



HAL
open science

Contrôle redox de la sécrétion protéique chez *Saccharomyces cerevisiae*

Alise Ponsoero

► **To cite this version:**

Alise Ponsoero. Contrôle redox de la sécrétion protéique chez *Saccharomyces cerevisiae*. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS276 . tel-01386426

HAL Id: tel-01386426

<https://theses.hal.science/tel-01386426>

Submitted on 24 Oct 2016

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

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

NNT : 2016SACLS276

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD
"CEA SACLAY"

ECOLE DOCTORALE N° ([577](#))
Structure et dynamique des systèmes vivants
Spécialité de doctorat Sciences de la vie et de la santé
Par

Mme Ponsoero Alise

Contrôle redox de la sécrétion protéique chez *Saccharomyces cerevisiae*

Thèse présentée et soutenue à Saclay le 30 septembre 2016 :

Composition du Jury :

M. Toledano, Michel	Directeur de thèse, CEA Saclay	Directeur de thèse
M. Capy, Pierre	Université Paris Saclay	Président du jury
Mme Jackson, Cathy	Institut Jacques Monod	Examinatrice
M. Winther, Jakob	University of Copenhagen	Examinateur
M. Huang, Meng Er	Institut Curie	Examinateur
Mme Babour, Anna	INSERM	Rapporteur
M. Collet, Jean-François	Institut de Duve	Rapporteur

Il faut pas respirer dans la compote, ça fait tousser.

Brice Fournier, *Kaamelott*
Livre V, 42 : le Destitué, écrit par Alexandre Astier

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Anna Babour et M. Jean-François Collet d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse ainsi que pour leurs commentaires et suggestions toujours pertinentes.

Merci également à Mme Cathy Jackson et M. Jakob Winther pour leurs soutiens en tant que tuteurs de thèse, toujours disponibles et de bons conseils. Vos présences dans mon jury ont été un vrai plaisir. Merci pour vos précieux avis concernant mon futur.

Je souhaite aussi remercier M. Meng Er Huang et M. Pierre Capy d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse ainsi que pour leur gentillesse et soutien tout au long de ces quatre années.

Je souhaite bien sur remercier Michel Toledano d'avoir accepté de m'encadrer sur ce travail de thèse et d'avoir suivi mes avancées scientifiques tout au long de ce travail.

Ces quatre années auraient été bien longues sans tous les bons moments passés au sein de la grande famille du bâtiment 142. Car si la thèse est une aventure scientifique, elle a été pour moi principalement une aventure humaine, pleine de moments surréalistes, de fous rires, d'échanges et de partage. Merci infiniment à tous pour ces bons souvenirs !

Je tiens donc à remercier tout d'abord les membres de mon laboratoire, Agnès Delaunay-Moisan, Gwen(doline) Le Pavec, Gael Palais, Samia Miled, Estelle Talet et Benoit D'Autreaux, qui m'ont encadré à la paillasse, m'ont toujours apporté un soutien sans faille, et ont porté une oreille attentive à tous mes questionnements expérimentaux, scientifiques et parfois existentiels.

Je souhaite également remercier mes « esclaves » préférés : Michael Nogueira et Pierre Tomietto. Merci à tous les deux d'avoir supporté mes débuts en tant que petite chef, ça a été un véritable plaisir de travailler avec vous deux !

Merci également à Chloé Godard, pour ton amitié et ta gentillesse. J'ai été heureuse de pouvoir travailler à tes côtés et d'avoir la chance de te rencontrer.

Ce projet de thèse n'aurait certainement pas été le même sans l'aide de l'équipe « Mann » : Carl Mann, Jean-Yves Thuret et Régis Courberette, et l'équipe « Labarre » : Jean Labarre, Stéphane « papy » Chedin, Jean-Christophe et Gilles Lagniel. Merci à tous pour vos conseils toujours précieux et pour les bons moments passés à vos côtés.

Enfin, je souhaite remercier mes « compagnons de galère », Vodor Veaudor, Cyril Carvalho et Clément Coudereau, qui savent toute l'amitié que je leur porte. On se retrouve de l'autre côté !

