

Table des matières

Introduction	4
I. Modifications chimiques des thiols par les espèces oxydantes	6
I.A. Réactivité des espèces réactives dérivées de l'oxygène et du monoxyde d'azote	6
I.B. Oxydation de cystéines en ponts disulfure	7
I.C. Systèmes cellulaires de réduction des thiols cytoplasmiques	10
I.C.1. Description des protéines impliquées dans les voies de réduction	10
I.C.2. Redondance entre les deux voies de réduction des thiols cytoplasmiques	11
I.D. Rôle de l'H ₂ O ₂ et formation de ponts disulfure au cours de la signalisation cellulaire	12
I.D.1. Mise en évidence d'un rôle de l'H ₂ O ₂ de second messenger dans la signalisation	12
I.D.2. Identification de phosphatases comme cibles de l'oxydation par l'H ₂ O ₂	13
I.D.3. Identification de protéines kinases comme cibles de l'oxydation par l'H ₂ O ₂	14
II. Le facteur de transcription Nrf2	17
II.A. Identification de Nrf2	17
II.B. Régulation de la voie Keap1-Nrf2	18
II.B.1. Les inducteurs de Nrf2	19
II.B.2. Keap1, le régulateur de Nrf2	19
II.B.2.a. Structure de Keap1	19
II.B.2.b. Keap1 contrôle l'ubiquitylation et la stabilité de Nrf2	20
II.B.2.c. Keap1 est le détecteur des inducteurs de Nrf2	22
II.B.2.d. Activation de Keap1-Nrf2 par l'H ₂ O ₂ et le NO?	25
II.B.2.e. Keap1 est ubiquitinylé	27
II.B.3. Activation de Nrf2 par phosphorylation	28
II.C. Rôle physiologique de Nrf2	29
II.C.1. Les gènes régulés par Nrf2	29
II.C.2. Apports du modèle de souris à la compréhension de la fonction de Nrf2	30
<i>Phénotypes des souris nrf2^{-/-}</i>	30
<i>Phénotype des souris keap1^{-/-}</i>	31
<i>Nrf2 et cancers</i>	31
<i>Nrf2 et inflammation</i>	33
III. Les facteurs de transcription Bach1 et Bach2	36
III.A. Fonction de Bach1	36
III.B. Fonction de Bach2	37
III.C. Régulation de Bach1 et Bach2 par des agents électrophiles ou oxydants	38
Résultats et discussion	40
I. La régulation de Keap1 par oxydation	41
I.A. Étude de l'état redox de Keap1 in vivo	41
I.A.1. Keap1 est oxydé dans des cellules exposées à de l'H ₂ O ₂	41
I.A.2. Cinétique et dose-dépendance de l'oxydation de Keap1 par l'H ₂ O ₂	44
I.A.3. Identification des cystéines engagées dans les ponts disulfure de Keap1	44
I.A.3.a. Stratégie	45
I.A.3.b. Keap1 oxydé par l'H ₂ O ₂ contient deux ponts disulfures	45
I.A.3.c. Analyse des complexes redox de haut poids moléculaire de Keap1	47
I.A.3.d. Présence d'un dimère non covalent de Keap1	51
I.A.4. Oxydation de Keap1 par la spermine NONOate	51
I.A.5. Oxydation de Keap1 endogène dans des macrophages en culture	53
I.A.6. Détection indirecte de l'alkylation des cystéines 151, 226, et 613	55
I.B. L'oxydation de Keap1 inhibe la dégradation de Nrf2	56
I.B.1. Validation du système expérimental	56

I.B.2. L'oxydation de Cys151 de Keap1 par le NO induit la stabilisation de Nrf2	58
I.B.3. Oxydation de Keap1 et stabilisation de Nrf2 par la S-nitrosocystéine	60
I.B.4. L'H ₂ O ₂ active-t-il Nrf2 ?	61
I.C. Effet de l'inactivation du contrôle thiol redox sur l'axe Keap1-Nrf2	65
I.C.1. Effets de l'inactivation de la voie de la thioredoxine	65
I.C.2. Effet de l'inactivation conjointe des voies du GSH et de la thioredoxine	67
I.D. Conclusion : une hypothèse mécanistique concernant la régulation redox de la voie Keap1-Nrf2	69
II. La régulation de Bach2 par oxydation	71
II.A. Mise en évidence et caractérisation de la formation de ponts disulfure dans la protéine Bach2 induite par l'H ₂ O ₂	71
II.A.1. Bach2 est oxydé dans des cellules exposées à de l'H ₂ O ₂	71
II.A.2. Mutagenèse des cystéines de Bach2	72
II.A.3. Recherche d'autres protéines engagées par des ponts disulfure dans les formes d'oxydation de Bach2	74
II.A.3.a. Les complexes d'oxydation de Bach2 ne contiennent pas d'autre protéine en quantité équivalente à celle de Bach2.	74
II.A.3.b. purification de la forme oxydée de Bach2	75
II.A.3.c. Formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre Bach2 et MafK	77
II.B. Modulation de l'oxydation de Bach2 par le glucose	79
II.C. L'H ₂ O ₂ provoque l'accumulation nucléaire de Bach2	80
II.D. Discussion	82
III. Effet de Prx1 sur l'oxydation de protéines par l'H ₂ O ₂	84
III.A. L'H ₂ O ₂ induit la formation de ponts disulfure entre la peroxyredoxine Prx1 et d'autres protéines	84
III.A.1. L'H ₂ O ₂ induit la formation d'un pont disulfure entre Prx1 et Bach2	84
III.A.2. L'H ₂ O ₂ induit la formation d'un pont disulfure entre Prx1 et Keap1	86
III.B. Effet de la surexpression de la Prx1 sur l'oxydation d'autres protéines cibles de l'oxydation par l'H ₂ O ₂	87
III.B.1. La sur-expression de Prx1 sensibilise Bach2 à l'oxydation par l'H ₂ O ₂	87
III.B.2. La sur-expression de la Prx1 sensibilise Keap1 à l'oxydation par l'H ₂ O ₂	88
III.B.3. La sur-expression de la Prx1 sensibilise ASK1 à l'oxydation par l'H ₂ O ₂	90
III.B.4. Effet de la sur-expression de Prx2 sur l'oxydation de ASK1 par l'H ₂ O ₂	91
III.B.5. Prx1 est-elle nécessaire à l'oxydation de Keap1 par l'H ₂ O ₂ ?	92
III.C. Discussion	93
Matériel et méthodes	97
1. Produits	98
2. Plasmides	98
3. Culture cellulaire	99
4. Transfection des cellules Hela	100
5. Etablissement de populations cellulaires exprimant de façon stable un ARN interférent.	100
6. Analyse de l'état redox des protéines contenues dans des lysats cellulaires	101
7. Précipitation des protéines fusionnées à une étiquette HIS par chromatographie d'adsorption sur résine de nickel	101
8. Purification et analyse par spectroscopie de masse des formes oxydées de Bach2	102
9. Localisation par immunofluorescence de 9myc-Bach2	105
Références Bibliographiques	106
Remerciements	117

Introduction

Les espèces chimiques dérivées par réduction incomplète de l'oxygène, les ROS pour « Reactive Oxygen Species », et espèces réactives dérivées de l'azote, les RNS pour « Reactive Nitrogen Species », sont potentiellement toxiques pour les cellules, car leur pouvoir oxydant leur confère une grande réactivité sur la plupart des molécules biologiques. Des systèmes cellulaires existent, qui assurent leur maintien à des concentrations non toxiques. Cependant, l'oxygène est nécessaire aux cellules pour son rôle d'accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire, et certains ROS ou RNS sont nécessaires à l'accomplissement de diverses fonctions biologiques. En particulier, l'H₂O₂ participe en tant que second messenger à la signalisation cellulaire en aval de l'engagement de certains récepteurs à des facteurs de croissance.

Notre objectif est de documenter le rôle possible de ces espèces réactives dans la signalisation cellulaire chez les mammifères, en mettant en évidence des protéines cibles de l'oxydation, et en étudiant l'effet fonctionnel de ces oxydations. Nous avons choisi d'étudier la formation de ponts disulfures en réponse peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et au monoxyde d'azote NO dans la protéine Keap1, qui régule l'activité du facteur de transcription Nrf2, et le facteur de transcription Bach2. Nrf2 et Bach2 sont deux facteurs de transcription de la famille des protéines à CNC-bZip, et contrôlent tous deux l'expression de gènes régulés en cis par des séquences de type ARE, pour « Antioxidant Responsive Element ».

I. Modifications chimiques des thiols par les espèces oxydantes

I.A. Réactivité des espèces réactives dérivées de l'oxygène et du monoxyde d'azote.

Malgré le haut potentiel du couple O_2/H_2O , de l'ordre de 700mV, l'oxygène ne réagit que très lentement sur la plupart des molécules biologiques, car l'état de spin triplet de son niveau fondamental l'empêche de réagir avec des état singulets. Cependant, l'oxygène peut réagir avec des métaux pour subir dans la cellules une série de réductions qui aboutissent à la formation d'espèces dites « espèces réactives de l'oxygène » (ROS) : par réductions successives à un électron, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , puis le radical peroxyde $HO^{\cdot}$. Le superoxyde est produit dans les cellules au cours de cycles futiles d'enzymes de type oxydases qui utilisent l' O_2 comme substrat, notamment au niveau de la chaîne respiratoire, ou par des enzymes spécialisés, les NADPH oxydases. Il est relativement peu réactif, et présente une spécificité pour l'oxydation de métallo-protéines comme les protéines à centre fer-soufre. L' H_2O_2 produit par dismutation du superoxyde, spontanée ou catalysée, ou par l'effet de radiations ionisantes, peut oxyder des métallo-protéines, mais également certains acides aminés, en particulier les acides aminés soufrés. $HO^{\cdot}$ peut être généré par des radiations ionisantes ou par la réduction catalysée par des métaux de l' H_2O_2 (réaction de Fenton). Il réagit avec la plupart des molécules biologiques sans spécificité, avec des constantes de vitesse de réaction très élevées, proches des constantes de diffusion. Sont aussi considérés comme ROS l'état activé singulet de spin de l'oxygène 1O_2 , produit par photo-excitation de l'oxygène triplet, et l'acide hypochloreux $HOCl$, produit lors d'intoxication au dichlore par hydrolyse de ce composé ou au cours de la réponse inflammatoire par des enzymes spécialisés, les myéloperoxydases. Ces deux espèces présentent un large spectre de réactivité.

Le monoxyde d'azote $\cdot NO$ est produit dans les cellules au cours de l'oxydation de l'arginine par les NO-synthases. Il peut réagir sur certaines métallo-protéines, en particulier les protéines contenant un fer ferreux. Les espèces dérivées du monoxyde d'azote (RNS) par oxydation comprennent des oxydes d'azote supérieurs, comme l'acide nitreux HNO_2 et le

trioxyde d'azote N_2O_3 , ainsi que le peroxydinitrite ONO_2^- . Ces espèces sont très oxydantes envers de nombreuses molécules biologiques.

De par leur grande réactivité, les espèces oxydantes sont potentiellement toxiques, et cette toxicité a été impliquée dans de nombreuses pathologies comme le cancer, l'athérosclérose, certains diabètes ou maladies neurodégénératives, ou des phénomènes de vieillissement. Pour limiter cette toxicité, les cellules sont équipées d'un arsenal de protection permettant la détoxification de ces espèces et la réparation des dommages oxydatifs causés aux bio-molécules. Nous nous sommes intéressés uniquement aux réactions conduisant à l'oxydation de cystéines dans des protéines sous forme de ponts disulfure.

I.B. Oxydation de cystéines en ponts disulfure

La cystéine est l'acide aminé le plus réactif envers des agents électrophiles (oxydants ou alkylants). La densité électronique fortement polarisable portée par l'atome du soufre en fait un bon réducteur et un nucléophile mou. De fait, la cystéine peut être modifiée par oxydation radicalaire à un électron, ou réaliser des substitutions ou additions nucléophiles qui aboutissent à son oxydation ou à son alkylation.

Si des agents électrophiles très réactifs, comme des radicaux peroxydes $\text{HO}^\bullet$, peuvent réagir sur toutes les cystéines, d'autres, comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , qui présentent une réactivité relativement faible, ne peuvent réagir qu'avec certaines cystéines suffisamment réactives. Outre le problème de l'accessibilité au solvant d'une cystéine située au cœur d'une protéine, différents facteurs déterminent la réactivité d'une cystéine donnée dans une protéine envers l' H_2O_2 . En particulier, un anion thiolate est beaucoup plus réactif, c'est-à-dire nucléophile et oxydant, que le thiol correspondant. En solution aqueuse, le pKa de la cystéine est 8,5, aussi est-elle présente de façon majoritaire sous forme protonée. De même, dans une protéine, les cystéines sont majoritairement protonées et relativement peu sensibles à l'oxydation par l' H_2O_2 . En revanche, la forme thiolate d'une cystéine peut être stabilisée dans une protéine par la proximité d'une fonction chimique basique, et ainsi la cystéine rendue particulièrement réactive. La réaction d'oxydation des thiols par l' H_2O_2 permet une certaine spécificité, et rend l' H_2O_2 particulièrement adapté pour participer en tant que second messager à des processus de signalisation cellulaire (B. D'Autreaux, 2007, C.C. Winterbourn, 2008).

Le pont disulfure représente une forme d'oxydation des cystéines particulièrement stable, et est impliqué dans de nombreux processus biochimiques. Divers chemins réactionnels peuvent aboutir à la formation de ponts disulfure par oxydation de thiols.

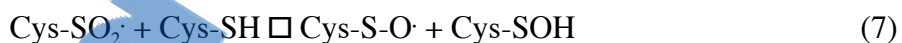
L'oxydation d'un thiolate par le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 réaction (1) ou l'acide hypochloreux $HOCl$ (2) conduit à la formation d'un acide sulfénique $R-SOH$, une espèce électrophile en général instable, qui peut réagir par substitution nucléophile avec un second thiol, pour former un pont disulfure (3) :



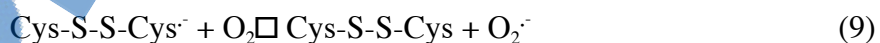
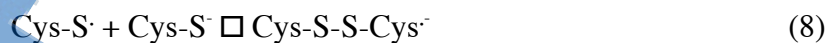
L'oxydation à un électron d'un thiol ou d'un thiolate par des radiations ionisantes, par divers radicaux, ou catalysée par des métaux de transition, résulte dans la formation d'un radical thiyl (4), qui peut ensuite évoluer vers la forme disulfure par recombinaison avec un second radical thiyl (5) :



Un pont disulfure peut aussi être formé à partir d'un thiyl après réaction avec l'oxygène (6), et via la formation d'un acide sulfénique (7) :

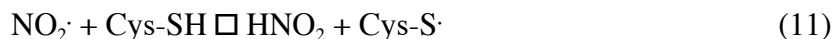


Un thiyl réagit aussi avec un thiolate pour faire un radical anion disulfure (8), qui peut ensuite céder son électron supplémentaire à l'oxygène (9) :

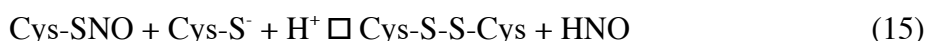
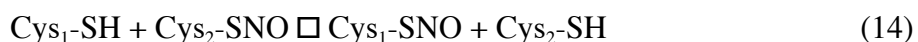


En conditions aérobies, des cystéines peuvent également être oxydées en disulfures par des dérivés du monoxyde d'azote. Au moins deux types de mécanismes réactionnels peuvent être impliqués dans ce phénomène.

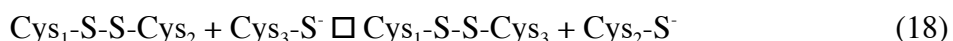
Des radicaux dérivés de l'azote et fortement oxydants comme le dioxyde d'azote (10) peuvent oxyder des thiols en radicaux thiyls (11), susceptibles ensuite d'évoluer en ponts disulfure :



Des nitrosothiols R-SNO, formés par réaction d'une cystéine sur divers RNS, dont l'anion nitrite (12), par recombinaisons de radicaux thiyl et monoxyde d'azote (13), ou par transnitrosation (14), peuvent évoluer en disulfure selon la réaction (15), ou (16) suivie de (5), (6), ou (17) :



Les ponts disulfures eux-mêmes présentent un caractère électrophile et peuvent être isomérisés par réaction d'échange thiol-disulfure avec un autre thiolate :

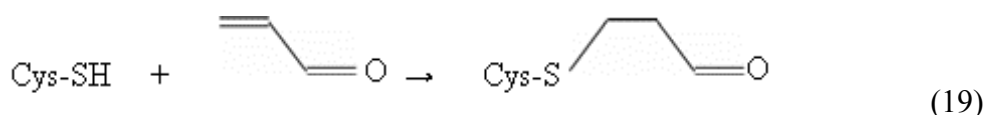


Les chemins réactionnels présentés ici conduisant à l'oxydation de cystéines en ponts disulfure après réaction avec des ROS ou RNS ne forment pas une liste exhaustive. Pour plus de détails concernant la formation des ponts disulfures, des nitroso-thiols, et d'autres formes oxydées des cystéines, voir (A. Bindoli, 2008, G.I. Giles, 2002, J.R. Lancaster, Jr., 2006, J.S. Stamler, 1994, J.S. Stamler, 2002). De plus, les détails mécanistiques des réactions présentées ci-dessus proviennent en grande partie d'études réalisées sur des thiols en solution aqueuse, et n'ont pas tous été observés avec des protéines *in vivo* ou *in vitro*.

Enfin, pour certains enzymes, des mécanismes catalytiques particuliers peuvent conduire à la formation de ponts disulfure. Ainsi dans le réticulum, Ero1 est oxydé par un mécanisme enzymatique qui utilise peut-être l'oxygène comme accepteur d'électrons. Une

cascade d'échanges thiol-disulfure permet ensuite de transférer ces ponts disulfure à des protéines qui entrent dans la voie de sécrétion (C.S. Sevier, 2008). Certains enzymes cytosoliques comme la ribonucléotide réductase sont également oxydés avec formation d'un pont disulfure de façon transitoire au cours de leur cycle catalytique (M.B. Toledano, 2007).

Certains résidus cystéines peuvent être modifiés par alkylation. Parce que ce type de réactions fournit une base mécanistique à la détection de xénobiotiques par Keap1, nous les citons ici. Les composés alkylants peuvent présenter une grande diversité chimique, et selon le composé considéré, la réactivité d'une cystéine particulière dépendra de différents paramètres, dont son état de protonation. A titre d'exemple est donnée la réaction (19) d'addition nucléophile d'une cystéine sur une ènone ou accepteur de Michael :



I.C. Systèmes cellulaires de réduction des thiols cytoplasmiques

I.C.1. Description des protéines impliquées dans les voies de réduction

Le pont disulfure est une fonction chimique relativement stable. Néanmoins, leur formation est réversible, et il existe chez la plupart des organismes deux voies de réduction des ponts disulfures remarquablement conservées : la voie des thioredoxines et celle du glutathion. Ces deux voies permettent de coupler la réduction de ponts disulfures à l'oxydation du NADPH, produit dans les cellules au cours du métabolisme des pentoses phosphates. Nous excluons de ces considérations les ponts disulfure présents dans des protéines du réticulum et de la voie de sécrétion, où un système différent assure le contrôle de l'état redox des thiols.

La description des mécanismes enzymatiques des protéines impliquées dans ces voies provient principalement d'études réalisées sur des bactéries ou des levures (A. Holmgren, 2005, M.B. Toledano, 2007). Les thioredoxines et les glutaredoxines dites « di-thiol » sont de petites protéines susceptibles de réduire directement des ponts disulfures dans certaines protéines, par des mécanismes d'échanges thiol-disulfure conduisant à l'oxydation en disulfure de leurs deux cystéines catalytiques. Les glutaredoxines di-thiol sont réduites par le glutathion, un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyl-glycine) présent dans les cellules en concentration millimolaires. La réduction par le NADPH des thioredoxines et du glutathion est ensuite catalysée par les thioredoxines réductases et les glutathion réductases, respectivement, complétant ainsi la chaîne de transfert d'électrons entre des ponts disulfures dans des protéines et le NADPH.

Si l'oxydation d'une cystéine dans une protéine peut représenter un dommage oxydatif et participer à l'effet toxique d'espèces oxydantes telles que l' H_2O_2 , la formation de ponts disulfure est réversible, et peut être envisagée comme un mécanisme de protection des thiols contre d'autres formes d'oxydation non réductibles. En particulier, les concentrations cellulaires en glutathion, de l'ordre du millimolaire, permettent la transformation rapide d'acides sulféniques (Cys-SOH) par glutathionylation (Cys-S-S-G), empêchant ainsi leur oxydation ultérieure en acides sulfiniques (Cys-SO₂H) ou sulfoniques (Cys-SO₃H), des formes d'oxydation non réductibles en général.

I.C.2. Redondance entre les deux voies de réduction des thiols cytoplasmiques

Chez la levure, des données génétiques montrent que ces deux voies de réduction ne sont pas redondantes, ce qui suggère une spécificité dans la réduction de substrats (M.B. Toledano, 2007). Par exemple, les glutaredoxines catalysent la réduction de ponts disulfures mixtes entre protéine et glutathion, et les peroxydases de la famille des peroxyredoxines sont réduites spécifiquement par les thioredoxines. La question de la redondance des deux voies de réduction des thiols cytosoliques n'a pas été abordée chez les mammifères par des moyens génétiques. Cependant, l'inactivation de la glutathion réductase dans des fibroblastes dérivés d'embryons de souris invalidées pour *trr2*, le gène de la thioredoxine reductase mitochondriale, a été obtenue par moyen chimique, après exposition de ces cellules à de la buthionine sulfoximine, un peptide synthétique qui inhibe de manière spécifique la synthèse

de glutathion au niveau de la γ -glutamyl-cystéine ligase. Ces cellules, déficientes pour les deux voies de réduction des thiols dans la mitochondrie, sont incapables de proliférer. (M. Conrad, 2004). Cette observation suggère une redondance au moins partielle dans la réduction de substrats oxydés par le glutathion et les thioredoxines chez la souris.

I.D. Rôle de l' H_2O_2 et formation de ponts disulfure au cours de la signalisation cellulaire

L'exposition de cellules à de l' H_2O_2 peut déclencher l'activation de voies de signalisation protectrices, dans le sens où elles culminent dans l'induction de gènes codant pour des activités anti-oxydantes. A titre d'exemple, l'activation des facteurs de transcription FOXO4 et NF- κ B par de l' H_2O_2 exogène ou produit en réponse au TNF- α aurait un effet cytoprotecteur, notamment à travers l'induction de la manganèse superoxyde dismutase (M.A. Essers, 2004, H. Kamata, 2005). De plus, si l' H_2O_2 est potentiellement toxique, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle nécessaire de l' H_2O_2 produit de façon endogène en tant que second messenger dans des phénomènes de signalisation cellulaire déclenchés par des stimuli extracellulaires (T. Finkel, 2003, S.G. Rhee, 2006). Cependant, les cibles moléculaires de l'oxydation par l' H_2O_2 ne sont pas toujours connues.

I.D.1. Mise en évidence d'un rôle de l' H_2O_2 de second messenger dans la signalisation

Les exemples les mieux documentés concernent le rôle de l' H_2O_2 dans la signalisation en aval de l'engagement de récepteurs membranaires par leurs ligands. Ainsi, une production intracellulaire d' H_2O_2 a d'abord été observée dans des cellules adipeuses exposées à de l'insuline, puis dans divers types cellulaires en réponse à des facteurs de croissance comme le PDGF ou l'EGF, et des cytokines comme le TNF- α et le TGF- β (S.G. Rhee, 2000). En parallèle, l'exposition de cellules à de l' H_2O_2 exogène reproduit la phosphorylation des récepteurs à l'insuline, au PDGF, ou à l'EGF, ceci en l'absence de stimulation de ces récepteurs par leur ligands (S. Gamou, 1995, M. Sundaresan, 1995). Enfin, l' H_2O_2 est nécessaire à la signalisation puisque l'exposition de cellules à des produits antioxydants

comme la N-acétylcystéine, ou l'augmentation d'activités enzymatiques antioxydantes comme une catalase ou une peroxyredoxine bloque l'activation cellulaire en réponse au PDGF, au $\text{TNF}\alpha$, à l'EGF ou à l'angiotensine II (Y.S. Bae, 1997, S.W. Kang, 1998, M. Sundaresan, 1995, M. Ushio-Fukai, 1999). A l'inverse, l'invalidation de la peroxyredoxine 2 améliore la phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques du récepteur au PDGF et en conséquence l'activation de la phospholipase $\text{C}\gamma$ dans des cellules exposées au PDGF (M.H. Choi, 2005). Une production d' H_2O_2 est donc nécessaire à la signalisation en aval de certains récepteurs membranaires. Ces observations ont suggéré que l' H_2O_2 puisse être un second messager dans la signalisation en aval de l'engagement de récepteurs à activité tyrosine kinase.

Dans cette perspective, des complexes enzymatiques NADPH oxydases ont été identifiés comme source principale de l' H_2O_2 produit en réponse à l'engagement de récepteurs à activité tyrosine kinase. Les NADPH oxydases catalysent la réduction par le NADPH de l'oxygène en superoxyde, qui peut ensuite être dismuté en H_2O_2 . Dans des cellules musculaires lisses vasculaires, l'inhibition par approche antisens de Nox1, une des sous-unité d'un complexe NADPH oxydase, bloque la production de superoxyde et la croissance stimulées par du sérum (Y.A. Suh, 1999), ainsi que l'activation des voies Akt et p38 en réponse à l'angiotensine II et au PDGF (B. Lassegue, 2001). Ainsi, l'augmentation d'activité NADPH oxydase est nécessaire à la production d' H_2O_2 et à l'activation des voies de signalisation en aval de l'engagement de certains récepteurs membranaires.

I.D.2. Identification de phosphatases comme cibles de l'oxydation par l' H_2O_2

Ainsi, l' H_2O_2 produit par des NADPH oxydases participe au contrôle de la phosphorylation de protéines régulatrices suite à l'engagement de récepteurs membranaires par leurs ligands. Ceci suggère que l' H_2O_2 régule l'activité de protéines kinases et/ou de protéines phosphatases.

Les protéines tyrosine phosphatases utilisent dans leur centre catalytique une cystéine réactive, stabilisée sous forme de thiolate, qui réagit par addition nucléophile sur le phosphate porté par leur substrat pour initier la catalyse. Plusieurs études montrent que des protéines tyrosines phosphatases sont inactivées par oxydation de ce résidu cystéine, ceci en réponse à de l' H_2O_2 exogène (A. Caselli, 1998, P.A. Savitsky, 2002), ou en réponse à des facteurs de croissance (P. Chiarugi, 2001, S.R. Lee, 1998, K. Mahadev, 2001, T.C. Meng, 2002). La mise

au point d'un test pour détecter et identifier les protéines tyrosine phosphatases oxydées de manière réversible au niveau de leur cystéine catalytique a permis de montrer que l'oxydation de la cystéine catalytique représente un mécanisme de régulation général de nombreuses protéines tyrosine phosphatases (T.C. Meng, 2002). L'oxydation de ces protéines peut survenir sous diverses formes : ponts disulfure (A. Caselli, 1998, P. Chiarugi, 2001, P.A. Savitsky, 2002, T. van der Wijk, 2004), acide sulfénique (J.M. Denu, 1998, R.L. van Montfort, 2003), glutathionylation (W.C. Barrett, 1999), ou sulfénylamide (A. Salmeen, 2003, R.L. van Montfort, 2003). L'oxydation d'une cystéine non catalytique peut également permettre l'inactivation de l'activité phosphatase. Ainsi, l'oxydation d'une cystéine située dans un domaine régulateur de RPTP α provoque un changement conformationnel dans la protéine responsable son inactivation (C. Persson, 2004).

Une autre phosphatase cible de l'oxydation par l'H₂O₂ en aval de la signalisation par un facteur de croissance, le PDGF, est la phosphatase PTEN du phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate PIP₃. Cette molécule est produite comme second messenger suite à l'engagement du récepteur à des facteurs de croissance, et active la voie Akt. Comme pour des protéines tyrosine phosphatases, l'oxydation de la cystéine catalytique de PTEN sous forme d'un pont disulfure intramoléculaire suite à l'engagement des récepteurs au PDGF ou à l'EGF inactive l'enzyme. Ceci a pour effet d'augmenter la concentration cellulaire de PIP₃ et de potentialiser l'activation de Akt. L'oxydation de PTEN est réversible, et sa réduction serait catalysée par la voie des thioredoxines (J. Kwon, 2004).

I.D.3. Identification de protéines kinases comme cibles de l'oxydation par l'H₂O₂

Outre l'inactivation de phosphatases, l'H₂O₂ peut également potentialiser des événements de phosphorylation et participer à l'activation de voies de signalisation en activant par oxydation des protéines kinases.

La MAP3 kinase ASK1 régule l'apoptose en réponse à de l'H₂O₂ exogène via les voies p38 et JNK. Un modèle décrit la thioredoxine Trx1 comme un inhibiteur de ASK1, qui exerce son effet au travers d'une interaction directe avec ASK1. En réponse à l'H₂O₂, l'oxydation de Trx1 induit la perte de cette interaction et la levée d'inhibition de ASK1 (Y. Liu, 2002, M. Saitoh, 1998). La description récente de l'oxydation d'ASK1 en réponse à l'H₂O₂ remet en doute ce modèle, et suggère que l'oxydation d'ASK1 sous forme de

complexes covalents de haut poids moléculaire liés par des ponts disulfure est responsable de son activation par phosphorylation et en aval de la phosphorylation de JNK. La mise en évidence d'un pont disulfure intermoléculaire liant ASK1 à Trx1 et la non réversibilité de l'oxydation d'ASK1 dans des cellules qui expriment un mutant dominant négatif de Trx1 montrent que ASK1 est réduit et probablement désactivé par la voie des thioredoxines (P.J. Nadeau, 2007). Nous avons utilisé l'oxydation d'ASK1 pour généraliser certains résultats obtenus concernant Bach2 et Keap1 (voir Résultats et Discussions).

Différents mécanismes moléculaires peuvent être mis en jeu dans l'activation de protéines kinases suite à la formation de ponts disulfure. A titre d'exemple, Akt est oxydé avec formation d'un pont disulfure dans des cellules exposées à de l' H_2O_2 , et cette oxydation participe à son activation en prévenant la déphosphorylation de ses résidus Ser473 et Thr309. L'état d'oxydation et l'activité kinase de Akt seraient régulées par la voie des glutaredoxines (H. Murata, 2003). En réponse à l' H_2O_2 , la dimérisation de la protéine kinase dépendante du cGMP (PKG) par formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre deux monomères induit une augmentation de l'affinité de la kinase pour ses substrats (J.R. Burgoyne, 2007). Dans des cardiomyocytes en culture primaire exposés à de l' H_2O_2 , une telle dimérisation redox activatrice est aussi observée entre les sous-unités régulatrices de la protéine kinase dépendant du cAMP (PKA). Cette oxydation augmente l'affinité de la PKA pour la chaîne lourde de la myosine, ce qui résulte en une relocalisation de la PKA à proximité de ses substrats troponine 1 et myosin binding protein C (J.P. Brennan, 2006).

L'oxydation de protéines kinase, qui résulte en leur activation, peut ainsi advenir en réponse à de l' H_2O_2 exogène, mais également suite à une production endogène d'espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, la kinase Src est oxydée, probablement sous forme de ponts disulfure, lors de l'adhésion de cellules NIH3T3 exposées à de la fibronectine. L'implication d'une production endogène d' H_2O_2 dans ce phénomène est démontrée par l'effet antagoniste d'une activité spécifique de dégradation de l' H_2O_2 , la catalase. L'identification de cystéines dont la mutation rend Src insensible à l'oxydation a permis de démontrer que cette oxydation a un effet activateur sur Src, et est requise pour les propriétés oncogéniques d'un mutant constitutivement actif de Src, comme la croissance indépendante de l'ancrage ou du sérum et la formation de tumeurs dans des souris athymiques (E. Giannoni, 2005)

Ainsi, la modification post-traductionnelle par formation de ponts disulfure dans des protéines régulatrices peut constituer un événement important dans l'activation de voies de signalisation. Les exemples donnés ci-dessus ne forment pas une liste exhaustive. De plus en

plus d'études mettent en évidence de tels mécanismes de régulation en réponse à l'H₂O₂. En revanche, nous n'avons pas trouvé d'étude décrivant la formation de ponts disulfure dans des protéines en réponse au NO dans des cellules, et les exemples *in vitro* sont très rares.

Notre objectif était de documenter des phénomènes de régulation par oxydation de protéines sous forme de ponts disulfure. Des indices montrent que les facteurs de transcription de la famille CNC-bZIP Nrf2 et Bach2 seraient activés par des agents oxydants comme l'H₂O₂ ou le NO. Nous avons cherché à confirmer ceci, et à identifier dans les mécanismes d'activation les détecteurs de ces oxydants, les cibles moléculaires de l'oxydation.

II. Le facteur de transcription Nrf2

Chez les organismes métazoaires, le facteur de transcription Nrf2 (NF-E2-related factor) a un rôle majeur dans le contrôle de la détoxification de xénobiotiques électrophiles, d'oxydants et de chimiques prooxydants, et dans la protection au cours de l'inflammation. Ce rôle physiologique confère aujourd'hui à ce régulateur une importance grandissante chez l'homme dans la protection contre des stress environnementaux, mais également vis-à-vis de la carcinogenèse chimique et dans les pathologies inflammatoires aiguës et chroniques. L'activité transcriptionnelle de Nrf2 n'est pas constitutive mais inductible par plusieurs des substances vis-à-vis desquelles Nrf2 confère une protection. Nrf2 est le sujet de nombreuses recherches visant à mieux comprendre le rôle physiologique et pathophysiologique complexe de ce régulateur, et à exploiter le rôle de protection cellulaire de Nrf2 dans la prévention du cancer et d'autres maladies. Les efforts de recherche sont aussi et surtout dirigés vers la compréhension des mécanismes moléculaires qui prévalent à l'activation de Nrf2 et qui impliquent la protéine régulatrice Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), un adaptateur d'ubiquitine ligase dépendant de Cul3 qui cible Nrf2 pour sa dégradation, et le détecteur proprement dit des inducteurs de Nrf2. Comme nous le verrons plus loin, notre travail de recherche s'est intéressé au mécanisme redox régulant l'activité de Keap1 en réponse à l' H_2O_2 et au NO.

II.A. Identification de Nrf2

Nrf2 fut initialement identifié comme un homologue du facteur de transcription érythroïde NF-E2, par sa capacité à interagir avec une séquence d'ADN contrôlant en cis le gène de la β -globine (P. Moi, 1994). En effet, Nrf2 se lie à un site de reconnaissance à l'ADN très similaire aux sites de reconnaissance de NF-E2 appelé ARE pour « Antioxidant Responsive Elements » ou encore EpRE pour « Electrophile Response Element », et qui est présent dans les régions régulatrices de ses gènes cibles. Comme NF-E2, Nrf2 possède un domaine de liaison à l'ADN de type CNC-bZip. Ce dernier définit un sous-groupe de la famille des facteurs de transcription bZip. Il contient non seulement l'homologie « basic leucine zipper » constituant le domaine de reconnaissance à l'ADN proprement dit, mais également le domaine Cap N' Colar initialement identifié chez la drosophile dans un facteur de transcription de cette famille. La figure 1 montre une vue schématique des domaines de

Nrf2. Comme tous les membres de la famille CNC-bZip, Nrf2 s'associe en hétérodimère obligatoire avec l'un des trois membres de la famille des petites Maf (MafF, MafG, ou MafK) pour former la forme active du facteur de transcription (M. Kobayashi, 2006). Nrf2 est conservé chez les organismes métazoaires. Outre l'homme, la souris et le rat, des homologues de Nrf2 ont été identifiés chez le nématode (J.M. Tullet, 2008), la drosophile (G.P. Sykiotis, 2008), et le poisson (M. Kobayashi, 2002), et sont également l'objet d'études intensives.

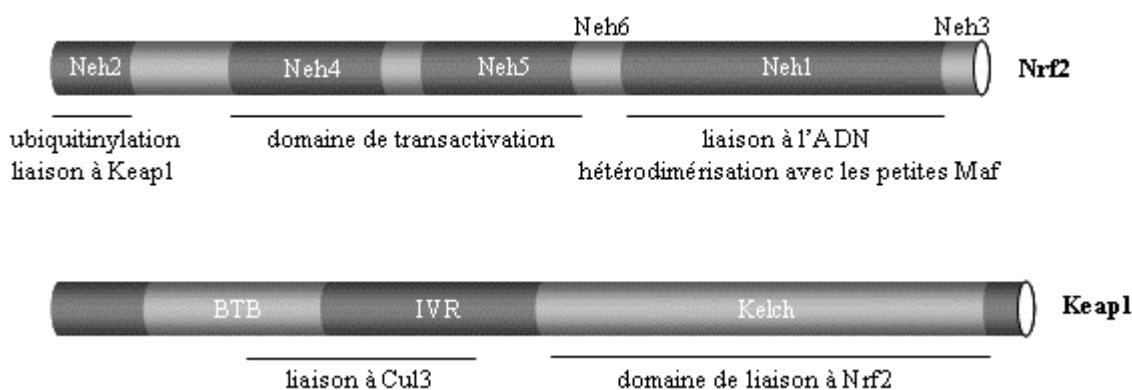


Figure 1. Représentation schématique en domaines fonctionnels de Nrf2 et Keap1. Nrf2 est divisée en domaines fonctionnels. Du côté N-terminal, le Neh2 constitue le domaine responsable de sa dégradation, en particulier c'est le domaine d'interaction avec Keap1, et il comporte les résidus lysines cibles de l'ubiquitinylation. Les domaines Neh4 et Neh5 constituent des domaines de transactivation, le Neh6 serait également responsable d'une dégradation de Nrf2 indépendante de Keap1, et le Neh1 constitue le domaine d'hétérodimérisation avec les petites Maf et de liaison à l'ADN. Keap1 fonctionne comme un « adaptateur » pour le recrutement de Nrf2 au complexe E3 ligase dépendant de la culline 3. Son domaine BTB et sa région IVR sont importants pour la liaison à la culline 3, alors que l'interaction avec le Neh2 de Nrf2 s'effectue au niveau du domaine Kelch.

II.B. Regulation de la voie Keap1-Nrf2

Nrf2 est constitutivement actif, mais son activité est fortement augmentée par différents inducteurs chimiques ayant des propriétés électrophiles. L'augmentation de l'activité de Nrf2 est en majeure partie le résultat d'une stabilisation de la protéine. Cette stabilisation est secondaire à l'inhibition de l'ubiquitination de Nrf2 par le complexe ubiquitine ligase Cul3-Keap1 conduisant à sa dégradation par le protéasome. Les inducteurs de Nrf2 interviennent par modification covalente de Keap1. Cependant Nrf2 est également contrôlé par phosphorylation.

II.B.1. Les inducteurs de Nrf2

Un grand nombre de substances chimiques sont connues pour induire l'activité transcriptionnelle de Nrf2, de façon plus ou moins efficace en fonction de la substance. A.T. Dinkova-Kostova et collègues ont classé ces inducteurs en neuf classes de composés chimiques : quinones et diphenols oxydables, accepteurs de Michael, isothiocyanates, hydroperoxydes, dérivés d'arsenic trivalents, métaux lourds divalents (Hg_2^+ et Cd_2^+), dithiols vicinaux, 1,2-dithiole-3-thiones et polyènes conjugués (A.T. Dinkova-Kostova, 2001). Depuis, d'autres inducteurs ont été caractérisés, en particulier des substances endogènes telles le monoxyde d'azote (NO) (S. Dhakshinamoorthy, 2004) et la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J_2 (K. Itoh, 2004, Y. Kawamoto, 2000).

