en interaction avec la petite protéine est signalée par une astérisque. B. Effet des mutations des cystéines de Yap1 sur la formation de la bande de haut poids moléculaire. Les extraits ont été réalisés à partir d'une souche *yap1* exprimant les allèles mutants indiqués, non traitée ou exposée à 0,4 mM de H₂O₂ pendant 2 minutes. Les protéines sont ensuite séparées comme décrit en A.

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

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

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

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

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

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

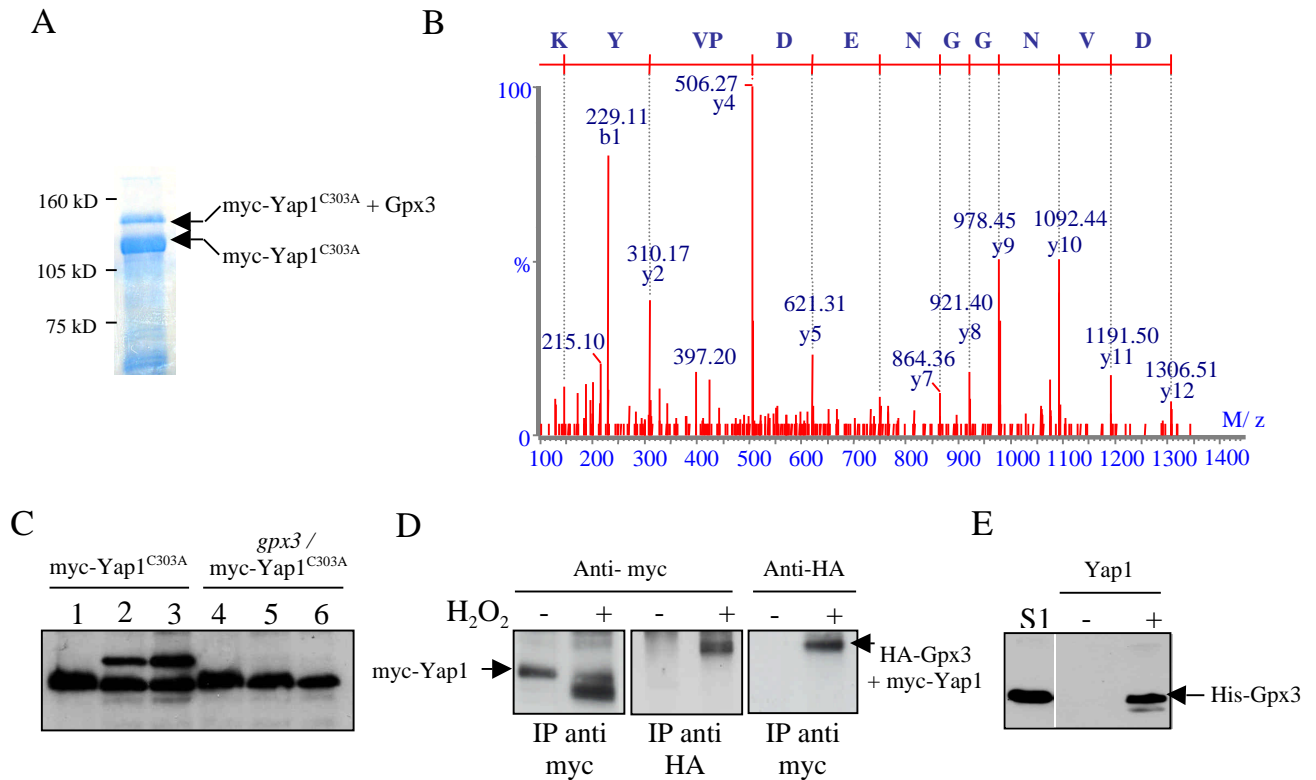


Figure 22. La glutathion-peroxydase Gpx3 est la protéine de 20 kD interagissant avec Yap1. A. Gel préparatif dénaturant non réducteur séparant myc-Yap1^{C303A} libre ou associé à son partenaire. Yap1 a été purifié à partir d'une souche *yap1* exprimant myc-Yap1^{C303A} exposée à 0,6 mM de H₂O₂ pendant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