Un gros bisou à tous les stagiaires et post-docs du bâtiment 142, Louis Dumas, Amir « pti chat » Ben Mansour, Shakir Shakir, Indranil Adhya et Bo Huang.

Merci également à tous ceux qui ont pu croiser ma route au cours de ces quatre ans, et m'ont apporté leur aide et leur amitié, notamment Catherine Doreau, véritable maman pour tous les thésards en détresse, et Marie-Bénédicte Barrault. Un grand merci également à Maité Paternostre, toujours aux petits soins pour les thésards du service !

Merci enfin à mes amis, à toute l'équipe d'OSE France et ma famille, et bien sûr à mon Erwann (et un peu aussi à Mr PoucPouc), pour leur soutien sans faille tout au long de ces quatre ans ! Votre présence m'a permis de garder un certain équilibre mental !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I. DEFINITION ET ROLE DES PONTS DISULFURES DANS LA CELLULE EUCARYOTE 10

A. ROLES DES PONTS DISULFURES EN BIOLOGIE..... 11

1. LA FORMATION D'UN OU PLUSIEURS PONTS DISULFURES PERMET LA STABILITE CONFORMATIONELLE DES PROTEINES SECRETEES 11

2. LE PONT DISULFURE N'EST PAS L'APANAGE DES PROTEINES SECRETEES 11

B. LA FORMATION DES PONTS DISULFURES STRUCTURAUX *IN VIVO* NECESSITE UNE CATALYSE ENZYMATIQUE 12

1. LA FORMATION DE PONTS DISULFURES DANS LE PERIPLASME BACTERIEN REPOSE SUR LE COMPLEXE DsbA/B/C/D 13

a) Un système d'oxydation périplasmique : DsbA/B..... 14

b) Un système de réduction des thiols périplasmiques : DsbC/D/G 14

2. LA FORMATION DE PONTS DISULFURE CATALYSEE PAR LE RELAI REDOX ERV1-MIA40 CONSTITUE UN MECANISME D'IMPORT DE CERTAINES PROTEINES DANS L'IMS 16

3. LA FORMATION DES PONTS DISULFURES AU COURS DU REPLIEMENT OXYDATIF DES PROTEINES DANS LE RE 18

a) La formation des ponts disulfures dans le RE repose sur le relai redox PDI/Ero1 19

b) L'isomérisation des ponts disulfures dans le RE est réalisée par PDI 26

c) L'état redox de la PDI est central pour le repliement protéique..... 27

II. LE RE : COMPARTIMENT DE LA SECRETION PROTEIQUE EUCARYOTE 31

A. TRANSLOCATION DES PROTEINES 31

1. LE COMPLEXE SEC61 31

a) Translocation des protéines..... 33

b) Perméabilité aux petites molécules..... 33

2. LE COMPLEXE SSH1 35

3. KAR2 35

B. STRESS RE..... 37

1. REPOSE UPR 39

a) Activation de la voie UPR 39

b) Cibles de la voie UPR..... 40

c) Retour à l'homéostasie 41

2. STRESS RE ET MORT CELLULAIRE..... 42

III. LE SYSTEME DU GLUTATHION : HOMEOSTASIE ET COMPARTIMENTATION 47

A. LE SYSTEME DU GLUTATHION 47

1. LE GLUTATHION 49

a) Synthèse du glutathion 49

b) Dégradation du glutathion..... 49

c) Fonctions redox du GSH 50

2. GLUTATHION REDUCTASE 51

3. LES GLUTAREDOXINES 51

B. COMPARTIMENTATION DU SYSTEME DU GLUTATHION	52
1. MAINTENANCE DE L'HOMÉOSTASIE INTRACELLULAIRE DU GLUTATHION	53
a) Le cytosol : maintenance d'un état redox très réduit	53
b) La mitochondrie	57
c) Le RE	58
2. RÔLE DU GLUTATHION	58
a) La fonction essentielle du GSH est liée à son rôle dans le métabolisme du fer	59
b) Le rôle physiologique du GSH dans le RE est controversé	60
c) Le système du GSH est un système secondaire dans le contrôle thiol-redox intracellulaire	61
d) Phénotypes de délétion de GLR1 et des Grx dithiols	61
e) Autres rôles du GSH	62