Dinkova-Kostova notait que tous ces composés bien que structurellement très distincts tous la propriété chimique d'électrophilie, ce qui leur confère une réactivité chimique particulière envers des thiols (-SH), présents dans la chaîne latérale de l'acide aminé soufré cystéine. La réaction d'un composé avec le résidu cystéine peut conduire à des modifications du thiol qui diffèrent en fonction de la classe à laquelle appartient le composé : oxydations, réductions, ou substitutions ou additions nucléophiles. Cette observation a conduit à proposer que la détection des inducteurs de Nrf2 implique la présence d'une ou de plusieurs cystéines chimiquement réactives au sein de du régulateur Keap1 (A.T. Dinkova-Kostova, 2001).

II.B.2. Keap1, le régulateur de Nrf2

II.B.2.a. Structure de Keap1

Keap1 fut identifié par le laboratoire de M. Yamamoto au Japon lors d'un crible deux-hybrides chez la levure utilisant comme appât le domaine Neh2 de Nrf2 (K. Itoh, 1999) (voir schéma figure 1). Une cartographie des domaines fonctionnels de Nrf2 avait permis d'identifier le domaine Neh2 (Nrf2 and ECH homology) à l'extrémité N-terminale de la protéine comme une région permettant de réguler l'activité transcriptionnelle de Nrf2 par les inducteurs. La délétion du domaine Neh2 conduit à une protéine dont l'activité est maximale et non inductible.

La protéine Keap1 appartient à la superfamille BTB (bric-à-brac, tramtrack, broad complex) –Kelch. Le BTB (acides aminés 161 à 179), également appelé POZ (Poxvirus zinc finger), est un domaine de dimérisation de par la présence d'une grande surface d'interaction

hydrophobe, qui permet ainsi l'homodimérisation de Keap1 (L.M. Zipper, 2002). Les protéines à BTB servent généralement d'« adaptateurs » dans les complexes d'ubiquitine ligase E3, recrutant d'une part la machinerie d'ubiquitylation par le biais d'une interaction entre leur domaine BTB et une culline, et d'autre part un substrat spécifique de l'ubiquitylation. La structure de plusieurs domaines BTB a été résolue par diffraction de rayons X, montrant la présence d'un repliement spatial très conservé.

La région entre les acides aminés 192 à 308 est appelée IVR (InterVening Region) ou domaine BACK (BTB and C-terminal Kelch). Elle est présente dans toutes les protéines contenant les domaines BTB et Kelch (P.J. Stogios, 2004). Une étude biochimique à partir de protéine recombinante a montré que Keap1 comporte un atome de zinc par molécule et que celui-ci semble coordonné, tout au moins en partie, par des cystéines présentes dans l'IVR (cf. plus bas) (A.T. Dinkova-Kostova, 2005). La constante d'association mesurée de cette association est très forte, typique des protéines à zinc, de l'ordre de 10^{11}M^{-1} .

Le domaine Kelch aussi appelé DGR (double glycin repeat) de Keap1 est compris entre les acides aminés 316 à 598. Il est responsable de l'interaction de Keap1 et Nrf2. Le domaine Kelch de Keap1 a été co-cristallisé avec un peptide de Nrf2 contenant le motif ETGE d'interaction avec Keap1 (S.C. Lo, 2006, B. Padmanabhan, 2006). Le domaine Kelch de Keap1 présente une structure en feuillets β repliés en hélice, caractéristique également des domaines WD40 présents dans certaines protéines F-box.

II.B.2.b. Keap1 contrôle l'ubiquitylation et la stabilité de Nrf2

Il avait été initialement proposé, au vu de la propriété de liaison à l'actine de la protéine Kelch de la drosophile, que le rôle de Keap1 était de séquestrer Nrf2 au cytoplasme par le fait de son attachement au cytosquelette. Dans ce modèle, les inducteurs chimiques activaient Nrf2 en rompant son interaction avec Keap1, et permettant ainsi sa translocation dans le noyau (K. Itoh, 1999, M.I. Kang, 2004).

Cependant quelques années plus tard, la découverte d'homologues de Keap1 fonctionnant comme adaptateurs d'un complexe ubiquitine ligase suggéra une fonction similaire chez Keap1. Quatre groupes montrèrent simultanément que Keap1 est en effet un adaptateur dans un complexe E3 ligase dépendant de la culline 3, et qu'il utilise pour substrat d'ubiquitylation Nrf2 (S.B. Cullinan, 2004, M. Furukawa, 2005, A. Kobayashi, 2004, D.D. Zhang, 2004). Ainsi, en l'absence d'inducteur, Nrf2 est ubiquitylé, puis dégradé par le

protéasome, et a de ce fait une demi-vie courte de quelques dizaines de minutes (K. Itoh, 2003, M. McMahon, 2003, D. Stewart, 2003, D.D. Zhang, 2003). En revanche, en présence d'inducteurs, Nrf2 n'est plus ubiquitinylé, sa demi-vie augmente significativement et il s'accumule dans le noyau des cellules pour activer ses gènes cibles. Dans macrophages issus de souris invalidées pour Keap1 (K. Itoh, 2003), ou dans des lignées cellulaires chez lesquelles l'expression de Keap1 est inhibée par interférence d'ARN (S.B. Cullinan, 2004), l'abondance de Nrf2 est maximale et n'est plus augmentée par les inducteurs, ce qui confirme le rôle primordial de Keap1 dans le contrôle de la dégradation de Nrf2.

Dans le cadre de ce dernier modèle du contrôle de Nrf2, comment les inducteurs interviennent-ils pour inhiber l'ubiquitylation de Nrf2 et sa dégradation ? L'effet des inducteurs de causer la perte de l'interaction entre Keap1 et Nrf2 est toujours plausible car elle entraîne nécessairement l'arrêt de l'ubiquitylation de Nrf2. Cependant, ce modèle a récemment perdu de sa popularité, en raison d'observations faites par plusieurs groupes indiquant l'absence de la perte de l'interaction Keap1- Nrf2 au cours de l'activation de Nrf2. Un modèle alternatif a été proposé par les groupes de Yamamoto et de Hannink (S.C. Lo, 2006, B. Padmanabhan, 2006). Les inducteurs, par leur effet de modifier la conformation de Keap1, entraîneraient un repositionnement de Nrf2 dans une position inadéquate pour son ubiquitylation. Ces deux groupes divergent cependant sur les modalités de l'interaction Keap1- Nrf2, au vu des informations de structures qu'ils ont chacun obtenues à partir de la co-cristallisation du domaine Kelch avec un peptide de Nrf2. Pour le groupe de Yamamoto, deux monomères de Keap1 se lient à Nrf2 par le biais de deux interactions au niveau du Neh2 de Nrf2, qui encadrent la région contenant les résidus lysine cibles de l'ubiquitylation : une interaction de forte affinité intéressant le motif ETGE et une autre d'affinité intermédiaire intéressant le motif DLG. Dans ce cas, le changement de conformation de Keap1 conduirait à la perte du point d'interaction d'affinité intermédiaire, ce qui suffirait à inhiber l'ubiquitylation de Nrf2 (A.L. Eggler, 2005, K.I. Tong, 2006). Pour Hannink, Keap1 et Nrf2 seraient liés dans des complexes de stœchiométrie 2:2 (S.C. Lo, 2006), et il propose que la modification de Keap1 par des inducteurs résulterait en un affaiblissement de l'interaction entre Keap1 et Cul3 (A. Kobayashi, 2006, D.D. Zhang, 2003, D.D. Zhang, 2004), et une possible réorientation de ces deux protéines pouvant aboutir à l'ubiquitylation de Keap1 (F. Hong, 2005, D.D. Zhang, 2005).

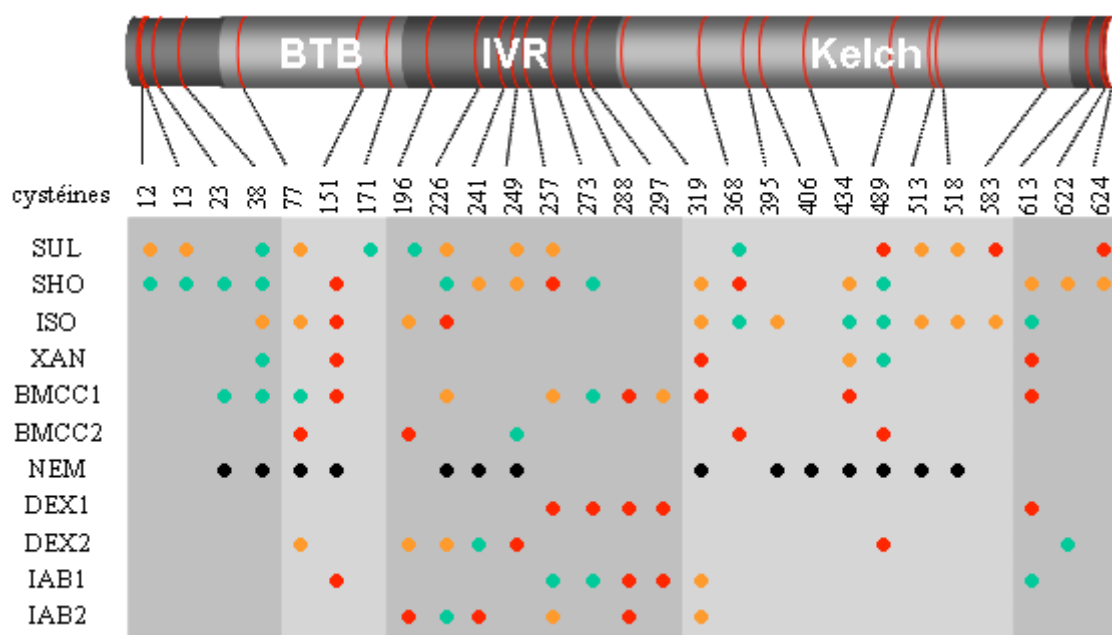


Figure 2. Réactivité des cystéines de Keap1 envers des agents alkylants *in vitro*. Keap1 est représenté avec son organisation en domaines structuraux. La position de chacune de ses cystéines y est repérée par une marque rouge, reliée à l'indication de sa position dans la structure primaire de Keap1. Les électrophiles utilisés pour des études de l'alkylation de Keap1 *in vitro* sont listés en colonne à gauche. SUL: sulforaphane (F. Hong, 2005); SHO, ISO, XAN, BMCC1: 10-shogaol, isoliquiritigénine, xanthohumol et 1-biotinamido-4-(4'-[maleimidiethylcyclohexane]-carboxamido)butane (Y. Luo, 2007); BMCC2: 1-biotinamido-4-(4'-[maleimidiethylcyclohexane]-carboxamido)butane (A.L. Egger, 2005); NEM: N-éthylmaleimide et DEX1: dexaméthasonemésylate (A.T. Dinkova-Kostova, 2002); DEX2: dexaméthasonemésylate (F. Hong, 2005); IAB1: N-iodoacétyl-Nbiotinylhexylènediamine (A.L. Egger, 2005); IAB2: N-iodoacétyl-Nbiotinylhexylènediamine (F. Hong, 2005). La détection de l'alkylation d'une cystéine par un composé est indiquée par un point. Les expériences utilisant plusieurs concentrations d'agent alkylant permettent de classer les cystéines en fonction de leurs réactivités relatives. Un point rouge indique alors une réactivité plus importante qu'un point orange, puis qu'un point vert. Les données correspondant aux lignes "NEM" et "DEX1" ont été obtenues avec le Keap1 de souris qui ne contient pas de cystéines aux positions 12 et 13, les autres avec le Keap1 humain. Figure adaptée de (R. Holland, 2008).

II.B.2.c. Keap1 est le détecteur des inducteurs de Nrf2

Rôle des résidus cystéine de Keap1 dans la détection des inducteurs

Comme nous l'avons vu précédemment, Dinkova-Kostava a proposé au vu de l'étude de la structure chimique d'un grand nombre d'inducteurs de Nrf2, que ceux-ci partagent la propriété chimique de réagir fortement avec le résidu cystéine. Ce groupe, suivi ensuite par d'autres, a donc logiquement voulu confirmer cette hypothèse en essayant tout d'abord de mettre en évidence une réactivité particulière de certaines des 25 cystéines de Keap1 conservées chez l'homme et la souris. Une multitude d'études *in vitro* à partir de KEAP1 recombinant et combinant diverses techniques, dont la spectrométrie de masse, et la

mutagenèse dirigée des résidus cystéines, publiées ces dernières années, ont cherché à identifier les cystéines réactives de KEAP1. Certaines cystéines apparaissent plus réactives que d'autres *in vitro* (Voir Figure). Les résultats obtenus divergent selon l'étude et l'agent alkylant utilisé. On notera une réactivité particulière *in vitro* des cystéines 151 et 288. D'autres approches ont cherché à prouver l'existence d'une modification covalente des cystéines de Keap1 *in vivo* et de les identifier. La prostaglandine 15d $\Delta^{12,14}$ PGJ2 (A.L. Levonen, 2004), le 4-hydroxy-nonénal, un accepteur de Michael qui peut être produit de façon endogène par la dégradation oxydative de lipides (A.L. Levonen, 2004), et un catechol, l'acide carnosique (T. Satoh, 2008), modifient Keap1 par alkylation et activent Nrf2. Un mutant de Keap1 dans lequel les cystéines de la région IVR ont été mutées n'est plus alkylé par la 15d $\Delta^{12,14}$ PGJ2 (K. Itoh, 2004). L'alkylation de la cystéine 151 de Keap1 par l'acide carnosique a été détectée *in vivo* par spectrométrie de masse (T. Satoh, 2008).

Enfin plusieurs études ont cherché à montrer le rôle des cystéines dans la fonction de Keap1, soit sur des modèles *in vitro* étudiant l'effet de certains inducteurs et de la mutation de certains résidus sur la perte de l'interaction Keap1-Neh2, soit *in vivo* en suivant la fonction de protéines mutées au niveau des cystéines, après transfection transitoire.

Ce que l'on peut retenir aujourd'hui de façon sûre de ces travaux multiples, c'est l'existence d'une alkylation de la cystéine 151 du domaine BTB de Keap1 en réponse à différents inducteurs, et le rôle crucial de cette cystéine et des cystéines 273 et 288 de la région IVR pour l'activité de Keap1.

Rôle des cystéines 273 et 288 de l'IVR de Keap1

Après transfection transitoire en culture cellulaire, les mutants de Keap1 dans lesquels les cystéines 273 et 288 ont été substituées sont incapables de réprimer l'activité de Nrf2 : Nrf2 apparaît moins ubiquitinylé, sa stabilité est augmentée, et l'activité d'un gène rapporteur contrôlé par l'ARE est plus importante (N. Wakabayashi, 2004, D.D. Zhang, 2003). Le rôle fonctionnel de ces deux cystéines a pu également être établi chez la souris. Comme nous le verrons plus loin, l'inactivation de Keap1 chez la souris conduit à un phénotype de létalité, lié à une suractivation de Nrf2, comme le démontre la suppression de ce phénotype par l'inactivation de Nrf2. Cependant, cette létalité n'est pas corrigée lorsqu'un transgène exprimant Keap1 portant la mutation des cystéines 273 et 288 est introduite dans la souris *keap1^{-/-}*, confirmant que ce mutant chez la souris ne peut réprimer Nrf2 (T. Yamamoto, 2008).

La co-expression dans une même cellule un mutant de Keap1 avec mutation de la cystéine 273 et un autre avec mutation de la cystéine 288 restaure environ 50% de l'activité Keap1 (N. Wakabayashi, 2004), indiquant que Keap1 est actif sous forme d'un homodimère au sein duquel une seule cystéine 273 et une seule 288 sont nécessaires à l'activité. Cette propriété est conservée chez les poissons, qui expriment deux formes différentes de Keap1 contenant l'une une cystéine correspondant à la cystéine 273, et l'autre à la cystéine 288 (L. Li, 2008)

Comment pourrait-on rationaliser le rôle des Cys273 et Cys288 dans l'activité de Keap1 ? Une notion importante à considérer ici, restant cependant à confirmer, est le rôle possible de ces deux cystéines dans la coordination de l'atome de zinc présent dans Keap1. Les inducteurs de Nrf2 pourraient ainsi déplacer le zinc sans nécessairement modifier ces cystéines, comme cela est suggéré *in vitro*, ce qui entraînerait une perte d'activité de Keap1 par modification de conformation (B. D'Autreaux, 2007, A.T. Dinkova-Kostova, 2005)

Rôle de la cystéine 151 de Keap1

La cystéine 151 est la seule des cystéines de Keap1 pour laquelle on a pu démontrer la modification *in vivo* (T. Satoh, 2008). De plus, ce résidu est le seul dont le rôle dans la fonction de Keap1 est clair, sans toutefois que l'on en connaisse encore tous les détails moléculaires : la présence de ce résidu est indispensable pour que l'ubiquitylation et la dégradation de Nrf2 puissent être levées par les inducteurs. En système de transfection transitoire sur cellules en culture, la mutation de la cystéine 151 de Keap1 ne perturbe pas l'ubiquitylation et la dégradation de Nrf2. En revanche, cette même mutation bloque complètement la stabilisation de Nrf2 induite par la tertio-butylhydroquinone (tBHQ) (D.D. Zhang, 2003, D.D. Zhang, 2004). Ce résultat a été confirmé chez la souris par l'introduction du mutant correspondant dans la lignée *keap1^{-/-}*. L'expression du transgène récupère la viabilité liée à l'invalidation de Keap1, ce qui prouve que le mutant la cystéine 151 réprime bien Nrf2 chez la souris. Cette même souris a une expression de base normale des gènes cibles de Nrf2 mais cette expression n'est pas augmentée par les inducteurs classiques de la voie, et se comporte de fait comme la souris *nrf2^{-/-}*, ce qui confirme bien que l'activation de Nrf2 implique la cystéine 151 de Keap1 (T. Yamamoto, 2008).

Outre sa modification covalente en réponse au tBHQ, la cystéine 151 est le site d'une modification post-traductionnelle de Keap1 dont la nature n'est pas encore élucidée (G. Rachakonda, 2008, D.D. Zhang, 2003). Dans les cellules traitées au tBHQ, Keap1 forme un

complexe covalent de haut poids moléculaire non-réductible par le dithiothréitol. La formation de ce complexe dont la taille est grossièrement celle du double de Keap1 nécessite la cystéine 151. Ni la nature de ce complexe ni sa fonction ne sont connus.

En définitive le rôle de la cystéine 151 est important, mais sa fonction moléculaire est inconnue. La mutation la cystéine 151 apparaît dominante par rapport à celles des cystéines 273 et 288, c'est-à-dire que malgré l'alkylation de ces dernières, il ne peut y avoir occurrence du « switch » fonctionnel de Keap1 en l'absence de la cystéine 151 (T. Yamamoto, 2008).

Quel est donc le rôle moléculaire de la cystéine 151 ? L'alignement de la séquence du BTB de Keap1 avec celui de la protéine LRF dont la structure cristallographique a été résolue (F.D. Schubot, 2006), montre que la cystéine 151 est située à la surface du domaine BTB, mais du côté opposé à l'interface de dimérisation canonique (Figure 3), ce qui élimine la possibilité d'une fonction de modulation de l'homodimérisation de Keap1.

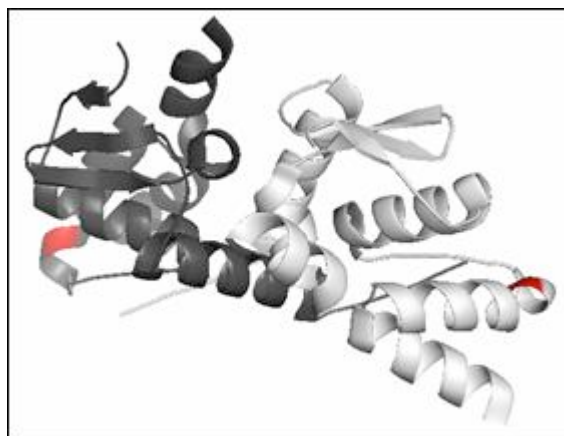


Figure 3. Structure du domaine BTB de LRF (leukemia/lymphoma related factor) sous forme d'homodimère. Un monomère apparaît en gris pâle, l'autre en gris foncé. En rouge, la position de l'acide aminé correspondant à la cystéine 151 de Keap1. Numéro d'accèsion PDB : 2IF5 (F.D. Schubot, 2006).

II.B.2.d. Activation de Keap1-Nrf2 par l' H_2O_2 et le NO?

Nous individualisons ici les données concernant l'activation de Nrf2 par l' H_2O_2 et le NO en les revoyant de façon exhaustive, car étant étroitement liées à notre étude expérimentale. Les questions essentielles sont de savoir si la voie Keap1- Nrf2 est activée par les oxydants proprement dits que sont l' H_2O_2 et le NO, et si tel est le cas, si cette activation s'accompagne d'une oxydation de Keap1.

Données expérimentales en support de l'activation de Nrf2 par l'H₂O₂ et le NO

Les données de la littérature concernant la régulation de Nrf2 par l'H₂O₂ sont éparpillées, voire contradictoires, n'apportant pas la conviction de l'existence d'une telle activation. Ces discordances sont possiblement liées aux différents types cellulaires utilisés. Les données concernant le monoxyde d'azote (NO) sont beaucoup plus convaincantes. L'H₂O₂ active les gènes cibles de Nrf2 dans les macrophages péritonéaux et cette activation nécessite la présence de Nrf2, comme l'indique l'absence d'induction dans les macrophages issus de souris *nrf2*^{-/-} (T. Ishii, 2000). Il faut néanmoins noter que l'induction décrite ici est très limitée dans son intensité. Cette même étude montre que la présence de l'enzyme glucose oxydase dans le milieu de culture, un enzyme qui produit de l'anion superoxyde au cours de son cycle catalytique, induit aussi l'accumulation nucléaire de Nrf2 dans les macrophages péritonéaux. Dans des lignées issues de carcinomes ovariens humains, le facteur de transcription ETS-1 est activé au niveau de sa transcription par l'H₂O₂. Cette induction est dépendante de la présence de séquences ARE en cis. Cette dernière étude montrait aussi l'induction par l'H₂O₂ de la liaison de ETS-1 nucléaire à l'ADN spécifique de l'ARE (L.A. Wilson, 2005). Paradoxalement, la régulation négative de Nrf2 par l'H₂O₂ a été décrite dans les cellules de la lignée HepG2. Cette inactivation est le résultat de la stimulation de l'export nucléaire de Nrf2 causé par phosphorylation de sa tyrosine 568 par Fyn (A.K. Jain, 2006).

Un nombre plus important d'articles rapportent l'activation de Nrf2 par le NO, avec des observations beaucoup plus convaincantes. Dans des lignées dérivées de neuroblastomes, le NO active la transcription des gènes cibles de Nrf2, et l'expression ectopique d'un mutant dominant négatif de Nrf2 ou la baisse du niveau d'expression de ce dernier par interférence d'ARN bloque la transcription régulée en cis par l'ARE (S. Dhakshinamoorthy, 2004). Une autre étude rapporte l'induction d'HO-1 dans les macrophages primaires stimulés par le lipopolysaccharide (LPS) (T. Ashino, 2008). Cette induction dépend de la NO synthase inducible (iNOS) et de Nrf2, puisqu'elle n'est pas observée dans les macrophages ayant une invalidation de l'un ou de l'autre des gènes correspondants. L'induction par le NO des gènes cibles de Nrf2 a été récemment décrite dans les cellules musculaires lisses, avec pour conséquence un effet positif dans la survie cellulaire (X.M. Liu, 2007).

Détection de formes oxydées de Keap1 in vivo

L'hypothèse prévalente quant à la modulation de l'activité de Keap1 est, comme nous l'avons vu précédemment, celle de la modification de résidus cystéines réactifs. Qu'en est-il de l'oxydation de Keap1 proprement dite, en particulier en réponse à des inducteurs capables d'oxyder le résidu cystéine comme le NO et l'H₂O₂ ?

Il n'existe aucune donnée de la littérature témoignant de l'oxydation de Keap1 en réponse à l'H₂O₂. En revanche la preuve d'une oxydation de Keap1 a été apportée dans une publication : il a été montré que dans les cellules HEK293H, la S-nitro-cystéine (Cys-NO) entraînait une oxydation de Keap1 concomitante à l'accumulation nucléaire de Nrf2 et de Keap1 (B.J. Buckley, 2008). La Cys-NO est un composé capable de nitroser les résidus cystéines par réaction de transnitrosation. Le protocole utilisé par ce groupe consistait à dérivatiser les résidus cystéine réduits puis, après réduction des cystéines oxydées, à marquer celles-ci par carbamidométhylation par l'iodo-acétamide biotinylé. Le signal de biotinylation obtenu après immuno-précipitation de Keap1 donnait ensuite une appréciation qualitative et quantitative de l'oxydation de la protéine, sans pourtant renseigner sur la nature de l'oxydation ni sur les résidus cystéines intéressés par l'oxydation.

Le groupe de Talalay a montré en 2004 qu'en réponse à des alkylants de trois classes distinctes, le sulforaphane, la 1,2-dithiole-3-thione, et la bis(2-hydroxybenzylidène)acétone, Keap1 est modifié en un complexe covalent de haut poids moléculaire, réductible par le dithiothréitol, et dont la taille suggère la nature dimérique (N. Wakabayashi, 2004). Cependant, la nature biochimique de ce complexe que l'on pourrait interpréter comme un dimère de Keap1 lié par un pont disulfure, n'a pas été explorée plus avant, et cette observation n'a pas été reproduite par d'autres groupes. De plus, l'induction d'un pont disulfure par les agents alkylants est improbable biochimiquement. Il est donc possible que les conditions expérimentales utilisées aient favorisé l'oxydation de KEAP1, par exemple au cours de la lyse cellulaire lors de l'extraction des protéines.

II.B.2.e. Keap1 est ubiquitinylé

Keap1 est également ubiquitinylé par le même complexe Cul3 ubiquitine ligase auquel il est associé. Cette ubiquitylation augmente après traitement par le tBHQ (D.D. Zhang, 2005) et le N-éthyl-N-biotinylhexylènediamine (F. Hong, 2005), mais pas avec le sulforaphane (D.D. Zhang, 2005) ni le maléimide BMMC (F. Hong, 2005). L'ubiquitylation de Keap1 requiert la présence de la cystéine 151 (D.D. Zhang, 2005). Cependant l'absence du domaine

d'interaction de Keap1 avec Cul3 augmente l'ubiquitinylation de Keap1 alors qu'elle diminue celle de Nrf2 (D.D. Zhang, 2005). L'ubiquitinylation de Keap1 corrèle avec une dégradation accrue de la protéine selon un mécanisme qui curieusement est indépendant du protéasome. On ne connaît pas le rôle de cette ubiquitinylation de Keap1 dans l'activation de Nrf2. Zhang et collègues ont suggéré que l'alkylation de Keap1 aurait pour effet de réorienter le complexe E3 ligase de l'ubiquitinylation de Nrf2 vers celle de Keap1. Cette idée reste encore à prouver. A noter qu'une ubiquitinylation induite par le tBHQ a été observée avec trois protéines BTB/POZ, la gigaxonine, la sarcosine, et ENC-1, ce qui démontre qu'il ne s'agit pas d'un phénomène spécifique de Keap1 (D.D. Zhang, 2005).

II.B.3. Activation de Nrf2 par phosphorylation

L'activité de Nrf2 est également contrôlée par phosphorylation. Plusieurs kinases ont été impliquées dans l'activation de Nrf2. Tout d'abord, Nrf2 est phosphorylé au niveau de la tyrosine 568, induisant ainsi l'export de la protéine par le récepteur d'export nucléaire Xpo1/Crm1 (M. Salazar, 2006). Cette phosphorylation est dépendante de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) et de Fyn, dont Nrf2 est le substrat direct (A.K. Jain, 2007).

Nrf2 est également un substrat direct de la kinase PERK, une des kinases contrôlant la réponse de stress de surcharge du réticulum, ou UPR (Unfolded Protein Response). L'activation de Nrf2 par le stress UPR aurait pour effet d'augmenter la synthèse de glutathion (GSH) (voir ci-dessous, rôle physiologique de Nrf2), qui intervient dans l'adaptation cellulaire à ce stress. Ici la phosphorylation directe de Nrf2 par la kinase PERK a été montrée empêcher l'interaction de Nrf2 avec Keap1 (S.B. Cullinan, 2004, S.B. Cullinan, 2003). Le monoxyde de carbone active aussi Nrf2 d'une façon dépendante de PERK-, bien qu'il n'induisse pas de stress UPR (K.M. Kim, 2007).

La protéine kinase C (PKC) semble aussi avoir un rôle important dans la régulation de Nrf2, en réponse au tBHQ. La PKC phosphoryle Nrf2 *in vitro* et *in vivo*, et les inhibiteurs de la PKC bloquent l'activation de Nrf2 par le tBHQ et le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) (H.C. Huang, 2000). De plus, l'invalidation du gène codant la PKC δ limite l'activation de Nrf2 dans des ostéoblastes exposés à l'arsénite de sodium (B. Li, 2004). La PKC phosphoryle Nrf2 au niveau de la sérine 40, du domaine Neh2 à proximité des sites d'ubiquitinylation, induisant ainsi une perte d'interaction avec Keap1 (D.A. Bloom, 2003, H.C. Huang, 2002).

Les voies ERK (K.W. Kang, 2000, R. Yu, 1999, L.M. Zipper, 2000) et p38 (J. Alam, 2000, R. Yu, 2000, L.M. Zipper, 2000) semblent participer à la régulation des ARE, mais les résultats contradictoires de la littérature rendent l'appréciation de ce phénomène difficile.

II.C. Rôle physiologique de Nrf2

Une multitude d'études se sont intéressées au rôle physiologique de la voie Keap1-Nrf2. Nous nous focaliserons sur les aspects de ces études que nous jugeons les plus importants.

II.C.1. Les gènes régulés par Nrf2

Une des clés de la compréhension du rôle physiologique de Nrf2 réside dans la nature de ses gènes cibles. Plusieurs études utilisant l'approche génomique par puces à ADN, couplée à l'utilisation de cellules issues de souris invalidées pour le gène codant Nrf2, ont permis un accès exhaustif au répertoire des gènes cibles de Nrf2. Pour revue, voir (M. Kobayashi, 2006). La nature de ces gènes révèle en particulier les fonctions de Nrf2 dans la protection cellulaire contre les xénobiotiques, les stress environnementaux, le stress oxydant, et dans le contrôle de l'homéostasie redox intracellulaire.

Nous avons utilisé une classification des gènes cibles de Nrf2 en différentes catégories fonctionnelles:

— Les enzymes de phase II, parmi lesquelles la NADPH:quinone oxydoréductase NQO1, des glutathion S-transférases (GST), des UDP-glucuronyl transférases (UGT). Les enzymes de phase II participent à un processus biochimique de détoxification des xénobiotiques, qui est décrit par un modèle en deux étapes. La première étape met en jeu des enzymes de phase I, des oxydases comme les cytochromes P450, qui catalysent la fonctionnalisation des xénobiotiques, souvent par oxydation. La seconde étape, catalysée par les enzymes de phase II, permet la conjugaison des produits obtenus avec des groupements chimiques polaires pour former des produits pouvant être facilement excrétés. Les gènes codant pour les enzymes de phase II sont inductibles par les produits du métabolisme de phase I, qui sont souvent des produits très électrophiles.

— Les enzymes de détoxification des ROS, telles la peroxyredoxine 1, la superoxyde dismutase, la catalase, et l'hème oxygénase (HO-1), un enzyme qui catalyse le catabolisme de

l'hème en biliverdine, monoxyde de carbone, et fer, et qui est décrit comme ayant la propriété de protéger contre les espèces réactives de l'oxygène. En accord avec la nature de ces gènes contrôlés par Nrf2, le niveau basal d'espèces actives de l'oxygène mesuré par RPE dans le foie et les reins de souris, est affecté significativement en l'absence de Nrf2 (A. Hirayama, 2003).

— Les enzymes impliqués dans les voies de réduction des thiols et dans la synthèse de glutathion : la thioredoxine 1, la thioredoxine réductase 1, la glutathion réductase, la γ -glutamyl-cystéine ligase, et le transporteur d'échange glutamate-cystéine xCT.

— Des transporteurs membranaires impliqués dans les phénomènes de résistance multiples aux drogues.

— Des protéines chaperons du stress.

— Des sous-unités du protéasome 26S.

II.C.2. Apports du modèle de souris à la compréhension de la fonction de Nrf2

Le phénotype des souris *nrf2*^{-/-} a largement confirmé le rôle majeur de Nrf2 dans la protection cellulaire contre les stress chimiques et oxydant et a également mis en évidence un rôle important dans la cytoprotection au cours des phénomènes d'inflammations aigües et chroniques. Ce modèle génétique a permis aussi de valider l'utilisation des inducteurs de Nrf2 dans la prévention des cancers.

*Phénotypes des souris *nrf2*^{-/-}*

Les souris *nrf2*^{-/-} ont une susceptibilité accrue vis-à-vis de l'hépatotoxicité induite par l'acétaminophène (A. Enomoto, 2001, C.E. Goldring, 2004), la toxicité pulmonaire du butyl-hydroxytoluène (K. Chan, 1999) et de l'hyperoxie (H.Y. Cho, 2002), la neurotoxicité de l'acide 3-nitropropionique (M.J. Calkins, 2005, A.Y. Shih, 2005). Chez ces souris, la carcinogénicité gastrique du benzo[*a*]pyrene (M. Ramos-Gomez, 2001) est très exacerbée, comme l'est la carcinogénicité vésicale du *N*-nitrosobutyl(4-hydroxybutyl)amine (K. Iida, 2004). Les souris *nrf2*^{-/-} développent aussi un emphysème pulmonaire massif lors de l'exposition chronique à la fumée de cigarettes (T. Iizuka, 2005) et aux particules d'échappement de moteur diesel. Elles sont également beaucoup plus susceptibles aux

rayonnements UV (A. Hirota, 2005). L'invalidation de Nrf2 augmente de façon majeure l'inflammation des voies aériennes supérieures et l'asthme induits par les allergènes (T. Rangasamy, 2004), l'inflammation secondaire aux blessures cutanées (S. Braun, 2002), et au cours de la colite expérimentale induite par le dextrane sulfate de sodium (T.O. Khor, 2006). De plus, cette invalidation augmente significativement la létalité et exacerbe les manifestations morbides au cours du choc endotoxinique induit par le LPS (R.K. Thimmulappa, 2006). Elle entraîne aussi, en particulier chez les souris femelles, des manifestations inflammatoires auto-immunes très semblables au lupus érythémateux disséminé : apparition d'autoanticorps, activation polyclonale des lymphocytes, et mortalité précoce liée à des néphrites glomérulaires (Q. Ma, 2006).

L'ensemble de ces phénotypes bien sûr confirment le rôle cytoprotecteur majeur de Nrf2 vis-à-vis de différentes agressions chimiques et physiques, et ses effets anticarcinogéniques et anti-inflammatoires méritent d'être discutés de façon individuelle.

*Phénotype des souris *keap1*^{-/-}*

L'invalidation de *keap1* chez la souris conduit à une létalité peu après la naissance liée à une hyperkératose de la paroi œsophagienne et gastrique empêchant l'alimentation des nouveaux-nés. Ce phénotype est sauvé par l'invalidation de *nrf2*, confirmant *in vivo* que la fonction majeure de Keap1 est de réprimer Nrf2 et que le phénotype léthal est causé par l'activation constitutive de Nrf2 (N. Wakabayashi, 2003). Le modèle de la souris Keap1 KO ne pouvant renseigner sur l'effet de l'activation chronique chez la souris adulte, une invalidation de *keap1* ciblée aux hépatocytes a été obtenue (H. Okawa, 2006). Ces souris sont parfaitement viables et ne présentent pas d'anomalie morphologique du foie. Cependant, ces souris ont une élévation importante de l'expression des enzymes de détoxification au niveau du foie et sont beaucoup plus résistantes que les souris sauvages à la toxicité hépatique de l'acétaminophène.

Nrf2 et cancers

La voie Keap1- Nrf2 a un rôle paradoxal dans le cancer, protecteur mais également facilitateur du développement du cancer. Elle favorise aussi la résistance à la chimiothérapie anticancéreuse. Ce rôle paradoxal a été décrit par les anglo-saxons par le vocable de « double-edge sword » (J.D. Hayes, 2006).

Nrf2 a clairement un rôle anticarcinogène. Cette fonction est bien sûr liée au contrôle exercé par Nrf2 sur l'expression des enzymes de détoxification, parmi lesquels les enzymes de phase II du métabolisme des xénobiotiques. Ces enzymes sont capables de conjuguer puis de réduire les chimiques électrophiles réactifs à propriété carcinogène en composés chimiques moins réactifs et plus facilement excrétés. Par exemple, l'incidence accrue chez les souris *nrf2*^{-/-} de tumeurs vésicales induites par le *N*-nitrosobutyl(4-hydroxybutyl)amine (BBN) est liée au défaut d'expression de l'UDP-glucuronyltransférase responsable de l'O-glucuronylation du BBN (K. Iida, 2004). En effet, en l'absence de cette glucuronylation, le BBN est oxydé en un composé carcinogène, le *N*-nitrosobutyl(3-carboxypropyl)amine (BCPN), dont la concentration est très augmentée dans les urines des souris *nrf2*^{-/-}. Le rôle antioxydant de Nrf2 contribue aussi indirectement à la prévention de la carcinogenèse chimique, étant donné le rôle des oxydants dans ce processus. Le rôle anti-inflammatoire de Nrf2 intervient également dans la prévention des cancers liés à l'inflammation chronique, comme cela a été montré dans un modèle expérimental murin de cancer du côlon par l'azoxyméthane en association avec le dextrane sulfate de sodium induisant une inflammation colique chronique (W.O. Osburn, 2007). Dans ce modèle, les souris *nrf2*^{-/-} ont un nombre considérablement plus élevé de polypes coliques malins, comparé aux souris sauvages.

L'ensemble de ces données légitime pleinement les stratégies ciblant Nrf2 dans la chimio-prévention de la carcinogenèse chimique, et de celle liée à l'inflammation chronique. Le potentiel d'une telle stratégie a déjà été largement démontré dans le modèle murin et est à l'étude chez l'homme. L'administration de petites molécules capables d'activer Nrf2 mais dénuées d'effet toxique a un effet préventif contre l'apparition de cancers, démontré dans une multitude de modèles animaux de carcinogenèse (W.O. Osburn, 2007). L'oltipraz, une dithiol-thione initialement développée pour le traitement des bilharzioses, est l'une des molécules les plus prometteuses, comme le démontre son utilisation dans la prévention des tumeurs gastriques murines induites par un gavage au benzo[a]pyrène (M. Ramos-Gomez, 2001). L'oltipraz est également très efficace dans la prévention de cancers induits par l'aflatoxine chez les rats (T.W. Kensler, 1987). Le sulforaphane, un isothiocyanate présent dans le brocoli et autres crucifères, et un puissant inducteur de Nrf2, a également une grande efficacité de chimio-prévention des cancers. Il est entre autres capable de prévenir les tumeurs mammaires induites par le 7,12-diméthyl-benzanthracène (DMBA) (Y. Zhang, 1994), les tumeurs gastriques induites par le benzo[a]pyrène (J.W. Fahey, 2002) et les tumeurs de la peau induites par le DMBA et le TPA (C. Xu, 2006). La butyl-hydroxyanisole et l'éthoxyquine induisent chez la souris l'augmentation de l'expression des enzymes de phase

II, et protègent aussi contre l'effet mutagène du benzo[a]pyrène (A.M. Benson, 1978). Dans plusieurs de ces modèles de carcinogénèse chimique, la perte de l'effet de chimio-prévention chez les souris *nrf2*^{-/-} a permis de démontrer le rôle crucial de Nrf2 dans ce phénomène.