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

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

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

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

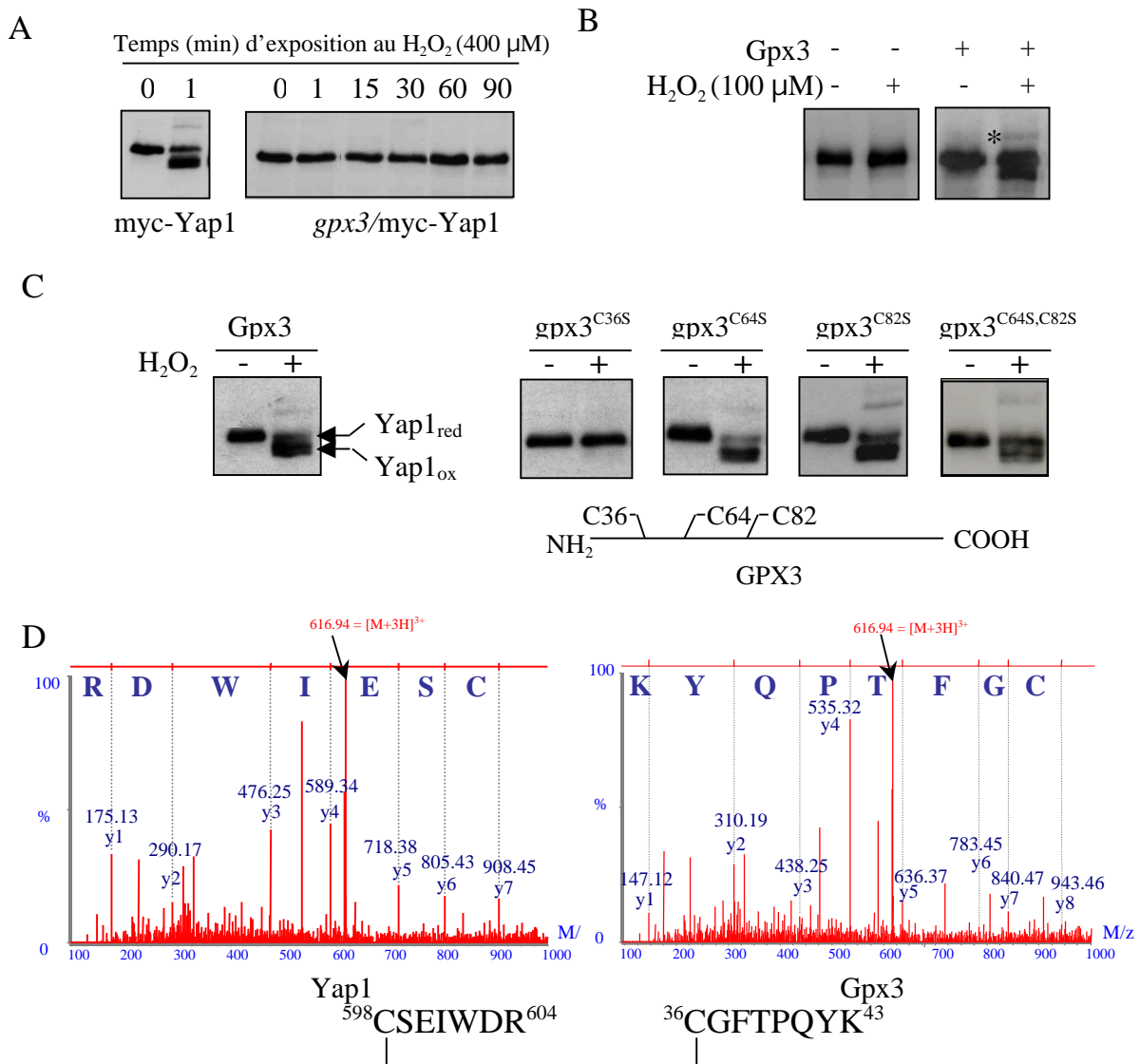


Figure 23. La formation d'un pont disulfure entre les cystéines 598 de Yap1 et 36 de Gpx3 permet l'oxydation de Yap1. A. Gpx3 est essentiel à l'oxydation de Yap1 par le H₂O₂. Les souches *yap1*, *yap1 gpx3* transformées avec myc-Yap1 ont été exposées ou non à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués.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