IV. OUTILS D'ÉTUDE DES FLUX DU GLUTATHION ET DE SA COMPARTIMENTATION CELLULAIRE

A. SONDAS REDOX	65
1. MÉCANISMES DES SONDAS RX _{YFP} ET RO _{GFP}	65
2. LIMITES DE L'UTILISATION DES SONDAS REDOX	66
B. SYSTÈME HGT1	68

V. OBJECTIFS DE LA THÈSE.....

RESULTATS

VI. CHAPITRE 1 : ÉTUDE DES FLUX DE GLUTATHION ENTRE CYTOSOL ET RE

A. INTRODUCTION	75
B. RESULTATS	77
1. LA CONCENTRATION ABSOLUE EN GLUTATHION EST EN ÉQUILIBRE ENTRE CYTOSOL ET RE.....	77
a) $[GSx]_{Cyt}$ est supérieure à $[GSx]_{TotCell}$	77
b) $[GSx]_{RE}$ est égale à $[GSx]_{Cyt}$	78
c) Le GSSG cellulaire est accumulé dans la vacuole	79
d) L'activité d'Ero1 permet le maintien du RE E_{GSH}	80
2. TRANSPORT DE GSH DANS LE RE.....	81
a) Caractéristiques du transport de GSH dans le RE	82
b) Devenir du GSH dans le RE.....	84
c) Stress physiologiques conduisant à un flux de glutathion dans le RE	87
3. RÉGULATION DE L'IMPORT DE GSH DANS LE RE	90
a) L'import de GSH dans le RE est régulé par l'oxydation de Kar2	91
b) Interaction fonctionnelle entre induction d'Ero1 par la voie UPR et régulation de l'import de GSH dans le RE	95
4. LE GSSG EST ÉGALEMENT IMPORTÉ DANS LE RE	99

_Toc461104733

VII. CHAPITRE 2 : LE GSH EST TRANSPORTE PAR SEC61 DANS LE RE113

A. INTRODUCTION 113
B. RESULTATS 113
1. RECHERCHE DU TRANSPORTEUR DE GLUTATHION PAR L'APPROCHE DE GENES CANDIDATS 113
2. LE COMPLEXE Ssh1 PERMET LE TRANSPORT DE GSH DANS LE RE 116
3. RELATION ENTRE TRANSPORT DU GLUTATHION ET TRANSLOCATION PROTEIQUE 117
a) Effet de l'inhibition de la traduction protéique sur le transport de GSH 119
b) Inhibition de la translocation co-traductionnelle 120
c) Inhibition de la translocation post-traductionnelle 121
4. ACTIVITE DU TRANSLOCON ET TRANSPORT DU GLUTATHION..... 123
C. DISCUSSION..... 127

VIII. CHAPITRE 3 : MODIFICATION DE L'ETAT REDOX DU GLUTATHION DANS LE RE ET IMPACTS SUR LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE133

A. INTRODUCTION 133
B. RESULTATS 133
1. IMPACTS D'UNE MODIFICATION DU RE E_{GSH} SUR LA PHYSIOLOGIE DU RE 133
a) La réduction du ER E_{GSH} conduit à une induction des voies de signalisation du stress RE 133
b) L'oxydation du RE E_{GSH} conduit à une induction des voies de signalisation du stress RE 137
2. MORT CELLULAIRE ASSOCIEE AU STRESS REDUCTEUR DU RE 139
a) La toxicité du GSH sur une souche HGT1 est liée à une perte de viabilité cellulaire et d'une augmentation de la mort cellulaire..... 139
b) La toxicité est directement liée à l'intensité du stress RE..... 140
c) Rôle de la voie de mort cellulaire programmée nécrotique dans la toxicité du GSH..... 142
a) Rôle de la signalisation mitochondriale 145
3. RALENTISSEMENT DE CROISSANCE ASSOCIEE AU STRESS REDUCTEUR DU RE 147
a) Le ralentissement de croissance est indépendant de la mort cellulaire..... 149
b) Le ralentissement de croissance est dû à un arrêt du cycle en G2 149
C. DISCUSSION..... 151