Paradoxalement, l'axe Keap1- Nrf2 confère aussi un avantage de croissance à la cellule tumorale et favorise l'émergence de chimiorésistance. La présence de séquences variantes inactivatrices de Keap1, ayant pour conséquence une activation constitutive de Nrf2, a été identifiée dans des tumeurs du poumon chez l'homme (B. Padmanabhan, 2006, A. Singh, 2006). Singh et collègues ont aussi identifié de telles mutations dans des lignées tumorales issues de cancers du poumon et ont montré que ces lignées présentent une résistance accrue vis-à-vis de drogues utilisées en chimiothérapie. La fréquence de ces mutations somatiques de Keap1 est élevée, de 50% dans les lignées tumorales et de 19% dans les tumeurs humaines analysées. Une deuxième étude similaire a identifié dans les tumeurs du poumon cinq mutations de Keap1 avec une fréquence de 8% (T. Ohta, 2008). Cette même étude a aussi identifié dans deux lignées dérivées de tumeurs du poumon des mutations de Keap1 associées à une activation constitutive de Nrf2, une résistance accrue au cisplatine, et à un avantage de croissance cellulaire. Une mutation inactivant *keap1* a également été décrite dans un cas de cancer du sein (P. Nioi, 2007). Une baisse de l'expression de Keap1 liée à l'hyperméthylation du locus correspondant, a été identifiée dans des lignées humaines issues de cancers du poumon (R. Wang, 2008).

En conclusion, la fonction de régulation de l'expression des gènes de détoxification cellulaire permet à Nrf2 d'éliminer les carcinogènes et de prévenir le cancer. Paradoxalement cette même fonction promeut une résistance accrue vis-à-vis des drogues de chimiothérapie dans les tumeurs établies. L'activation chronique de Nrf2 secondaire à des mutations de Keap1 donne également un avantage de croissance à la cellule tumorale possiblement lié au rôle de survie cellulaire de ce régulateur.

Nrf2 et inflammation

Un grand nombre des phénotypes observés chez les souris *nrf2*^{-/-} peuvent être interprétés comme le résultat de réactions inflammatoires anormales et laissent suggérer un rôle majeur de Nrf2 en tant que modulateur de l'inflammation.

Les réactions anormales du poumon aux allergènes, à l'hyperoxie, à la fumée de cigarettes avec développement d'un emphysème majeur, celles du colon au dextrane sulfate de sodium, observées chez les souris *nrf2*^{-/-} (voir au-dessus) sont des manifestations qui

témoignent toutes d'une réaction inflammatoire anormale comme l'indique la présence d'un infiltrat de cellules inflammatoire majeur dans les organes concernés. La présence d'un syndrome proche du lupus érythémateux disséminé chez les souris *nrf2*^{-/-}, témoigne aussi d'un défaut de la réaction inflammatoire. Il en est de même de la morbidité et mortalité accrues lors du choc endotoxinique par le LPS chez ces souris déficientes.

De quelle manière peut-on rationaliser le rôle de Nrf2 au cours de l'inflammation ? Nrf2 pourrait limiter les dommages liés aux réactions inflammatoires excessives par différents mécanismes. Nrf2 est activé dans les macrophages stimulés par le LPS (T. Ashino, 2008, K. Srisook, 2005). Cette activation fait intervenir le NO lui-même produit par les macrophages activés, et conduit à l'expression des gènes cibles de Nrf2, dont des antioxydants, les enzymes intervenant dans la synthèse du GSH et l'hème oxygenase (HO-1). Ces antioxydants pourraient limiter les effets collatéraux de l'inflammation liés aux espèces actives de l'oxygène et du NO produites au cours de l'activation de macrophages et des neutrophiles. En effet, HO-1 protège vis-à-vis de l'apoptose induite par le NO, comme ceci a été montré dans une lignée de neuroblastome (S. Dhakshinamoorthy, 2004). L'induction de HO-1 par Nrf2 en réponse au NO est également impliquée dans la rétro-régulation négative de la NO synthase inductible iNOS, l'enzyme responsable de la synthèse de NO dans les macrophages activés (T. Ashino, 2008). L'effet antiapoptotique de Nrf2 est également décrit en système cellulaire dans les modèles d'apoptose induite par l'H₂O₂ (A.D. Kraft, 2004), les radiations UV (A. Hirota, 2005), et le stress de surcharge du réticulum UPR (S.B. Cullinan, 2004). L'effet antiapoptotique de Nrf2 est également suggéré par la sévérité des hépatites observées chez les souris *nrf2*^{-/-} après administration d'anticorps anti-FAS ou de TNF α , et liées à une apoptose des hépatocytes (N. Morito, 2003). La réduction de la sévérité de ces hépatites par l'administration d'un précurseur du GSH, la N-acétylcystéine, suggère l'importance du contrôle exercé par Nrf2 sur le maintien de l'homéostasie redox dans la genèse de ces manifestations.

La voie Nrf2 pourrait également limiter l'intensité et la durée de l'activation des macrophages. En effet, une étude biochimique des macrophages de souris *nrf2*^{-/-} a montré qu'en réponse au LPS, celles-ci produisent beaucoup plus d'espèces réactives de l'oxygène, et les voies de signalisation en aval du récepteur au LPS (NF- κ B et MAP kinases JNK, p38 et ERK) sont recrutées de façon plus intense et plus soutenue que dans les cellules sauvages (R.K. Thimmulappa, 2006). Nrf2 pourrait moduler l'activation de ces voies de signalisation par le biais du contrôle qu'il exerce sur l'homéostasie redox intracellulaire, sachant que ces voies ont toutes une composante redox (J.K. Kolls, 2006).

En conclusion, Nrf2 apparaît comme un modulateur important de l'inflammation, limitant les effets pathologiques de celle-ci, sans que l'on sache encore exactement le mécanisme de cette protection. Toujours est-il que Nrf2 est envisagé comme cible thérapeutique anti-inflammatoire (N.G. Innamorato, 2008, R.K. Thimmulappa, 2007). En fait, certains agents anti-inflammatoires comme des triterpénoïdes (A.T. Dinkova-Kostova, 2005), et certains sels d'or (K. Kataoka, 2001) sont de puissants activateurs de Nrf2, et leur effet thérapeutique est au moins partiellement dépendent de Nrf2.

III. Les facteurs de transcription Bach1 et Bach2

Les protéines Bach1 et Bach2 (BTB and CNC homology 1 et 2) ont été identifiées à partir d'un crible double hybride dans la levure utilisant la protéine MafK comme sonde. (T. Oyake, 1996). Comme NF-E2 p45 et Nrf2, ils présentent chacun un domaine CNC-bZip (figure 4) responsable de leur hétérodimérisation avec les petites Maf, et de leur interaction avec des séquences d'ADN régulatrices de type ARE. Outre le CNC-bZip, Bach1 et Bach2 présentent à leurs extrémités N-terminales un domaine BTB, et une courte extrémité C-terminale, qui comporte un signal de localisation cytoplasmique (SLC). En dehors de ces régions, Bach1 et Bach2 sont très faiblement homologues l'un à l'autre. Ils ne présentent pas de domaine canonique de transactivation, et fonctionnent comme des inhibiteurs de la transcription.



Figure 4. Représentation schématique en domaines fonctionnels de Bach1 et Bach2. Bach1 et Bach2 présentent plusieurs régions d'homologie. Le domaine BTB, situé à leur extrémité N-terminale, présente une homologie de 62% entre ces deux protéines. Leurs domaines CNC-bZip de liaison à l'ADN et de dimérisation avec les petites Maf sont homologues à 54%. Une courte région C-terminale qui constitue un signal de localisation cytoplasmique (SLC), est conservée à 78% entre Bach1 et Bach2. En dehors de ces régions, Bach1 et Bach2 ne présentent pas d'homologie. Figure adaptée de (H. Hoshino, 2000).

III.A. Fonction de Bach1

Bach1 est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus. C'est un des régulateurs physiologiques principaux du gène de l'hème oxygénase HO-1. En effet, Bach1 interagit directement avec les séquences ARE du promoteur du gène de HO-1, et son invalidation génétique induit une forte augmentation du niveau d'expression basal de HO-1. La régulation en cis de l'expression du gène ho-1 par les séquences ARE résulte d'une compétition pour ces

séquences entre les facteurs Nrf2 et Bach1 (J. Sun, 2002). L'activation constitutive de HO-1 par l'invalidation de Bach1 chez la souris limite la taille d'infarctus du myocarde causés par une ischémie/reperfusion (Y. Yano, 2006).

Bach1 participe au maintien de l'homéostasie cellulaire de l'hème en tant que détecteur direct de la concentration d'hème intracellulaire. En effet, Bach1, par l'intermédiaire de différents motifs cystéine-proline, présente une affinité pour l'hème, avec un Kd mesuré de 140nM, et suite à une augmentation de concentration en hème, la liaison de l'hème à Bach1 constitue un signal de reconnaissance par l'exportine Crm-1, ce qui provoque l'exclusion nucléaire de Bach1, donc son inactivation, et la levée de dérégulation de HO-1 (H. Suzuki, 2004).

III.B. Fonction de Bach2

Bach2 est exprimé principalement dans le thymus et la rate, et plus faiblement dans les leucocytes, le grêle, et le cerveau (S. Sasaki, 2000). Bach2 est également exprimé dans des embryons de souris au jour 12,5 de la gestation, au niveau des cellules neuronales en cours de différenciation et dans des cellules de la lentille (H. Hoshino, 2002). Au niveau cellulaire, l'expression de Bach2 est restreinte aux stades précoces de la différenciation des lymphocytes B. Bach2 participe à la différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes. Si son invalidation génétique n'empêche pas cette différenciation, elle perturbe les processus de diversification des immunoglobulines, au niveau de la commutation isotypique par recombinaison et de l'hypermutation somatique (A. Muto, 2004). Une cible transcriptionnelle de Bach2 dans les lymphocytes B est le gène codant pour Blimp-1, un facteur de transcription qui tient un rôle central dans la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. En particulier, Blimp-1 régule négativement l'expression de la cytidine déaminase AID qui participe directement aux mécanismes de recombinaison isotypique des classes d'immunoglobulines d'hypermutation somatique. Cette observation a conduit à l'hypothèse qu'un rôle de Bach2 puisse être de retarder la différenciation terminale des lymphocytes B en réprimant de Blimp-1, pour permettre une diversification efficace des immunoglobulines (K. Ochiai, 2006).

III.C. Régulation de Bach1 et Bach2 par des agents électrophiles ou oxydants

Il a été montré en systèmes cellulaires que Bach1 et Bach2 sont régulés par des composés chimiques électrophiles.

Le diéthylmaléate (DEM), un électrophile de la classe des accepteurs de Michael induit l'accumulation de Bach2 au noyau. Une étude par microscopie confocale sur une lignée de fibroblastes ou de lymphocytes B a permis d'obtenir de magnifiques clichés d'immunolocalisation de Bach2, montrant qu'en réponse au DEM, Bach2 relocalise à la périphérie de certains corps nucléaires, positifs à un marquage anti-PML, dans lesquels il réprimerait l'activité transcriptionnelle (A. Muto, 2002, S. Tashiro, 2004).

L'activation de Bach2 en réponse au DEM aurait pour effet l'induction d'une apoptose. En effet, des cellules qui surexpriment Bach2 de manière ectopique prolifèrent moins rapidement, meurent spontanément, et présentent une sensibilité accrue à l'apoptose induite par le DEM (A. Muto, 2002). De plus, des composés anti-cancéreux comme l'étoposide ou la doxorubicine présentent une cytotoxicité accrue sur des cellules lymphoïdes (RAJI) qui surexpriment Bach2. Dans cette étude, cet effet est restreint aux composés utilisés qui provoquent une production cellulaire de ROS, et induisent l'accumulation nucléaire de Bach2 (T. Kamio, 2003).

Ces données suggèrent fortement que Bach2 est activé dans des conditions pro-oxydantes. Dans ces conditions, la cytotoxicité liée à l'activation de Bach2 représenterait un mécanisme important pour limiter la croissance de certaines cellules tumorales. Yoshida et collègues ont proposé que l'effet oncogénique de la protéine de fusion Bcr-Abl soit dû, au moins en partie, à un effet antagoniste à l'activation de Bach2 par les ROS. Dans des cellules Ph⁺, qui expriment Bcr-Abl, en dépit d'un niveau de ROS élevé, Bach2 est maintenu dans le cytoplasme de façon constitutive suite la phosphorylation de sa sérine 521 en aval de la voie Bcr-Abl / PI3K / S6K. Cette étude identifie le gène de l'hème oxygénase 1 comme une cible de Bach2, dont la dérégulation liée à l'inactivation de Bach2 participerait à la protection contre la cytotoxicité dans des cellules Ph⁺ (C. Yoshida, 2007).

Si des conditions pro-oxydantes semblent induire l'activation de Bach2, la question d'une éventuelle régulation de Bach2 par l'H₂O₂ n'a pas été posée directement. Une seule expérience a montré que les 97 acides aminés C-terminaux de Bach2 sont suffisants pour

entraîner l'accumulation nucléaire d'une GFP à laquelle ils sont fusionnés, après exposition de cellules à l'H₂O₂ ou au DEM (H. Hoshino, 2000). Six de ces 97 acides aminés sont des cystéines, et l'hypothèse de la formation de ponts disulfure engageant certaines de ces cystéines a été formulée. Deux de ces cystéines, la Cys823 et la Cys830, sont comprises dans le signal de localisation cytoplasmique de Bach2, qui dirige son export nucléaire par un mécanisme qui dépend de l'exportine Crm-1. La modification de cystéines par alkylation ou oxydation pourrait inactiver le signal de localisation cytoplasmique en bloquant l'interaction entre Bach2 et Crm-1. Un tel mécanisme de régulation de la localisation d'un facteur de transcription à bZip a déjà été mis en évidence au laboratoire pour Yap1, le régulateur principal de la réponse à l'H₂O₂ et aux agents alkylants chez la levure *S. cerevisiae* (M.B. Toledano, 2004).

Bach1 est également régulé par des espèces chimiques susceptibles de modifier des thiols. Comme pour Bach2, le DEM induirait l'accumulation nucléaire de Bach1 (A. Muto, 2002). A l'inverse, le cadmium Cd²⁺ provoque l'accumulation cytoplasmique de Bach1 (H. Suzuki, 2003). De plus, dans des expériences de gène reporteur, le diamide, un composé qui provoque la formation de ponts disulfure, et le 4-hydroxy-nonènal, un accepteur de Michael, lèvent la répression imposée par la surexpression de Bach1 de la transcription contrôlée en cis par des séquences ARE. La mutation de certaines cystéines de Bach1, en particulier la cystéine 574, bloque l'effet du diamide. Ceci démontre que Bach1 est directement impliqué dans cette réponse, et suggère que la modification de ces cystéines pourrait constituer le mécanisme de détection. Parallèlement, dans des cellules COS7 dans lesquelles Bach1 surexprimé est localisé principalement dans le noyau, le diamide induit l'accumulation cytoplasmique de Bach1. Cet effet est également bloqué si Bach1 est muté au niveau de sa cystéine 574 (M. Ishikawa, 2005).

Bach1 et Bach2, comme Nrf2 ou, chez la levure, Yap1, semblent donc être des facteurs de transcription régulés par des agents électrophiles. Sur le modèle de Yap1, nous faisons l'hypothèse d'un mécanisme de détection de ces électrophiles par la modification directe de cystéines de Bach1 ou Bach2. Nous avons choisi de mettre en évidence et d'étudier dans cette perspective des modifications oxydatives de Bach2 par de l'H₂O₂ exogène.

Résultats et discussion

I. La régulation de Keap1 par oxydation

Le facteur de transcription Nrf2 est contrôlé au niveau de sa stabilité par l'adaptateur d'ubiquitine ligase Keap1, responsable de l'ubiquitylation de Nrf2. Nrf2 est activé par toute une série de substances à propriété électrophile et pro-oxydante dont l' H_2O_2 et le NO. Cette activation passe par l'inhibition de l'ubiquitinylation de Nrf2 par Keap1. Une littérature abondante a montré que les inducteurs de Nrf2 inhibaient l'activité de Keap1 par modification covalente, ou oxydation de certains résidus cystéine très réactifs. Cependant le mécanisme par lequel la modification de ces résidus conduit à l'inhibition de Keap1 n'est pas connu. Dans cette étude, nous avons voulu savoir si Keap1 était oxydé *in vivo* en réponse à l' H_2O_2 et au NO, ce qui n'a jusqu'à présent jamais été étudié directement. Nous avons voulu savoir aussi si cette oxydation pouvait être rendue responsable de la modulation de l'activité de Keap1. La modification spécifique de certaines cystéines de Keap1 par différents électrophiles *in vitro* et *in vivo*, est une preuve de la réactivité chimique de ces résidus qui rend plausible l'hypothèse de leur oxydation. En fait, une oxydation de Keap1 a été observée en réponse à certains électrophiles, sans que la nature et le rôle de cette modification ne soient approfondis (voir introduction chapitre X). Une oxydation de Keap1 a également été décrite lors de l'activation de Nrf2 par la S-nitrosocystéine, mais là encore, ni la nature de cette modification ni son rôle dans la régulation de Keap1 n'ont été établis.

Notre étude a consisté en l'étude exhaustive des modifications redox de Keap1 survenant *in vivo* en réponse à l' H_2O_2 , au NO, et à la S-nitrosocystéine (Cys-SNO), à apprécier les conséquences induites par l'inactivation des voies de contrôle thiol redox, la thioredoxine et le GSH, sur l'état redox de Keap1, et à apprécier la conséquence de ces modifications redox sur la fonction de Keap1.

I.A. Étude de l'état redox de Keap1 in vivo

I.A.1. Keap1 est oxydé dans des cellules exposées à de l' H_2O_2

Pour étudier l'état redox de Keap1 dans des cellules en culture, nous avons utilisé un protocole établi au laboratoire tirant parti d'un agent alkylant spécifique des thiols, le N-éthyl-maléimide (NEM) à forte concentration, et permettant la protection des thiols libres (réduits) au cours de la lyse cellulaire. L'étude de l'état redox des protéines *in vivo* est rendu difficile par l'occurrence possible lors de la lyse cellulaire de l'oxydation de thiols réduits, et de la

réduction de thiols oxydés par les réductases cellulaires. Pour obtenir des renseignements sur l'état redox des protéines *in vivo*, il est donc nécessaire de bloquer tous les thiols réduits par un agent alkylant comme le NEM, ce qui prévient leur oxydation ultérieure et aussi inhibe les réductases, thioredoxines, glutaredoxines et le GSH, dont la fonction est entièrement dépendante de leurs résidus cystéines libres.

Nous avons étudié l'état redox de Keap1 dans des cellules Hela exprimant une forme de ce régulateur étiquetée par l'épitope HA exprimée à partir du plasmide pcDNA3-HA-mKeap1. Nous avons ensuite étudié l'état redox de Keap1 par western blot avec l'anticorps anti-HA, après séparation électrophorétique sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) après réduction ou non du lysat cellulaire par le β -mercaptoéthanol (β ME) (figure 5).

En conditions réductrices, aussi bien en l'absence de traitement que lorsque les cellules ont été exposées à l' H_2O_2 (0,2 mM), HA-Keap1 migre selon une bande unique dont la mobilité électrophorétique est compatible avec son poids moléculaire théorique de 71 kDa.

En conditions non-réductrices et en l'absence de traitement, Keap1 migre sous la forme d'une bande majoritaire dont la taille est sensiblement similaire à celle observée en conditions réductrices ; en revanche lorsque les cellules ont été exposées à l' H_2O_2 (0,2 mM) pendant 5 min, la migration de Keap1 est profondément modifiée : quatre bandes majeures sont détectées avec l'anticorps anti-HA. La différence de migration de Keap1 observée lors de l'exposition des cellules à l' H_2O_2 par rapport aux cellules non-traitées en conditions non réduites, et la perte de cette différence en conditions réduites reflète la présence de formes d'oxydations multiples de Keap1 dans les cellules exposées à l' H_2O_2 . La sensibilité de ces formes au β ME, un réductant spécifique des thiols, établit la nature de ces oxydations : différents ponts disulfures.

Le profil de migrations des quatre formes redox de Keap1 observées dans les cellules exposées à l' H_2O_2 permet d'anticiper leur nature. L'une de celle-ci ayant une migration identique de Keap1 tel qu'il apparaît dans les cellules non-traitées correspond à la forme réduite de Keap1 et témoigne donc d'une oxydation incomplète de la protéine, tout au moins à cette concentration d' H_2O_2 . Les deux bandes, dont la migration est plus lente que celle de la forme réduite de Keap1, correspondent vraisemblablement à Keap1 en association avec une autre protéine par un pont disulfure. Nous verrons plus loin que toutes deux correspondent à l'association de deux molécules de Keap1 par un pont disulfure. La bande redox dont la mobilité est plus rapide que celle de Keap1 réduit correspond vraisemblablement à

l'oxydation de Keap1 sous la forme d'un pont disulfure intramoléculaire. En effet, la présence d'un pont disulfure intramoléculaire diminue le rayon hydrodynamique d'une protéine dénaturée, d'autant plus que les résidus cystéines sont espacés l'un de l'autre, ce qui a pour effet d'augmenter la mobilité électrophorétique de celle-ci.

Au total, cette expérience montre qu'après exposition à des concentrations faibles d' H_2O_2 , Keap1 s'oxyde en deux différentes formes d'oxydation. L'existence d'autres formes d'oxydation de la protéine n'entraînant pas de modification de mobilité électrophorétique ne peut être écartée au vu des conditions de cette analyse. Il est également important de noter, que les formes d'oxydation de Keap1 sont déjà discernables dans les cellules non-traitées selon des formes dont la migration est similaire aux formes observées après traitement par l' H_2O_2 (voir figure 5). Cette oxydation est probablement due aux oxydants produits par le métabolisme cellulaire dans les conditions de culture des cellules en présence de 21% d'oxygène et témoigne. Elle témoigne de l'extrême sensibilité de cette protéine à l'oxydation.

De plus en plus d'études identifient des cibles protéiques de l'oxydation par l' H_2O_2 . L'hypothèse la plus simple pour expliquer la formation de ponts disulfure dans une protéine est l'oxydation directement par l' H_2O_2 d'un résidu cystéine de cette protéine en acide sulfénique Cys-SOH, suivie de l'attaque nucléophile par une autre cystéine de cet acide sulfénique, aboutissant au disulfure. Pour Keap1, une seconde hypothèse suggérée par des résultats présentés au chapitre 3 des Résultats et Discussion sera proposée.

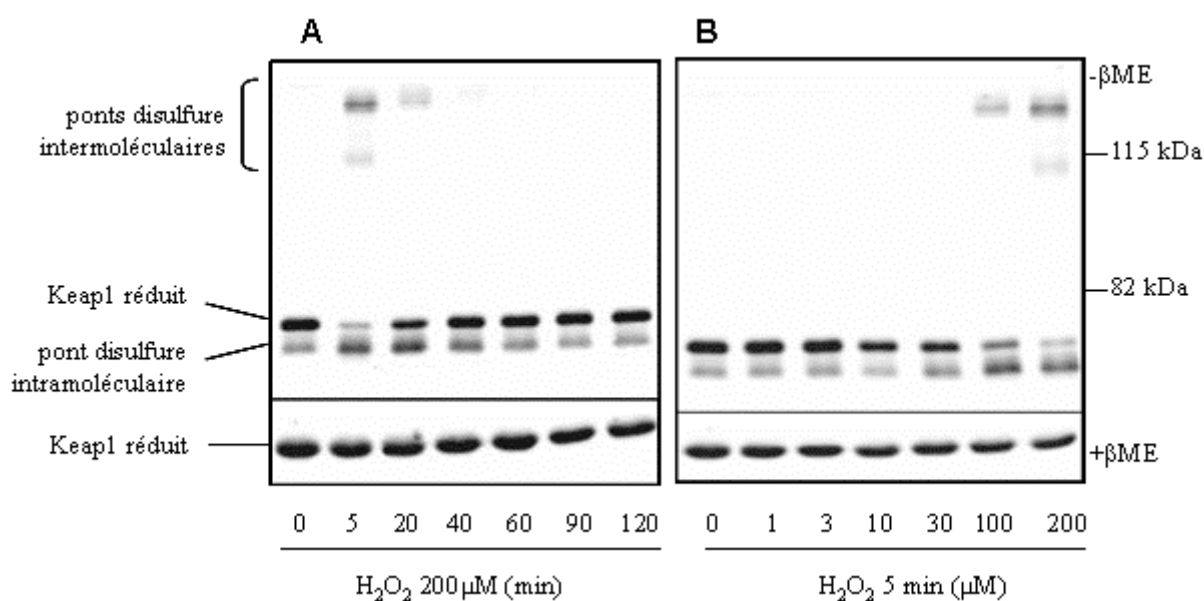


Figure 5. Oxydation de Keap1 en réponse à l' H_2O_2 . Des cellules Hela transfectées avec pcDNA3-HA-mKeap1 sont exposées à 0,2mM d' H_2O_2 puis lysées en présence de NEM. Les

formes d'oxydation de Keap1 sont révélées par son profil de migration en gel d'acrylamide en conditions non réductrice (- β ME) ou réductrices (+ β ME), après un western blot avec un anticorps dirigé contre l'épitope HA. A. Cinétique d'oxydation à 200 μ M. B. Effet de la concentration d' H_2O_2 après 5 minutes.

I.A.2. Cinétique et dose-dépendence de l'oxydation de Keap1 par l' H_2O_2

Nous avons cherché à déterminer la dose-dépendence de l'oxydation de Keap1 par l' H_2O_2 (figure 5). L'oxydation de Keap1 a été analysée dans des cellules traitées pendant cinq minutes avec des doses croissantes d' H_2O_2 allant de 1 à 200 μ M. De plus fortes doses sont toxiques pour la cellule et n'ont pas été utilisées. L'oxydation de Keap1 débute à 30 μ M d' H_2O_2 , préférentiellement au niveau de la bande correspondant au pont intramoléculaire. À partir de 100 μ M, la majorité des formes oxydées est visible et, à 200 μ M il y a encore augmentation de l'oxydation de Keap1, mais celle-ci n'est pas totale puisqu'il reste encore de la forme réduite de Keap1.

Nous avons également déterminé la cinétique d'oxydation de Keap1 au cours du temps, après exposition des cellules à un bolus d' H_2O_2 de 200 μ M. Il est remarquable de constater que l'oxydation de Keap1 survient très rapidement, à 1 min, et qu'elle est transitoire, puisqu'à 40 min Keap1 est entièrement retourné dans sa forme réduite. Le profil très transitoire de l'oxydation de Keap1 par l' H_2O_2 exogène suggère que la protéine a été rapidement réduite par les réductases intracellulaires de la voie de la thioredoxine et/ou de celle du GSH.

I.A.3. Identification des cystéines engagées dans les ponts disulfure de Keap1

Nous avons voulu décrire la nature des formes oxydées de Keap1 par l'identification par mutagenèse dirigée des résidus cystéines impliqués dans leur formation. L'intérêt d'une telle approche était aussi de pouvoir obtenir des mutants de Keap1 insensibles à l'oxydation pour tester le rôle de l'oxydation dans l'activité de la protéine.

I.A.3.a. Stratégie

La protéine Keap1 murine contient 25 résidus cystéines, tous conservés chez l'homologue humain. Ce dernier contient deux résidus cystéines supplémentaires (voir schéma figure 2). Nous avons décidé de tester individuellement l'importance de chacune des 25 cystéines de mKeap1 dans l'oxydation de ce dernier en substituant chacun de ces résidus par une sérine. La sérine ne diffère de la cystéine que par le remplacement par un groupe hydroxyle ($-\text{OH}$) du sulfhydryle ($-\text{SH}$) de la chaîne latérale. Par conséquent, une sérine en place d'une cystéine substitue le groupement $-\text{SH}$ très réactif chimiquement par le groupement $-\text{OH}$ beaucoup moins réactif, tout en limitant les changements de conformations de la protéine qui pourraient survenir avec d'autres types de substitutions.

Au total, Nous avons muté 23 des 25 cystéines de Keap1 à partir du plasmide pcDNA3-HA-mKeap1. Cette mutagenèse a généré 21 plasmides, dont 19 expriment une mutation unique d'une des cystéines de Keap1, et deux une mutation double (C513S et C518S, C622S et C624S). La proximité des résidus cystéines de ces deux paires a permis de faire leur substitution simultanée. Deux des 25 cystéines de Keap1, Cys368 et Cys489, n'ont pas été étudiées. Comme l'a montré la structure cristalline du domaine Kelch de Keap1 humain, Cys368 et Cys489 sont situées au cœur du domaine Kelch dans une zone non accessible au solvant, et ne se situent à proximité d'aucune autre cystéine. De ce fait il est peu probable que ces résidus aient une réactivité chimique et qu'ils soient impliqués dans un phénomène de régulation redox.

I.A.3.b. Keap1 oxydé par l' H_2O_2 contient deux ponts disulfures

Les 21 mutants de cystéines de Keap1 ont été exprimés dans les cellules Hela et leur capacité à s'oxyder en réponse à l' H_2O_2 (200 μM) a été étudiée par western blot redox (fig. 6). À l'exception des substitutions des cystéines 151, 226, et 613, aucune autre mutation de Keap1 ne modifie sa mobilité (résultat non montré).

En l'absence de traitement il est possible de voir avec la protéine sauvage la présence d'une bande de faible intensité, correspondant à un complexe de haut poids moléculaire non-réductible par le βME (figure 6). Ce complexe est spécifiquement bloqué par la substitution C151S, confirmant les observations de Hannink (D.D. Zhang, 2003) et Freeman (G. Rachakonda, 2008). Sa nature reste à ce jour inconnue.

La cystéine 151 contribue au pont disulfure intermoléculaire de Keap1

L'analyse pratiquée à partir de lysats de cellules exposées à l' H_2O_2 , montre que le mutant C151S bloque la formation des deux bandes correspondant aux complexes redox de haut poids moléculaire, ce que nous avons interprété comme résultant d'un pont disulfure intermoléculaire de Keap1 avec lui-même ou avec une autre molécule (ce point sera discuté plus tard). Ce pont intermoléculaire engage donc la cystéine 151, un résidu présent dans le BTB, sur une face opposée à la surface de dimérisation de la protéine (figure 3). Il persiste cependant chez ce mutant deux bandes minoritaires redox, c'est-à-dire qui disparaissent après traitement par le βME , à hauteur du complexe redox de plus haut poids moléculaire, et dont l'intensité est beaucoup plus faible. Ces bandes pourraient indiquer la contribution d'une deuxième cystéine dans la formation du ou des pont(s) intermoléculaire(s) de Keap1, une hypothèse qui n'a pas été testée plus avant.

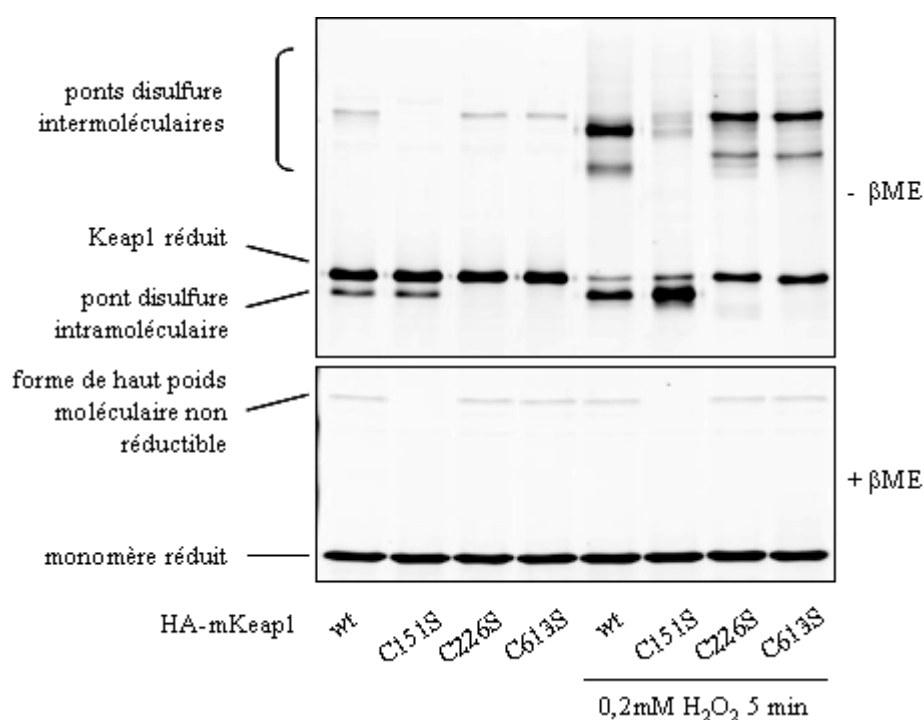


Figure 6. Identification de cystéines de Keap1 engagées dans des ponts disulfure. Des cellules Hela transfectées avec pcDNA3-HA-mKeap1 ou les mutants indiqués sont exposées à 0,2mM d' H_2O_2 pendant 5 minutes, puis lysées en présence de NEM. Les formes d'oxydation de Keap1 sont révélées par son profil de migration en gel d'acrylamide dénaturant en conditions non réductrices ($-\beta\text{ME}$) ou réductrices ($+\beta\text{ME}$), après un western blot avec un anticorps dirigé contre l'épitope HA.

Les cystéines 226 et 613 constituent le pont disulfure intramoléculaire de Keap1

Les mutations C226S et C613S bloquent toutes deux la formation de la bande redox de migration rapide déjà visible en l'absence de traitement, et que nous avons attribué à un pont disulfure intramoléculaire (Figure 6). Ces deux mutants confirment la présence d'un pont intramoléculaire et identifient les cystéines 226 et 613 comme responsables de sa formation. La cystéine 226 est située dans le domaine IVR de Keap1 et la cystéine 613 dans la portion C-terminale, après le domaine Kelch. Ce pont disulfure impliquant donc des cystéines très éloignées l'une de l'autre dans la structure primaire de la protéine est de type « long range disulfide », dont on sait qu'ils accélèrent la migration électrophorétique des polypeptides en conditions dénaturantes non réduites.

L'analyse des western redox de la figure 6 révèle que les deux complexes redox de poids moléculaire élevé ont une migration légèrement plus lente chez les mutants C226S et C613S en comparaison avec la protéine sauvage. Cette différence est vraisemblablement due à la présence du pont disulfure Cys226-Cys613 au sein des complexes de haut poids moléculaire redox et dont l'effet est d'accélérer leur migration.

En définitive, Keap1 oxydé comporte au moins deux ponts disulfures indépendants, l'un impliquant la cystéine 151 et établissant une liaison intermoléculaire, et l'autre impliquant les cystéines 226 et 613, et établissant une liaison intramoléculaire. De plus, toutes les molécules de Keap1 engagées dans le pont disulfure intermoléculaire contiennent le pont intramoléculaire

I.A.3.c. Analyse des complexes redox de haut poids moléculaire de Keap1

Nous avons vu que les deux complexes redox de migration lente induits par l' H_2O_2 engagent la cystéine 151 et sont compatibles avec un pont intermoléculaire de Keap1 avec lui-même, ou avec une autre protéine. Nous avons cherché à établir la nature exacte de ces complexes et la relation qu'il existe entre eux.

Afin de tester l'hypothèse d'un dimère redox, nous avons co-exprimé deux versions de Keap1 qui diffèrent par leur poids moléculaires en raison de leur fusion, l'une à une étiquette HA (HA-Keap1, 71 kDa), et l'autre, à 3 étiquettes myc et à une étiquette 8xHIS (myc-HIS-Keap1, 76 kDa). Nous avons analysé l'état redox de Keap1 après exposition des cellules à l' H_2O_2 (200 μM) par western blot avec un anti-HA ou un anti-myc, avant et après chromatographie des protéines sur colonne de nickel (figure 7A).

Le western blot révélé par l'anticorps anti-myc ne montre pas de dimère redox de Keap1

Dans la figure 7A, à gauche, l'anticorps anti-myc révèle la présence des formes typiques de Keap1 oxydé dans les cellules exprimant myc-HIS-Keap1: disparition presque complète de la forme réduite de la protéine, présence de forme contenant le pont intramoléculaire de migration rapide et des deux formes de migration lente correspondant aux ponts intermoléculaires de Keap1. Ce profil de migration n'est pas modifié par la présence de HA-Keap1 ou de HA-Keap1-C151S. L'intensité des bandes est augmentée après adsorption sur colonne de nickel, témoignant de l'enrichissement de Keap1 après cette procédure. La co-expression de HA-Keap1 ne change donc en rien la mobilité des bandes de haut-poids moléculaires de myc-HIS-Keap1, semblant exclure l'hypothèse du dimère redox de Keap1. En effet, l'existence d'une dimérisation redox de Keap1 aurait dû entraîner l'apparition de deux doubles bandes de migration lentes dans les cellules exprimant les deux versions de Keap1, les unes constituée exclusivement par myc-HIS-Keap1, les autres constituées par l'association des deux formes de Keap1 (myc-HIS-Keap1 et HA-Keap1).

Le western blot révélé par l'anti-HA est en faveur d'une dimérisation redox de Keap1

Le western blot pratiqué avec les mêmes lysats et révélé par l'anti-HA démontre l'existence d'une dimérisation redox de Keap1 à l'origine des complexes de haut poids moléculaires (figure 7A, panel de droite).

Avant précipitation, l'anti-HA révèle HA-Keap1 oxydé, avec la bande de migration rapide et les deux bandes de migration lente dénommées c et d (figure 7A). La taille de chacune de ces trois bandes est clairement plus petite que les bandes correspondantes formées par myc-HIS-Keap1 (comparer avec le panel de gauche), en accord avec la différence de taille de ces protéines. On voit ici aussi que la mutation HA-Keap1-Cys151S bloque la formation des deux bandes de migration lente.

Après adsorption des protéines sur colonne de nickel, l'anti-HA révèle des bandes de migration lentes dénommées a et b, dont la taille est intermédiaire entre celles révélées par l'anti-myc (panel de gauche) et les bandes c et d révélées avec l'anti-HA avant précipitation. Les bandes a et b sont déjà présentes avant adsorption sur colonne de nickel dans les cellules co-exprimant les versions HA et myc-HIS de Keap1, mais pas dans les cellules n'exprimant que la version HA, et ont été enrichies après cette procédure. Cet enrichissement sélectif des

bandes a et b révélées par l'anti-HA et leur taille intermédiaires entre celles formées par chacune des versions de Keap1 sont des indications fortes pour affirmer qu'elles correspondent toutes deux à la présence d'au moins deux molécules de Keap1 liées par pont disulfure, l'une portant l'étiquette HA et l'autre les étiquette myc-HIS. La taille de ces deux bandes, comprises entre 115 et 150 kDa, est en faveur de formes dimériques, puisque le poids théorique d'un tel dimère est de 147 kDa (71 + 76 kDa). Ces deux bandes de migration lente correspondent donc toutes deux à un dimère, mais leur différence de migration n'a pas été clarifiée. Cette différence pourrait être liée à une conformation redox particulière accélérant la migration du dimère.

L'absence de détection par l'anti-myc des dimères fait de l'association des deux versions de Keap1 (fig. 7A, à gauche) pourrait être en rapport avec un faible taux d'expression simultanée des deux plasmides dans une même cellule.

Quelles sont les cystéines de Keap1 impliquées dans sa dimérisation redox ?

La cystéine 151 est clairement engagée dans la formation du pont intermoléculaire de Keap1, mais l'est-elle seule ? Les observations faites lors de la co-expression de HA-Keap1-C151S et de myc-HIS-Keap1 apportent des arguments en défaveur de cette hypothèse.

Lorsqu'il y a co-expression de HA-Keap1-C151S et de myc-HIS-Keap1, l'H₂O₂ induit l'oxydation de HA-Keap1-C151S qui présente non seulement le pont disulfure intramoléculaire attendu chez ce mutant, mais aussi un complexe de haut poids moléculaire minoritaire (Figure 7A). La co-purification de ce complexe avec myc-HIS-Keap1 montre qu'il s'agit d'un dimère de HA-Keap1-C151S et de myc-HIS-Keap1 relié par un pont intermoléculaire. Ce résultat pourrait indiquer l'existence de deux ponts disulfure intermoléculaires dans la protéine sauvage, l'un formé par la liaison des cystéines 151 de chaque monomère, et l'autre par celle de deux autres cystéines. Cependant, la disparition de ce complexe lorsque sont co-exprimés HA-Keap1-C151S et myc-HIS-Keap1-C151S (figure 7B) élimine cette possibilité. Le pont disulfure reliant HA-Keap1-C151S et myc-HIS-Keap1 engage donc nécessairement la cystéine 151 de myc-HIS-Keap1 et un autre résidu cystéine de HA-Keap1-C151S. Qu'apprend-t-on de ce résultat sur la protéine sauvage ? Deux possibilités formelles sont offertes : (i) le pont disulfure reliant le dimère de Keap1 engage bien les cystéines 151 de chaque monomère ; cependant en l'absence de cystéine 151 sur l'un des monomères, ce résidu est capable de lier une autre cystéine. (ii) Une explication alternative serait l'existence chez la protéine sauvage de deux types de ponts disulfures, tous deux engageant cystéine 151, reliée soit à la cystéine 151 de l'autre monomère, soit à une autre

cystéine. Pour répondre à cette question, il sera nécessaire d'identifier la cystéine formant le pont disulfure entre HA-Keap1-C151S et myc-HIS-Keap1, puis de vérifier son rôle dans la protéine sauvage.