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

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

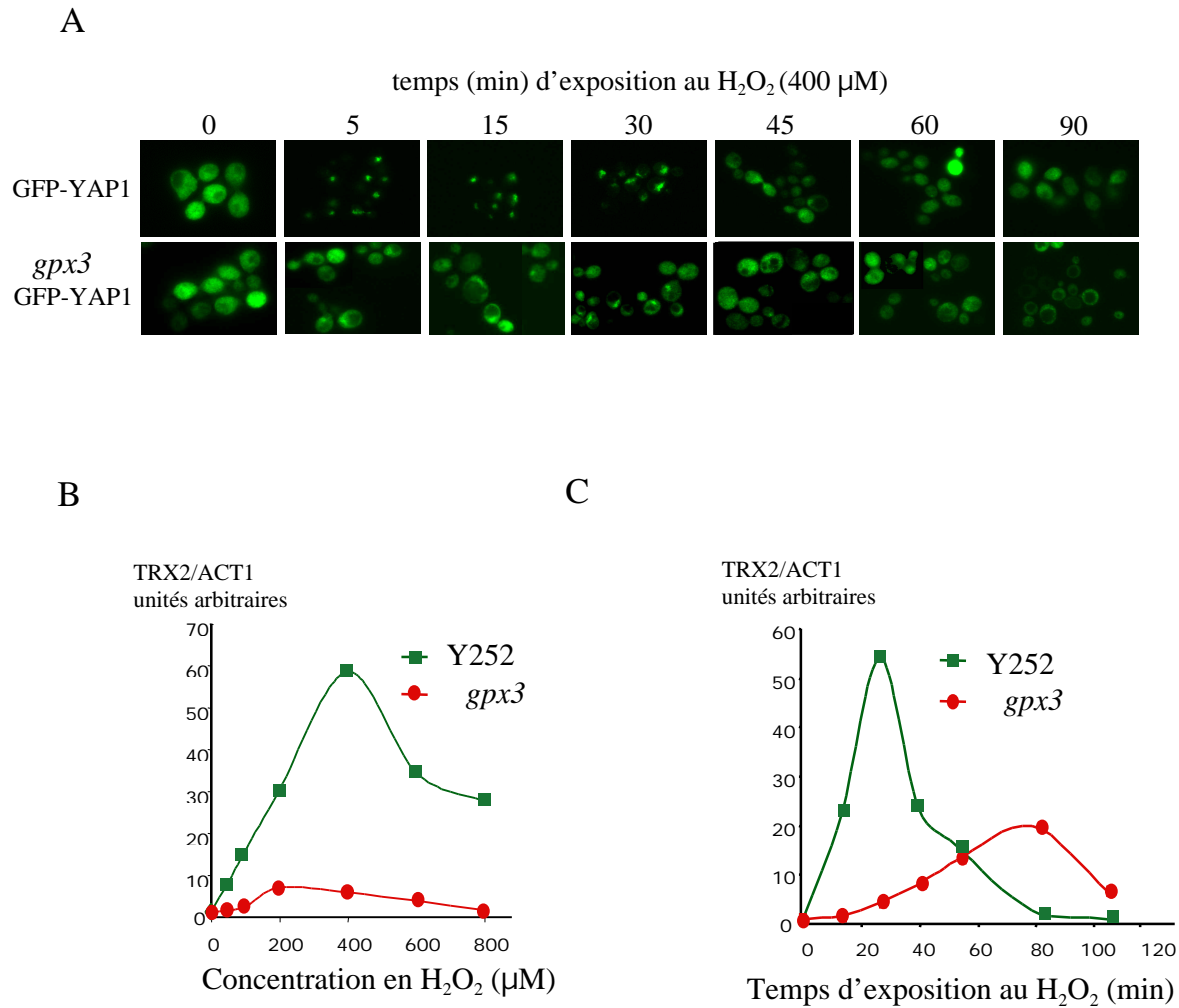


Figure 24. Gpx3 est essentielle à l'activation de Yap1 par le H₂O₂. A. Gpx3 est nécessaire à l'accumulation nucléaire de Yap1. Les souche *yap1* et *gpx3*, exprimant GFP-Yap1 ont été exposées à 0,4 mM de H₂O₂ pendant les temps indiqués et le marquage GFP a été observé au microscope à fluorescence. B.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

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

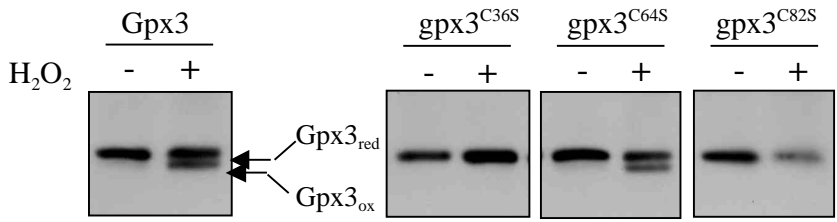
Nous avons montré qu'en réponse au H₂O₂, Gpx3 et Yap1 s'associent grâce à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre la cystéine 36 de Gpx3 et la cystéine 598 de Yap1. Cette association est indispensable à la formation du pont intramoléculaire 303-598 de Yap1. La cystéine 36 de Gpx3, qui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

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

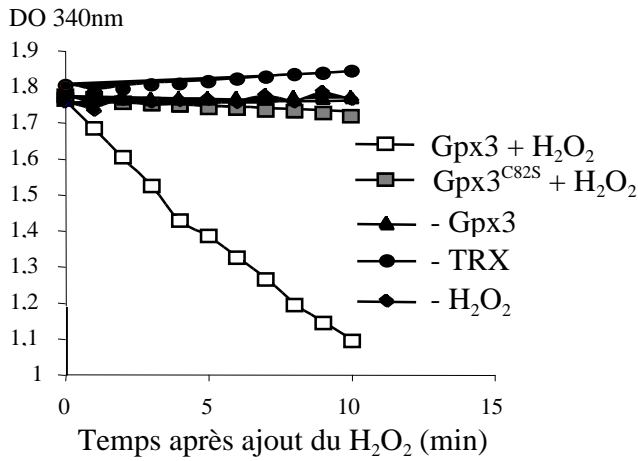
L'oxydation de Yap1 par les peroxydes entraîne son accumulation rapide dans le noyau, et permet l'induction de ses gènes cibles. Or, dans une souche *gpx3* exposée au H₂O₂, Yap1 reste majoritairement cytoplasmique et ce jusqu'à 90 minutes d'exposition, ce qui contraste avec la localisation exclusivement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

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

A



B



C

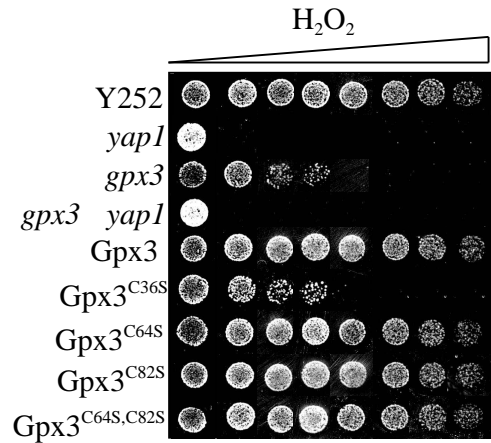


Figure 25. L'activité peroxydase de Gpx3 requiert la formation d'un pont disulfure intramoléculeire entre les cystéines 36 et 82. A. Mesure *in vivo* de l'état redox de Gpx3. Une souche *gpx3* exprimant HA-Gpx3, HA-Gpx3^{C36S}, HA-Gpx3^{C64S} ou HA-Gpx3^{C82S} a été exposée pendant 2 minutes à 0,4 mM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