DISCUSSION

IX. DISCUSSION GENERALE.....155

A. UNE REGULATION RECIPROQUE DE L'ACTIVATION D'ERO1 ET DE L'IMPORT DE GSH DANS LE RE 155
B. INTERACTION ENTRE SECRETION ET TRADUCTION DES PROTEINES : ROLE DU GSH 160
C. MECANISME DE L'INHIBITION DE L'IMPORT DE GSH DANS LE RE PAR LA FORME OXYDEE DE KAR2 161

X. CONCLUSION162

XI. MATERIEL ET METHODES.....165

ANNEXES181

BIBLIOGRAPHIE.....186

Liste des Abréviations

AMS = 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid

Cellules (souches) HGT1 = Cellules (souches) surexprimant le transporteur HGT1
constitutivement

CFU = Colony Forming Unit

CWI = Cell Wall Integrity pathway

Cys = Cystéine

DTT = dithiothréitol

GSH = glutathion réduit

GSSG = glutathione oxydé

IMS = Intermembrane Mitochondrial Space

NEM = *N*-Ethylmaleimide

RE = Réticulum endoplasmique

Tm =Tunicamycine

UPR = Unfolded Protein Response

Avant-Propos

La formation d'un pont disulfure implique l'oxydation de deux groupements thiols sur des résidus cystéines pour former une liaison covalente. Cette réaction est catalysée *in vivo*, notamment dans certains compartiments cellulaires comme le réticulum endoplasmique (RE). La formation d'un pont disulfure entre deux cystéines permet un gain de stabilité de la structure polypeptidique, particulièrement importante pour les protéines sécrétées.

La formation des ponts disulfures dans le RE repose sur un relai redox formé par l'oxydase Ero1 et la Protéine disulfure isomérase (PDI). Cependant, la formation de ponts disulfures natifs nécessite l'existence d'une voie d'isomérisation et de réduction des ponts disulfures incorrects. Dans le RE, certains auteurs suggèrent que le glutathion réduit (GSH) soit une source de pouvoir réducteur permettant cette voie de réduction des ponts disulfures dans le RE.

Le glutathion est un tripeptide redox, constituant le thiol le plus abondant dans la cellule. Son abondance et ses propriétés redox en font un réducteur de thiols et un nucléophile puissant. Si les fonctions biochimiques du glutathion sont aujourd'hui bien connues, une compréhension intégrative de son rôle physiologique reste nécessaire.

En effet, le glutathion est considéré classiquement comme le tampon redox de la cellule, une définition qui a été remise en cause par la mise en évidence d'une compartimentalisation du système du glutathion dans la cellule eucaryote. L'utilisation récente de biosenseurs redox a permis d'établir la disparité de l'état redox du GSH d'un compartiment à l'autre, suggérant un rôle organelle-spécifique du tripeptide.

La concentration et l'état redox subcellulaires du glutathion peuvent être régulés de façon non exclusive par 1) les flux de glutathion entre les différents compartiments et 2) l'existence de système enzymatiques spécifiques régulant sa synthèse, sa dégradation et son oxydoréduction. Si les mécanismes enzymatiques sont aujourd'hui relativement bien décrits, la description des flux intracellulaires de glutathion reste une question encore peu abordée. De

même, l'existence d'un contrôle réciproque de ses deux paramètres, permettant un meilleur contrôle homéostatique de l'état redox du glutathion, est un problème complexe que peu d'études abordent mais est aujourd'hui nécessaire pour fournir une meilleure compréhension des fonctions subcellulaires du glutathion.

Ce projet s'intéresse donc aux modalités de transport et au contrôle redox du glutathion dans le RE, un compartiment dans lequel le rôle du glutathion reste sujet à débat.

Au cours de cette introduction, l'importance des ponts disulfures en biologie et les machineries enzymatiques permettant leur formation *in vivo*, notamment dans le RE seront abordés. Dans un second temps, la machinerie de sécrétion du RE sera présentée. Enfin, la compartimentalisation du glutathion et les outils utilisés pour étudier ce système seront traités.