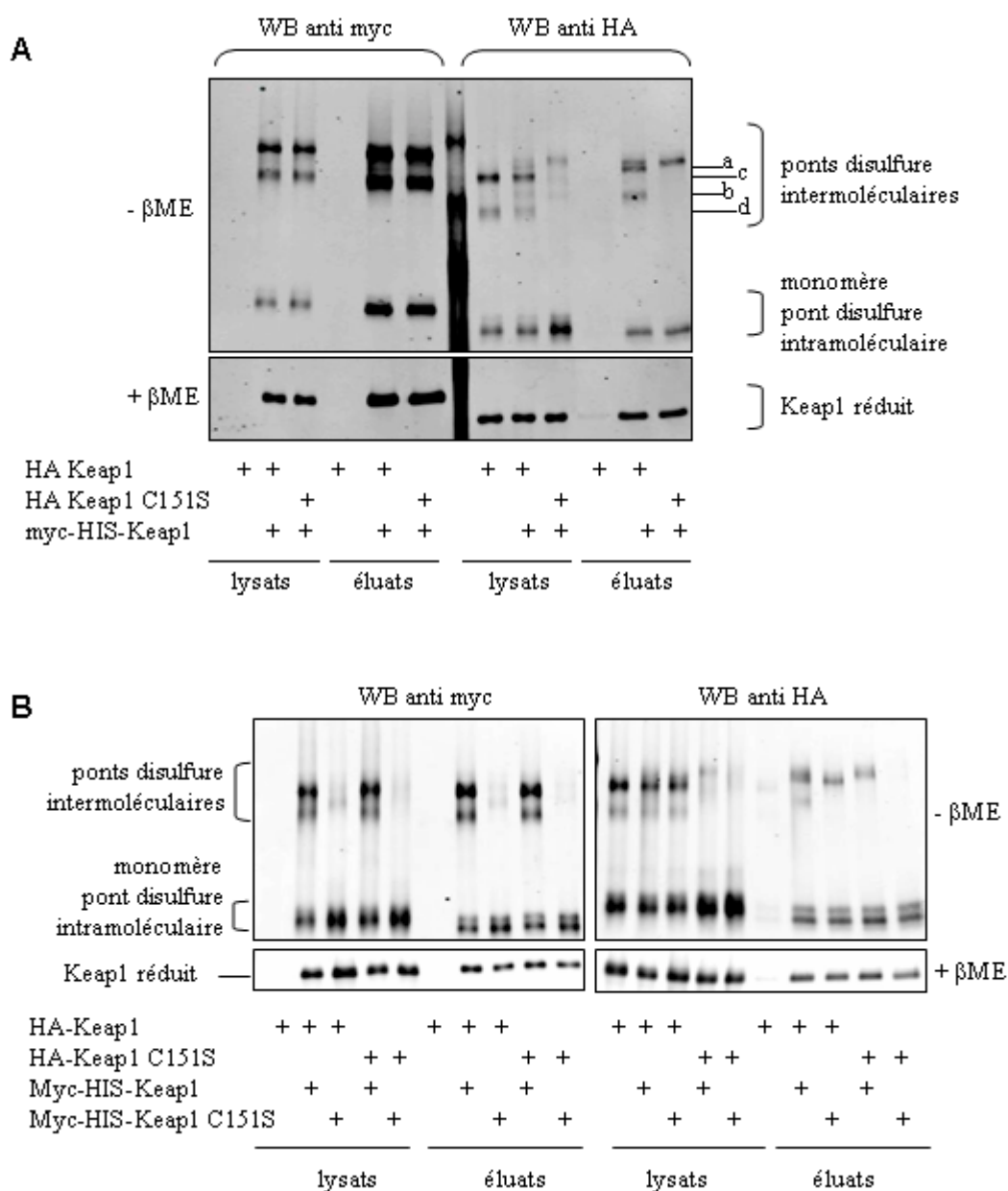


Figure 7. Mise en évidence d'un dimère de Keap1 covalent et réductible. Des cellules Hela sont co-transfectées avec deux plasmides: A. avec 1,5 µg de pcDNA-HA-Keap1 ou HA-Keap1-C151S et avec 1,5 µg de pcDNA3-myc-HIS-Keap1 ou de pcDNA3. B. avec 1,5 µg de pcDNA-HA-Keap1 ou HA-Keap1-C151S et avec 1,5 µg de pcDNA3-myc-HIS-Keap1 ou myc-HIS-Keap1-C151S. Après 5 minutes d'exposition à 0,2 mM d'H₂O₂, et lyse en présence de NEM, myc-HIS-Keap1 est précipité par chromatographie d'adsorption sur résine de nickel. L'état redox des

formes étiquetées HA ou myc de Keap1 est analysée par western blot. A. Les protéines utilisées pour ces western blots ont été séparées sur un même gel. Après transfert, les membranes ont été découpées suivant la trace du marqueur de poids moléculaire (au centre), traitées séparément pour les western blots, puis rassemblées pour le scan. a et b : bandes correspondant à des espèces contenant HA-Keap1 et myc-HIS-Keap1. c et d : bandes correspondant à des espèces contenant deux monomères de HA-Keap1.

I.A.3.d. Présence d'un dimère non covalent de Keap1

L'expérience de la figure 7 confirme aussi l'existence d'une dimérisation non covalente de Keap1 décrite par d'autres (L.M. Zipper, 2002) comme faisant intervenir le BTB. En effet nous voyons qu'après purification sur colonne de nickel, l'anti-HA révèle non seulement les deux complexes de migration lente, mais également la forme monomérique de Keap1 contenant le pont disulfure intramoléculaire. La co-précipitation de cette dernière espèce est diagnostique d'une interaction non covalente entre myc-HIS-Keap1 et HA-Keap1, correspondant au dimère décrit par Zipper. Il est également important de noter que l'absence des bandes c et d après purification sur colonne de nickel suggère que la dimérisation non redox de Keap1 et sa dimérisation par pont disulfure sont des événements exclusifs l'un de l'autre. La cystéine 151 étant situé à l'opposé de la surface de dimérisation du domaine BTB (figure 3), l'engagement de ce résidu dans un pont disulfure doit modifier suffisamment la surface de dimérisation du BTB pour empêcher cet événement et vice-versa.

I.A.4. Oxydation de Keap1 par la spermine NONOate

Le monoxyde d'azote (NO) est aussi décrit comme un activateur de Nrf2. Le NO a la propriété d'induire la nitrosylation du résidu cystéine, voire de l'oxyder notemment sous forme de pont disulfure. Nous avons donc cherché à savoir si l'état redox de Keap1 était modifié par le NO et si l'on pouvait déterminer la nature de cette modification redox. Nous avons utilisé la spermine NONOate (Figure 8A), un composé chimique se dissociant lentement en solution en un équivalent de spermine et deux équivalents de NO. Dans le milieu de culture des cellules, la demi-vie mesurée du spermine NONOate est de l'ordre de 2 heures (Figure 8B).

De façon surprenante, l'exposition de cellules à 1 mM de spermine NONOate provoque une modification de l'état redox de Keap1, comme le montre le changement de mobilité électrophorétique de la protéine en gel réduit ou non réduit. La disparition de ces

de ces deux molécules. Lorsque l' H_2O_2 est introduit dans le milieu, sa concentration est d'emblée maximale puis décroît rapidement s'annulant après environ 60 min, en fonction de la quantité initiale. En revanche, la dissociation lente du spermine NONOate en solution résulte en une concentration instantanée de NO faible, mais maintenue pendant plusieurs heures.

Bien qu'en solution le NO puisse oxyder des thiols en ponts disulfure en présence d'oxygène, la formation de ponts disulfure dans des protéines par des donneurs de NO a été très peu décrite. A notre connaissance, nos résultats montrent même pour la première fois un tel phénomène *in vivo*. Le NO ne peut oxyder directement des cystéines. Des études *in vitro* avec de la protéine purifiée pourraient permettre d'élucider les mécanismes de formation de ponts disulfure dans Keap1 par le NO. On peut envisager par exemple une catalyse assistée par des métaux, ou la formation en conditions aérobies d'espèces réactives de l'azote plus réactives que le NO.

I.A.5. Oxydation de Keap1 endogène dans des macrophages en culture

Nous avons cherché à confirmer l'existence d'une oxydation de Keap1 dans des macrophages frais murins issus de la moelle osseuse, grâce à l'utilisation d'un anticorps polyclonal spécifique de Keap1. Cette expérience était motivée par le souhait de confirmer l'oxydation de Keap1 sur la protéine endogène et d'exclure ainsi la possibilité formelle que l'oxydation de Keap1 observée dans les cellules Hela soit le résultat d'artefacts liés aux conditions expérimentales, par exemple la nature tumorale de la lignée cellulaire Hela, les conditions de surexpression de Keap1, ou encore l'étiquette HA fusionnée à la protéine.

Dans les macrophages de moelle osseuse, en l'absence de tout traitement, l'anticorps anti-Keap1 révèle une bande dont la taille est compatible avec la forme réduite de Keap1 (70 kDa) et dont la migration est très légèrement plus rapide que celle de HA-Keap1 réduit dans les cellules Hela (figure 9). Juste au-dessous de cette bande existe une deuxième bande moins intense que nous avons identifié comme une forme de Keap1 réduit clivé à son extrémité N-terminale. Cette identification repose sur l'analyse de la migration en gel d'une forme de Keap1 fusionnée à une étiquette myc en N-terminal et une étiquette HA en C-terminal (résultat non montré), et est en accord avec les profils de migration de Keap1 endogène publiés dans la littérature. Enfin, l'anticorps anti-Keap1 révèle une bande intense de haut poids moléculaire, migrant légèrement au-dessus de la bande correspondant à l'homodimère

redox présent dans les cellules Hela transfectées avec pcDNA3-HA-mKeap1. La disparition de cette bande après réduction par le β -ME indique la présence d'un pont disulfure intermoléculaire à l'origine de cette bande : il pourrait s'agir d'un homodimère, en accord avec la taille observée, voir d'un hétérodimère de Keap1. Ainsi, Keap1 apparaît en grande partie oxydé dans les macrophages dérivés de moelle osseuse non traités, sous une forme compatible avec celle d'un homodimère lié par pont disulfure. Notons que la forme de Keap1 contenant le pont intramoléculaire n'est pas visible.

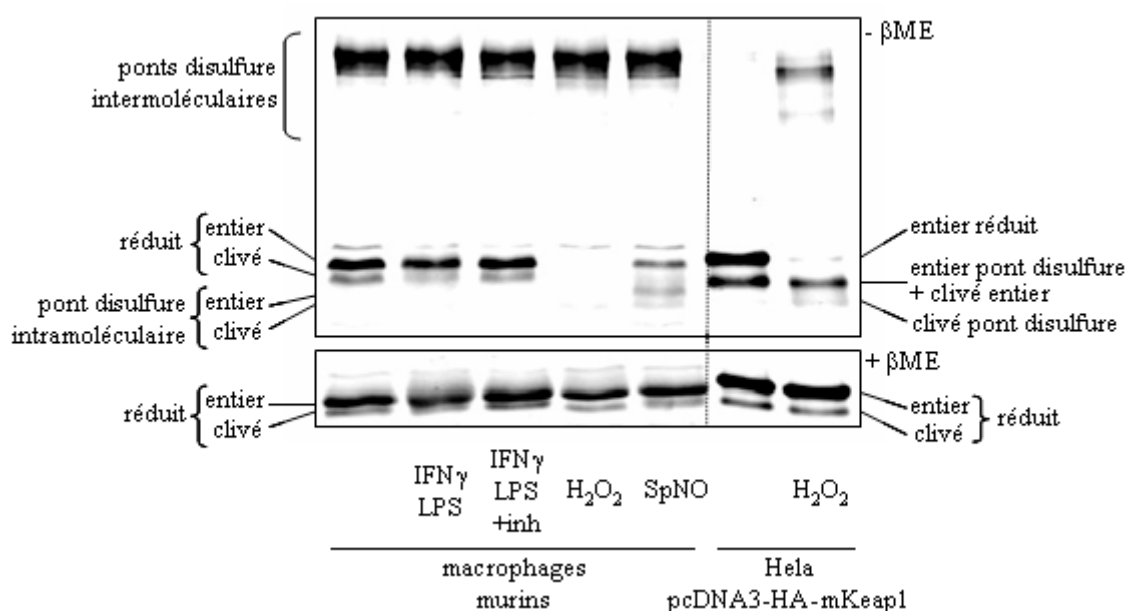


Figure 9. Oxydation de Keap1 endogène dans des macrophages murins. Des macrophages en culture dérivés de moelle osseuse de souris sont traités pendant 24h avec un mélange d'interféron γ et de LPS, plus éventuellement des inhibiteurs de NO synthase (1400W et S-éthylthiourée, inh.), pendant 5 minutes avec 0,2 mM d' H_2O_2 , ou pendant 30 minutes avec 1 mM de spermine NONOate, puis lysés en présence de NEM. L'état d'oxydation de Keap1 endogène est révélé par son profil de migration en gel d'acrylamide en conditions non réductrice (- β ME) ou réductrices (+ β ME), après un western blot avec un anticorps dirigé contre un épitope de la protéine Keap1. Les deux pistes de droites sont chargées avec des lysats de cellules Hela transfectées avec pcDNA3-HA-mKeap1 et exposées ou non à 0,2 mM d' H_2O_2 .

L'oxydation de Keap1 a ensuite été étudiée après traitement des macrophages. L'exposition des cellules pendant 5 min à l' H_2O_2 (200 μ M) conduit à la disparition quasi-totale de la bande de migration correspondant à Keap1 réduit, au profit au moins en partie de la bande correspondant au complexe de Keap1 de haut poids moléculaire lié par pont disulfure. L'exposition des macrophages au spermine NONOate (1 mM) pendant 30 min affecte également l'abondance de la forme réduite de Keap1, mais ici la diminution de cette

bande n'est pas aussi importante que celle observée avec l' H_2O_2 . De plus, le spermine NONOate induit l'apparition de bandes réductibles de mobilité supérieure, qui correspondent à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. En revanche, l'incubation des macrophages en présence de LPS et d'interféron γ , un traitement dont on sait qu'il induit fortement l'expression de l'iNOS et donc la production endogène de NO, n'induit pas de modification visible du profil de migration de Keap1 à 24 h après le début du traitement. Il est possible que notre analyse ait été trop tardive par rapport à la cinétique de production du NO au cours du temps. Cette expérience devra donc être répétée en utilisant des temps plus courts pour l'activation des macrophages.

I.A.6. Détection indirecte de l'alkylation des cystéines 151, 226, et 613

L'axe Keap1-Nrf2 est activé par un grand nombre de molécules chimiques qui partagent toutes un caractère électrophile et qui sont supposés modifier certains résidus cystéine dit « réactifs » de Keap1 (cf. introduction). La cystéine 151 de Keap1 a été impliquée dans cette régulation, ce qui rend la démonstration de sa modification *in vivo* importante. Une multitude d'études ont identifié la cystéine 151 comme un résidu chimiquement réactif *in vitro* (voir introduction). Cependant, à ce jour une seule étude utilisant un catechol, l'acide carnosique comme inducteur, a pu obtenir une preuve de la modification de ce résidu *in vivo* (T. Satoh, 2008).

Nous avons cherché à tirer parti de nos observations sur l'oxydation de la cystéine 151 par l' H_2O_2 pour démontrer que ce résidu est bien modifié par alkylation *in vivo* par des chimiques électrophiles (figure 10). Une activation de Nrf2 par un alkylant des thiols devrait, s'il modifie bien ce résidu, empêcher son oxydation par H_2O_2 . L'exposition des cellules au diéthylmaléate (100 μM) interfère complètement avec l'oxydation de Keap1 par l' H_2O_2 . L'absence de formation du pont intermoléculaire démontre que la cystéine 151 est modifiée par le DEM. L'absence d'augmentation de la forme contenant le pont intramoléculaire démontre que les cystéines 226 et/ou 613 sont également modifiées.

Nous avons également testé le tBHQ (100 μM), dont l'effet est de bloquer sélectivement la formation du pont disulfure intermoléculaire, sans interférer avec celle du pont intramoléculaire. Nous interprétons cette observation comme le reflet de l'alkylation préférentielle par le tBHQ de la cystéine 151 par rapport aux cystéines 226 et 613.

Cette expérience ne renseigne pas sur le statut des cystéines de la protéine autres que les cystéines 151, 226 et 613.

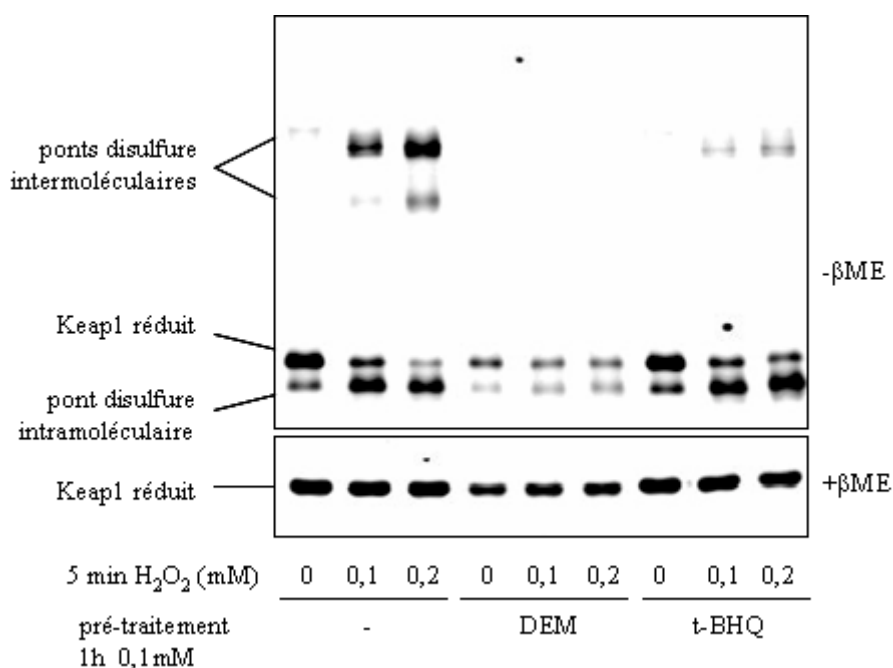


Figure 10. Oxydation de Keap1 par l'H₂O₂ dans des cellules pré-traitées avec des agents alkylants. Des cellules Hela transfectées avec pcDNA3-HA-mKeap1 ont été exposées à 0,1 mM d'agent alkylant, diéthyl-maléate (DEM) ou t-BHQ, pendant 1h, abondamment lavées avec du milieu frais, puis exposées à 0,2 mM d'H₂O₂ pendant 5 minutes. Les protéines sont préparées par lyse en présence de NEM, puis séparées sur gel de polyacrylamide en conditions réductrices (+βME) ou non réductrices (-βME). Le profil de migration des différentes formes de Keap1 est révélé par western blot avec un anticorps dirigé contre l'épitope HA.

I.B. L'oxydation de Keap1 inhibe la dégradation de Nrf2

I.B.1. Validation du système expérimental

Keap1 est l'adaptateur d'un complexe ubiquitine ligase dépendant de la Cul3 dont la fonction est de recruter et d'ubiquityler Nrf2 en vue de sa dégradation par le protéasome. Les inducteurs de Nrf2 ont pour effet d'inhiber cette fonction, entraînant une stabilisation de Nrf2. Pour vérifier l'effet de l'oxydation de Keap1 sur son activité, nous avons donc quantifié l'abondance de Nrf2, qui est le reflet direct de l'activité de Keap1.

Nous avons mesuré l'abondance de Nrf2 par western blot dans des cellules exprimant de façon transitoire pCI-HA-mNrf2 seul ou co-transfecté avec pcDNA3-myc-HIS-mKeap1 (figure 11). En l'absence de Keap1, Nrf2 est visualisé sous forme de deux bandes. En revanche en présence de Keap1, Nrf2 n'est plus du tout visible. Cependant, 5 heures de traitement des cellules co-exprimant les deux plasmides par le MG132, un inhibiteur du protéasome, font réapparaître Nrf2. Dans ce cas l'abondance de Nrf2 est supérieure à celle observée dans les cellules exprimant Nrf2 seul. Cette expérience confirme l'effet de la co-expression de Keap1 sur la stabilité de Nrf2 et montre aussi qu'il y a dégradation de Nrf2 même en l'absence de la surexpression de Keap1, peut-être par la protéine endogène. La surexpression de Nrf2 et de Keap1 est donc suffisante pour reconstituer le mécanisme de régulation de Nrf2 et il n'est pas nécessaire d'adjoindre la surexpression des autres protéines faisant partie du complexe ubiquitine ligase, c'est-à-dire Cul3, l'ubiquitine, Rbx1, et l'enzyme E3.

La figure 11 montre aussi qu'après 5 heures d'exposition au t-BHQ (80 μ M) Nrf2 est stabilisé dans les cellules co-exprimant avec Nrf2 Keap1 sauvage, mais pas dans celles co-exprimant Keap1-C151S, en accord avec les données de la littérature (D.D. Zhang, 2003). Cette expérience montre que le DEM (80 μ M) stabilise également Nrf2.

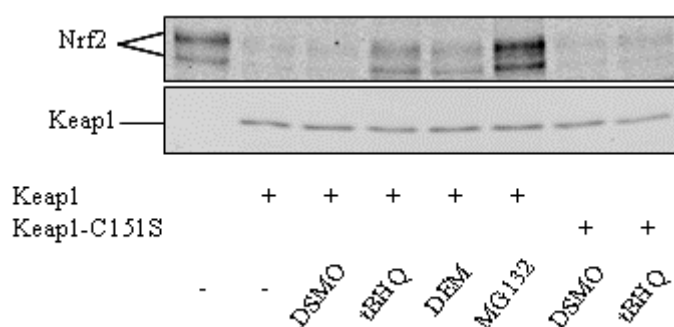


Figure 11. Effet d'agents alkylants sur la destabilisation de Nrf2 par Keap1. Rôle de la cystéine 151 de Keap1.

Des cellules Hela transfectées avec pCI-HA-mNrf2(1,5 μ g) seul ou en combinaison avec pcDNA3-myc-HIS-mKeap1 ou pcDNA3-myc-HIS-mKeap1-C151S (1,5 μ g), sont exposées à 80 μ M de t-BHQ, 80 μ M de DEM, ou 10 μ M de MG132 pendant 5h. Le niveau d'expression de Nrf2 et Keap1 sont révélés après western blot réalisé avec un anticorps dirigé contre Nrf2 ou contre l'épitope myc.

I.B.2. L'oxydation de Cys151 de Keap1 par le NO induit la stabilisation de Nrf2

Grâce à ce système expérimental, nous avons testé l'effet du spermine NONOate sur la stabilité de Nrf2 dans des cellules Hela co-exprimant Nrf2 et Keap1. L'abondance de la protéine fluorescente verte (GFP) co-exprimée dans ces mêmes cellules a été utilisée comme contrôle de l'efficacité de transfection.

Les cellules ont été traitées pendant 5 heures par du spermine NONOate (2 mM), puis l'oxydation de Keap1 et l'abondance de Nrf2 ont été analysées (figure 12)

On voit qu'après 5 heures de traitement, Keap1 est encore oxydé. Cette oxydation se manifeste par la présence du dimère redox, et à un moindre degré du pont intramoléculaire. L'analyse de l'électrophorèse en conditions réduites montre aussi que le tBHQ et le NO ont pour effet d'augmenter légèrement le complexe de haut poids moléculaire non réductible dépendant de la cystéine 151, déjà visible dans les extraits de cellules non traitées, et dont la nature reste à déterminer (cf. supra). Juste au-dessus de cette bande, une autre bande non réductible apparaît dans les échantillons provenant des cellules exposées au NO, et dont la nature est également inconnue. Cette bande n'est cependant pas dépendante de la cystéine 151, ni de la cystéine 226.

L'analyse de l'abondance de Nrf2 dans ces mêmes lysats montre qu'il y a stabilisation de la protéine dans les extraits de cellules exposées au tBHQ et au spermine NONOate. De plus, cette stabilisation est dépendante de la cystéine 151 mais pas de la cystéine 226.

En définitive, cette expérience montre qu'en réponse au NO, il existe une corrélation entre d'une part la formation du dimère redox de Keap1 et celle du complexe de haut poids moléculaire non réductible, et d'autre part la stabilisation de Nrf2. Cependant, du dimère redox ou du complexe non réductible, quelle est l'espèce de Keap1 responsable de l'effet de stabilisation de Nrf2 ? Les résultats actuels ne permettent pas de trancher définitivement. Cependant, l'induction plus franche du dimère redox est faveur de la responsabilité de ce dernier. Quoi qu'il en soit, cette expérience montre l'importance de la modification de la cystéine 151 de Keap1 dans la levée de l'inhibition de Keap1 sur Nrf2, et confirme cette donnée dans le cas de l'activation de Nrf2 par le tBHQ.

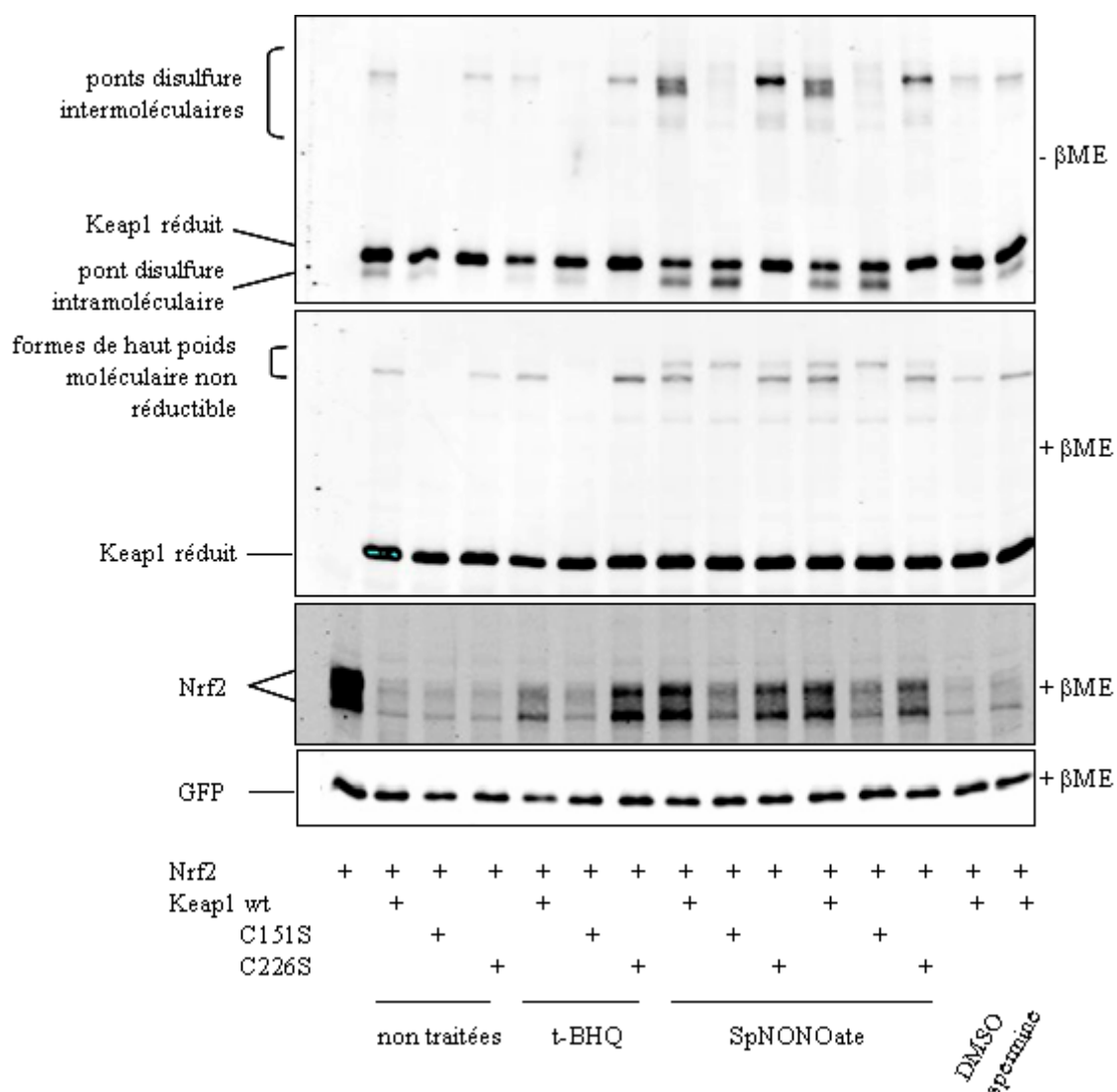


Figure 12. Oxydation de Keap1 et stabilisation de Nrf2 par le spermine NONOate. Des cellules Hela transfectées avec pCI-HA-mNrf2, peYFP-N1, et pcDNA3-myc-HIS-mKeap1 (wt) ou les mutants indiqués, sont exposées à 80µM de t-BHQ pendant 5h, à 1mM de spermine NONOate pendant 2h30 puis à nouveau 1mM de spermine NONOate pendant 2h30 (3 premières pistes

marquées SpNONOate), ou à 2mM de spermine NONOate pendant 5h (3 pistes suivantes). L'état d'oxydation de Keap1 est révélé par le profil de migration de Keap1 dans un gel sans β ME (WB anti myc), l'accumulation de Nrf2 par WB anti-Nrf2, et l'efficacité de transfection par WB anti-GFP. Le DMSO constitue le contrôle pour le tBHQ, et la spermine pour le spermine NONOate.

I.B.3. Oxydation de Keap1 et stabilisation de Nrf2 par la S-nitrosocystéine

Nous avons également testé l'effet du S-nitrosocystéine (figure 13). Ce composé induit également l'oxydation de Keap1, selon un profil similaire à celui observé avec l' H_2O_2 , et l'accumulation de Nrf2. Ces résultats sont en accord avec une étude récente qui met en évidence la stabilisation de Nrf2 par ce composé, qui corrèle avec une modification oxydative de Keap1, sans préciser toutefois s'il s'agit d'un pont disulfure ou d'une autre forme d'oxydation (B.J. Buckley, 2008).

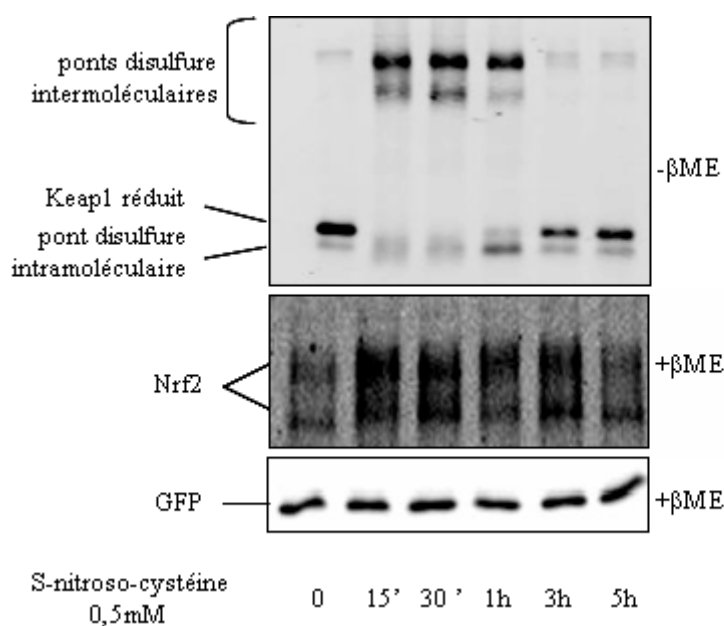


Figure 13. Oxydation de Keap1 et stabilisation de Nrf2 par la S-nitrosocystéine. Des cellules Hela transfectées avec pCI-HA-mNrf2, peYFP-N1, et pcDNA3-myc-HIS-mKeap1 sont exposées à 0,5mM de S-nitroso-cystéine pour différentes durées. Après lyse des cellules en présence de NEM et migration des lysats en gel d'acrylamide, l'oxydation de Keap1 est révélée par western blot dirigé contre l'épitope myc en conditions non réductrices, et le niveau d'expression de Nrf2 par western blot anti-Nrf2.

I.B.4. L'H₂O₂ active-t-il Nrf2 ?

Nous avons étudié l'effet de l'H₂O₂ sur Nrf2 selon la même approche que celle utilisée pour le NO, mais nous n'avons pu déceler dans ce cas de stabilisation de la protéine (résultat non montré).

Ce résultat négatif ne signifie cependant pas que l'H₂O₂ ne soit pas un activateur de Nrf2. En effet, dans les conditions expérimentales utilisées, le bolus d'H₂O₂ initial (200 µM) décroît en fait très rapidement pour disparaître totalement dans l'heure qui suit son introduction dans le milieu, en raison de sa dégradation rapide par les antioxydants cellulaires (résultat non montré). Cette décroissance rapide de la concentration d'H₂O₂ est également reflétée par la réduction rapide de Keap1 dans les 40 minutes suivant le début du traitement (figure 5). Cette demi-vie très courte de l'H₂O₂ en comparaison de celle du NO (environ 2 heures) est très probablement la raison pour laquelle on ne voit pas de stabilisation de Nrf2 dans ces conditions. En effet, la détection d'une stabilisation de Nrf2 suppose une inhibition prolongée de Keap1.

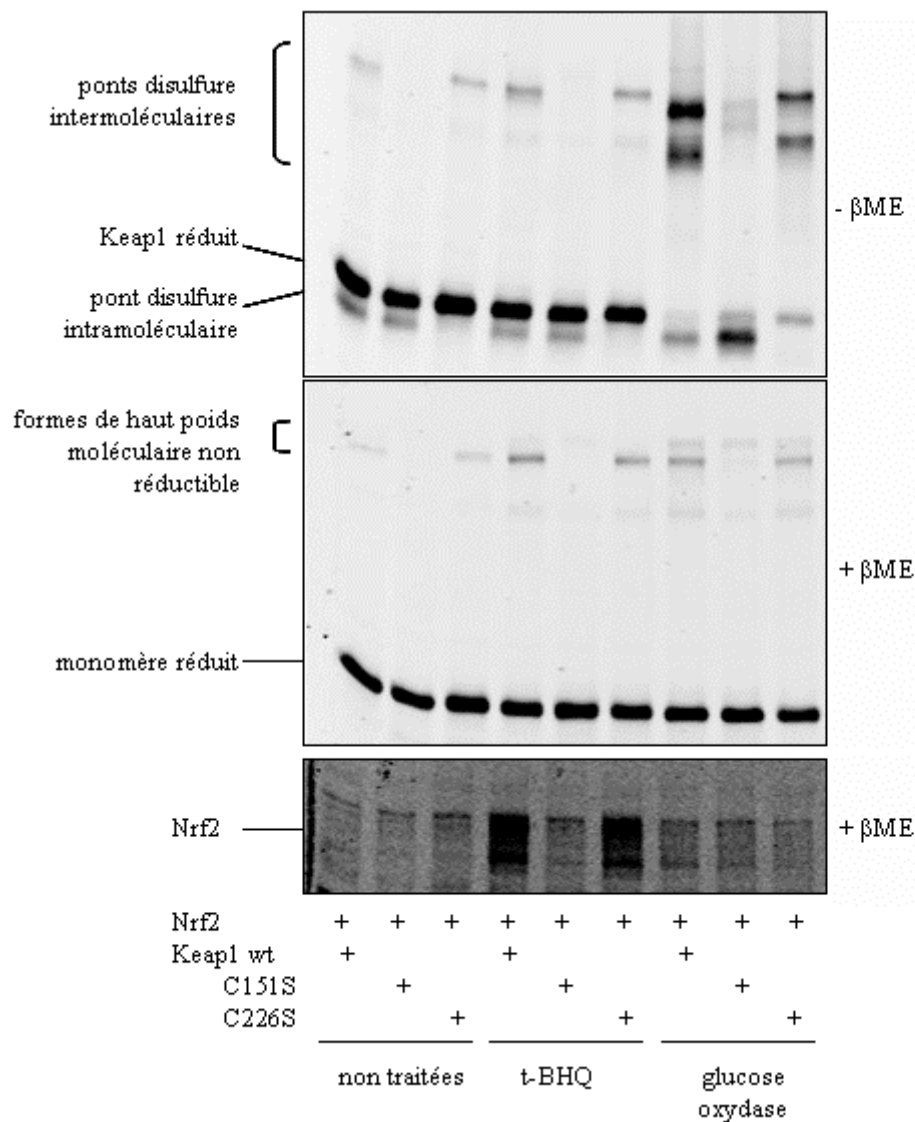


Figure 13. Oxydation de Keap1 et absence de stabilisation de Nrf2 par la glucose oxydase à 5h. Des cellules Hela transfectées avec pCI-HA-mNrf2, peYFP-N1, et pcDNA3-myc-HIS-mKeap1 ou les mutants indiqués, sont exposées à 0,1U de glucose oxydase pendant 5h. L'état d'oxydation de Keap1 est révélé par le profil de migration de Keap1 dans un gel sans β ME (WB anti myc), et le niveau d'expression de Nrf2 par WB anti-Nrf2.

Pour contourner cet obstacle, nous avons utilisé la glucose oxydase (GO), un enzyme utilisant le glucose et l'oxygène comme substrats, pour produire de la gluconolactone et de l' H_2O_2 . En présence de cet enzyme, l' H_2O_2 est produit à un rythme constant tant qu'il y a du substrat dans le milieu et à une concentration proportionnelle à la quantité d'enzyme. En présence de GO à 0,1 unité/ml de milieu, Keap1 s'oxyde et cette oxydation est toujours présente au bout de 5 heures (figure 13). Cette oxydation a le profil typique de celui observé en présence d'un bolus d' H_2O_2 . Dans ces conditions aucune accumulation notable de Nrf2 n'est observée.

Ces résultats nous ont conduits à regarder la stabilisation de Nrf2 à des temps plus court après le début de l'exposition à l' H_2O_2 (figure 14). Au bout d'une heure, le tBHQ et le spermine NONOate induisent tous deux une stabilisation modérée mais nette de Nrf2. Similairement, l' H_2O_2 et la glucose oxydase stabilisent Nrf2 selon le même ordre de grandeur. De plus, et quel que soit l'inducteur, la stabilisation de Nrf2 est perdue en présence Keap1-C151S. Cette expérience montre aussi, qu'en présence de cycloheximide (0,1 mM), un inhibiteur de la traduction, les inducteurs quels qu'ils soient n'induisent plus de stabilisation de Nrf2.

Notre hypothèse reste que l'oxydation de Keap1 cause son inactivation et la stabilisation de Nrf2, mais que la glucose oxydase provoque aux temps longs une baisse de l'expression de Nrf2 par un mécanisme indépendant de Keap1.

En définitive, l' H_2O_2 et la GO induisent bien une stabilisation de Nrf2. Cependant celle-ci n'est perceptible que dans l'heure qui suit le début de ce traitement, et lorsque l'incubation est poursuivie au-delà de 5 heures, il y a perte de l'effet de l' H_2O_2 . Nous concluons que l'oxydation de Keap1 par l' H_2O_2 initialement inhibe l'ubiquitinylation de Nrf2 et sa dégradation. Ensuite pourrait se superposer un autre phénomène, par exemple une inhibition de l'expression de Nrf2 par l' H_2O_2 .