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

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

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

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

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

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

A. Présentation du modèle

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

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

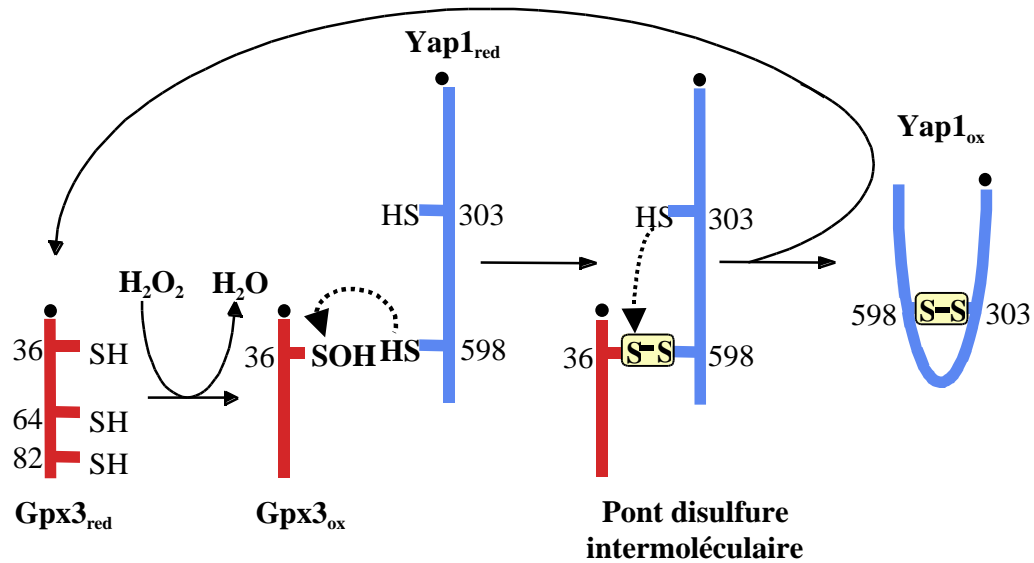
fortement que l'interaction redox entre Yap1 et Gpx3 promeut l'oxydation de Yap1, désignant Gpx3 comme le détecteur des peroxydes de la voie Yap1. Parmi les 3 cystéines présentes dans Gpx3, seule la cystéine 36 est essentielle à l'oxydation de Yap1. Ce résidu est également la cystéine conservée présente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

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

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

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

A



B

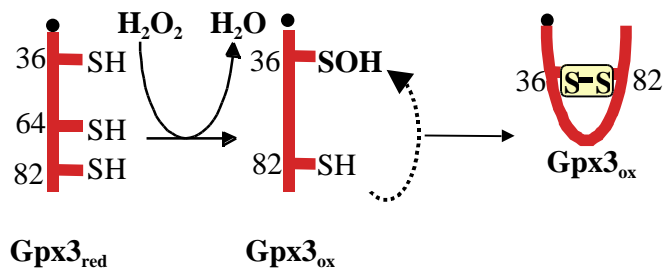


Figure 26. Modèle décrivant la double fonction de Gpx3, en tant que détecteur des peroxydes et en tant que peroxydase. A. Yap1 est associé en pré-complexe avec Gpx3. Le mécanisme de détection repose sur l'oxydation par les peroxydes de la cystéine 36 de Gpx3, en acide sulfénique (Cys36-SOH), réduisant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

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

2) Attaque nucléophile de la cystéine 303

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

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

1) Compétition des fonctions régulatrice et enzymatique de Gpx3.

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

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

2) Relation Structure-Fonction chez les PH-GPx

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

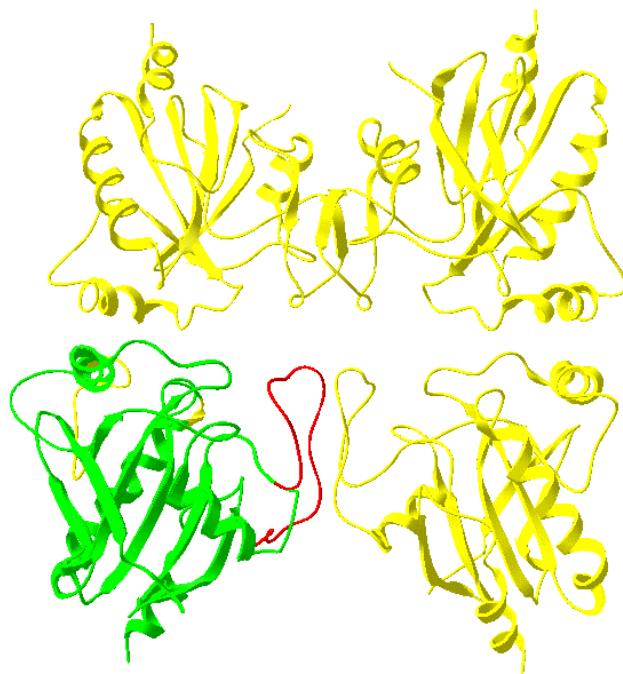
Chez la levure, Gpx1, Gpx2 et Gpx3 ne sont pas des sélénocystéine ; le sélénocystéine présent au sein du site actif des GPx chez les eucaryotes supérieurs est remplacée par une cystéine réactive. Cependant, une modélisation structurale de Gpx3 nous a permis de comparer les caractéristiques structurales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