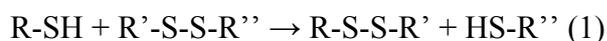
Introduction

I. Définition et rôle des ponts disulfures dans la cellule eucaryote

Le résidu cystéine (Cys) est d'un grand intérêt biologique car le groupement thiol (P-SH) de sa chaîne latérale peut exister sous plusieurs formes redox, ce qui l'engage dans différents types de réactions d'oxydo-réduction. En particulier la formation d'un pont disulfure (R-S-S-R') entre deux Cys du même polypeptide (pont disulfure intramoléculaire) ou de deux polypeptides distincts (pont disulfure intermoléculaire) promet dans certains cas un gain de stabilité de la structure tertiaire ou quaternaire de ces polypeptides. Le pont disulfure est également une forme réversible d'oxydation du résidu Cys, et de fait, intervient comme modification post-traductionnelle dans la régulation de la fonction des protéines.

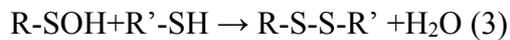
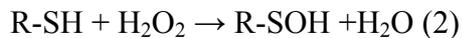
Nous aborderons dans un premier temps le rôle des ponts disulfures. La réversibilité des ponts disulfures implique leur réduction par les oxydoréductases des voies de contrôle thiol redox de la cellule ; ces dernières seront abordées dans un second temps.

La formation d'un pont disulfure implique l'oxydation de deux groupements thiols sur deux résidus cystéines pour former une liaison covalente. Cette réaction peut être réalisée par un échange thiol-disulfure consistant en un remplacement d'un des thiols oxydés du pont disulfure par un thiol réduit d'un autre résidu Cys (Fava et al., 1957). Dans cette réaction, un pont disulfure formé conduit à la réduction d'un autre pont (équation 1). Alternativement, un pont disulfure peut être formé *de novo* : les deux électrons du groupement thiol peuvent être transmis à l'oxygène moléculaire, lui-même réduit en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette réaction est le plus souvent catalysée par la flavine adénine dinucléotide (FAD) (Tu and Weissman, 2002).



Si l'oxydation d'un thiol en disulfure est la modification la plus extensivement étudiée, l'oxydation du groupement thiol en acide sulfénique (R-SOH), sulfonique (R-SO₂H) et sulfonique (R-SO₃H) sont observés dans un nombre toujours croissant d'études. L'acide sulfénique est notamment formé par l'oxydation d'un groupement thiol par un oxydant cellulaire tel que le peroxyde d'hydrogène (équation 2) ou le peroxinitrite. D'importance biologique majeure, l'acide sulfénique est un groupement assez instable et très réactif, traditionnellement vu comme une forme intermédiaire d'autres états oxydés (pont disulfure, acide sulfonique et sulfonique). Alternativement, la forme acide sulfénique du résidu Cys peut ensuite se condenser avec le thiol d'un autre résidu Cys pour former un pont disulfure

(équation 3). Cependant, des études récentes identifient ce groupement sulfénique sur de nombreuses protéines et suggèrent le rôle qu'il joue dans de nombreux mécanismes de signalisation cellulaire (Poole and Nelson, 2008).



A. Rôles des ponts disulfures en biologie

1. La formation d'un ou plusieurs ponts disulfures permet la stabilité conformationnelle des protéines sécrétées

La synthèse protéique implique deux étapes, souvent simultanées : la synthèse proprement dite du polypeptide par traduction de l'ARN messager, et le repliement des protéines, stabilisé par des interactions non-covalentes (interaction de Van Der Waals, liaisons électrostatiques, liaisons hydrogènes, interaction hydrophobe). La stabilité de certaines protéines, en particulier celles des protéines sécrétées et membranaires, nécessite la formation d'un ou de plusieurs ponts disulfures. En effet, la présence de ces ponts augmente la stabilité de la forme tridimensionnelle native du polypeptide, et facilite l'assemblage de complexes multi-protéiques (Hogg, 2003). Chez les eucaryotes, la formation de ces ponts disulfures sur les protéines sécrétées est catalysée dans le réticulum endoplasmique (RE). Dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (IMS), la formation de ponts disulfures structuraux intervient comme mécanisme d'import des polypeptides et contribue à leur repliement dans leur forme fonctionnelle. La réaction enzymatique permettant la formation des ponts disulfures dans le RE et l'IMS sera abordée plus bas.