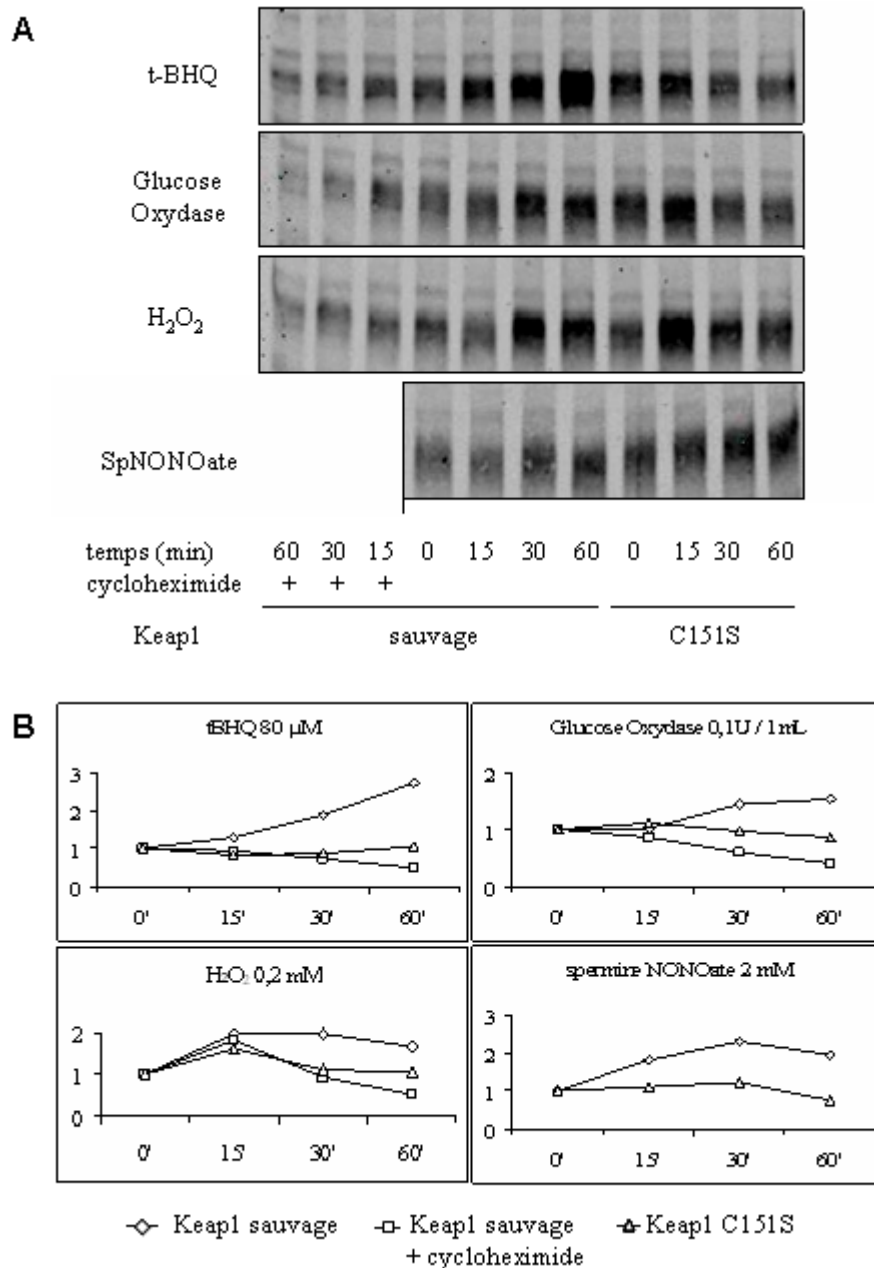


Figure 14. Stabilisation de Nrf2 par des agents oxydants ou alkylant aux temps courts. Des cellules Hela transfectées avec pCI-HA-mNrf2, peYFP-N1, et pcDNA3-myc-HIS-mKeap1 sauvage ou muté sur le codon cystéine 151, sont exposées à divers agents alkylants ou oxydants (80μM de t-BHQ, 0,1U de glucose oxydase dans 1mL, 200μM d' H₂O₂, ou 2mM de spermine NONOate) pour différentes durées. En parallèle, des cellules sont exposées à ces agents alkylants en présence de 0,1mM de cycloheximide. A. L'accumulation de Nrf2 est révélée par WB anti-Nrf2. B. Quantification de l'expression de Nrf2 ramené à la quantité de GFP.

I.C. Effet de l'inactivation du contrôle thiol redox sur l'axe Keap1-Nrf2

Il existe deux systèmes majeurs de contrôle de l'état redox des thiols, la voie du GSH et celle de la thioredoxine. La présence de résidus cystéine oxydés chez Keap1 lors de l'exposition des cellules à l' H_2O_2 , au spermine NONOate, à la S-nitrocystéine, et même en l'absence d'oxydants exogènes, et leur réduction rapide lorsque l'oxydant est éliminé, suggèrent la mise en jeu de l'une de ces deux voies de réduction des thiols.

Nous avons donc voulu tester le rôle de l'inactivation de chacune de ces deux voies sur l'oxydation de Keap1 et l'activation de Nrf2. La voie de la thioredoxine a été inactivée dans les cellules Hela par ciblage de la thioredoxine reductase cytoplasmique (TRR1) (il existe un isoenzyme cytoplasmique et un isoenzyme mitochondrial) avec un ARN interférant spécifique (ARNi) exprimé de façon stable à partir d'un plasmide réplicatif (figure 15C). La voie du GSH a été inactivée par inhibition pharmacologique de la γ -glutamyl-cysteine synthetase (γ -GCLC) par la buthionine sulfoximine (BSO). γ -GCLC est la première enzyme intervenant dans la biosynthèse du GSH et en constitue l'étape limitante.

I.C.1. Effets de l'inactivation de la voie de la thioredoxine

Les expériences suivantes ont été réalisées avec des cellules Hela exprimant de façon stable l'ARNi spécifique de TRR1 ou le contrôle négatif correspondant, et co-transfectées par les plasmides pcDNA3-Myc-HIS-mKeap1, pCI-HA-mNrf2, et peYFP-N1 pour contrôler l'efficacité de la transfection. L'état d'oxydation de Keap1 et l'abondance de Nrf2 ont été analysés avant et après exposition des cellules à l' H_2O_2 (100 μM) (figure 15A).

En l'absence de tout traitement, l'ARNi anti-TRR1 a pour effet d'augmenter légèrement la forme de Keap1 contenant le pont disulfure intramoléculaire. Après exposition à l' H_2O_2 , l'oxydation de Keap1 apparaît plus importante comme le montre la disparition quasi-totale de la forme réduite de la protéine. Cette augmentation porte aussi bien sur le pont intramoléculaire que sur le pont intermoléculaire. De façon surprenante, la cinétique de réduction de Keap1 n'est pas modifiée, la réduction intervenant au même moment que dans les cellules contrôle à partir de 40 min après le début du traitement. Si la thioredoxine est en effet responsable de la réduction de Keap1, sa réduction devrait être retardée après inactivation de cette voie.

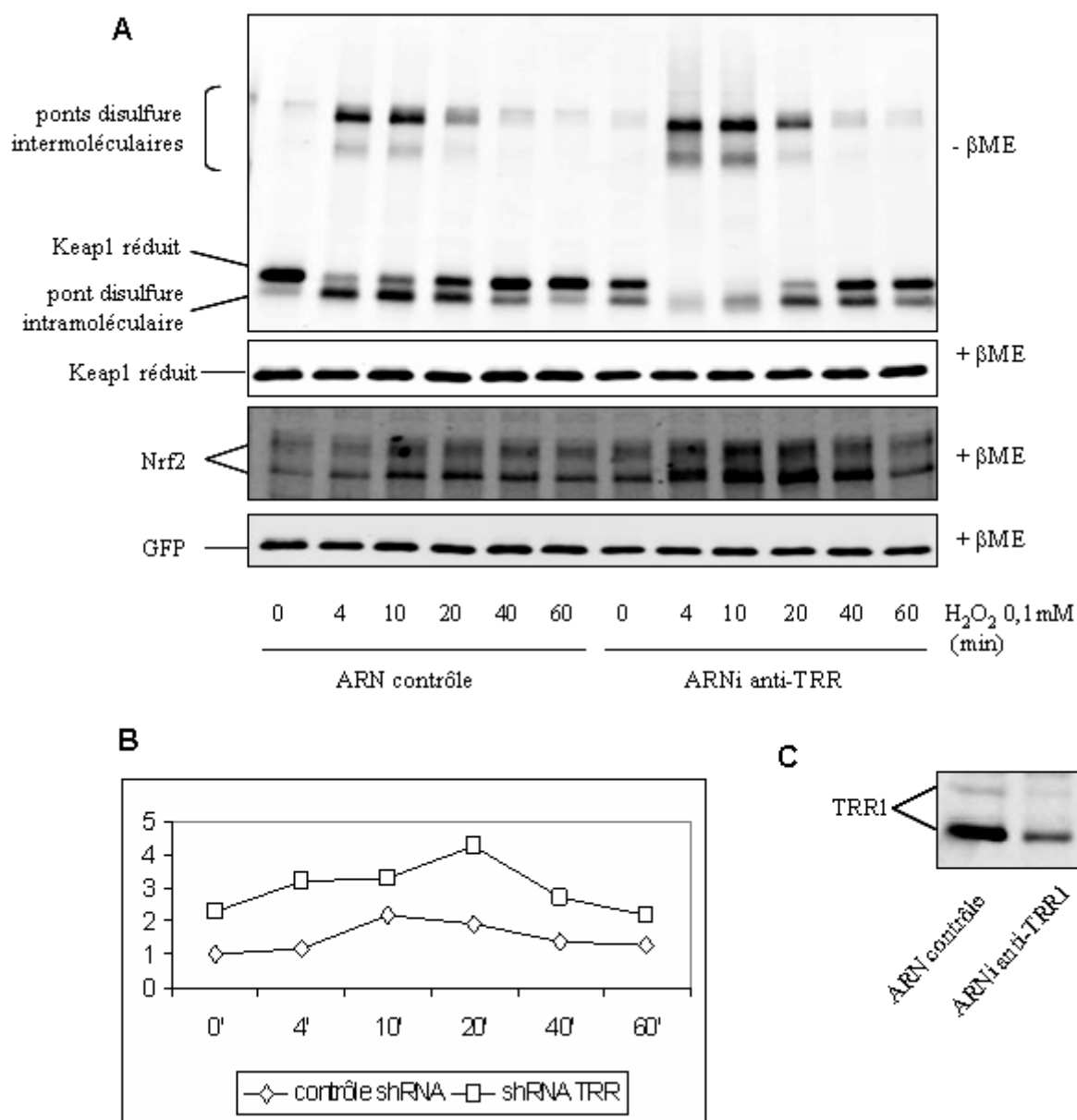


Figure 15. Effet de l'inactivation de la réduction des thiols par la voie des thioredoxines sur Keap1 et Nrf2. A. Etat d'oxydation de Keap1, niveaux d'expression de Nrf2 et de GFP, comme contrôle d'efficacité de transfection et de quantité de protéine chargée sur gel, dans des lysats de cellules Hela exprimant un ARN interférant (hairpin) ciblant la thioredoxine réductase TRR1 et transfectées transitoirement avec pcDNA-myc-HIS-mKeap1, pCI-HA-mNrf2, et pYFP-N1, puis exposées à 0,1mM d' H_2O_2 pour différentes durées. Keap1 est détecté par western blot avec un anticorps dirigé contre l'étiquette myc, Nrf2 avec un anticorps dirigé contre la protéine, et la GFP avec un anticorps dirigé contre un épitope de la GFP. B. Quantification du niveau d'expression de Nrf2. C. Niveau d'expression de la TRR1 dans des cellules Hela transfectées de façon stable avec un plasmide exprimant un ARN interférant (hairpin) ciblant la TRR1. Enlever la quantification

Parallèlement à cet effet sur Keap1, en l'absence de traitement on observe déjà un effet de l'inhibition de TRR1 sur la stabilisation de Nrf2 d'un facteur 2. L' H_2O_2 induit également dans ces conditions une légère stabilisation de Nrf2, qui suit la cinétique d'oxydation de Keap1.

Cette expérience permet d'affirmer que la voie de la thioredoxine intervient dans le contrôle de l'état redox de Keap1 et donc dans son activité. Il est cependant étonnant de n'avoir observé d'effet qu'en l'absence de traitement et sur l'intensité de l'oxydation induite par l' H_2O_2 , mais pas sur la cinétique de cette oxydation. Ceci laisse suggérer que l'effet d'inactivation de TRR1 sur l'oxydation de Keap1 est indirect, et donc que la thioredoxine n'est pas le réducteur physiologique de Keap1. Cependant, il est également important de questionner ici l'efficacité de l'inactivation de TRR1 (figure 15C).

Les résultats de cette expérience sont parfaitement en accord avec les résultats d'autres études montrant que l'expression de certains gènes cibles de Nrf2 est augmentée lorsque TRR1 est inhibée (A.A. Bondareva, 2007).

I.C.2. Effet de l'inactivation conjointe des voies du GSH et de la thioredoxine

L'effet de l'inhibition de la synthèse de GSH par le BSO a été testé dans les cellules contrôles, et dans celles exprimant l'ARNi spécifique de TRR1.

Dans les cellules contrôle le BSO n'a pas d'effet, ni sur l'état redox de Keap1, ni sur la stabilité de Nrf2 (figure 16). En revanche, le BSO a un effet majeur dans les cellules exprimant l'ARNi anti-TRR1, aussi bien sur l'oxydation de Keap1 que sur la stabilisation de Nrf2. Remarquablement, l'oxydation de Keap1 en l'absence de tout traitement est comparable à celle observée dans les cellules contrôles exposées à l' H_2O_2 . Cette oxydation est encore augmentée par l' H_2O_2 , avec quasi-disparition de la forme rémonomère. L'effet sur la stabilisation de Nrf2 est très important, déjà présent à un niveau maximal avant exposition à l' H_2O_2 , et persistant tout au long de l'analyse.

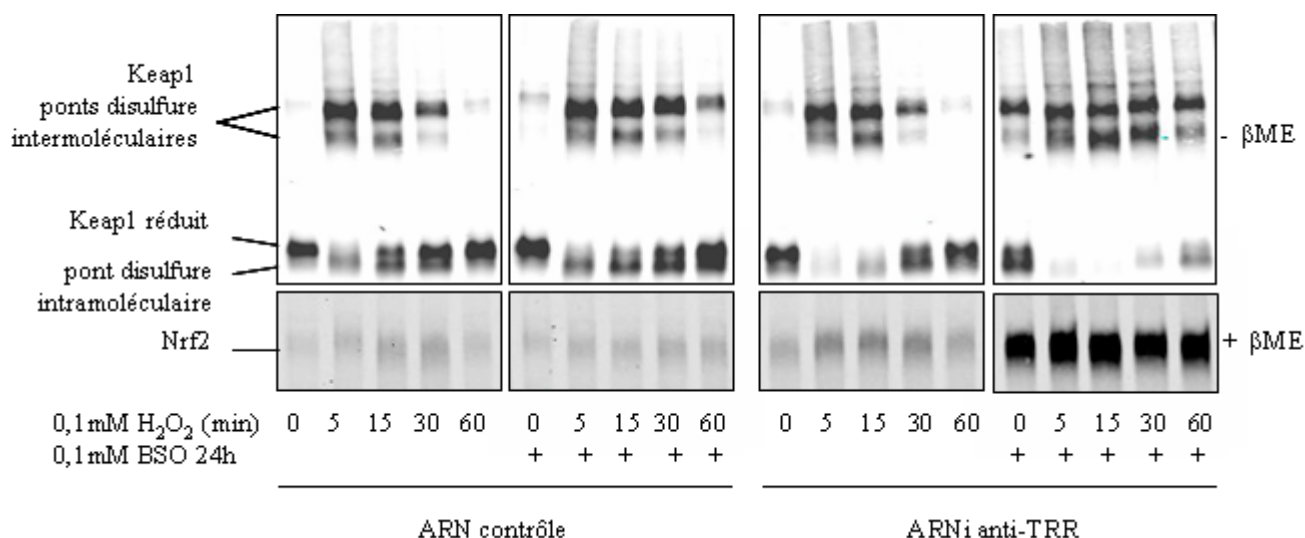


Figure 16. Effet cumulé de l'inactivation de la thioredoxine réductase et de la synthèse du glutathion sur la voie Keap1-Nrf2. Des cellules Hela exprimant de façon stable un ARN contrôle ou un ARN interférant (ARNi) qui induit une baisse du niveau d'expression de la thioredoxine réductase TRR1, sont transfectées transitoirement avec pcDNA3-myc-HIS-mKeap1, pCI-HA-mNrf2, et peYFP-N1, exposées 24h à 0,1mM de buthionine sulfoximine (BSO), un inhibiteur de la synthèse de glutathion, puis à 0,1mM d'H₂O₂ pour différentes durées. Les protéines préparées en présence de NEM sont séparées sur gel de polyacrylamide en l'absence ou en présence de βME. Les formes d'oxydation de Keap1 sont révélées par western blot avec un anticorps dirigé contre l'épitope myc, et le niveau d'expression de Nrf2 est apprécié par western blot avec un anticorps anti-Nrf2.

En conclusion, cette série d'expériences montre qu'il est nécessaire d'inactiver les deux voies de contrôle thiol redox pour influencer l'état d'oxydation de Keap1. Ceci signifierait que ces deux voies présentent une redondance de fonction sur le contrôle redox de Keap1, ce qui est en soi assez surprenant car on suppose l'existence d'une spécificité dans leur mode d'action (M.B. Toledano, 2007). L'oxydation maintenue de Keap1 est probablement causée par la conjonction des effets des espèces réactives de l'oxygène endogènes, produits en permanence par la cellule, et de l'absence de réduction de la protéine. Cette expérience montre encore une fois une corrélation nette entre oxydation de Keap1 et stabilisation de Nrf2. Avant de pouvoir conclure quant à la relation de causalité entre ces deux événements, il faudra vérifier si l'expression de mutants incapables de s'oxyder dans les cellules dans lesquelles les deux voies de contrôle thiol-redox sont inactivées bloque la stabilisation de Keap1. On pourrait en effet imaginer que la stabilisation observée est le résultat d'un effet direct sur l'activation Nrf2, par exemple suite à la phosphorylation de ce dernier par l'une des kinases déjà citées (voir introduction). Dans cette perspective, la kinase PERK serait le premier candidat à vérifier dans la mesure où la dérégulation redox est connue pour induire un défaut de sécrétion et donc d'activer la réponse UPR.

I.D. Conclusion : une hypothèse mécanistique concernant la régulation redox de la voie Keap1-Nrf2

Nous avons montré que Keap1 fonctionne comme un « senseur », un détecteur cellulaire d'espèces oxydantes (ROS et RNS), en aval de l'activation de Nrf2. Cette fonction est assurée, au niveau biochimique, par l'oxydation de thiols spécifiques de Keap1, en particulier la cystéine 151, sous forme de ponts disulfures. Cette modification de la cystéine 151, comme son alkylation par le tBHQ ou le sulforaphane (Zhang, 2003), inactive l'activité ubiquitine-ligase du complexe E3 dans lequel Keap1 fonctionne comme un « adaptateur », et ceci provoque la stabilisation et l'activation de Nrf2. Le mécanisme moléculaire responsable de cette inactivation de Keap1 par formation de ponts disulfure reste à déterminer. Cependant, nos expériences de co-immunoprécipitation avec deux formes de Keap1 portant des étiquettes différentes (figure 7) montrent que la dimérisation redox de Keap1, par formation d'un pont disulfure intermoléculaire, et sa dimérisation non redox, sont exclusives l'une de l'autre. L'architecture du complexe formé de deux monomères de Keap1 recrutant un monomère de Nrf2 et le positionnant de manière à ce qu'il puisse être ubiquitinylé par l'E2 ligase (M. McMahon, 2006, KI. Tong, 2006) serait profondément remaniée par la formation d'un dimère redox (figure 17). Cette hypothèse présente une alternative aux hypothèses proposées pour le mécanisme de stabilisation de Nrf2 suite à la modification de cystéines de Keap1 par le tBHQ. En effet, le groupe de Hannink a proposé que la modification de la cystéine 151 de Keap1 induit la perte d'interaction de Keap1 avec Cul3 (S.C. Lo, 2006), et les groupes de Yamamoto et Hayes que cette modification induit la perte de l'interaction entre le Kelch de Keap1 et le motif DLG de Nrf2 (M. McMahon, 2006, KI Tong, 2006).

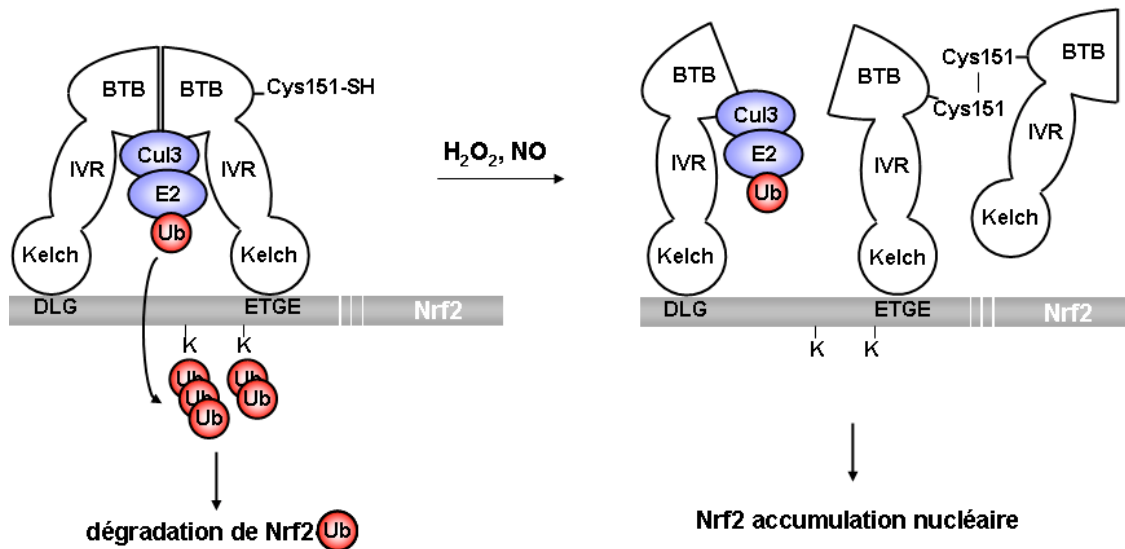


Figure 17. Mécanisme proposé pour la stabilisation de Nrf2 par des oxydants. Dans le modèle d'interaction à 2 sites (McMahon, 2006, Tong, 2006), Keap1, représenté par ses trois domaines BTB, IVR, et Kelch, forme un dimère à travers une interaction non redox au niveau du BTB. Une molécule de Nrf2 interagit avec les 2 domaines Kelch du dimère de Keap1, au niveau des motifs ETGE et DLG. Dans cette configuration, le complexe Cul3 + E2 ligase recruté par Keap1 peut ubiquitinyler Nrf2, qui est alors dégradé par le protéasome 26S. Nous proposons que la dimérisation redox via la cystéine 151 de Keap1 qui apparaît en réponse à l' H_2O_2 ou au NO empêche la dimérisation non redox et l'ubiquitination de Nrf2, qui s'accumule alors dans la cellule.

II. La régulation de Bach2 par oxydation

II.A. Mise en évidence et caractérisation de la formation de ponts disulfure dans la protéine Bach2 induite par l' H_2O_2

II.A.1. Bach2 est oxydé dans des cellules exposées à de l' H_2O_2

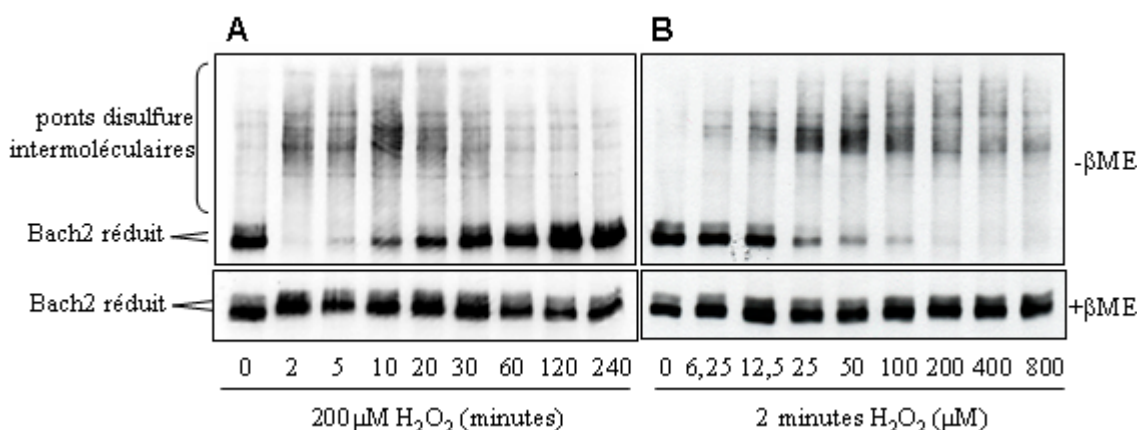


Figure 17. Oxydation de Bach2 dans des cellules exposées à l' H_2O_2 . Des cellules Hela transfectées avec pcDNA3-9myc-hBach2 sont exposées à 0,2 mM d' H_2O_2 pendant différentes durées (A) ou à différentes doses d' H_2O_2 pendant 2 minutes (B), puis lysées en présence de NEM. Les formes d'oxydation de 9myc-Bach2 sont révélées par son profil de migration en gel d'acrylamide en conditions non réductrices (- βME) ou réductrices (+ βME), après un western blot avec un anticorps dirigé contre l'épitope myc.

Afin de déterminer si des ponts disulfure sont formés dans la protéine Bach2 dans des cellules exposées à de l' H_2O_2 , l'état des redox des thiols est figé par l'utilisation d'une forte concentration en NEM dans le tampon de lyse. Des cellules Hela en culture sont transfectées par le plasmide d'expression de Bach2, pcDNA3-9myc-hBach2, puis traitées ou non par de l' H_2O_2 exogène. Après la lyse, les protéines sont réduites ou non, et la migration de 9myc-Bach2 en électrophorèse SDS-PAGE est analysée par western blot. Avec des échantillons non additionnés de β mercaptoéthanol, on observe qu'en absence de traitement, la protéine Bach2 couplée à l'étiquette 9myc migre en électrophorèse en conditions dénaturantes vers 180 kDa. (figure 17). Lorsque les cellules ont été exposées à l' H_2O_2 , la migration de 9myc-Bach2 est déplacée vers les plus hauts poids moléculaires. En revanche, si les échantillons dénaturés sont réduits en présence de β -mercapto-éthanol (+ βME) avant l'électrophorèse, cette différence de migration disparaît. Comme pour Keap1, nous interprétons cette observation

comme le reflet de l'oxydation de Bach2 par la formation de ponts disulfure. On peut détecter l'oxydation de Bach2 après exposition des cellules à quelques micromolaires d'H₂O₂, et la dose d'H₂O₂ pour l'oxyder quantitativement est de l'ordre du dixième de millimolaire. Suite à l'exposition des cellules à 200µM d'H₂O₂, au bout d'une minute, l'oxydation de Bach2 est quasi-complète. Après dix minutes de traitement, le taux d'oxydation de Bach2 diminue, au point que la protéine est presque entièrement réduite au bout de 40 minutes. Il existe donc un mécanisme de réduction de Bach2. Bach2 présente ainsi certaines caractéristiques requises par un senseur de l'H₂O₂: sensibilité à l'oxydation et réversibilité de cette oxydation.

La ou les formes oxydées de Bach2 présentent une mobilité électrophorétique révélée en western blot comme une trace mal résolue qui s'étend sur une large plage de poids moléculaires. Il pourrait s'agir de multimères covalents, au sein desquels les monomères interagissent entre eux par des ponts disulfure. Cependant, il est difficile de faire une quelconque hypothèse sur la stœchiométrie de Bach2 dans sa forme oxydée, tant celle-ci est mal résolue en électrophorèse. Il est également possible que d'autres protéines soient engagées dans des ponts disulfures intermoléculaires avec Bach2.

La même approche expérimentale met en évidence la formation de ponts disulfure dans Bach1 dans des cellules exposées à de l'H₂O₂, qui présente alors un profil de migration électrophorétique similaire à celui observé pour Bach2. De plus, Bach2 est également oxydé dans des cellules exposées à du spermine NONOate (résultats non montrés).

II.A.2. Mutagenèse des cystéines de Bach2

Dans la perspective de caractériser ces formes oxydées de Bach2, et en particulier d'identifier les cystéines modifiées par l'oxydation, la mutagenèse systématique des cystéines de Bach2 en sérine a été entreprise. La stratégie adoptée a consisté à grouper les mutations entre elles pour résumer en un nombre restreint de constructions l'ensemble des mutations des cystéines de Bach2. Des résultats préliminaires ne mettant en évidence aucun défaut d'oxydation d'un mutant de Bach2 qui ne contient plus le domaine BTB nous ont poussés à traiter séparément les cystéines du BTB. Avec le mutant de délétion du domaine BTB (ABTB), cinq constructions résument la mutagenèse des 38 cystéines de Bach2 (notées 1 à 5 sur la figure 18A). Lorsqu'elles sont exprimées dans des cellules, ces versions mutées de

Bach2 sont complètement oxydées après exposition des cellules à 0,2 mM d'H₂O₂ pendant une minute, comme en témoigne la disparition complète du monomère (figure 18B).

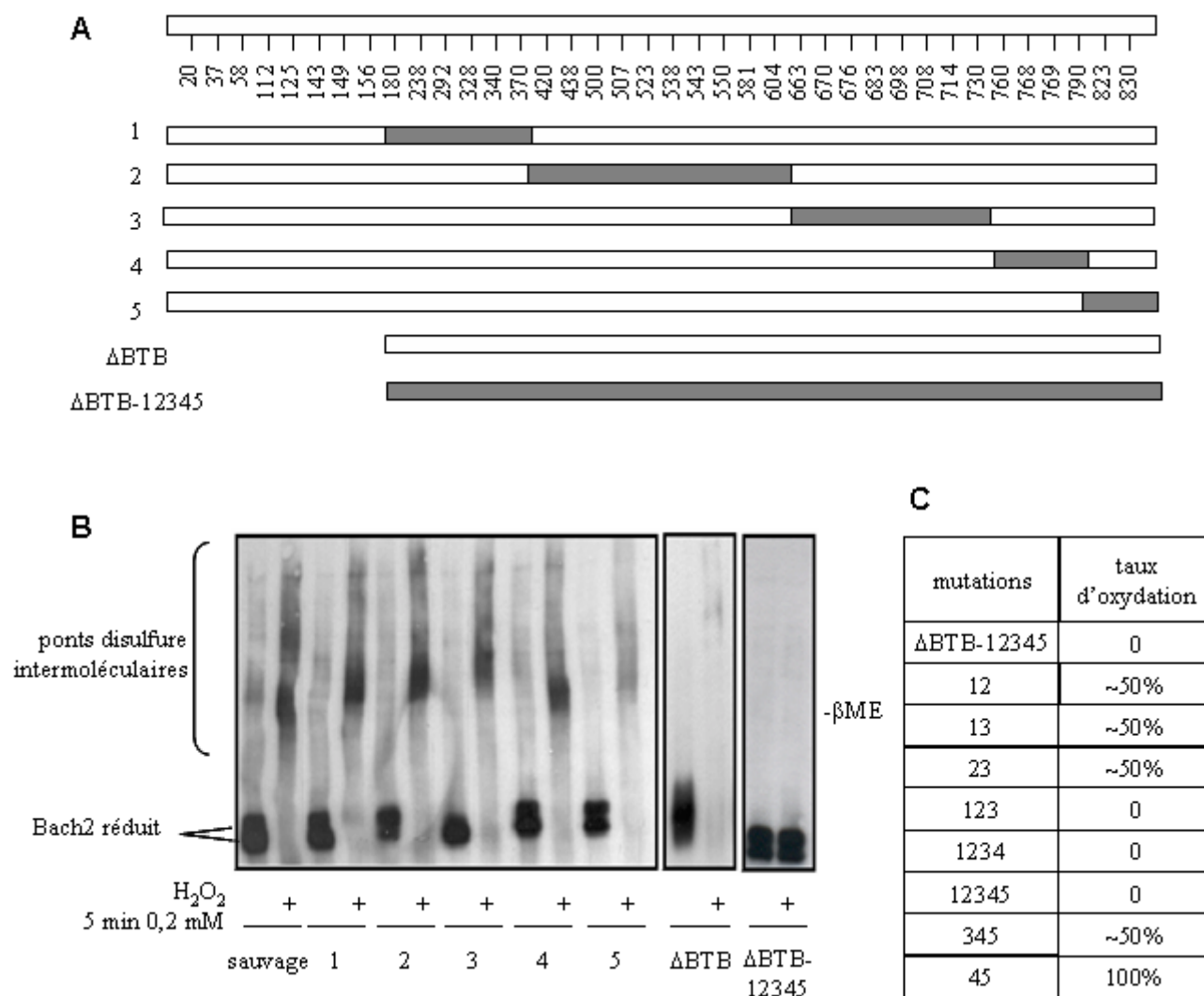


Figure 18. Mutagenèse des cystéines de Bach2. La mutagenèse systématique des cystéines de Bach2 a été réalisée dans le plasmide pcDNA3-9myc-hBach2. Les cystéines du BTB ont été traitées séparément par délétion d'une partie du cadre ouvert de lecture correspondant aux codons 2 à 158 de Bach2. La mutagenèse ponctuelle des autres cystéines de Bach2 en sérine est résumée par cinq constructions qui regroupent chacune une partie de ces mutations. A. Représentation graphique des constructions réalisées. En grisé apparaissent les parties de Bach2 dans lesquelles toutes les cystéines sont mutées. B. Les plasmides correspondant sont transfectés dans des cellules Hela, et l'état d'oxydation des différentes versions de 9myc-Bach2 en réponse à 0,2 mM d'H₂O₂ pendant 5 minutes est analysé après électrophorèse en conditions non réductrices et western blot avec un anticorps dirigé contre l'épitope myc. C. Des groupes de mutations ont été combinés entre eux pour générer de nouvelles versions de Bach2, et les taux d'oxydation observés en western blot sont résumés dans un tableau.

Les mutations contenues dans différents groupes ont été combinées pour générer de nouveaux mutants, dont les taux d'oxydation approximatifs dans des cellules exposées à 0,2 mM d' H_2O_2 sont donnés (figure 18C). Si l'oxydation de Bach2 dans des cellules exposées à l' H_2O_2 est bien dépendante de ses cystéines, comme en atteste le défaut complet d'oxydation d'une protéine dépourvue de cystéine ($\Delta\text{BTB-1235}$), aucune des combinaisons testées de quelques mutations de cystéines, et *a fortiori* aucune mutation ponctuelle d'une seule cystéine ne permet d'altérer cette oxydation. Une hypothèse pour expliquer ces résultats serait la formation simultanée de plusieurs ponts disulfure de façon indépendante dans Bach2.

II.A.3. Recherche d'autres protéines engagées par des ponts disulfure dans les formes d'oxydation de Bach2.

II.A.3.a. Les complexes d'oxydation de Bach2 ne contiennent pas d'autre protéine en quantité équivalente à celle de Bach2.

Afin de déterminer si d'autres protéines sont engagées dans des ponts disulfure intermoléculaire avec Bach2, les formes oxydées de Bach2 contenues dans des lysats de cellules transfectées avec pcDNA3-9myc-Bach2, exposées à un marquage métabolique au ^{35}S , puis à de l' H_2O_2 , sont immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette myc. Après réduction, les protéines marquées précipitées migrent sous forme d'une bande unique correspondant à un poids moléculaire de 180kDa environ (figure 19). Aucune autre bande n'a pu être détectée dans les plus faibles poids moléculaires (résultat non montré). Les complexes d'oxydation de Bach2 de haut poids moléculaire ne semblent donc contenir que la protéine Bach2. Cependant, on ne peut exclure la possibilité que ces complexes contiennent également des protéines qui ne soient pas marquées de façon efficace par le ^{35}S . De plus, une protéine engagée dans un pont disulfure avec Bach2 de façon non stœchiométrique, minoritaire, pourrait ne pas être détectée avec cette approche expérimentale.

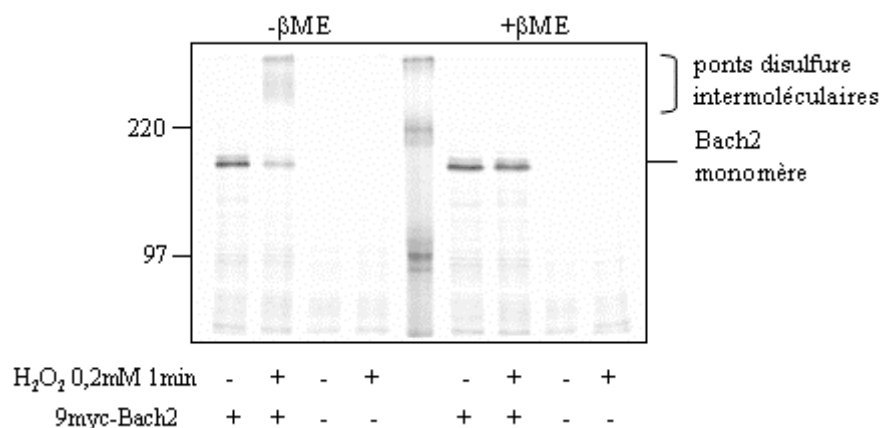


Figure 19. Immunoprécipitation des complexes d'oxydation de Bach2. Des cellules Hela sont transfectées avec pcDNA3-9myc-Bach2 ou pcDNA3, exposées à un marquage métabolique au ³⁵S, puis à 0,2 mM d'H₂O₂ pendant 1 minute. 9-myc-Bach2 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope myc, puis les protéines sont séparées sur gel d'acrylamide et visualisées par autoradiographie.

II.A.3.b. purification de la forme oxydée de Bach2

Nous avons entrepris la purification des formes oxydées de Bach2 dans le but d'identifier par spectrométrie de masse des partenaires redox éventuels de Bach2 dont la présence n'aurait pu être détectée par l'expérience précédente, et dans l'espoir d'identifier des cystéines de Bach2 modifiées par l'oxydation. Pour les besoins de l'analyse par spectrométrie de masse, qui requiert de grandes quantités de protéine, une lignée de cellules Hela S3, capables de croître en suspension, et qui sur-exprime de manière constitutive la protéine Bach2 fusionnée à une étiquette Flag, une étiquette HIS, et une étiquette HA (FHH-Bach2) a été construite. Après exposition des cellules pendant 5 minutes à 0,2 mM d'H₂O₂, les formes oxydées de Bach2 sont purifiées en présence de NEM et en conditions non réductrices par une première étape de chromatographie d'adsorption sur résine de nickel, puis une seconde étape de chromatographie d'affinité réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope Flag. La moitié des protéines obtenues après purification est réduite par du βME. Après électrophorèse en gel d'acrylamide, et coloration à l'argent (figure 20), certaines bandes sont découpées, et les protéines contenues dans les morceaux de gel digérées par la trypsine. Les ponts disulfures sont ensuite réduits au DTT et les thiols ainsi libérés alkylés par l'iodoacétamide. Ainsi, les cystéines initialement engagées dans des ponts disulfure doivent se retrouver marquées par une carbamidométhylation, alors que les cystéines initialement réduites doivent être alkylées par le NEM.

Lorsque les échantillons sont réduits avant l'électrophorèse, une bande majoritaire apparaît. L'analyse par spectrométrie LC-MS/MS de l'espèce correspondante identifie avec certitude Bach2. Si l'échantillon n'est pas réduit avant l'électrophorèse, cette bande n'est plus visible, mais une trace mal résolue s'étend dans les hauts poids moléculaires, qui correspondrait aux formes oxydées de Bach2. Parmi les peptides détectés, deux d'entre eux contiennent des cystéines alkylées par l'iodoacétamide, la cystéine 37 du domaine BTB pour l'un, et les cystéines 670 et 676 du bZip pour l'autre. Ces cystéines étaient donc engagées dans des ponts disulfure après l'exposition des cellules à l'H₂O₂. Ce résultat confirme l'hypothèse issue des résultats obtenus par la mutagenèse des cystéines selon laquelle plusieurs ponts disulfure peuvent être formés dans Bach2 après exposition de cellules à l'H₂O₂.