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

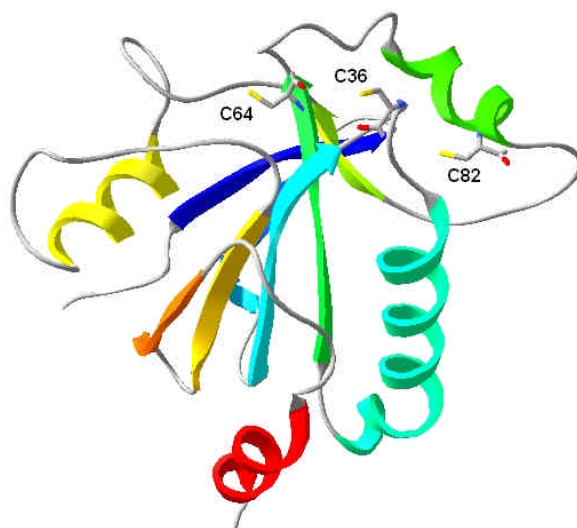
Gpx3 présente un haut degré d'identité avec Gpx2 (74%) mais aussi Gpx1 (58%) (voir aussi Annexe 1). Cependant, l'absence d'oxydation de Yap1 dans la souche *gpx3* indique que seul Gpx3 est capable d'être le détecteur et le transducteur de la voie Yap1. Contrairement à *GPX2* [67] et à la majorité des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

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

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

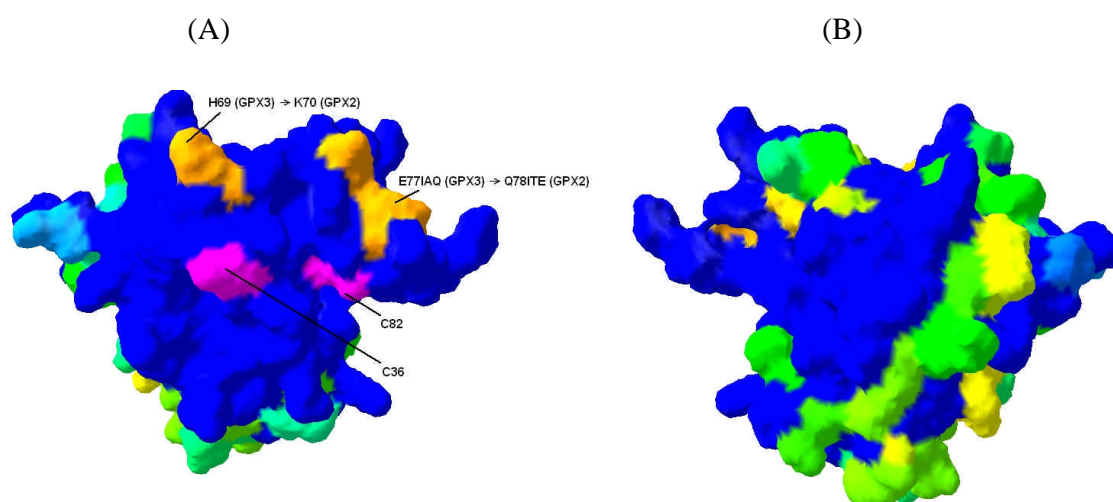


B. Représentation du modèle de GPX3 en rubans (du Nter bleu au Cter rouge). Les trois cystéines C36, C64 et C82 sont représentées.



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

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



Remarques :

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

D. Gpx3 est-elle une enzyme bi-fonctionnelle

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

IV. La réduction de Yap1

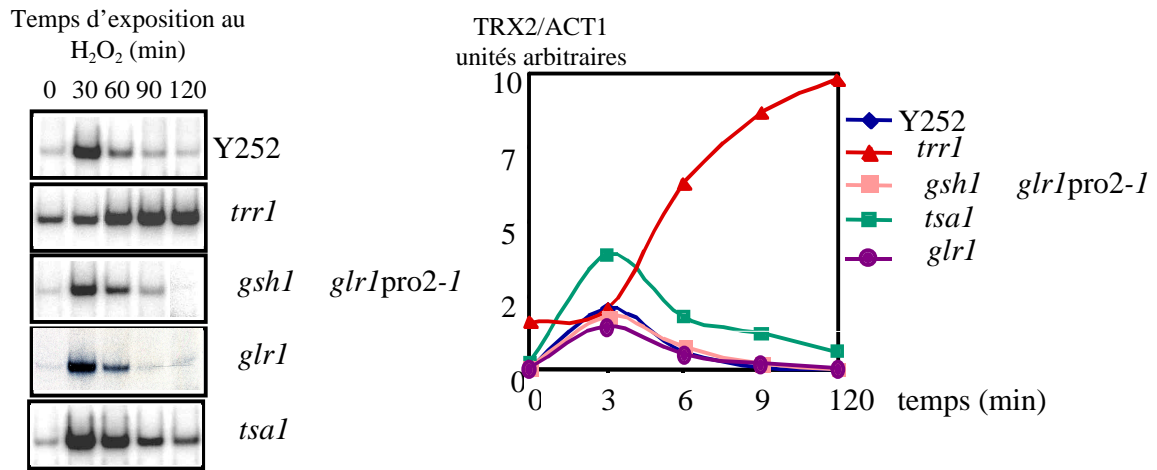
La désactivation de Yap1 peut être suivie par la chute de l'expression de *TRX2*, et par le retour de Yap1 dans le cytoplasme après 30 minutes d'exposition au H₂O₂ (0,4mM) (Fig. 14A et 14B). Elle est associée à sa réduction (Fig. 15B). La réduction de Yap1 pourrait être couplée, comme c'est le cas chez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