2. Le pont disulfure n'est pas l'apanage des protéines sécrétées

On a longtemps pensé que l'oxydation du résidu Cys n'intervenait que dans le RE et l'IMS. En effet, le résidu thiol est en apparence toujours sous forme réduite dans les autres compartiments de la cellule. Cependant cette hypothèse est erronée et le phénomène d'oxydation des résidus Cys intervient également dans les autres compartiments cellulaires. Ainsi, de nombreuses enzymes forment un pont disulfure au cours de leur cycle catalytique, comme par exemple la ribonucléotide réductase catalysant la réduction des ribonucléotides en

désoxyribonucléotides, nécessaires à la synthèse d'ADN (Laurent et al., 1964), ou encore les peroxiredoxines (Delaunay et al., 2002)...

Les espèces réactives de l'oxygène, en particulier l' H_2O_2 , et l'oxyde nitrique (NO), sont capables de modifier l'activité de certains régulateurs par la modification du repliement de la protéine qu'ils peuvent induire par oxydation de résidus Cys et formation de ponts disulfures. Ainsi l'oxydation par l' H_2O_2 des régulateurs de la transcription OxyR chez *E. coli* (Åslund et al., 1999) et Yap1 chez la levure (Delaunay et al., 2000; Kuge et al., 1997) active leur fonction, alors que la phosphatase PTEN des mammifères est au contraire inhibée dans sa fonction par la formation d'un pont disulfure (Yu et al., 2005). L'oxydation d'une multitude de régulateurs suggère un rôle de l' H_2O_2 et du NO dans la signalisation cellulaire.

B. La formation des ponts disulfures structuraux *in vivo* nécessite une catalyse enzymatique

Au début des années 60, Anfinsen et collaborateurs montrent que la formation d'un pont disulfure est un processus spontané mais très lent *in vitro* (Anfinsen and Haber, 1961), suggérant l'existence *in vivo* d'enzymes catalysant leur formation. Il faudra cependant attendre le début des années 1990 pour que la première machinerie catalysant la formation de ponts disulfures dans une protéine sécrétée soit identifiée chez *E. coli*. L'équipe de Jon Beckwith identifie ainsi un mutant d'*E. coli* incapable de former des ponts disulfures sur les protéines du périplasma, qu'ils nomment « dsbA » pour « disulfide bond » (Bardwell et al., 1991).

Ces études ont ainsi mis en évidence des protéines ayant un rôle d'oxydo-réductase de thiols, permettant de catalyser les échanges thiol-disulfures *in vivo*. L'activité redox de ces protéines repose sur deux cystéines constituant un motif CXXC. Ce motif est caractéristique du domaine dit « thioredoxin fold », initialement décrit dans les thioredoxines, protéines au rôle redox important. Un « thioredoxin fold » peut être défini comme une structure $\alpha\beta\alpha\alpha$, avec deux hélices α repliées sur un feuillet β , et une hélice α du côté opposé.

1. La formation de ponts disulfures dans le périplasma bactérien repose sur le complexe DsbA/B/C/D

Chez *E. coli*, de très nombreuses protéines possédant des ponts disulfures sont présentes dans le périplasma bactérien (Dutton et al., 2008; Hiniker and Bardwell, 2004), et sont donc les substrats de la machinerie d'oxydation permettant le repliement oxydatif. La machinerie assurant la formation et la réduction des ponts disulfure périplasmique est représentée dans la **figure 1**.