Une autre bande apparaît de manière spécifique lorsque l'échantillon est réduit avant l'électrophorèse, autour de 20 kDa. L'analyse LC-MS/MS révèle sans ambiguïté qu'il s'agit de la peroxyredoxine Prx1. L'absence de cette bande avec l'échantillon non réduit signifie que la Prx1 est co-purifiée avec Bach2 sous une forme réductible de poids moléculaire supérieur à celui de son monomère. Il est possible que Prx1 soit purifiée comme partenaire redox de Bach2, lié à celui-ci par un pont disulfure. L'interaction par l'intermédiaire d'un pont disulfure entre ces deux protéines est confirmée par des expériences de co-précipitation entre Bach2 et Prx1 (figure 24) et fera, avec d'autres résultats concernant la régulation par la Prx1 de l'oxydation de différentes protéines, l'objet du prochain chapitre.

Deux autres bandes ont une intensité qui semble supérieure lorsque l'échantillon a été réduit avant l'électrophorèse, et pourraient donc correspondre à des partenaires redox potentiels de Bach2. Vers 60 kDa est identifiée la sous-unité β de la prolyl 4-hydroxylase, et, vers 18 kDa, la cofiline 1, MafG et MafK. L'interaction redox entre Bach2 et la prolyl 4-hydroxylase β ou la cofiline 1 n'a pas donné lieu à des expériences supplémentaires.

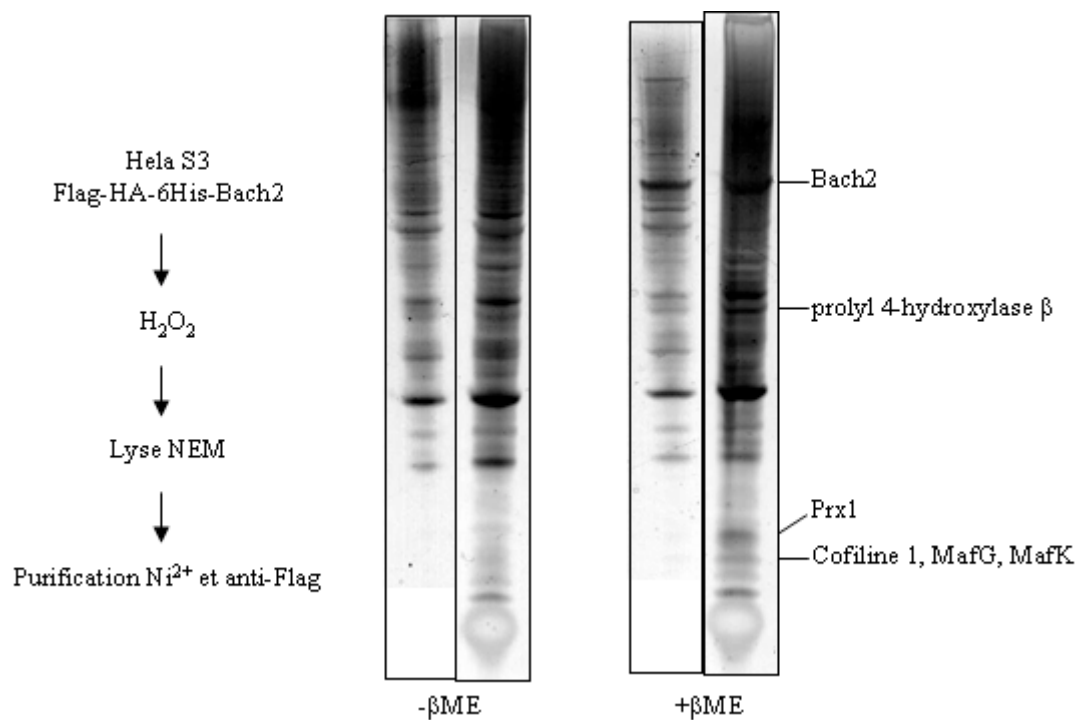


Figure 20. Purification des formes oxydées de Bach2. Des cellules HeLa S3 qui expriment de façon stable Bach2 fusionné à une étiquette Flag, une étiquette HA, et une étiquette 6HIS, sont exposées pendant 5 minutes à 0,2 mM d'H₂O₂, puis lysées en présence de NEM. Après purification en deux étapes, l'extrait est séparé en deux parts égales, dont l'une est réduite au βME. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel dénaturant de polyacrylamide, et visualisées par coloration à l'argent. Pour chacun des échantillons, -βME ou +βME, la piste de gauche est chargée avec 10% du total des protéines, celle de droite avec 90%. L'analyse par spectrométrie LC-MS/MS des protéines contenues dans certaines bandes a été effectuée par Vasily Ogryzko à l'Institut André Lwoff à Villejuif.

II.A.3.c. Formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre Bach2 et MafK

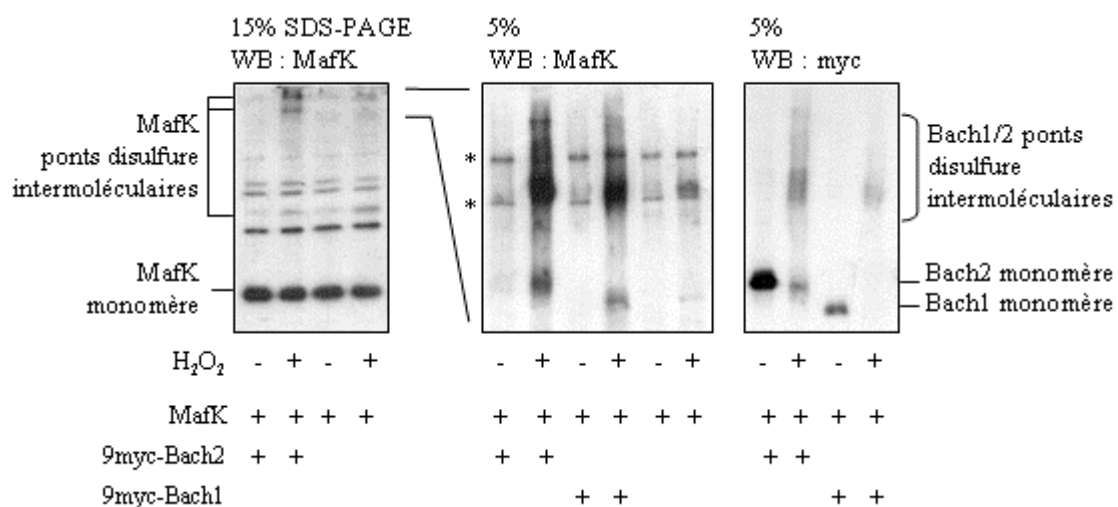


Figure 21. Formation d'un pont disulfure entre Bach2 ou Bach1 et MafK. Des cellules Hela sont transfectées transitoirement avec pMT2-mMafK (1,5 µg), et pcDNA3, pcDNA3-9myc-hBach2, ou pcDNA3-9myc-hBach1 (1,5 µg), exposées à 0,2 mM d'H₂O₂ pendant 1 minute, puis lysées en présence de NEM. La migration électrophorétique de MafK, est analysée après électrophorèse dans un gel à 15% d'acrylamide en conditions non réductrices et western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine MafK. La migration de Bach2 et Bach1 est analysée après électrophorèse dans un gel à 5% d'acrylamide en conditions non réductrices et western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope myc. * marquage non spécifique de l'anticorps anti-MafK. Les bandes indiquées comme correspondant à des ponts disulfure sont sensibles à la réduction par le βME.

Bach1 et Bach2 interagissent avec les membres de la famille des petites Maf, en association avec lesquels ils exercent leur fonction de régulateurs de la transcription. Les résultats obtenus suite à la purification de Bach2 oxydé suggèrent que cette interaction pourrait être redox par l'intermédiaire d'un pont disulfure en réponse à l'H₂O₂. Pour tester cette hypothèse, un plasmide qui dirige l'expression ectopique de MafK est transfecté dans des cellules Hela, seul ou en combinaison avec un plasmide d'expression de 9myc-Bach2 ou de 9myc-Bach1, et après exposition des cellules à 0,2 mM d'H₂O₂ pendant cinq minutes, la migration de MafK, Bach1, et Bach2 est analysée (figure 21). En l'absence d'H₂O₂, MafK migre dans un gel d'acrylamide à 15% principalement à une taille compatible avec une structure monomérique. Lorsque les cellules sont exposées à l'H₂O₂, une forme minoritaire apparaît, qui est sensible à la réduction par le βME (résultats non montré), et présente un poids moléculaire apparent proche de 30 kDa, compatible avec une structure homodimérique. La surexpression de 9myc-Bach2 induit le ralentissement dans les hauts poids moléculaires d'une partie de MafK. Un gel d'acrylamide à 5%, qui permet de mieux séparer ces espèces immunoréactives avec l'anticorps anti-MafK, montre qu'elles présentent le même profil électrophorétique que les formes oxydées de Bach2, et dans une moindre mesure, que le monomère de Bach2. Le même résultat est obtenu lorsque Bach1 est exprimé à la place de Bach2. La formation d'un pont disulfure entre MafK et Bach1 ou Bach2 explique ces résultats. L'espèce immunoréactive avec l'anticorps dirigé contre MafK et de poids moléculaire similaire à celui du monomère de Bach2 correspondrait à la présence d'un hétérodimère redox Bach2-MafK, l'incrément de poids moléculaire conféré par MafK, 17,5kDa, aux 180 kDa apparents de 9myc-Bach2 n'étant pas visible.

L'H₂O₂ induit donc la formation d'un pont disulfure entre Bach2 et MafK. Cependant, nos résultats ne permettent pas de déterminer si une proportion de Bach2 importante participe à ce pont disulfure.

II.B. Modulation de l'oxydation de Bach2 par le glucose

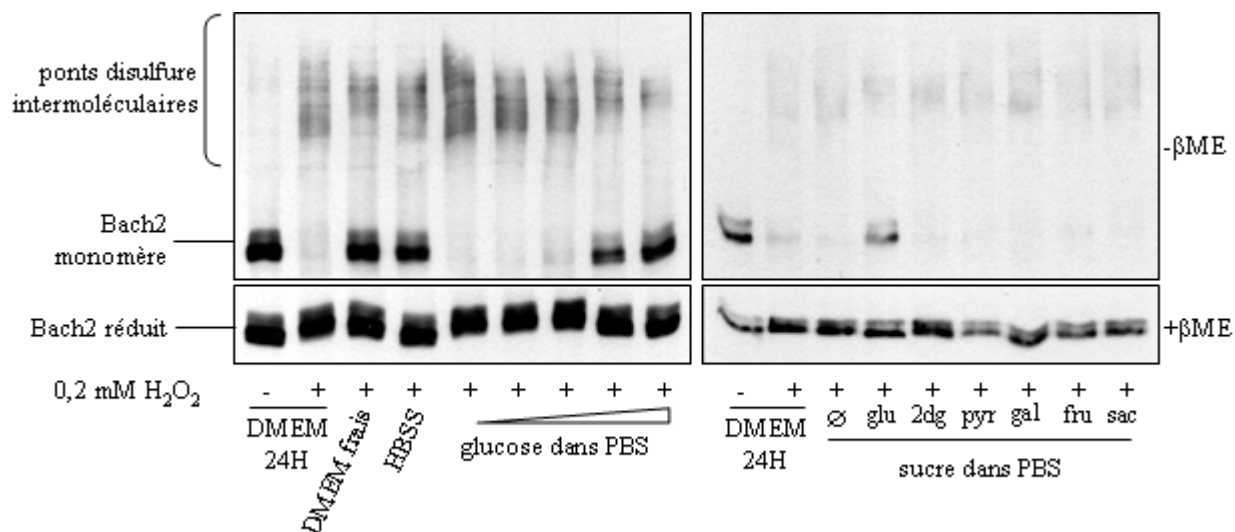


Figure 22. Le glucose inhibe spécifiquement l'oxydation de Bach2 par l'H₂O₂. Des cellules Hela transfectées avec pcDNA3-9myc-hBach2 sont exposées à 0,2 mM d'H₂O₂ pendant 1 minute dans différents milieux : du DMEM à 1g/L de glucose dans lequel elles sont restées en culture pendant 24h, du DMEM frais, de l'HBSS, du PBS complémenté par des concentrations croissantes en glucose (0 à 1 g/L), ou par 1g/L de glucose (glu), 2-déoxy-glucose (2dg), pyruvate (pyr), galactose (gal), fructose (fru), ou saccharose (sac). L'état d'oxydation de 9myc-Bach2 est révélé après lyse en présence de NEM, électrophorèse en gel d'acrylamide en condition non réductrices (-βME) et western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope myc.

Dans certaines expériences, l'oxydation de Bach2 est parfois fortement inhibée. Cette inhibition dépend du milieu de culture utilisé (figure 22). Bach2 est quantitativement oxydé suite à l'exposition de cellules à 0,2 mM d'H₂O₂ introduit dans du milieu DMEM dans lequel les cellules sont restées en culture pendant 24h, ou dans du tampon phosphate frais (PBS). En revanche, lorsque l'H₂O₂ est introduit dans du DMEM frais ou dans du HBSS (solution saline équilibrée de Hank), Bach2 migre principalement sous sa forme monomérique. Ceci suggère la présence d'un composé présent dans le DMEM et le HBSS qui soit capable d'inhiber l'oxydation de Bach2, et qui soit épuisé au bout de 24h de culture. Cette hypothèse nous a conduit à identifier le glucose comme responsable de l'inhibition de l'oxydation de Bach2. La complémentation d'un tampon PBS par du glucose inhibe l'oxydation de Bach2 en réponse à l'H₂O₂ de façon dépendant de la dose de glucose utilisée. Cet effet est spécifique au glucose, puisque la complémentation d'un tampon PBS par d'autres sucres ne modifie pas l'oxydation de Bach2. Cette inhibition de l'oxydation par la présence de glucose semble également

spécifique à Bach2, puisque le glucose n'inhibe pas l'oxydation d'au moins une autre protéine, Keap1 (résultat non montré). Le glucose semble donc exercer une régulation spécifique sur l'oxydation de Bach2.

II.C. L'H₂O₂ provoque l'accumulation nucléaire de Bach2

Pour apprécier l'importance du phénomène d'oxydation de Bach2, nous avons regardé comme conséquence fonctionnelle possible la modulation de la localisation cellulaire de Bach2 par l'H₂O₂ (figure 23). Dans un modèle expérimental de sur-expression transitoire d'une forme de Bach2 fusionnée à 9 étiquettes myc dans des cellules Hela, Bach2 présente une localisation cytoplasmique. L'H₂O₂ induit une accumulation nucléaire de Bach2 réversible au cours du temps. Des images caractéristiques obtenues par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope myc sont présentées en figure 23A. La quantification du nombre de cellules présentant un marquage partiel ou total de myc-Bach2 dans le noyau montre que la translocation nucléaire est rapide, puisque Bach2 se retrouve au moins partiellement dans le noyau de près de 80% des cellules après 2 minutes d'exposition à l'H₂O₂ (figure 23B). L'accumulation nucléaire de 9myc-Bach2 présente un maximum à 1 heure, puis commence à diminuer. Après 4 heures d'exposition à l'H₂O₂, la majorité des cellules présentent un marquage cytoplasmique. Comme l'oxydation de Bach2 (figure 17), son accumulation nucléaire augmente avec la dose d'H₂O₂ utilisée (figure 23C). Enfin, le glucose inhibe l'accumulation nucléaire de Bach2 (figure 23D). Ces résultats montrent que l'exposition de cellules à l'H₂O₂ provoque l'oxydation de Bach2 et son accumulation nucléaire. La corrélation entre ces deux événements n'est pas rigoureuse, dans la mesure où les cinétiques d'oxydation et d'accumulation nucléaires de Bach2 diffèrent l'une de l'autre. En particulier, après 2 minutes d'exposition à l'H₂O₂, l'oxydation de Bach2 est maximale alors que son accumulation nucléaire ne l'est pas encore. Cette préséance de l'oxydation sur l'accumulation nucléaire pourrait refléter le fait que cette dernière soit la conséquence de l'oxydation. Un important retard de la relocalisation de Bach2 au cytoplasme par rapport à sa réduction est également observé.

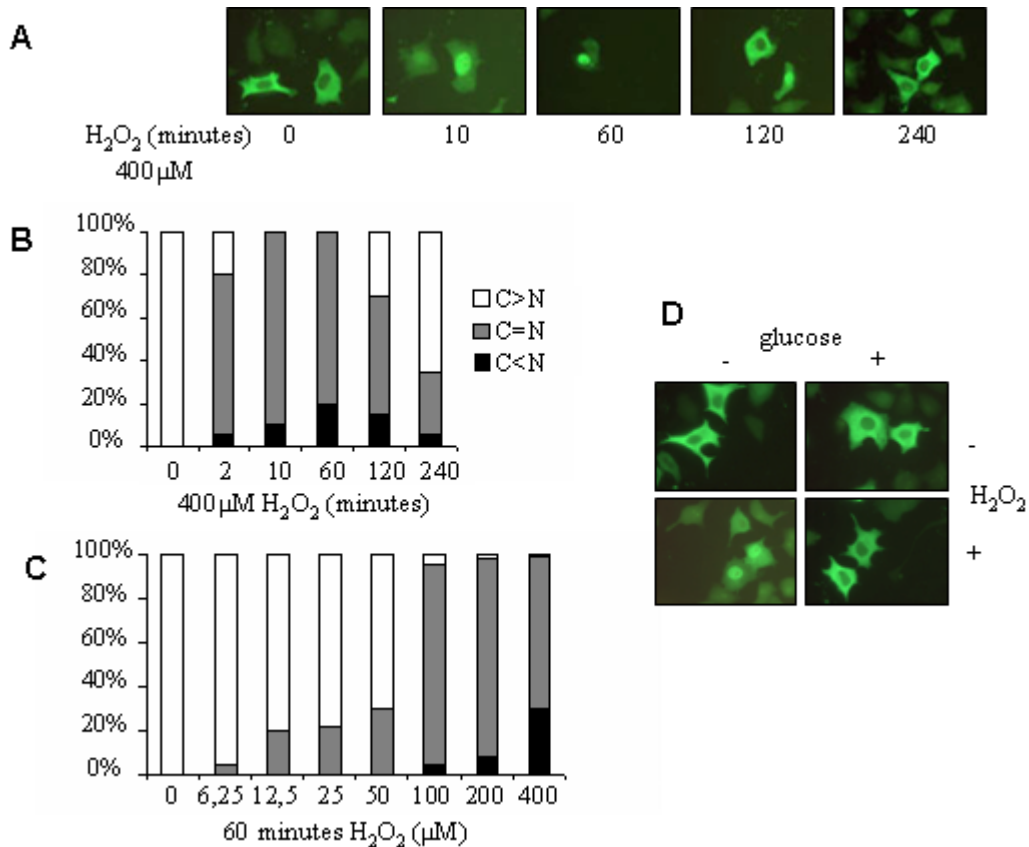


Figure 23. L'H₂O₂ induit l'accumulation nucléaire de Bach2. Des cellules Hela transfectées transitoirement avec pcDNA3-9myc-hBach2 sont exposées à de l'H₂O₂ pour différentes durées avant d'être fixées. La localisation cellulaire de 9myc-Bach2 est détectée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope myc. A. Images caractéristiques obtenues à différents temps après exposition des cellules à 0,4 mM d'H₂O₂. B. Les cellules sont classées en trois catégories pour être comptées selon qu'elles présentent un marquage dans le cytoplasme plus intense (C>N) ou moins intense (C<N) que dans le noyau, ou un marquage équivalent dans le cytoplasme et le noyau (C=N). C. Résultat obtenu après comptage réalisé comme précédemment sur des cellules exposées à différentes doses d'H₂O₂ pendant 1 heure. D. Les cellules sont exposées ou non à 0,4 mM d'H₂O₂ pendant 1 heure, en présence (1g/L) ou en absence de glucose.

L'accumulation nucléaire de Bach2 en réponse à l'H₂O₂ a été reproduite de nombreuses fois, mais depuis deux ans, il nous est impossible de la reproduire à nouveau. Nous croyons encore que les résultats présentés ici étaient valables, mais que certains paramètres du système expérimental que nous ignorons ont du changer. Nous avons essayé sans succès de reproduire ces résultats en modifiant un à un certains de ces paramètres, en utilisant notamment d'autres lignées cellulaires, ou des lots de sérum différents. Le plasmide d'expression de Bach2 a également été séquencé une nouvelle fois. Nous nous sommes retrouvés dans l'impossibilité d'étudier l'effet fonctionnel de l'oxydation de Bach2, et avons décidé la suspension du projet.

II.D. Discussion

Un rôle de Bach2 dans la sensibilisation de cellules à la mort cellulaire induite par des conditions de stress oxydant a été proposé, notamment au vu de résultats montrant la toxicité de l'expression ectopique constitutive de Bach2 et son activation par des agents électrophiles. jbc/ anticancer drugs. Dans cette perspective, nos résultats montrent que Bach2 pourrait être activé par l' H_2O_2 , selon un mécanisme initié par l'oxydation de Bach2 sous forme de complexes de haut poids moléculaire maintenus par des ponts disulfure. Le profil de migration de Bach2 oxydé en gel d'acrylamide, qui apparaît comme une trace mal résolue, ainsi que les résultats obtenus avec la mutagenèse des cystéines de Bach2, suggèrent que Bach2 est oxydé par l' H_2O_2 comme un mélange de plusieurs formes biochimiques, et que plusieurs de ses cystéines sont engagées dans des ponts disulfure intermoléculaires. Si Bach2 semble être la protéine majoritaire dans ces complexes d'oxydation, nous avons pu identifier certaines autres protéines susceptibles de se lier à Bach2 par l'intermédiaire de ponts disulfure. Parmi celles-ci, on trouve MafK, qui fonctionne comme partenaire de Bach2 pour l'assemblage d'un facteur de transcription à bZip dimérique fonctionnel. MafK ne comporte qu'une seule cystéine, située dans la région basique de son domaine bZip. Cette cystéine est conservée dans de nombreuses autres protéines à bZip, parmi lesquelles Nrf2, Bach1, ou Bach2, ou certains facteurs de transcription de AP-1. Il a été proposé que l'oxydation de cette cystéine dans les facteurs de transcription à bZip puisse constituer un événement de régulation négative par inhibition de leur liaison à l'ADN (abate 90, jones, ce papier de synthèse que je dois retrouver). Par ailleurs, l'interaction entre Bach2 et MafK promeut l'accumulation nucléaire de Bach2. Il est donc possible que la modification de cette interaction par formation d'un pont disulfure ait un effet sur l'étape d'accumulation nucléaire de l'activation Bach2. Malheureusement, nous n'avons pas pu tester cette hypothèse, en raison des problèmes rencontrés dans nos expériences d'immunofluorescence. Nous avons également identifié la prolyl 4-hydroxylase β , comme un partenaire potentiel de Bach2 dans ses complexes d'oxydation mais n'avons pas poursuivi nos investigations dans ce sens. Cependant l'hypothèse de l'implication de cette protéine dans la régulation redox de Bach2 est intéressante, et dans cette perspective, sa purification par Benezra à partir du cytoplasme de cellules Hela comme une activité capable de réduire *in vitro* le facteur de transcription E2A fournit un précédent. L'interaction par l'intermédiaire d'un pont disulfure entre Prx1 et Bach2

sera confirmée et généralisée à d'autres régulateurs que Bach2 au chapitre suivant, et l'hypothèse d'un rôle de Prx1 dans les mécanismes d'oxydation induits par l' H_2O_2 sera discutée.

En ce qui concerne l'effet inhibiteur du glucose sur l'oxydation de Bach2, les mécanismes sous-jacents à cette régulation de l'oxydation de Bach2 restent complètement inconnus. Dans l'hypothèse où l'état d'oxydation de Bach2 dépendrait d'un équilibre entre son oxydation et sa réduction, la possibilité que le glucose fournisse, par l'intermédiaire de la voie des pentoses phosphates, un surplus d'équivalents réducteurs responsables du défaut observé d'oxydation de Bach2 paraît incompatible avec la réduction de Bach2 après son oxydation, qui doit requérir aussi de tels équivalents réducteurs (figure 17). Ce défaut d'accumulation nucléaire de Bach2 en présence de glucose étaye encore la corrélation entre oxydation et accumulation nucléaire.

Parmi les perspectives soulevées par ce travail, il pourrait être intéressant de déterminer si l'oxydation de Bach2 est importante pour le rôle physiologique de Bach2 de régulation de la différenciation des lymphocytes B. On pourrait se demander si Bach2 est oxydé au cours de cette différenciation, par de l' H_2O_2 produit de façon endogène. Bach2 pourrait ainsi être oxydé et activé suite à l'engagement du récepteur B et production endogène d' H_2O_2 suite à une stimulation d'activité NADPH oxydase.

III. Effet de Prx1 sur l'oxydation de protéines par l'H₂O₂

III.A. L'H₂O₂ induit la formation de ponts disulfure entre la peroxyredoxine Prx1 et d'autres protéines

III.A.1. L'H₂O₂ induit la formation d'un pont disulfure entre Prx1 et Bach2

Au chapitre précédent, nous avons vu que la peroxyredoxine Prx1 est co-purifiée sous une forme oxydée avec Bach2. Ceci suggère la possibilité que l'H₂O₂ induise la formation d'un pont disulfure entre Bach2 et Prx1. Pour confirmer cette hypothèse, les formes d'oxydation de Prx1 dans des cellules Hela S3 qui expriment de façon stable Flag-HA-6HIS-Bach2 (FHH-Bach2) sont analysées avant et après précipitation de FHH-Bach2 en conditions non réductrices (figure 24A). Lorsque les cellules n'ont pas été exposées à l'H₂O₂, Prx1 est présente dans les lysats avant la précipitation sous forme de monomères ou de dimères réductibles uniquement. Une augmentation de la quantité de dimères réductibles de Prx1 ainsi que la formation de complexes réductibles de haut poids moléculaire qui contiennent Prx1 sont induites après exposition des cellules à l'H₂O₂. Dans l'éluat après précipitation de FHH-Bach2, seule une partie de ces complexes de haut poids moléculaires inductibles par l'H₂O₂ est encore présente, visible tout en haut du gel et indiquée par une flèche, toutes les autres formes d'oxydation de Prx1 n'étant pas retenues au cours de la précipitation. L'espèce contenue dans ces complexes et reconnue par l'anticorps dirigé contre Prx1 est bien Prx1, puisqu'elle est réduite par le β ME à la taille du monomère de Prx1. La précipitation de ces formes oxydées de Prx1 ne résulte pas d'une interaction non spécifique avec le support de chromatographie, puis qu'elles ne sont pas détectées lorsque des cellules n'exprimant pas FHH-Bach2 sont utilisées.

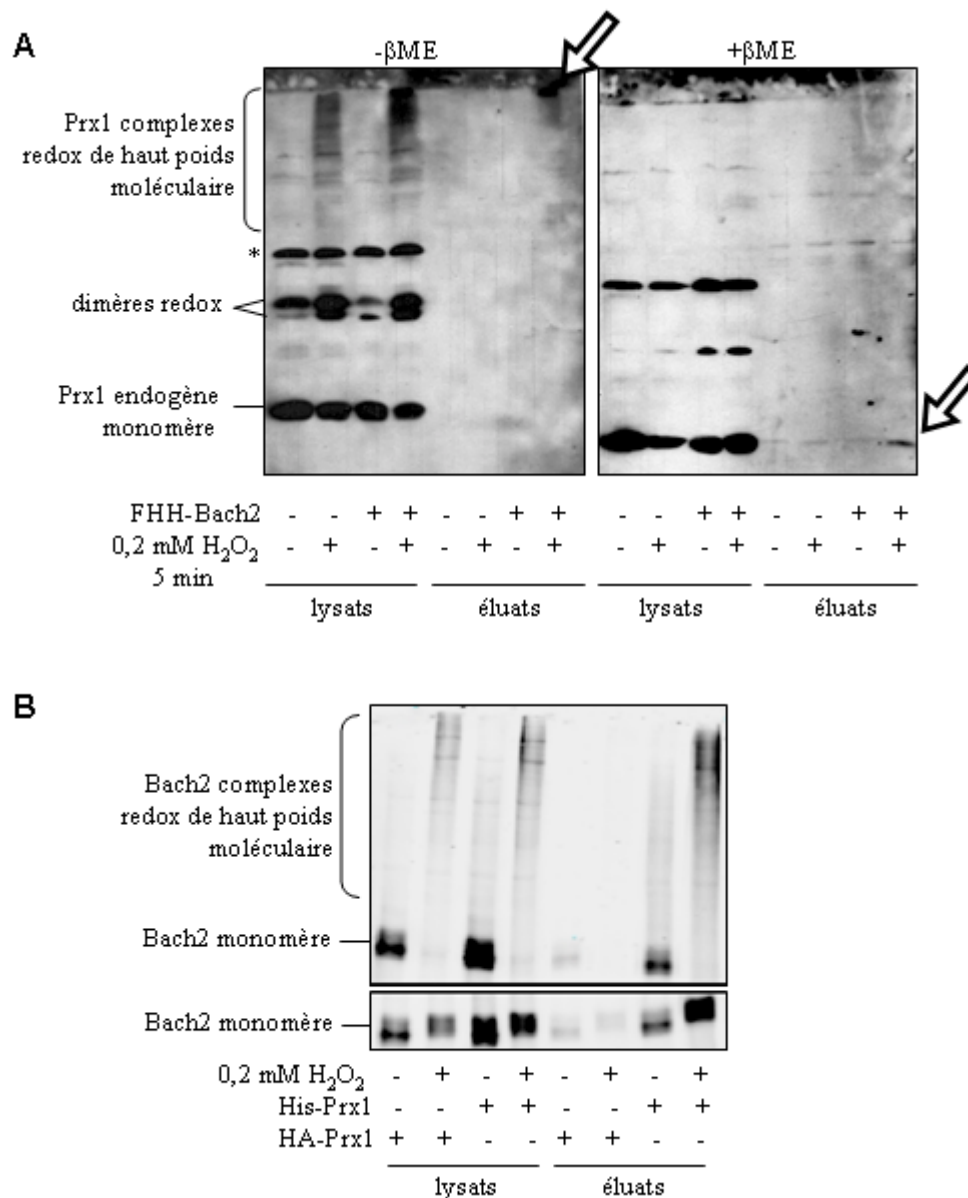


Figure 24. Formation d'un point disulfure inducible par l'H₂O₂ entre Bach2 et Prx1. A. Des cellules Hela S3 exprimant ou non de façon stable Flag-HA-6HIS-hBach2 (FHH-Bach2) sont exposées à 0,2 mM d'H₂O₂ pendant 5 minutes, puis lysées en présence de NEM. FHH-Bach2 est ensuite précipité par chromatographie d'adsorption sur résine de nickel en conditions non réductrices. Les formes d'oxydation de Prx1 endogène sont analysées après une électrophorèse en gel d'acrylamide en présence ou en absence de βME, puis western blot réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine Prx1. Prx1 co-précipitée avec FHH-Bach2 est repérée par une flèche. * : marquage non spécifique d'une protéine avec l'anticorps anti-Prx1. B. Des cellules Hela sont transfectées avec pcDNA3-9myc-Bach2 (1,5γ) et pRK5-HA-Prx1 ou pRK5-HIS-Prx1 (1,5 μg), puis exposées à 0,2 mM d'H₂O₂. et lysées en présence de NEM. HIS-Prx1 est précipité par chromatographie d'adsorption sur résine de nickel en conditions non réductrices. Les formes d'oxydation de 9myc-Bach2 sont analysées après une électrophorèse en gel d'acrylamide en présence ou en absence de βME, puis western blot réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope myc.

Ce résultat est confirmé par la co-précipitation de Bach2 oxydé avec Prx1. Des cellules Hela sont transfectées de façon transitoire avec des plasmides d'expression de 9myc-Bach2 et de HA-Prx1 ou HIS-Prx1, puis HIS-Prx1 est précipitée par chromatographie d'adsorption sur résine de nickel en conditions non réductrices (figure 24B). 9myc-Bach2 oxydé co-précipite avec HIS-Prx1 de façon importante lorsque les cellules ont été exposées à 0,2 mM d' H_2O_2 . Si les cellules n'ont pas été exposées à l' H_2O_2 , un peu de 9myc-Bach2 monomérique est détecté après précipitation, en quantité bien plus faible. L'affinité de Bach2 oxydé pour Prx1 dans des cellules exposées à l' H_2O_2 est donc plus importante que celle de Bach2 réduit dans des cellules non exposées à l' H_2O_2 . Ainsi, l' H_2O_2 induit l'interaction de Prx1 avec Bach2, et préférentiellement avec les formes oxydées de haut poids moléculaire de Bach2. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse de formation d'un pont disulfure entre les deux protéines.

Lorsque HA-Prx1 est exprimé dans ces cellules à la place de HIS-Prx1 seules des traces de myc-Bach2 sont encore co-précipitées, donc le résultat obtenu n'est pas lié à un résidu d'interaction non spécifique entre Bach2 oxydé et le support de chromatographie.

Ces résultats montrent que l' H_2O_2 induit l'interaction par l'intermédiaire d'un pont disulfure entre Bach2 et Prx1.

III.A.2. L' H_2O_2 induit la formation d'un pont disulfure entre Prx1 et Keap1

Nous avons voulu déterminer si l'interaction redox entre Prx1 et Bach2 était spécifique à Bach2, ou si la Prx1 pouvait engager des ponts disulfure avec d'autres protéines au cours de leur oxydation. Dans cette perspective, nous avons mis à profit notre caractérisation de l'oxydation de Keap1. La même approche que celle utilisée pour Bach2 permet de mettre en évidence une interaction covalente et réductible entre Keap1 et Prx1. Ainsi, une partie des formes réductibles de haut poids moléculaires de Prx1, induites par l'exposition de cellules à l' H_2O_2 , est spécifiquement co-précipitée avec les formes oxydées de myc-HIS-Keap1 lors d'une chromatographie par adsorption sur résine de nickel (figure 25). Cette expérience est réalisée à l'aide de cellules Hela qui sur-expriment par transfection transitoire myc-HIS-Keap1 et HA-Prx1. Dans ces conditions, la spécificité de la co-précipitation de HA-Prx1 par l'intermédiaire de myc-HIS-Keap1 n'est pas parfaite, puisque Prx1 est encore détectée après précipitation à partir de lysat de cellules qui n'expriment pas myc-HIS-Keap1, mais ceci en quantité bien moindre. Cette expérience démontre bel et bien la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre Keap1 et Prx1.

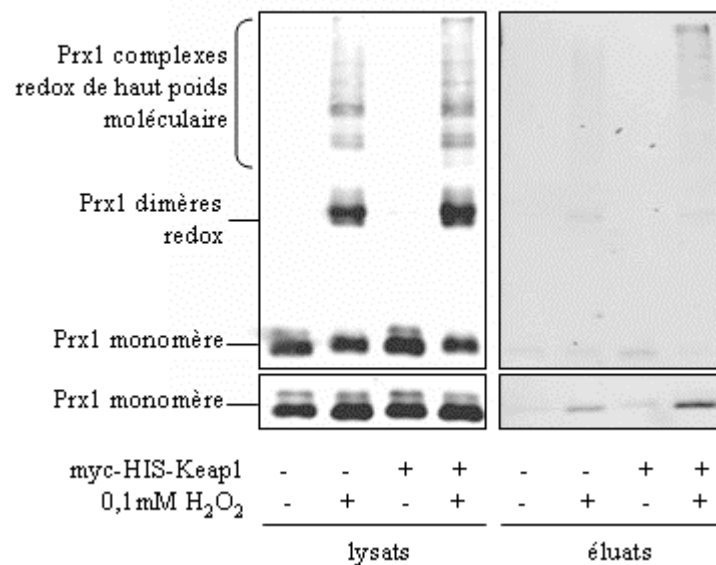


Figure 25. Formation d'un pont disulfure inducible par l'H₂O₂ entre Keap1 et Prx1. Des cellules Hela sont transfectées avec pRK5-HA-Prx1 (1,5 µg) et pcDNA3 ou pcDNA3-myc-HIS-Keap1 (1,5 µg), puis exposées à 0,1 mM d'H₂O₂ pendant 5 minutes, et lysées en présence de NEM. myc-HIS-Keap1 est précipité par chromatographie d'adsorption sur résine de nickel en conditions non réductrices. Les formes d'oxydation de HA-Prx1 sont analysées après une électrophorèse en gel d'acrylamide en présence ou en absence de βME, puis western blot réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope HA.

III.B. Effet de la surexpression de la Prx1 sur l'oxydation d'autres protéines cibles de l'oxydation par l'H₂O₂.

III.B.1. La sur-expression de Prx1 sensibilise Bach2 à l'oxydation par l'H₂O₂

La formation de pont disulfure entre Prx1 et Bach2 ou Keap1 peut suggérer un rôle pour Prx1 dans le contrôle de l'état d'oxydation de ces protéines. Pour tester cette hypothèse, nous avons examiné l'effet de la sur-expression de Prx1 par transfection transitoire sur la sensibilité de Bach2 à l'oxydation par l'H₂O₂. Des cellules Hela sont transfectées avec des plasmides d'expression de 9myc-Bach2 et HIS-Prx1, et exposées à 0,2 mM d'H₂O₂ pendant 5 minutes, dans du milieu qui contient ou non du glucose. L'analyse de l'état d'oxydation de 9myc-Bach2 dans des lysats révèle qu'en présence de glucose, la sur-expression de Prx1 restaure l'oxydation de Bach2, qui présente alors un profil de migration électrophétique très similaire à celui observé pour Bach2 oxydé en absence de glucose (figure 26). De plus, en l'absence de glucose, une faible proportion de Bach2 reste sous forme monomérique réduite

après exposition à l' H_2O_2 des cellules qui ne sur-expriment pas HIS-Prx1, alors que la sur-expression de HIS-Prx1 provoque l'oxydation quantitative de 9myc-Bach2. La sur-expression de Prx1 sensibilise donc Bach2 à l'oxydation induite par l' H_2O_2 .

Pour caractériser cet effet de Prx1, nous nous sommes demandés si son activité catalytique peroxydase était nécessaire. La mutation de la cystéine 51 de Prx1, celle qui réduit directement l' H_2O_2 lors du cycle catalytique, inhibe complètement l'effet de sensibilisation de Bach2 à l'oxydation par l' H_2O_2 . L'intégrité de la cystéine 51 de Prx1 est donc requise pour l'effet de sensibilisation de Bach2 à l'oxydation par la sur-expression de Prx1.

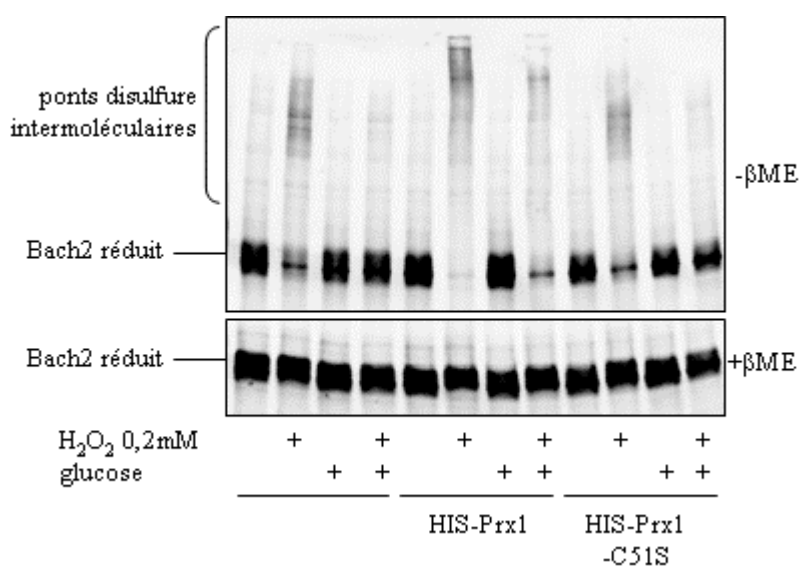


Figure 26. Effet de la surexpression de la peroxyredoxine 1 sur la sensibilité Bach2 à l'oxydation par l' H_2O_2 . Des cellules Hela transfectées avec pcDNA3-9myc-Bach2 (1,5 μg) et pRK5-HIS-hPrx1, pRK5-HIS-hPrx1-C51S ou pcDNA3 (1,5 μg) sont exposées à différentes doses d' H_2O_2 pendant 5 minutes, puis lysées en présence de NEM. L'état d'oxydation de Bach2 est analysé d'après son profil de migration en gel d'acrylamide en conditions non réductrices ($-\beta\text{ME}$) ou réductrices ($+\beta\text{ME}$) par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope myc.