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

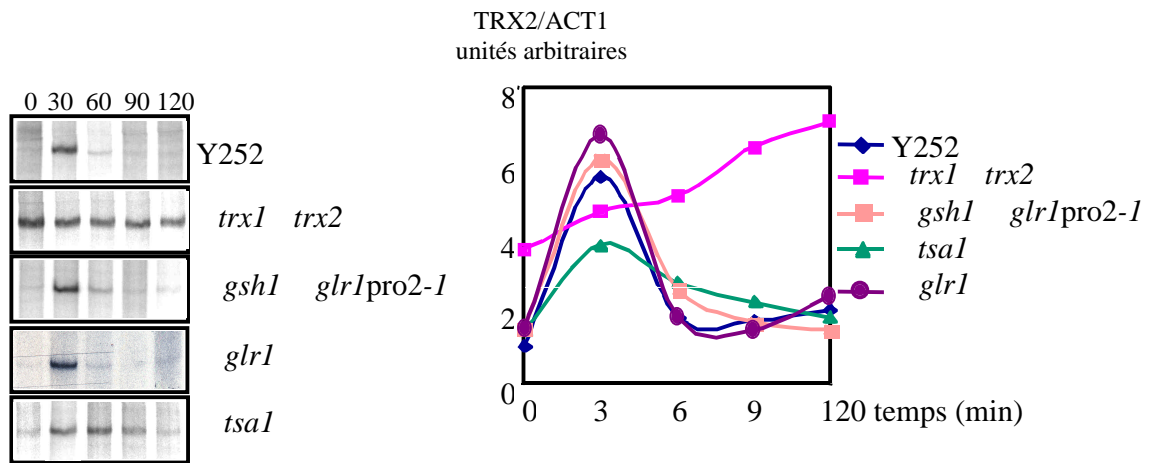
1) Utilisation de mutants spécifiques de la voie des thiorédoxines ou du glutathion

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

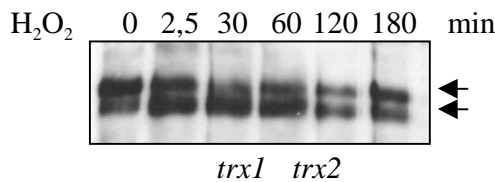
A



B



C



D

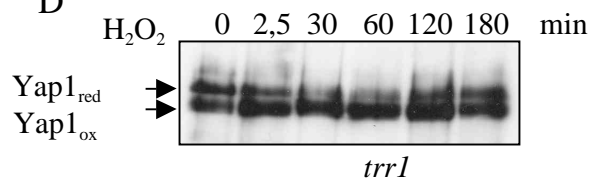


Figure 29. L'activité de Yap1 est dérégulée dans les mutants de la voie des thiorédoxines.