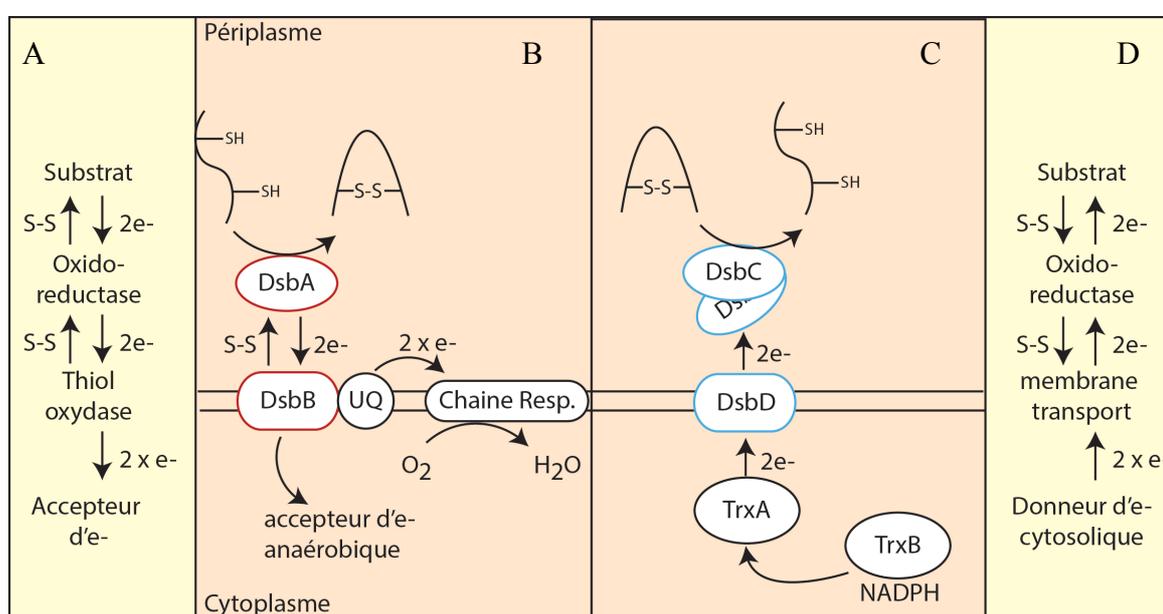


Figure 1 : Formation et isomérisation des ponts disulfures dans le périplasma bactérien.

(A) Flux d'électrons lors de la formation des ponts disulfures.

(B) Machinerie permettant la formation des ponts disulfures dans le périplasma bactérien. L'oxydase DsbA permet l'oxydation des substrats dans le périplasma. DsbA est maintenue sous sa forme oxydée par DsbB. L'accepteur final d'électron dans des conditions d'aérobiose est l'oxygène moléculaire, qui reçoit ses électrons par la chaîne respiratoire.

(C) Voie d'isomérisation/réduction dans le périplasma bactérien. DsbC réduit et isomérisse les substrats. DsbC est gardée à l'état réduit par la protéine membranaire DsbD. DsbD reçoit ses électrons de donneurs cytosoliques : la thioredoxine (TrxA) et la thioredoxine réductase (TrxB).

(D) Flux d'électrons lors de la réduction des ponts disulfures

Schéma adapté de (Kojer and Riemer, 2014)

a) *Un système d'oxydation périplasmique : DsbA/B*

DsbA est une petite enzyme périplasmique responsable de l'oxydation des protéines périplasmiques chez *E. coli*. Un mutant de cette enzyme est viable, mais de nombreuses protéines périplasmiques n'acquièrent pas, ou très lentement, leurs ponts disulfures (Bardwell et al., 1991). DsbA porte un motif de type CXXC (Cys-Pro-His-Cys) sur lequel un pont disulfure peut se former (Bardwell et al., 1991; Martin et al., 1993). DsbA permet l'oxydation d'une large variété de substrats périplasmiques par un échange thiol-disulfure, en transférant son pont disulfure sur une paire de cystéines du substrat.

Après transfert de son pont disulfure sur le substrat, DsbA est réoxydée par une oxydase membranaire, DsbB (Bardwell et al., 1993). Dans des conditions de croissance normale, DsbA est maintenue dans son état oxydé. Au contraire, chez un mutant pour lequel le gène DsbB est inactivé, DsbA est réduite. Il est intéressant de noter que le phénotype du mutant délété pour DsbB est moins sévère que celui d'une délétion DsbA, surtout dans des conditions de cultures favorisant l'oxydation de DsbA par de petites molécules oxydantes présentes dans le milieu (Bardwell et al., 1993).