III.B.2. La sur-expression de la Prx1 sensibilise Keap1 à l'oxydation par l' H_2O_2

Des résultats similaires sont obtenus avec Keap1. Lorsque Prx1 est sur-exprimée par transfection transitoire avec Keap1 dans des cellules Hela, le niveau basal d'oxydation de Keap1 reste inchangé, mais l' H_2O_2 induit une oxydation de Keap1 plus importante à dose égale (figure 27A). Ainsi, la sur-expression de la Prx1 ramène de 100 à 50 μM la dose d' H_2O_2 nécessaire pour induire des niveaux comparables d'oxydation de Keap1 sous la forme du monomère avec pont disulfure intramoléculaire ou sous la forme des deux complexes

réductibles de haut poids moléculaire. D'autres formes d'oxydation de Keap1 apparaissent à des poids moléculaires supérieurs. La mutation de la cystéine catalytique de Prx1 (C51S) annihile l'effet de la sur-expression de Prx1 sur l'oxydation de Keap1 par l' H_2O_2 (figure 27B). Prx1 mutée sur sa cystéine résolutive (C172S) a également été sur-exprimée avec Keap1. Ceci induit la stabilisation de plusieurs formes d'oxydation de migration électrophorétiques différentes, correspondant à des ponts disulfure intermoléculaires.

La sur-expression de Prx1 sensibilise donc Keap1 à l'oxydation par l' H_2O_2 . La cystéine catalytique C51 de Prx1 est requise pour cet effet, tandis que la mutation de sa cystéine résolutive C172 le modifie.

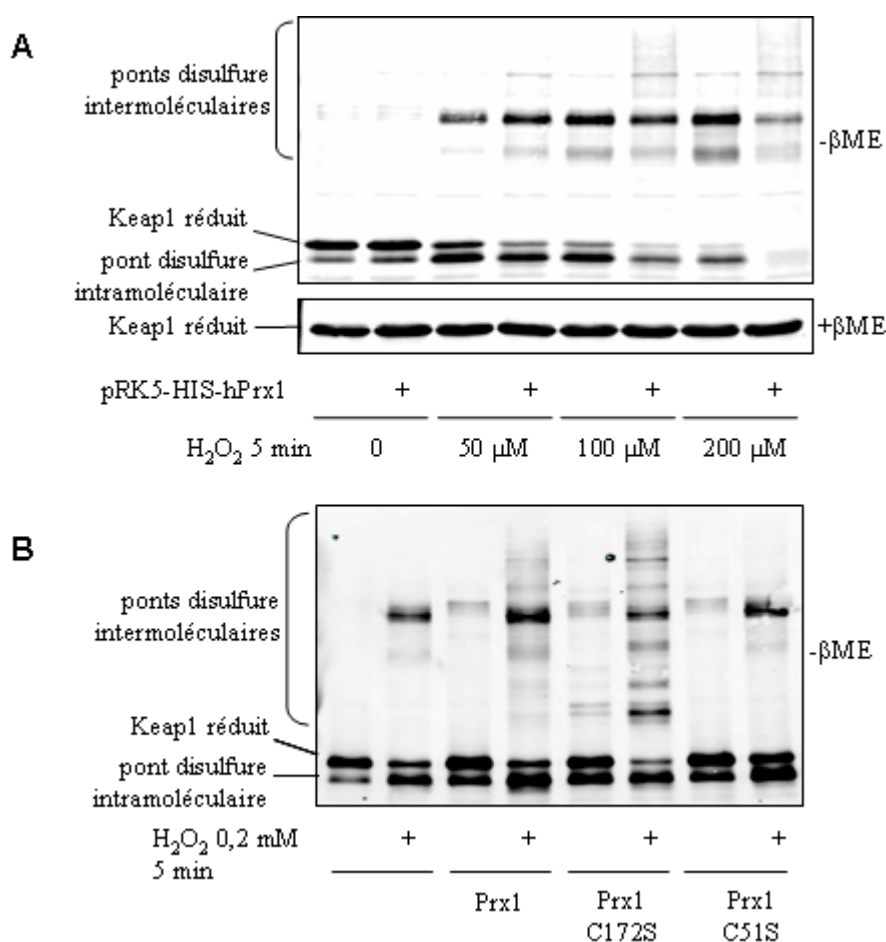


Figure 27. Effet de la surexpression de la peroxyredoxine 1 sur la sensibilité de Keap1 à l'oxydation par l' H_2O_2 . Des cellules Hela transfectées avec pcDNA3-HA-mKeap1 (1,5 μg) et pRK5-HIS-hPrx1, pRK5-HIS-hPrx1-C172S, pRK5-HIS-hPrx1-C51S ou pcDNA3 (1,5 μg) sont exposées à différentes doses d' H_2O_2 pendant 5 minutes, puis lysées en présence de NEM. L'état d'oxydation de Keap1 est analysé d'après son profil de migration en gel d'acrylamide en conditions non réductrices (-βME) ou réductrices (+βME) par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope HA..

III.B.3. La sur-expression de la Prx1 sensibilise ASK1 à l'oxydation par l'H₂O₂

Comme nous l'avons vu en introduction, les protéines Keap1 et Bach2 présentent une homologie structurale dans la mesure où elles contiennent toutes deux un domaine BTB. De plus, du point de vue fonctionnel, elles sont impliquées dans la régulation de séquences d'ADN de type ARE. La sur-expression de Prx1 sensibilise-t-elle d'autres protéines cytoplasmiques à l'oxydation par l'H₂O₂, ou son effet est-il restreint à des protéines apparentées à Keap1 et Bach2 pour des raisons de séquence ou fonctionnelles ? Pour documenter la spécificité de cet effet de la sur-expression de Prx1, l'état d'oxydation de la protéine MAP3 kinase ASK1 est déterminé dans des cellules qui sur-expriment Prx1 (figure 28). l'H₂O₂ n'induit dans des cellules Hela transfectées avec un plasmide d'expression de HA-ASK1 qu'une très faible oxydation de HA-ASK1, détectée sous formes de complexes covalents réductibles de haut poids moléculaire. En revanche, si HIS-Prx1 est également sur-exprimée dans ces cellules, l'oxydation de HA-ASK1 devient plus importante, au point que sa forme monomérique devient très minoritaire après exposition des cellules à 0,2 mM d'H₂O₂. De façon similaire aux résultats obtenus avec Keap1, la sur-expression de HIS-Prx1-C172S stabilise également certaines formes d'oxydation d'ASK1 : en particulier, une forme oxydée qui migre un peu moins vite que le monomère en condition non réductrices est déjà détectée en absence d'H₂O₂ exogène.

Comme pour Bach2 et Keap1, la sur-expression de Prx1 sensibilise ASK1 à l'oxydation induite par l'H₂O₂. Cet effet n'est donc pas restreint à l'oxydation de protéines à domaine BTB ou de protéines qui interviennent dans la régulation des ARE.

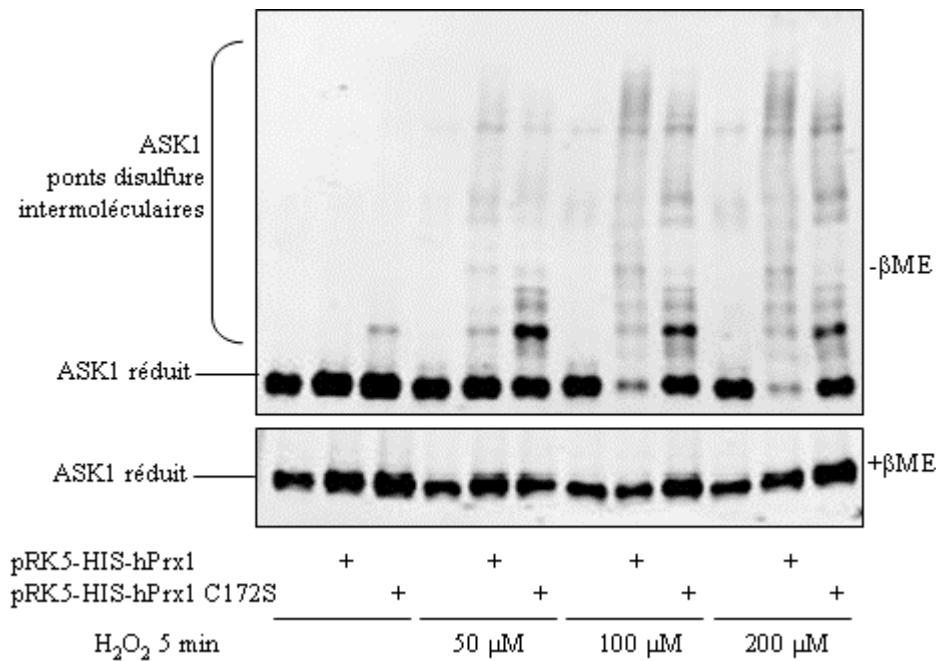


Figure 28. Effet de la surexpression de la peroxyredoxine 1 sur la sensibilité de ASK1 à l'oxydation par l'H₂O₂. Des cellules Hela transfectées avec pcDNA3-HA-ASK1 (1,5 μg) et pRK5-HIS-hPrx, pRK5-HIS-hPrx1 C172S, ou pcDNA3 (1,5 μg) sont exposées à différentes doses d'H₂O₂ pendant 5 minutes, puis lysées en présence de NEM. L'état d'oxydation de HA-ASK1 est analysé d'après son profil de migration en gel d'acrylamide en conditions non réductrices (-βME) ou réductrices (+βME).

III.B.4. Effet de la sur-expression de Prx2 sur l'oxydation de ASK1 par l'H₂O₂

La peroxyredoxine Prx2, comme Prx1, est classée comme peroxyredoxine à deux cystéines atypique, et présente une localisation cytoplasmique. En outre, leurs séquences sont très homologues. Prx2 a-t-elle le même effet que Prx1 sur l'oxydation de substrats protéiques ? Nous avons regardé l'oxydation de HA-ASK1 dans des cellules qui surexpriment HIS-Prx1 ou HIS-Prx2 (figure 29). En absence d'H₂O₂, la sur-expression de Prx2 ne modifie pas le profil de migration d'ASK1 en électrophorèse en conditions non réductrices, mais permet une oxydation importante d'ASK1 dans des cellules exposées à 0,2 mM d'H₂O₂. Cependant, cette oxydation est moindre que si Prx1 est sur-exprimée, alors que le niveau d'expression de Prx2 obtenu après transfection est supérieur. Prx1 et Prx2

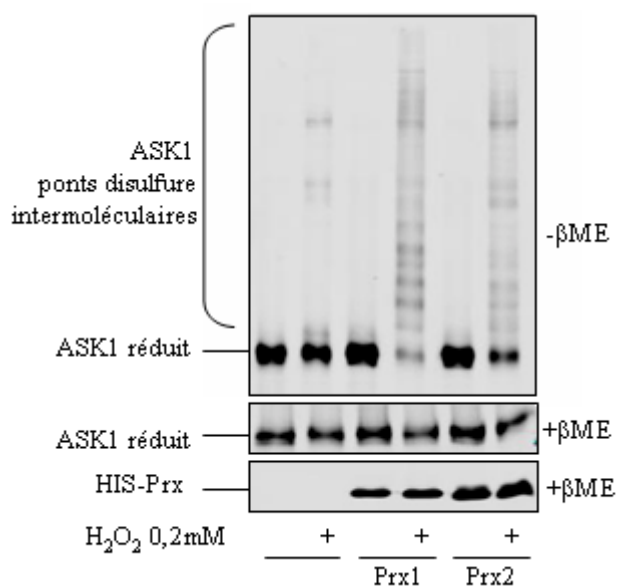


Figure 29. Effet de la surexpression de la peroxyredoxine 2 sur la sensibilité de ASK1 à l'oxydation par l'H₂O₂. Des cellules Hela transfectées avec pcDNA3-HA-ASK1 (1,5 µg) et pRK5-HIS-hPrx, pRK5-HIS-hPrx2, ou pcDNA3 (1,5 µg) sont exposées à 0,2 mM d'H₂O₂ pendant 5 minutes, puis lysées en présence de NEM. L'état d'oxydation de HA-ASK1 est analysé d'après son profil de migration en gel d'acrylamide en conditions non réductrices (-βME) ou réductrices (+βME). Les niveaux d'expression relatifs de HIS-Prx1 et HIS-Prx2 sont comparés par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope HIS.

III.B.5. Prx1 est-elle nécessaire à l'oxydation de Keap1 par l'H₂O₂ ?

Au vu de ces résultats, nous avons fait l'hypothèse que Prx1 puisse être impliquée directement dans les mécanismes d'oxydation par l'H₂O₂ de certaines protéines cytoplasmiques. Cette hypothèse est testée par une approche d'interférence d'ARN ciblant une baisse du niveau d'expression de Prx1. Trois séquences ont été choisies pour construire des plasmides d'interférence d'ARN ciblant Prx1, et des populations cellulaires ont été obtenues après transfection stable de ces plasmides et sélection. L'interférence d'ARN est efficace, à en juger par les niveaux d'expression de la protéine Prx1 détectée par western blot (figure 30A), puisque dans les trois populations cellulaires, la protéine Prx1 est pratiquement indétectable. Dans ces cellules, l'oxydation de Keap1 sur-exprimé par transfection transitoire n'est pas inhibée par l'interférence d'ARN anti-Prx1 (figure 30B). Des résultats similaires sont obtenus avec les trois lignées présentant un niveau d'expression de Prx1 abaissé (non montré). Prx1 ne semble donc pas nécessaire à l'oxydation de Keap1 par l'H₂O₂.

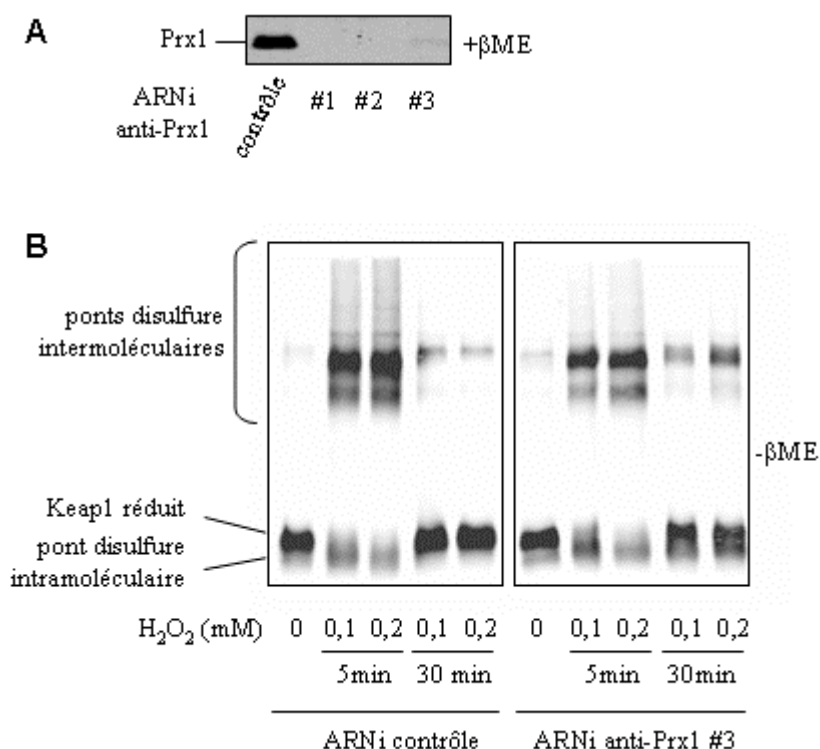


Figure 30. Effet de l'interférence d'ARN dirigée contre Prx1 sur l'oxydation de Keap1.

Des populations cellulaires présentant des niveaux d'expression de Prx1 réduits suite à une interférence d'ARN sont construites par transfection stable des plasmides pBD1226, pBD1227, et pBD1228. (#1 à 3 dans l'ordre). Après transfection transitoire avec pCI-HA-mNrf2 (1,5 µg), peYFP-N1 (0,3 µg), et pcDNA3-myc-HIS-mKeap1 (1 µg), les cellules sont exposées à de l'H₂O₂, puis lysées en présence de NEM. A. Le niveau d'expression de Prx1 dans des cellules non exposées à l'H₂O₂ est apprécié par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre Prx1 après électrophorèse en conditions réductrices. contrôle, #1, #2, et #3 : populations cellulaires établies après transfection des plasmides pBD650, pBD1226, pBD1227, et pBD1228, respectivement. B. Dans les cellules #3, l'état d'oxydation de Keap1 est analysé par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope myc après électrophorèse en conditions non réductrices.

III.C. Discussion

De nombreuses études pointent le rôle de peroxyredoxines dans la régulation de voies de signalisation cellulaire. Si elles sont susceptibles de moduler des voies de signalisation sensibles à la présence d'H₂O₂ par leur activité de dégradation de l'H₂O₂, de nombreux exemples suggèrent qu'elles peuvent participer à des phénomènes de régulation, notamment en agissant par l'intermédiaire d'interactions avec des régulateurs spécifiques (S. Fourquet, 2008). Nous avons montré que l'H₂O₂ induit la formation de ponts disulfure entre la Prx1 et Bach2 ou entre Prx1 et Keap1. Cette observation nous a conduits à décrire un effet de la sur-expression de Prx1, qui sensibilise ces protéines à l'oxydation par l'H₂O₂. Cet effet pourrait

être très général, puisqu'il est également observé pour la MAP3 kinase ASK1, qui ne présente pas d'homologie avec Bach2 ni avec Keap1, pas de domaine BTB en particulier. Des résultats comparables ont été également obtenus avec le chaperon d'histone ASF1 (résultat non montré).

Il nous paraît contre intuitif que la sur-expression d'un anti-oxydant comme Prx1 potentialise des phénomènes d'oxydation dans la cellule. En effet, l'activité peroxydase de Prx1 devrait diminuer la quantité d'H₂O₂ intracellulaire disponible pour l'oxydation d'autres protéines. Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle Prx1 puisse catalyser l'oxydation de ces protéines par l'H₂O₂. Un tel rôle d'une peroxyredoxine comme oxydase d'une protéine substrat a été mis en évidence chez la levure au laboratoire, et les mécanismes moléculaires mis en jeu éclaircis (A. Delaunay, 2002, M.B. Toledano, 2004). Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisiae*, le facteur de transcription Yap1, qui assure le maintien homéostatique de la concentration d'H₂O₂ et la réponse au stress provoqué par divers agents électrophiles, est activé par l'H₂O₂ suite à la formation de ponts disulfure intramoléculaires. La formation du premier de ces ponts disulfure n'est pas directe. Elle met en jeu une première étape qui consiste en l'oxydation de la cystéine catalytique de la peroxyredoxine Orp1 en acide sulfénique par l'H₂O₂, puis une réaction de substitution nucléophile sur cet acide sulfénique par une cystéine spécifique de Yap1, la cystéine 598, ce qui aboutit à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre Orp1 et Yap1. Ce pont disulfure est ensuite isomérisé en un pont disulfure intramoléculaire à Yap1. Le même phénomène conduit à l'oxydation de Pap1, l'homologue de Yap1 chez *Saccharomyces Pombe*, catalysée par la peroxyredoxine Tpx1 (A.P. Vivancos, 2005). Ce mécanisme de catalyse de l'oxydation d'une protéine substrat par une peroxyredoxine est schématisé dans la figure 31. Les levures mettent donc à profit la sensibilité particulière de la cystéine catalytique des peroxyredoxines pour détecter une augmentation de la concentration intracellulaire d'H₂O₂, et transmettre cette information, sous forme d'un pont disulfure, à des régulateurs spécifiques.

Nos résultats concernant l'oxydation de Keap1, Bach2, et ASK1 seraient compatibles avec un tel mécanisme dans des cellules de mammifères. La nécessité de la cystéine catalytique de Prx1, la cystéine 51, à la sensibilisation de Bach2 et Keap1 à l'oxydation par l'H₂O₂, est aussi compatibles avec l'hypothèse d'un rôle pour Prx1 comme oxydase de ces protéines.

Nos résultats mettent en évidence l'apparition de nouvelles formes d'oxydation de Keap1 lorsque Prx1 est sur-exprimée. Certaines de ces formes d'oxydation sont

particulièrement stabilisées avec le mutant C172S de Prx1. La nature de ces oxydations et le mécanisme par lequel la mutation de la cystéine 172 de Prx1 conduit à leur restent inconnus. Cependant, nous pouvons faire l'hypothèse que ces complexes redox contiennent Prx1 et Keap1 liés par des ponts disulfure. Un effet similaire a déjà été observé chez *S. Pombe* avec la stabilisation de nouvelles formes d'oxydation de Pap1 dans les haut poids moléculaire causée par la mutation de la cystéine résolutive de la peroxyredoxine Tpx1, son oxydase (E. Hidalgo, communication personnelle). Cette similarité suggère que les mêmes mécanismes pourraient être responsables de cet effet de la mutation de la cystéine résolutive des peroxyredoxines Prx1 et Tpx1 sur Keap1 et Pap1, et constitue à nos yeux un indice supplémentaire accréditant l'hypothèse selon laquelle la fonction d'oxydase de substrats protéiques de Pap1 serait conservée pour Prx1.

Cependant, une approche par interférence d'ARN semble indiquer que Prx1 n'est pas nécessaire à l'oxydation de Keap1 par l' H_2O_2 . Dans l'hypothèse où ce mécanisme d'oxydation catalysé par une peroxyredoxine serait exclusif d'un mécanisme par oxydation directe de Keap1 par l' H_2O_2 , on peut envisager qu'un homologue de Prx1, dont l'expression ne serait pas inhibée par l'interférence d'ARN anti-Prx1, accomplisse la catalyse. Parmi les six peroxyredoxines recensées chez l'homme, Prx2 est l'homologue le plus proche de Prx1, du point de vue de leur séquence, de leur mode de catalyse de la dégradation de l' H_2O_2 , et de leur localisation cytoplasmique. Aussi Prx2 serait-elle le meilleur candidat pour assurer une éventuelle redondance avec Prx1 pour la catalyse de l'oxydation de substrats protéiques. Cette idée est renforcée par l'observation que la sur-expression de Prx2 dans des cellules Hela, comme celle de Prx1, sensibilise ASK1 à l'oxydation induite par l' H_2O_2 . Afin de tester cette hypothèse, nous développons actuellement un système expérimental d'interférence d'ARN visant la baisse des niveaux d'expression de Prx1 et Prx2 simultanément. Néanmoins, il est possible que les peroxyredoxine fonctionnent comme des oxydases de substrats protéiques uniquement lorsqu'elles sont sur-exprimées de façon ectopique à des niveaux élevés.

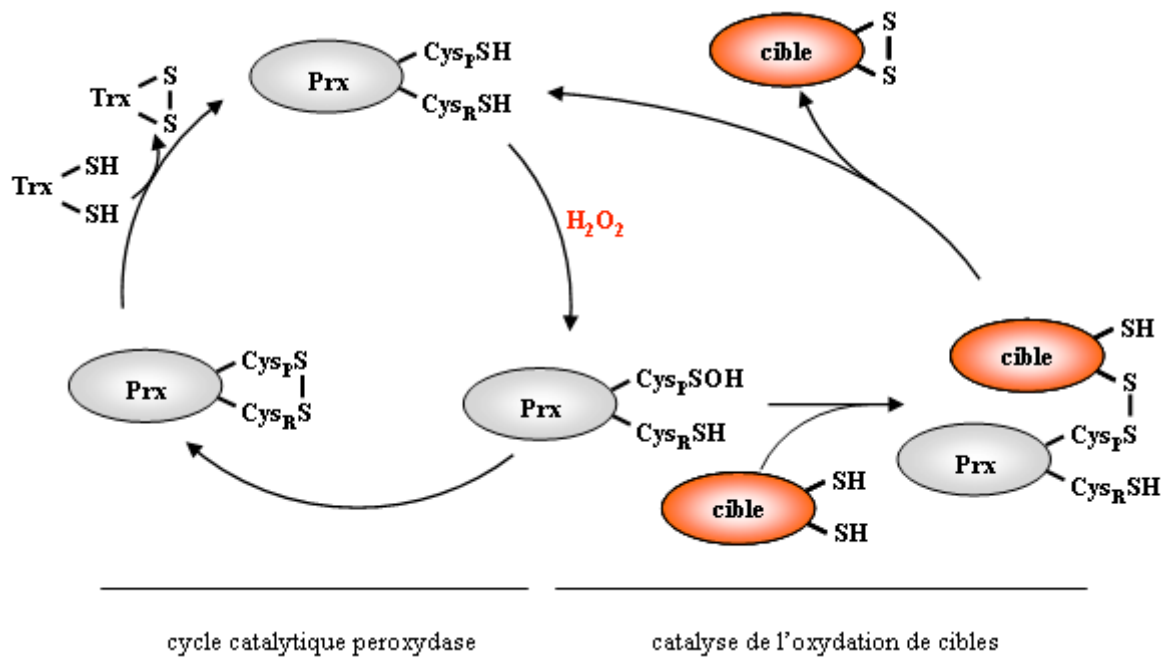


Figure 31. Cycle peroxydatique et catalyse de l'oxydation de substrats protéiques par une peroxyredoxine. Ce schéma représente les cycles catalytiques d'une peroxyredoxine à deux cystéines atypiques comme Orp1 de *S. cerevisiae*. La cystéine catalytique, ou « péroxydatique », Cys_P , de la peroxyredoxine est oxydée par l' H_2O_2 directement en acide sulfénique (-SOH). Cette espèce peut ensuite évoluer par condensation avec la cystéine résolvative Cys_R de la peroxyredoxine, pour former un pont disulfure intramoléculaire, qui sera ensuite réduit par la voie des thioredoxines (Trx). Ceci constitue le cycle catalytique à la base de l'activité peroxydase des peroxyredoxines. L'acide sulfénique peut également se condenser sur la cystéine d'une autre protéine, cible de l'oxydation par l' H_2O_2 . Un pont disulfure intermoléculaire reliant la peroxyredoxine à cette cible de l'oxydation est alors formé, qui peut ensuite être isomérisé en pont disulfure intramoléculaire à la cible. La cible oxydée est ainsi relâchée.

Matériel et méthodes

1. Produits

La glucose oxydase de *Aspergillus niger*, le N-éthylmaléimide, le diéthylmaléate, le *tert*-butylhydroquinone, l'H₂O₂, le N-(3-(aminométhyl-benzyl-acétamidine)) (1400W), et la cycloheximide ont été achetés auprès de Sigma, la S-éthylisothiourée et le spemine NONOate de Cayman Chemical, l'interféron γ (2.10⁶ U/mg) de R&D Systems. La S-nitrosocystéine est préparée par mélange équimolaire de L-cytéine et de nitrite de sodium, à pH 4, et sa concentration vérifiée par spectrométrie d'absorption à 334 nm. Une solution stock à 150 mM est conservée à -80°C. Immédiatement avant usage, le pH est neutralisé par une solution de NaOH 1M.

2. Plasmides

Les plasmides d'expression construits au laboratoire l'ont été par clonage de fragment de PCR amplifiés à partir d'autres plasmides d'expression. Tous ont été séquencés au moins sur l'intégralité du cadre ouvert de lecture, à l'aide d'un kit de réaction de séquençage «Big Dye terminator Cycle» et d'un séquenceur d'ADN Perkin Elmer ABI Prism 377. Certains ont été modifiés par introduction de mutations ponctuelles par mutagenèse dirigée à l'aide du kit commercial de Stratagene Quick Change Multi. La liste des plasmides utilisés dans cette étude est fournie ci-dessous. La provenance des plasmides qui n'ont pas été construits dans le cadre de cette étude est indiquée. Les fusions d'étiquettes à une protéine sont toutes situées à l'extrémité N-terminale de la protéine.

Nom du plasmide	Utilisation	Origine
pcDNA3-HA-mKeap1	expression de Keap1 de souris fusionné à un épitope HA sous contrôle du promoteur CMV	M. Yamamoto
pcDNA3-myc-HIS-mKeap1	expression de Keap1 de souris fusionné à 3 épitope myc et 8 codons HIS sous contrôle du promoteur CMV	
pCI-HA-mNrf2	expression de Nrf2 de souris fusionné à un épitope HA sous contrôle du promoteur CMV	J.A. Diehl
peYFP-N1	expression d'une version jaune de la GFP de <i>Aequorea victoria</i> sous contrôle du promoteur CMV	Clontech
pBD650	contrôle pour l'interférence d'ARN. expression d'un court ARN non auto-complémentaire sous contrôle du promoteur de l'ARN H1.	D. Biard
pBD1232	interférence d'ARN ciblant la TRR1 par expression d'un ARN auto-complémentaire sous contrôle du promoteur de l'ARN H1	D. Biard
pBD1226, pBD1227, et pBD1228	interférence d'ARN ciblant Prx1 par expression d'un ARN auto-complémentaire sous contrôle du promoteur de l'ARN H1	D. Biard
pcDNA3-9myc-hBach2	expression de Bach2 humain fusionné à 9 étiquettes myc sous contrôle du promoteur CMV	
pcDNA3-9myc-hBach2-ΔBTB	délétion des codons 2 à 158 de Bach2 dans pcDNA3-9myc-hBach2	
pcDNA3-9myc-hBach1	expression de Bach1 humain fusionné à 9 étiquettes myc sous contrôle du promoteur CMV	
pOZ-FHH-hBach2	vecteur bicistronique pour la production de rétrovirus écotropiques en vue de l'expression de Bach2 humain fusionné à une étiquette Flag, une HA, et une 6HIS, et de IL-2Ra pour la sélection.	
pMT2-mMafK	expression de MafK de souris sous contrôle du promoteur SV40	V. Blank
pRK5-HA-hPrx1	expression de Prx1 humaine fusionnée à une étiquette HA sous contrôle du promoteur CMV	A. Sekowska
pRK5-HIS-hPrx1	expression de Prx1 humaine fusionnée à une étiquette 8HIS sous contrôle du promoteur CMV	
pcDNA3-HA-ASK1	expression de ASK1 humain fusionné à un épitope HA sous contrôle du promoteur CMV	J. Landry

3. Culture cellulaire

Les cellules Hela sont cultivées à 37°C, sous 5% de CO₂, et 100% d'humidité, dans du milieu DMEM contenant 1g/L de glucose 110 mg/L de pyruvate de sodium et 4mM de glutamine ou Glutamax (Invitrogen), et 10% de sérum de veau fœtal (Sigma). Les cellules Hela S3 ont été cultivées dans les mêmes conditions, sinon que le milieu utilisé contenait 4,5 g/L de glucose. Les macrophages murins ont été préparés par Kahina Abbas dans l'équipe de Jean-Claude Drapier à l'ICSN de Gif-sur-Yvette, par différenciation de cellules de moelle osseuse de souris dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen) complémenté par 10% de sérum de veau fœtal et 10% de surnageant de culture de cellules L929.

4. Transfection des cellules Hela

Les cellules Hela sont transfectées à l'aide de Lipofectamine 2000 (Invitrogen). En général, 500 000 à 550 000 cellules sontensemencées dans une boîte de 35 mm de diamètre dans 2 mL de milieu pour être transfectées après 24 heures. Sauf précision complémentaire, 3 µg d'ADN plasmidique sont mélangé à 6 µL de Lipofectamine dans 400 µL d'OPTI-MEM (Invitrogen). La suspension de complexes ADN-lipides est ensuite déposée sur le milieu de culture des cellules. 4 à 5 heures après la transfection, le milieu est renouvelé par 1 mL de DMEM sans sérum de veau fœtal pour les expériences concernant l'oxydation de Bach2, ou par 1 mM de DMEM avec sérum pour les autres. Les traitements et lyses des cellules sont effectués 24 heures après la transfection.

5. Etablissement de populations cellulaires exprimant de façon stable un ARN interférant.

Des plasmides permettant la diminution de l'expression des gènes codant pour TRR1 et pour Prx1 ont été gracieusement construits pour nous par Denis Biard du CEA de Fontenay. Ce sont des plasmides qui contiennent une cassette de résistance à l'hygromycine B et des éléments du virus d'Epstein-Barr permettant leur répllication dans les cellules. Chacun de ces plasmides contient une séquence codant pour un ARN auto-complémentaire, exprimé sous le contrôle du promoteur de l'ARN H1, et qui induit *in vivo* la diminution de l'expression du gène choisi par un mécanisme d'interférence d'ARN (D.S. Biard, 2007). Comme contrôle est utilisé un plasmide apparenté, pBD650, qui code pour un court ARN qui ne se replie pas en ARN double brin auto-complémentaire. Pour établir des populations stables, 250000 cellules Hela sont ensemencées en boîte de 35mm de diamètre, puis transfectées avec 2 µg de plasmide. Les cellules qui contiennent le plasmide sont sélectionnées à l'aide de 250 µg/mL d'hygromycine B pendant une semaine, amplifiées en présence de 125µg/mL d'hygromycine B, puis congelées. Les séquences ciblées par l'interférence d'ARN ont été choisies à l'aide du programme DSIR développé au CEA de Grenoble : pour TRR1, GGATTAAGGCAACAAATAA, pour Prx1, GCACCATTGCTCAGGATTA (pBD1226), AGACTTTGAGACTAGTTCA (pBD1227), etGCATGGGTCAATACACCTA (pBD1228).

6. Analyse de l'état redox des protéines contenues dans des lysats cellulaires

Les cellules sont rincées sur glace avec une solution de PBS contenant 40 mM de NEM, puis grattées dans tampon de lyse de MacDougall (0,1 M Tris HCl pH 8, 0,12 M NaCl, 0,2% acide déoxycholique, 0,5% NP-40, 0,2 mM NaF, 0,2 mM EGTA, 0,1 mM PMSF, cocktail d'inhibiteurs de protéase Complete Mini de Roche) additionné de 40 mM de NEM. La lyse est achevée en vortexant toutes les 10 minutes pendant 30 minutes sur glace. Le lysat est débarrassé du contenu insoluble des cellules par centrifugation à 20 000 g à 4°C pendant 20 minutes. A ce stade, la concentration en protéine peut être déterminée par un dosage à l'aide du réactif de Bradford (Biorad), et les lysats peuvent être congelés. Si la concentration protéique n'est pas suffisante, les protéines peuvent être concentrées par une précipitation avec 10% d'acide trichloroacétique, suivie de lavages successifs du culot de protéines à l'acétone, et resuspension dans 0,1 M Tris HCl pH 8, 0,01 M EDTA, 1% SDS, 40 mM NEM. Après dilution au 2/3 avec du tampon de charge 3X pour électrophorèse de protéines (200 mM de Tris HCl pH 6,8, 45% glycérol, 6% SDS, 0,03% bleu de bromophénol) la moitié de chaque échantillon de protéine est réduite par ajout de 6% v/v de β -mercaptoéthanol. Les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes, puis déposées sur gel d'électrophorèse d'acrylamide dénaturant (SDS-PAGE). Après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, les protéines sont immunomarquées avec les anticorps suivants : anti-Nrf2 H300 (polyclonal, Santa Cruz), anti-NF-E2 p18 (anti-MafK) (polyclonal, Santa Cruz), anti-Keap1 H190 (polyclonal, Santa Cruz), anti-Prx1 (polyclonal, LabFrontier), anti-TRR1 (polyclonal, don de Arne Holmgren), anti-GFP JL8 (monoclonal, Clontech), anti-myc 9E10 (monoclonal, produit au CEA-Saclay par Gilles Clément), anti-HA HA11 (monoclonal, Covance), ou anti-HIS (monoclonal). La détection est effectuée soit après incubation avec un anticorps couplé à la peroxydase HRP par chimiluminescence (kit ECL+, Amersham) soit après incubation avec un anticorps couplé à chromophore fluorescent par détection d'émission de fluorescence (appareil Licor Odyssey, Sciencetech).

7. Précipitation des protéines fusionnées à une étiquette HIS par chromatographie d'adsorption sur résine de nickel

Le contenu protéique d'environ 10^6 cellules est utilisé. Toutes les étapes jusqu'à l'élution sont effectuées sur glace ou en chambre froide. Les cellules sont rincées avec une solution de

PBS 1X, NEM 40 mM, puis grattées dans du tampon de lyse (0,1 M Tris HCl pH 8, 1% NP-40, 2% glycérol, 0,3 M NaCl, 0,2 mM PMSF, cocktail d'inhibiteurs de protéase Complete Mini sans EDTA de Roche, NEM 40 mM). La lyse est achevée en vortexant toutes les 10 minutes pendant 30 minutes. Les parties insolubles sont éliminées par centrifugation à 20 000 g à 4°C pendant 30 minutes. Après ajout de 10 mM d'imidazole, 90% du lysat (environ 250 µL) est incubé pendant 1 heure sous lente agitation avec environ 50 µL de résine NiNTA (Qiagen) préalablement équilibrée avec (0,1 M Tris HCl pH 8, 1% NP-40, 2% glycérol, 0,3 M NaCl, 0,2 mM PMSF, 10 mM NEM). La résine est abondamment rincée avec (0,1 M Tris HCl pH 8, 1% NP-40, 2% glycérol, 0,3 M NaCl, 0,2 mM PMSF, NEM 10 mM, 10 mM imidazole). L'élution est effectuée avec du tampon 2X de charge pour électrophorèse de protéine contenant 10 mM de NEM ou avec (0,1 M Tris HCl pH 8, 1% NP-40, 2% glycérol, 0,3 M NaCl, 0,2 mM PMSF, NEM 10 mM, 330 mM imidazole). L'électrophorèse et l'analyse par western blot sont effectuées comme décrit pour l'analyse de l'état d'oxydation à partir de lysats crus de cellules.

8.Purification et analyse par spectroscopie de masse des formes oxydées de Bach2

Toute la partie expérimentale de ce travail a été menée sous la direction de Vasily Ogryzko à l'institut André Lwoff à Villejuif.

établissement d'une lignée de cellules exprimant de façon constitutive FHH-Bach2

Des cellules productrices de rétrovirus recombinants écotropiques (cellules Phoenix E) sont transfectées transitoirement avec le plasmide pOZ-FHH-Bach2. Ce plasmide code pour une version de Bach2 humain fusionnée aux étiquettes Flag, HA, et HIS, ainsi que pour le récepteur humain de l'interleukine 2 (IL-2). Pour la transduction virale, deux jours de suite, des cellules Hela S3 capable de pousser en suspension, et qui expriment de façon stable un récepteur pour les virus de type écotrope sont mises en contact du surnageant des cellules Phoenix E. Les cellules exprimant le transgène sont séparées à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre le récepteur de l'IL-2.

traitement et lyse des cellules.