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

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

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

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

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

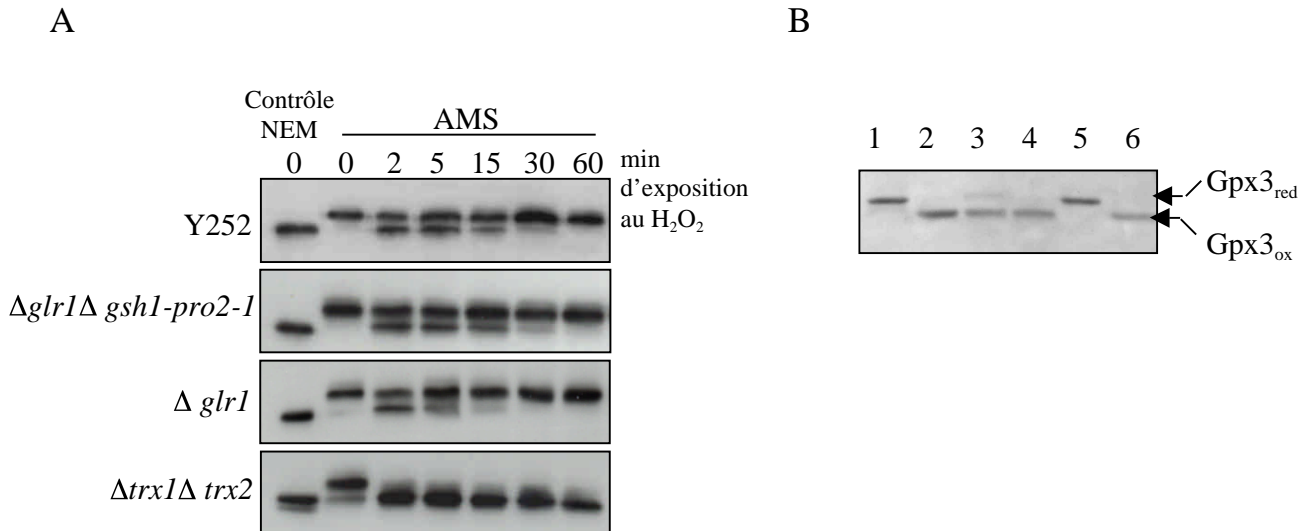


Figure 30. Gpx3 est réduite par la voie des thiorédoxines. Mesure *in vivo* de l'état redox de Gpx3 dans la souche sauvage (Y252) et les mutants $\Delta trx1 \Delta trx2$, $\Delta glr1$ et $\Delta glr1 \Delta gsh1-pro2-1$. Les différentes souches exprimant HA-Gpx3 ont été exposées à 0,4 mM de H₂O₂ pendant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

1) La réduction de Gpx3 dépend des thiorédoxines

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

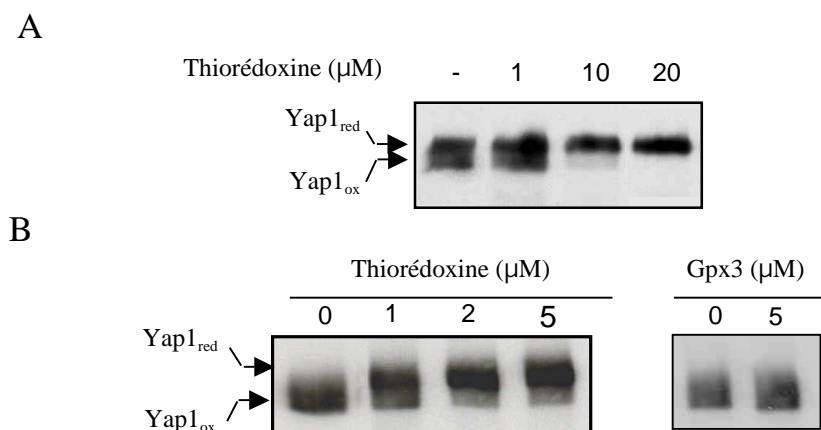


Figure 31. Les thiorédoxines réduisent Yap1 *in vitro*. A. Réduction de Yap1_{ox} dans un extrait brut en présence de thiorédoxine recombinante. Une souche *yap1* exprimant myc-Yap1, exposée à 0,4 mM de H₂O₂ pendant 5 minutes a été lysée dans un tampon contenant du Tris pH=8 (100 mM), du SDS (0,1%),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

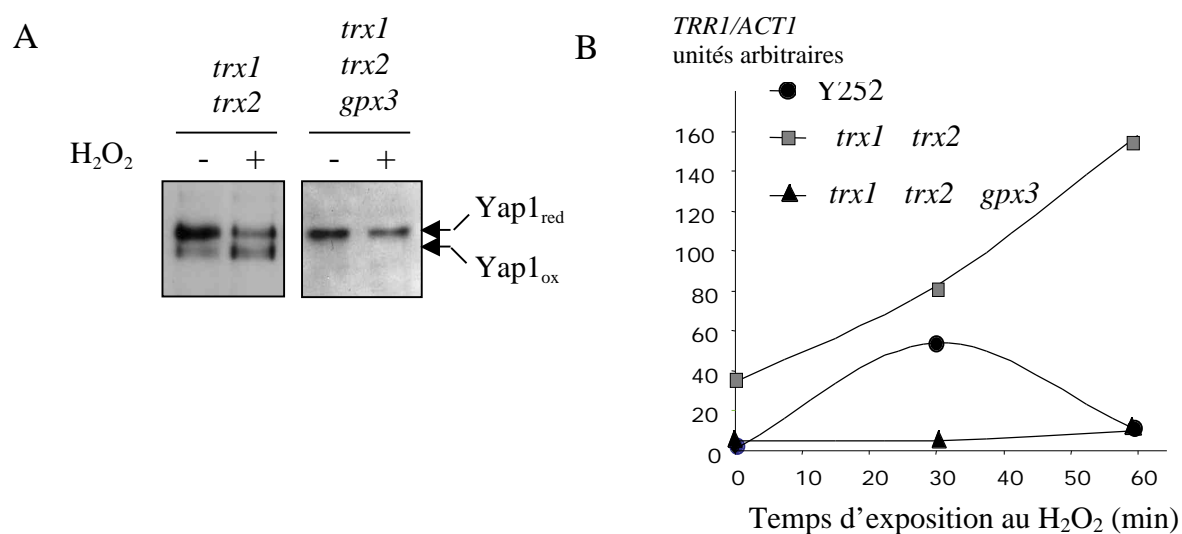


Figure 32. Gpx3 est responsable de la dérégulation de Yap1 dans la souche Δ *trx1* Δ *trx2*. A. Mesure de l'état redox de Yap1 dans les souches *trx1* *trx2* et *trx1* *trx2* *gpx3*. Les souches mutantes exprimant myc-Yap1 ont été exposées ou non à 0,4 mM de H₂O₂ pendant 2 minutes et les extraits ont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

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

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

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

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

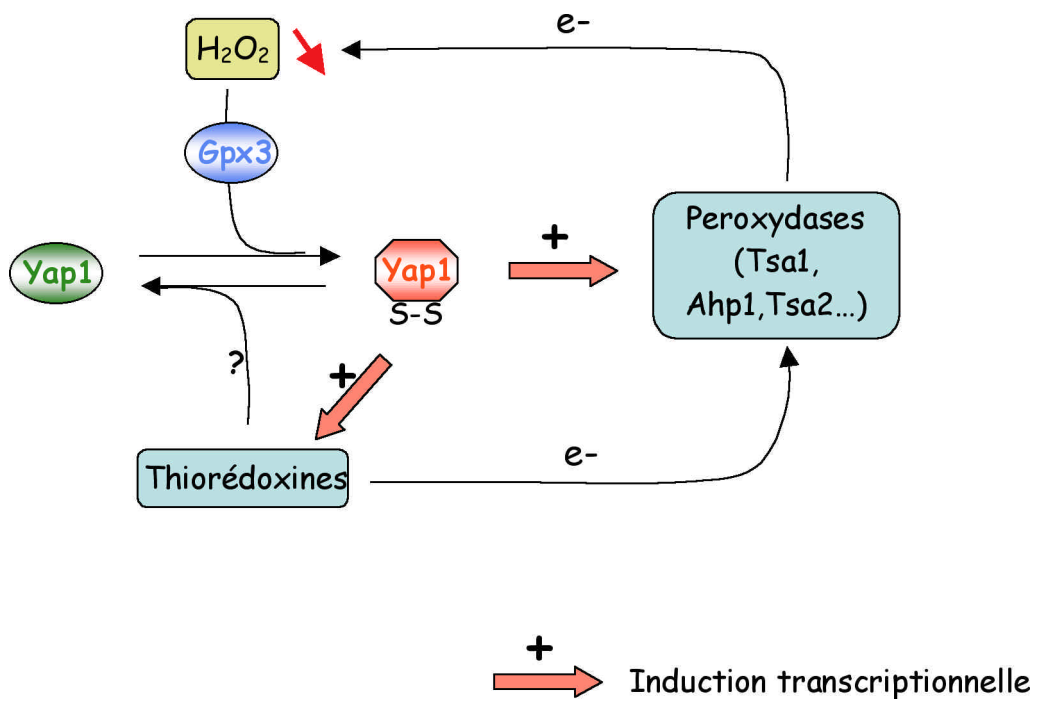


Figure 33. Modélisation du rôle de Gpx3 et des thiorédoxines dans le contrôle de l'activité de Yap1. Les thiorédoxines contrôlent indirectement la concentration en H₂O₂ par l'intermédiaire des peroxydases. Elles régulent donc l'activation Gpx3-dépendante de Yap1. Elles peuvent également réduire directement Yap1.

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

C. Conclusion/Discussion

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

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

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

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

2) Contrôle cinétique de la réduction

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

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

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

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

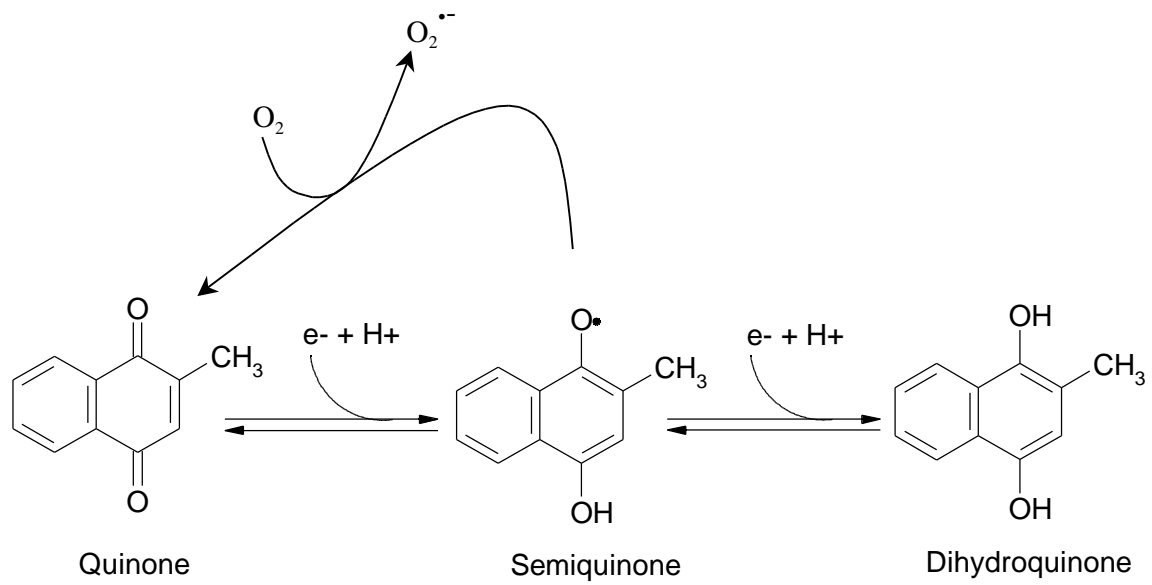


Figure 34. Production d'ions superoxyde par la ménadione. La ménadione alterne entre les formes quinone et semiquinone, alternativement réduite par des quinones réductases et oxydée par l'oxygène moléculaire. Cette réduction à un électron entraîne la production d'ions superoxyde.