Les cellules Hela S3 FHH-Bach2 sont cultivées par volumes de 3L dans des flasques sous agitation. Lorsque le milieu vire au jaune, les cellules sont centrifugées, et resuspendues dans 10 mL de PBS 1X, 0,2 mM H₂O₂. Après 5 minutes, 5 mL de PBS 1X, 120 mM NEM sont ajoutés pour figer l'état redox des thiols. Les cellules sont centrifugées, le culot resuspendu dans ½ volume de milieu et ½ volume de PBS 1X, NEM 120 mM, puis congelé. La lyse des cellules est effectuée à froid par ajout de 5 volumes de (20 mM Tris HCl pH 8, 0,12 M NaCl, 0,2% acide déoxycholique, 0,5% NP-40, 0,2 mM NaF, 0,2 mM PMSF, NEM 10 mM), en vortexant fortement.

purification de FHH-Bach2

Toutes les étapes sont effectuées dans la glace ou à 4°C. Le lysat est éclairci par centrifugation puis filtration sur une membrane de PVDF de porosité 0,22µ. La concentration en NaCl est ajustée à 300 mM, et 10 mM d'imidazole sont ajoutés. Le lysat est ensuite incubé 2 heures sous lente agitation avec 1/5 volume de résine NiNTA (Qiagen) préalablement rincée avec un tampon composé de (20 mM Tris HCl pH 7,5, 0,3 M KCl, 10% glycérol, 0,1% Tween 20). La résine est ensuite lavée avec (20 mM Tris HCl pH 7,5, 0,3 M KCl, 10% glycérol, 0,1% Tween 20, 10 mM imidazole, 10 mM NEM). L'élution est effectuée avec un volume de tampon (20 mM Tris HCl pH 7,5, 0,3 M KCl, 10% glycérol, 0,1% Tween 20, 300 mM imidazole, 10 mM NEM) égal au volume de résine utilisé. Une seconde étape de purification est réalisée. Les protéines pré-purifiées sur résine de nickel sont incubées pendant 16h avec de 1/5 volume d'agarose couplé à un anticorps dirigé contre l'épitope Flag (Agar-M2, Sigma) préalablement lavé par un rinçage dans 100 mM glycine, HCl pH 3 et rééquilibré dans un tampon 2M Tris, HCl pH 7,5. Les protéines non fixées sont lavées avec un tampon (20 mM Tris HCl pH 7,5, 0,3 M KCl, 10% glycérol, 0,1% Tween 20, 10 mM imidazole, 10 mM NEM). Les protéines fixées à l'agarose sont éluées avec un volume égal au volume d'agarose de peptide 3xFlag à 1mg/mL dans (20 mM Tris HCl pH 7,5, 0,3 M KCl, 10% glycérol, 0,1% Tween 20, 10 mM imidazole, 10 mM NEM), puis concentrées à l'aide de résine Strataclean (Stratagene).

Séparation des protéines purifiées sur gel

Les protéines sont récupérées dans un tampon (65 mM de Tris HCl pH 6,8 , 10% glycérol, 2% SDS, 0,01% bleu de bromophénol). La moitié est réduite par ajout de 6% βME.

Après dénaturation 5 minutes à 95°C, les protéines sont séparées sur un gel gradient 4-12% de polyacrylamide dénaturant (Nu-PAGE, Invitrogen). Pour la coloration argentique, le gel est fixé par immersion 20 minutes dans 50% méthanol, 5% acide acétique, et lavé 10 minutes dans 50% méthanol, puis 2 heures dans de l'eau distillée. Après sensibilisation 1 minutes dans 0,02% Na₂S₂O₃, et lavages à l'eau, le gel est incubé environ 20 minutes à 4°C dans 0,1% AgNO₃, lavé à l'eau, puis développé dans 0,04% formaline, 2% Na₂CO₃ pour quelques minutes. La coloration est arrêtée par immersion dans 5% acide acétique. Certaines bandes sont alors excisées du gel, et décolorées à l'aide du kit SilverQuest (Invitrogen).

Préparation des peptides et analyse par spectroscopie de masse

Pour limiter les contaminations par des polymères, toutes les opérations suivantes sont effectuées dans des tubes lavés au méthanol. Les lavages des morceaux de gels sont tous effectués à température ambiante sous agitation à 1400 tours/minute.

Les morceaux de gels excisés sont lavés dans 50% acétonitrile, 100 mM NH₄CO₃, puis dans 100% acétonitrile. Toute trace d'acétonitrile est ensuite enlevée par 5 minutes de centrifugation sous vide au speed-vac. Les protéines contenues dans le gel sont réduites dans une solution de 10 mM DTT 100 mM NH₄CO₃, pendant 1 heure à 56°C. Les thiols libérés sont alkylés par de l'iodoacétamide (55 mM iodoacétamide, 100 mM NH₄CO₃, pendant 45 minutes à l'obscurité). L'iodoacétamide en excès est lavé immersion 10 minutes dans 100 mM NH₄CO₃, 10 minutes dans 100% acétonitrile, 10 minutes dans NH₄CO₃, puis 10 minutes dans 100% acétonitrile. L'acétonitrile est enlevée par 15 minutes de centrifugation sous vide. Les peptides sont préparés par digestion des protéines contenues dans le gel, par incubation avec 4% v/v de solution de trypsine (Promega) dans 25 mM NH₄CO₃ (25 µL total par bande), pour 15 minutes dans la glace puis 16 heures à 37°C. Le surnageant est réservé, puis les peptides restant extraits du gel par lavage avec 25µL de 25 mM NH₄CO₃, puis 2 fois 25 µL d'acide formique à 5%. Les surnageant de la digestion par la trypsine et des lavages sont réunis, et le volume total ramené à environ 10 µL par centrifugation sous vide. Le mélange de peptides obtenus après digestion par la trypsine est analysé par nano-HPLC (LC-Packing) directement relié à un spectromètre de masse muni d'un piège à ions (ThermoFinnigan LCQ Deca XP).

9. Localisation par immunofluorescence de 9myc-Bach2

500 000 cellules Hela sontensemencées dans une boîte de 35 mm de diamètre contenant une lamelle de verre. Après traitement, les cellules sont rincées avec du PBS, puis fixées par immersion des lamelles pendant 30 minutes dans une solution PBS 1X, pH 7,4 additionnée de 4% de paraformaldéhyde dépolymérisé. Les lamelles sont ensuite incubées dans une solution de PBS 1X, glycine 50 mM sensée prévenir le bruit de fond de fluorescence du paraformaldéhyde. Les cellules sont perméabilisées dans 0,05% de saponine, 5% de sérum de chèvre, PBS 1X, incubées 40 minutes avec un anticorps anti-myc 9E10 dans 5% de sérum de chèvre, PBS 1X, rincées avec dans 5% de sérum de chèvre, PBS 1X, et incubées 40 minutes avec 12,5 ng/mL d'anticorps secondaire alexafluor 488 dans la même solution. Les lamelles sont retournées sur lame de verre dans une goutte de milieu de montage (50% glycérol, 0,2M Tris base, 2% N-propylgallate de sodium). Toutes les solutions sont filtrées à 0,45 μ avant usage. L'observation des lames est effectuée à l'aide d'un microscope droit à fluorescence Leica.

Références Bibliographiques

- J. Alam, C. Wicks, D. Stewart, P. Gong, C. Touchard, S. Otterbein, A.M. Choi, M.E. Burow and J. Tou (2000). Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. **J Biol Chem** 275, 27694-27702.
- T. Ashino, R. Yamanaka, M. Yamamoto, H. Shimokawa, K. Sekikawa, Y. Iwakura, S. Shioda, S. Numazawa and T. Yoshida (2008). Negative feedback regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase gene expression by heme oxygenase-1 induction in macrophages. **Mol Immunol** 45, 2106-2115.
- Y.S. Bae, S.W. Kang, M.S. Seo, I.C. Baines, E. Tekle, P.B. Chock and S.G. Rhee (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. **J Biol Chem** 272, 217-221.
- W.C. Barrett, J.P. DeGnore, S. Konig, H.M. Fales, Y.F. Keng, Z.Y. Zhang, M.B. Yim and P.B. Chock (1999). Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. **Biochemistry** 38, 6699-6705.
- A.M. Benson, R.P. Batzinger, S.Y. Ou, E. Bueding, Y.N. Cha and P. Talalay (1978). Elevation of hepatic glutathione S-transferase activities and protection against mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene by dietary antioxidants. **Cancer Res** 38, 4486-4495.
- D.S. Biard (2007). Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. **Nucleic Acids Res** 35, 3535-3550.
- A. Bindoli, J.M. Fukuto and H.J. Forman (2008). Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. **Antioxid Redox Signal** 10, 1549-1564.
- D.A. Bloom and A.K. Jaiswal (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. **J Biol Chem** 278, 44675-44682.
- A.A. Bondareva, M.R. Capecchi, S.V. Iverson, Y. Li, N.I. Lopez, O. Lucas, G.F. Merrill, J.R. Prigge, A.M. Siders, M. Wakamiya, S.L. Wallin and E.E. Schmidt (2007). Effects of thioredoxin reductase-1 deletion on embryogenesis and transcriptome. **Free Radic Biol Med** 43, 911-923.
- S. Braun, C. Hanselmann, M.G. Gassmann, U. auf dem Keller, C. Born-Berclaz, K. Chan, Y.W. Kan and S. Werner (2002). Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. **Mol Cell Biol** 22, 5492-5505.
- J.P. Brennan, S.C. Bardswell, J.R. Burgoyne, W. Fuller, E. Schroder, R. Wait, S. Begum, J.C. Kentish and P. Eaton (2006). Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation. **J Biol Chem** 281, 21827-21836.
- B.J. Buckley, S. Li and A.R. Whorton (2008). Keap1 modification and nuclear accumulation in response to S-nitrosocysteine. **Free Radic Biol Med** 44, 692-698.

- J.R. Burgoyne, M. Madhani, F. Cuello, R.L. Charles, J.P. Brennan, E. Schroder, D.D. Browning and P. Eaton (2007). Cysteine redox sensor in PKG1 α enables oxidant-induced activation. **Science** 317, 1393-1397.
- M.J. Calkins, R.J. Jakel, D.A. Johnson, K. Chan, Y.W. Kan and J.A. Johnson (2005). Protection from mitochondrial complex II inhibition in vitro and in vivo by Nrf2-mediated transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102, 244-249.
- A. Caselli, R. Marzocchi, G. Camici, G. Manao, G. Moneti, G. Pieraccini and G. Ramponi (1998). The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. **J Biol Chem** 273, 32554-32560.
- K. Chan and Y.W. Kan (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96, 12731-12736.
- P. Chiarugi, T. Fiaschi, M.L. Taddei, D. Talini, E. Giannoni, G. Raugei and G. Ramponi (2001). Two vicinal cysteines confer a peculiar redox regulation to low molecular weight protein tyrosine phosphatase in response to platelet-derived growth factor receptor stimulation. **J Biol Chem** 276, 33478-33487.
- H.Y. Cho, A.E. Jedlicka, S.P. Reddy, T.W. Kensler, M. Yamamoto, L.Y. Zhang and S.R. Kleeberger (2002). Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol** 26, 175-182.
- M.H. Choi, I.K. Lee, G.W. Kim, B.U. Kim, Y.H. Han, D.Y. Yu, H.S. Park, K.Y. Kim, J.S. Lee, C. Choi, Y.S. Bae, B.I. Lee, S.G. Rhee and S.W. Kang (2005). Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. **Nature** 435, 347-353.
- M. Conrad, C. Jakupoglu, S.G. Moreno, S. Lippl, A. Banjac, M. Schneider, H. Beck, A.K. Hatzopoulos, U. Just, F. Sinowatz, W. Schmahl, K.R. Chien, W. Wurst, G.W. Bornkamm and M. Brielmeier (2004). Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. **Mol Cell Biol** 24, 9414-9423.
- S.B. Cullinan and J.A. Diehl (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. **J Biol Chem** 279, 20108-20117.
- S.B. Cullinan, J.D. Gordan, J. Jin, J.W. Harper and J.A. Diehl (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. **Mol Cell Biol** 24, 8477-8486.
- S.B. Cullinan, D. Zhang, M. Hannink, E. Arvisais, R.J. Kaufman and J.A. Diehl (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. **Mol Cell Biol** 23, 7198-7209.
- B. D'Autreaux and M.B. Toledano (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8, 813-824.
- A. Delaunay, D. Pflieger, M.B. Barrault, J. Vinh and M.B. Toledano (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. **Cell** 111, 471-481.
- J.M. Denu and K.G. Tanner (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. **Biochemistry** 37, 5633-5642.
- S. Dhakshinamoorthy and A.G. Porter (2004). Nitric oxide-induced transcriptional up-regulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant response element counteracts apoptosis of neuroblastoma cells. **J Biol Chem** 279, 20096-20107.
- A.T. Dinkova-Kostova, W.D. Holtzclaw, R.N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto and P. Talalay (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99, 11908-11913.

- A.T. Dinkova-Kostova, W.D. Holtzclaw and N. Wakabayashi (2005). Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. **Biochemistry** 44, 6889-6899.
- A.T. Dinkova-Kostova, K.T. Liby, K.K. Stephenson, W.D. Holtzclaw, X. Gao, N. Suh, C. Williams, R. Risingsong, T. Honda, G.W. Gribble, M.B. Sporn and P. Talalay (2005). Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102, 4584-4589.
- A.T. Dinkova-Kostova, M.A. Massiah, R.E. Bozak, R.J. Hicks and P. Talalay (2001). Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98, 3404-3409.
- A.L. Eggler, G. Liu, J.M. Pezzuto, R.B. van Breemen and A.D. Mesecar (2005). Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102, 10070-10075.
- A. Enomoto, K. Itoh, E. Nagayoshi, J. Haruta, T. Kimura, T. O'Connor, T. Harada and M. Yamamoto (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. **Toxicol Sci** 59, 169-177.
- M.A. Essers, S. Weijzen, A.M. de Vries-Smits, I. Saarloos, N.D. de Ruiter, J.L. Bos and B.M. Burgering (2004). FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. **Embo J** 23, 4802-4812.
- J.W. Fahey, X. Haristoy, P.M. Dolan, T.W. Kensler, I. Scholtus, K.K. Stephenson, P. Talalay and A. Lozniewski (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99, 7610-7615.
- T. Finkel (2003). Oxidant signals and oxidative stress. **Curr Opin Cell Biol** 15, 247-254.
- S. Fourquet, M.E. Huang, B. D'Autreaux and M.B. Toledano (2008). The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling. **Antioxid Redox Signal** 10, 1565-1576.
- M. Furukawa and Y. Xiong (2005). BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. **Mol Cell Biol** 25, 162-171.
- S. Gamou and N. Shimizu (1995). Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. **FEBS Lett** 357, 161-164.
- E. Giannoni, F. Buricchi, G. Raugei, G. Ramponi and P. Chiarugi (2005). Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. **Mol Cell Biol** 25, 6391-6403.
- G.I. Giles and C. Jacob (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. **Biol Chem** 383, 375-388.
- C.E. Goldring, N.R. Kitteringham, R. Elsby, L.E. Randle, Y.N. Clement, D.P. Williams, M. McMahon, J.D. Hayes, K. Itoh, M. Yamamoto and B.K. Park (2004). Activation of hepatic Nrf2 in vivo by acetaminophen in CD-1 mice. **Hepatology** 39, 1267-1276.
- J.D. Hayes and M. McMahon (2006). The double-edged sword of Nrf2: subversion of redox homeostasis during the evolution of cancer. **Mol Cell** 21, 732-734.
- A. Hirayama, K. Yoh, S. Nagase, A. Ueda, K. Itoh, N. Morito, K. Hirayama, S. Takahashi, M. Yamamoto and A. Koyama (2003). EPR imaging of reducing activity in Nrf2 transcriptional factor-deficient mice. **Free Radic Biol Med** 34, 1236-1242.
- A. Hirota, Y. Kawachi, K. Itoh, Y. Nakamura, X. Xu, T. Banno, T. Takahashi, M. Yamamoto and F. Otsuka (2005). Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation

- in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis. **J Invest Dermatol** 124, 825-832.
- R. Holland, A.E. Hawkins, A.L. Eggler, A.D. Mesecar, D. Fabris and J.C. Fishbein (2008). Prospective Type 1 and Type 2 Disulfides of Keap1 Protein. **Chem Res Toxicol**.
- A. Holmgren, C. Johansson, C. Berndt, M.E. Lonn, C. Hudemann and C.H. Lillig (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. **Biochem Soc Trans** 33, 1375-1377.
- F. Hong, M.L. Freeman and D.C. Liebler (2005). Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. **Chem Res Toxicol** 18, 1917-1926.
- F. Hong, K.R. Sekhar, M.L. Freeman and D.C. Liebler (2005). Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. **J Biol Chem** 280, 31768-31775.
- H. Hoshino and K. Igarashi (2002). Expression of the oxidative stress-regulated transcription factor bach2 in differentiating neuronal cells. **J Biochem** 132, 427-431.
- H. Hoshino, A. Kobayashi, M. Yoshida, N. Kudo, T. Oyake, H. Motohashi, N. Hayashi, M. Yamamoto and K. Igarashi (2000). Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element. **J Biol Chem** 275, 15370-15376.
- H.C. Huang, T. Nguyen and C.B. Pickett (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97, 12475-12480.
- H.C. Huang, T. Nguyen and C.B. Pickett (2002). Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. **J Biol Chem** 277, 42769-42774.
- K. Iida, K. Itoh, Y. Kumagai, R. Oyasu, K. Hattori, K. Kawai, T. Shimazui, H. Akaza and M. Yamamoto (2004). Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. **Cancer Res** 64, 6424-6431.
- T. Iizuka, Y. Ishii, K. Itoh, T. Kiwamoto, T. Kimura, Y. Matsuno, Y. Morishima, A.E. Hegab, S. Homma, A. Nomura, T. Sakamoto, M. Shimura, A. Yoshida, M. Yamamoto and K. Sekizawa (2005). Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. **Genes Cells** 10, 1113-1125.
- N.G. Innamorato, A.I. Rojo, A.J. Garcia-Yague, M. Yamamoto, M.L. de Ceballos and A. Cuadrado (2008). The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. **J Immunol** 181, 680-689.
- T. Ishii, K. Itoh, S. Takahashi, H. Sato, T. Yanagawa, Y. Katoh, S. Bannai and M. Yamamoto (2000). Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. **J Biol Chem** 275, 16023-16029.
- M. Ishikawa, S. Numazawa and T. Yoshida (2005). Redox regulation of the transcriptional repressor Bach1. **Free Radic Biol Med** 38, 1344-1352.
- K. Itoh, M. Mochizuki, Y. Ishii, T. Ishii, T. Shibata, Y. Kawamoto, V. Kelly, K. Sekizawa, K. Uchida and M. Yamamoto (2004). Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). **Mol Cell Biol** 24, 36-45.
- K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J.D. Engel and M. Yamamoto (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes Dev** 13, 76-86.
- K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, T. O'Connor and M. Yamamoto (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. **Genes Cells** 8, 379-391.

- A.K. Jain and A.K. Jaiswal (2006). Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. **J Biol Chem** 281, 12132-12142.
- A.K. Jain and A.K. Jaiswal (2007). GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. **J Biol Chem** 282, 16502-16510.
- H. Kamata, S. Honda, S. Maeda, L. Chang, H. Hirata and M. Karin (2005). Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. **Cell** 120, 649-661.
- T. Kamio, T. Toki, R. Kanezaki, S. Sasaki, S. Tandai, K. Terui, D. Ikebe, K. Igarashi and E. Ito (2003). B-cell-specific transcription factor BACH2 modifies the cytotoxic effects of anticancer drugs. **Blood** 102, 3317-3322.
- K.W. Kang, J.H. Ryu and S.G. Kim (2000). The essential role of phosphatidylinositol 3-kinase and of p38 mitogen-activated protein kinase activation in the antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction by decreased glutathione in H4IIE hepatoma cells. **Mol Pharmacol** 58, 1017-1025.
- M.I. Kang, A. Kobayashi, N. Wakabayashi, S.G. Kim and M. Yamamoto (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101, 2046-2051.
- S.W. Kang, H.Z. Chae, M.S. Seo, K. Kim, I.C. Baines and S.G. Rhee (1998). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . **J Biol Chem** 273, 6297-6302.
- K. Kataoka, H. Handa and M. Nishizawa (2001). Induction of cellular antioxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/small Maf by antirheumatic gold(I) compounds. **J Biol Chem** 276, 34074-34081.
- Y. Kawamoto, Y. Nakamura, Y. Naito, Y. Torii, T. Kumagai, T. Osawa, H. Ohgashi, K. Satoh, M. Imagawa and K. Uchida (2000). Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of phase II detoxification enzymes. 15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin j2-induced expression of glutathione S-transferases. **J Biol Chem** 275, 11291-11299.
- T.W. Kensler, P.A. Egner, P.M. Dolan, J.D. Groopman and B.D. Roebuck (1987). Mechanism of protection against aflatoxin tumorigenicity in rats fed 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (oltipraz) and related 1,2-dithiol-3-thiones and 1,2-dithiol-3-ones. **Cancer Res** 47, 4271-4277.
- T.O. Khor, M.T. Huang, K.H. Kwon, J.Y. Chan, B.S. Reddy and A.N. Kong (2006). Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. **Cancer Res** 66, 11580-11584.
- K.M. Kim, H.O. Pae, M. Zheng, R. Park, Y.M. Kim and H.T. Chung (2007). Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. **Circ Res** 101, 919-927.
- A. Kobayashi, M.I. Kang, H. Okawa, M. Ohtsui, Y. Zenke, T. Chiba, K. Igarashi and M. Yamamoto (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. **Mol Cell Biol** 24, 7130-7139.
- A. Kobayashi, M.I. Kang, Y. Watai, K.I. Tong, T. Shibata, K. Uchida and M. Yamamoto (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. **Mol Cell Biol** 26, 221-229.
- M. Kobayashi, K. Itoh, T. Suzuki, H. Osanai, K. Nishikawa, Y. Katoh, Y. Takagi and M. Yamamoto (2002). Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. **Genes Cells** 7, 807-820.

- M. Kobayashi and M. Yamamoto (2006). Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. **Adv Enzyme Regul** 46, 113-140.
- J.K. Kolls (2006). Oxidative stress in sepsis: a redox redux. **J Clin Invest** 116, 860-863.
- A.D. Kraft, D.A. Johnson and J.A. Johnson (2004). Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. **J Neurosci** 24, 1101-1112.
- J. Kwon, S.R. Lee, K.S. Yang, Y. Ahn, Y.J. Kim, E.R. Stadtman and S.G. Rhee (2004). Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101, 16419-16424.
- J.R. Lancaster, Jr. (2006). Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. **Chem Res Toxicol** 19, 1160-1174.
- B. Lassegue, D. Sorescu, K. Szocs, Q. Yin, M. Akers, Y. Zhang, S.L. Grant, J.D. Lambeth and K.K. Griendling (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. **Circ Res** 88, 888-894.
- S.R. Lee, K.S. Kwon, S.R. Kim and S.G. Rhee (1998). Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. **J Biol Chem** 273, 15366-15372.
- A.L. Levonen, A. Landar, A. Ramachandran, E.K. Ceaser, D.A. Dickinson, G. Zanoni, J.D. Morrow and V.M. Darley-Usmar (2004). Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. **Biochem J** 378, 373-382.
- B. Li, X. Wang, N. Rasheed, Y. Hu, S. Boast, T. Ishii, K. Nakayama, K.I. Nakayama and S.P. Goff (2004). Distinct roles of c-Abl and Atm in oxidative stress response are mediated by protein kinase C delta. **Genes Dev** 18, 1824-1837.
- L. Li, M. Kobayashi, H. Kaneko, Y. Nakajima-Takagi, Y. Nakayama and M. Yamamoto (2008). Molecular evolution of Keap1. Two Keap1 molecules with distinctive intervening region structures are conserved among fish. **J Biol Chem** 283, 3248-3255.
- X.M. Liu, K.J. Peyton, D. Ensenat, H. Wang, M. Hannink, J. Alam and W. Durante (2007). Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival. **Cardiovasc Res** 75, 381-389.
- Y. Liu and W. Min (2002). Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. **Circ Res** 90, 1259-1266.
- S.C. Lo, X. Li, M.T. Henzl, L.J. Beamer and M. Hannink (2006). Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. **Embo J** 25, 3605-3617.
- Y. Luo, A.L. Eggler, D. Liu, G. Liu, A.D. Mesecar and R.B. van Breemen (2007). Sites of alkylation of human Keap1 by natural chemoprevention agents. **J Am Soc Mass Spectrom** 18, 2226-2232.
- Q. Ma, L. Battelli and A.F. Hubbs (2006). Multiorgan autoimmune inflammation, enhanced lymphoproliferation, and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2. **Am J Pathol** 168, 1960-1974.
- K. Mahadev, A. Zilbering, L. Zhu and B.J. Goldstein (2001). Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. **J Biol Chem** 276, 21938-21942.

- M. McMahon, K. Itoh, M. Yamamoto and J.D. Hayes (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. **J Biol Chem** 278, 21592-21600.
- M. McMahon, N Thomas, K Itoh, M Yamamoto, and JD Hayes (2006). Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. **J Biol Chem** 281, 24756-24768
- T.C. Meng, T. Fukada and N.K. Tonks (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. **Mol Cell** 9, 387-399.
- P. Moi, K. Chan, I. Asunis, A. Cao and Y.W. Kan (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91, 9926-9930.
- N. Morito, K. Yoh, K. Itoh, A. Hirayama, A. Koyama, M. Yamamoto and S. Takahashi (2003). Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals by affecting intracellular glutathione levels. **Oncogene** 22, 9275-9281.
- H. Murata, Y. Ihara, H. Nakamura, J. Yodoi, K. Sumikawa and T. Kondo (2003). Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. **J Biol Chem** 278, 50226-50233.
- A. Muto, S. Tashiro, O. Nakajima, H. Hoshino, S. Takahashi, E. Sakoda, D. Ikebe, M. Yamamoto and K. Igarashi (2004). The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. **Nature** 429, 566-571.
- A. Muto, S. Tashiro, H. Tsuchiya, A. Kume, M. Kanno, E. Ito, M. Yamamoto and K. Igarashi (2002). Activation of Maf/AP-1 repressor Bach2 by oxidative stress promotes apoptosis and its interaction with promyelocytic leukemia nuclear bodies. **J Biol Chem** 277, 20724-20733.
- P.J. Nadeau, S.J. Charette, M.B. Toledano and J. Landry (2007). Disulfide Bond-mediated multimerization of Ask1 and its reduction by thioredoxin-1 regulate H₂O₂-induced c-Jun NH₂-terminal kinase activation and apoptosis. **Mol Biol Cell** 18, 3903-3913.
- P. Nioi and T. Nguyen (2007). A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. **Biochem Biophys Res Commun** 362, 816-821.
- K. Ochiai, Y. Katoh, T. Ikura, Y. Hoshikawa, T. Noda, H. Karasuyama, S. Tashiro, A. Muto and K. Igarashi (2006). Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. **J Biol Chem** 281, 38226-38234.
- T. Ohta, K. Iijima, M. Miyamoto, I. Nakahara, H. Tanaka, M. Ohtsuji, T. Suzuki, A. Kobayashi, J. Yokota, T. Sakiyama, T. Shibata, M. Yamamoto and S. Hirohashi (2008). Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. **Cancer Res** 68, 1303-1309.
- H. Okawa, H. Motohashi, A. Kobayashi, H. Aburatani, T.W. Kensler and M. Yamamoto (2006). Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. **Biochem Biophys Res Commun** 339, 79-88.
- W.O. Osburn, B. Karim, P.M. Dolan, G. Liu, M. Yamamoto, D.L. Huso and T.W. Kensler (2007). Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment. **Int J Cancer** 121, 1883-1891.
- W.O. Osburn and T.W. Kensler (2007). Nrf2 signaling: An adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. **Mutat Res**.
- T. Oyake, K. Itoh, H. Motohashi, N. Hayashi, H. Hoshino, M. Nishizawa, M. Yamamoto and K. Igarashi (1996). Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. **Mol Cell Biol** 16, 6083-6095.

- B. Padmanabhan, K.I. Tong, T. Ohta, Y. Nakamura, M. Scharlock, M. Ohtsuji, M.I. Kang, A. Kobayashi, S. Yokoyama and M. Yamamoto (2006). Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. **Mol Cell** *21*, 689-700.
- C. Persson, T. Sjoblom, A. Groen, K. Kappert, U. Engstrom, U. Hellman, C.H. Heldin, J. den Hertog and A. Ostman (2004). Preferential oxidation of the second phosphatase domain of receptor-like PTP-alpha revealed by an antibody against oxidized protein tyrosine phosphatases. **Proc Natl Acad Sci U S A** *101*, 1886-1891.
- G. Rachakonda, Y. Xiong, K.R. Sekhar, S.L. Stamer, D.C. Liebler and M.L. Freeman (2008). Covalent modification at Cys151 dissociates the electrophile sensor Keap1 from the ubiquitin ligase CUL3. **Chem Res Toxicol** *21*, 705-710.
- M. Ramos-Gomez, M.K. Kwak, P.M. Dolan, K. Itoh, M. Yamamoto, P. Talalay and T.W. Kensler (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** *98*, 3410-3415.
- T. Rangasamy, C.Y. Cho, R.K. Thimmulappa, L. Zhen, S.S. Srisuma, T.W. Kensler, M. Yamamoto, I. Petrache, R.M. Tudor and S. Biswal (2004). Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. **J Clin Invest** *114*, 1248-1259.
- S.G. Rhee (2006). Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. **Science** *312*, 1882-1883.
- S.G. Rhee, Y.S. Bae, S.R. Lee and J. Kwon (2000). Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. **Sci STKE** *2000*, PE1.
- M. Saitoh, H. Nishitoh, M. Fujii, K. Takeda, K. Tobiume, Y. Sawada, M. Kawabata, K. Miyazono and H. Ichijo (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. **Embo J** *17*, 2596-2606.
- M. Salazar, A.I. Rojo, D. Velasco, R.M. de Sagarra and A. Cuadrado (2006). Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. **J Biol Chem** *281*, 14841-14851.
- A. Salmeen, J.N. Andersen, M.P. Myers, T.C. Meng, J.A. Hinks, N.K. Tonks and D. Barford (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. **Nature** *423*, 769-773.
- S. Sasaki, E. Ito, T. Toki, T. Maekawa, R. Kanezaki, T. Umenai, A. Muto, H. Nagai, T. Kinoshita, M. Yamamoto, J. Inazawa, M.M. Taketo, T. Nakahata, K. Igarashi and M. Yokoyama (2000). Cloning and expression of human B cell-specific transcription factor BACH2 mapped to chromosome 6q15. **Oncogene** *19*, 3739-3749.
- T. Satoh, K. Kosaka, K. Itoh, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Y. Shimojo, C. Kitajima, J. Cui, J. Kamins, S. Okamoto, M. Izumi, T. Shirasawa and S.A. Lipton (2008). Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1. **J Neurochem** *104*, 1116-1131.
- P.A. Savitsky and T. Finkel (2002). Redox regulation of Cdc25C. **J Biol Chem** *277*, 20535-20540.
- F.D. Schubot, J.E. Tropea and D.S. Waugh (2006). Structure of the POZ domain of human LRF, a master regulator of oncogenesis. **Biochem Biophys Res Commun** *351*, 1-6.
- C.S. Sevier and C.A. Kaiser (2008). Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. **Biochim Biophys Acta** *1783*, 549-556.
- A.Y. Shih, S. Imbeault, V. Barakauskas, H. Erb, L. Jiang, P. Li and T.H. Murphy (2005). Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo. **J Biol Chem** *280*, 22925-22936.

- A. Singh, V. Misra, R.K. Thimmulappa, H. Lee, S. Ames, M.O. Hoque, J.G. Herman, S.B. Baylin, D. Sidransky, E. Gabrielson, M.V. Brock and S. Biswal (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. **PLoS Med** 3, e420.
- K. Srisook and Y.N. Cha (2005). Super-induction of HO-1 in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by prior depletion of glutathione decreases iNOS expression and NO production. **Nitric Oxide** 12, 70-79.
- J.S. Stamler (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell** 78, 931-936.
- J.S. Stamler and E.J. Toone (2002). The decomposition of thionitrites. **Curr Opin Chem Biol** 6, 779-785.
- D. Stewart, E. Killeen, R. Naquin, S. Alam and J. Alam (2003). Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. **J Biol Chem** 278, 2396-2402.
- P.J. Stogios and G.G. Prive (2004). The BACK domain in BTB-kelch proteins. **Trends Biochem Sci** 29, 634-637.
- Y.A. Suh, R.S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A.B. Chung, K.K. Griendling and J.D. Lambeth (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. **Nature** 401, 79-82.
- J. Sun, H. Hoshino, K. Takaku, O. Nakajima, A. Muto, H. Suzuki, S. Tashiro, S. Takahashi, S. Shibahara, J. Alam, M.M. Taketo, M. Yamamoto and K. Igarashi (2002). Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. **Embo J** 21, 5216-5224.
- M. Sundaresan, Z.X. Yu, V.J. Ferrans, K. Irani and T. Finkel (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. **Science** 270, 296-299.
- H. Suzuki, S. Tashiro, S. Hira, J. Sun, C. Yamazaki, Y. Zenke, M. Ikeda-Saito, M. Yoshida and K. Igarashi (2004). Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. **Embo J** 23, 2544-2553.
- H. Suzuki, S. Tashiro, J. Sun, H. Doi, S. Satomi and K. Igarashi (2003). Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. **J Biol Chem** 278, 49246-49253.
- G.P. Sykiotis and D. Bohmann (2008). Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. **Dev Cell** 14, 76-85.
- S. Tashiro, A. Muto, K. Tanimoto, H. Tsuchiya, H. Suzuki, H. Hoshino, M. Yoshida, J. Walter and K. Igarashi (2004). Repression of PML nuclear body-associated transcription by oxidative stress-activated Bach2. **Mol Cell Biol** 24, 3473-3484.
- R.K. Thimmulappa, R.J. Fuchs, D. Malhotra, C. Scollick, K. Traore, J.H. Bream, M.A. Trush, K.T. Liby, M.B. Sporn, T.W. Kensler and S. Biswal (2007). Preclinical evaluation of targeting the Nrf2 pathway by triterpenoids (CDDO-Im and CDDO-Me) for protection from LPS-induced inflammatory response and reactive oxygen species in human peripheral blood mononuclear cells and neutrophils. **Antioxid Redox Signal** 9, 1963-1970.
- R.K. Thimmulappa, H. Lee, T. Rangasamy, S.P. Reddy, M. Yamamoto, T.W. Kensler and S. Biswal (2006). Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. **J Clin Invest** 116, 984-995.
- M.B. Toledano, A. Delaunay, L. Monceau and F. Tacnet (2004). Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. **Trends Biochem Sci** 29, 351-357.
- M.B. Toledano, C. Kumar, N. Le Moan, D. Spector and F. Tacnet (2007). The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. **FEBS Lett** 581, 3598-3607.

- K.I. Tong, Y. Katoh, H. Kusunoki, K. Itoh, T. Tanaka and M. Yamamoto (2006). Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. **Mol Cell Biol** 26, 2887-2900.
- J.M. Tullet, M. Hertweck, J.H. An, J. Baker, J.Y. Hwang, S. Liu, R.P. Oliveira, R. Baumeister and T.K. Blackwell (2008). Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. **Cell** 132, 1025-1038.
- M. Ushio-Fukai, R.W. Alexander, M. Akers, Q. Yin, Y. Fujio, K. Walsh and K.K. Griendling (1999). Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem** 274, 22699-22704.
- T. van der Wijk, J. Overvoorde and J. den Hertog (2004). H₂O₂-induced intermolecular disulfide bond formation between receptor protein-tyrosine phosphatases. **J Biol Chem** 279, 44355-44361.
- R.L. van Montfort, M. Congreve, D. Tisi, R. Carr and H. Jhoti (2003). Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. **Nature** 423, 773-777.
- A.P. Vivancos, E.A. Castillo, B. Biteau, C. Nicot, J. Ayte, M.B. Toledano and E. Hidalgo (2005). A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102, 8875-8880.
- N. Wakabayashi, A.T. Dinkova-Kostova, W.D. Holtzclaw, M.I. Kang, A. Kobayashi, M. Yamamoto, T.W. Kensler and P. Talalay (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101, 2040-2045.
- N. Wakabayashi, K. Itoh, J. Wakabayashi, H. Motohashi, S. Noda, S. Takahashi, S. Imakado, T. Kotsuji, F. Otsuka, D.R. Roop, T. Harada, J.D. Engel and M. Yamamoto (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. **Nat Genet** 35, 238-245.
- R. Wang, J. An, F. Ji, H. Jiao, H. Sun and D. Zhou (2008). Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. **Biochem Biophys Res Commun** 373, 151-154.
- L.A. Wilson, A. Gemin, R. Espiritu and G. Singh (2005). ets-1 is transcriptionally up-regulated by H₂O₂ via an antioxidant response element. **Faseb J** 19, 2085-2087.
- C.C. Winterbourn and M.B. Hampton (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radic Biol Med**.
- C. Xu, M.T. Huang, G. Shen, X. Yuan, W. Lin, T.O. Khor, A.H. Conney and A.N. Kong (2006). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. **Cancer Res** 66, 8293-8296.
- T. Yamamoto, T. Suzuki, A. Kobayashi, J. Wakabayashi, J. Maher, H. Motohashi and M. Yamamoto (2008). Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. **Mol Cell Biol** 28, 2758-2770.
- Y. Yano, R. Ozono, Y. Oishi, M. Kambe, M. Yoshizumi, T. Ishida, S. Omura, T. Oshima and K. Igarashi (2006). Genetic ablation of the transcription repressor Bach1 leads to myocardial protection against ischemia/reperfusion in mice. **Genes Cells** 11, 791-803.
- C. Yoshida, F. Yoshida, D.E. Sears, S.M. Hart, D. Ikebe, A. Muto, S. Basu, K. Igarashi and J.V. Melo (2007). Bcr-Abl signaling through the PI-3/S6 kinase pathway inhibits nuclear translocation of the transcription factor Bach2, which represses the antiapoptotic factor heme oxygenase-1. **Blood** 109, 1211-1219.
- R. Yu, W. Lei, S. Mandlekar, M.J. Weber, C.J. Der, J. Wu and A.N. Kong (1999). Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. **J Biol Chem** 274, 27545-27552.

- R. Yu, S. Mandlekar, W. Lei, W.E. Fahl, T.H. Tan and A.N. Kong (2000). p38 mitogen-activated protein kinase negatively regulates the induction of phase II drug-metabolizing enzymes that detoxify carcinogens. **J Biol Chem** 275, 2322-2327.
- D.D. Zhang and M. Hannink (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. **Mol Cell Biol** 23, 8137-8151.
- D.D. Zhang, S.C. Lo, J.V. Cross, D.J. Templeton and M. Hannink (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. **Mol Cell Biol** 24, 10941-10953.
- D.D. Zhang, S.C. Lo, Z. Sun, G.M. Habib, M.W. Lieberman and M. Hannink (2005). Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. **J Biol Chem** 280, 30091-30099.
- Y. Zhang, T.W. Kensler, C.G. Cho, G.H. Posner and P. Talalay (1994). Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91, 3147-3150.
- L.M. Zipper and R.T. Mulcahy (2000). Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. **Biochem Biophys Res Commun** 278, 484-492.
- L.M. Zipper and R.T. Mulcahy (2002). The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. **J Biol Chem** 277, 36544-36552.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire Stress Oxydant et Cancer de l'Institut de Biologie et de Biotechnologies du CEA à Saclay, avec le soutien financier du programme « Toxicologie Nucléaire Environnementale ». Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de thèse Michel Toledano pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, m'avoir proposé un sujet d'étude très intéressant et novateur, pour son encadrement et son aide à la rédaction de ce manuscrit. Je veux également remercier toutes les personnes qui sont ont sont passées par le laboratoire, pour leur soutien, leur amitié, et parfois leur aide précieuse dans le travail expérimental : Benoît, Benoît, Natacha, Ludivine, Fred, Agnès, Sophie, Chitranshu, Flora, Agnieszka, Lauren, Marie-Bénédicte, Aeid, Gaël, Anna-Gaëlle, Bruno, Sihem, Stéphanie, Reynaldo, Gemma, Carl, Jean-Yves, Régis, Catherine, Bruno, et plus particulièrement Germain et Stephanie pour m'avoir aussi appris à me servir d'une pipette et qui ont directement participé au travail présenté ici. Je remercie Denis Biard pour nous avoir donné accès à la technologie d'interférence d'ARN qu'il a développée, et pour nous avoir construit de nombreux plasmides, Raphaël Guérois pour son aide avec l'analyse des données de structures cristallographiques de protéines, et François Leteurtre pour ses conseils techniques et le don de plusieurs lignées cellulaires. Je remercie très chaleureusement Vasily Ogryzko qui m'a accueilli dans son laboratoire pour y faire les purifications de Bach2 oxydé et l'analyse par spectrométrie de masse, et a eu la patience de partager ses idées sur l'importance possible de phénomènes d'intrication quantique en biologie. Je remercie Giuseppe Baldacci, président de l'école doctorale « Gènes, Génomes, Cellules » pour son soutien et ses conseils, et les rapporteurs et examinateurs pour avoir accepté de juger notre travail.