Nous avons vu que DsbB permet la réoxydation de DsbA qui à son tour oxyde les substrats. Comment DsbB acquiert-il donc son pont disulfure ? DsbB réduit transmet ses électrons à une ubiquinone, qui à son tour est réoxydée par des oxydases terminales qui transmettent les électrons jusqu'à l'accepteur final O₂, couplant ainsi repliement oxydatif et respiration. Dans des conditions d'anaérobie, au contraire, DsbB réduit une ménaquinone, qui transmet ses électrons à un système de transfert d'électrons anaérobie (Bader et al., 1999).

b) *Un système de réduction des thiols périplasmiques : DsbC/D/G*

Le système DsbA-B permet l'oxydation de ses substrats dans le périplasma. Cependant, la formation de ponts disulfures natifs nécessite également leur réduction et leur isomérisation.

Chez *E. coli*, DsbC permet l'isomérisation des ponts disulfures non natifs (Berkmen et al., 2005; Hiniker and Bardwell, 2004). La mutation du gène DsbC provoque une accumulation de protéines mal repliées, possédant une activité réduite (Berkmen et al., 2005). De plus cette mutation provoque une hypersensibilité à une exposition au cuivre, car cette dernière provoquant une oxydation non spécifique des protéines périplasmiques. L'hypersensibilité des mutants DsbC semble due à leur incapacité à réduire ces thiols oxydés (Hiniker et al., 2005).

DsbC est une petite protéine périplasmique homodimérique portant également un domaine actif de type CXXC en C-terminal (McCarthy et al., 2000). *In vivo*, DsbC est réduite (Joly and Swartz, 1997), et la structure en dimère de DsbC protège ses résidus cystéines d'une oxydation par la voie DsbA/B. Le mode d'action exact de DsbC n'est pas résolu. DsbC peut ainsi agir comme une isomérase, en déplaçant le pont disulfure sur le substrat entre les cystéines disponibles. Alternativement, DsbC pourrait agir comme une réductase, en réduisant totalement le substrat, permettant une nouvelle oxydation de ces thiols par la voie DsbA/B (Kadokura et al., 2003; Rietsch et al., 1997).

La protéine DsbG, homologue de DsbC, comporte également un motif actif de type CXXC, et possède une activité chaperonne et isomérase *in vitro* (Bessette et al., 1999). La surexpression de DsbG permet de récupérer les phénotypes du mutant DsbC (Hiniker and Bardwell, 2004). Dans des conditions physiologiques normales, DsbG interagit avec trois substrats connus, qui de façon étonnante, ne portent qu'un unique résidu cystéine, fonctionnellement important. Il a été montré que ces cystéines s'oxydent dans la forme acide sulfénique (R-SOH), et que DsbG protège de cette sulfénylation par leur réduction (Depuydt et al., 2009). Ainsi, DsbG est une réductase d'acide sulfénique.

Pour être actives, DsbC et DsbG doivent être maintenues sous leur forme réduite, ce qui fait intervenir la protéine membranaire DsbD comportant huit segments transmembranaire (Bessette et al., 1999). DsbD a son domaine N-terminal cytoplasmique et son domaine C-terminal périplasmique, chacun ayant une paire de cystéines essentielles à l'activité de l'enzyme (Katzen and Beckwith, 2000). La mutation du gène DSBD inactive DsbC et DsbG. Lorsqu'elle est oxydée, DsbD est à son tour réduite par la thiorédoxine cytoplasmique TrxA, elle-même réduite par la thiorédoxine réductase TrxB. *In fine*, le pouvoir réducteur est fourni par le NADPH (Rietsch et al., 1997).

La machinerie redox permettant le repliement oxydatif des protéines dans le périplasmique bactérien repose donc sur deux systèmes : un système d'oxydation DsbA/B, et un système permettant l'isomérisation et la réduction des thiols : DsbC/D, tous deux coexistant dans le même compartiment.

2. La formation de ponts disulfure catalysée par le relai redox Erv1-Mia40 constitue un mécanisme d'import de certaines protéines dans l'IMS

Chez la levure, la présence dans l'espace intermembranaire mitochondrial (IMS) de nombreuses protéines riches en cystéines, dites petites protéines « TIM » dont le repliement repose sur la formation de ponts disulfures, a conduit à s'interroger sur la machinerie permettant la formation de ces ponts, d'autant que l'oxydation de ces protéines dans le cytosol prévient leur import dans l'IMS (Lu et al., 2004).

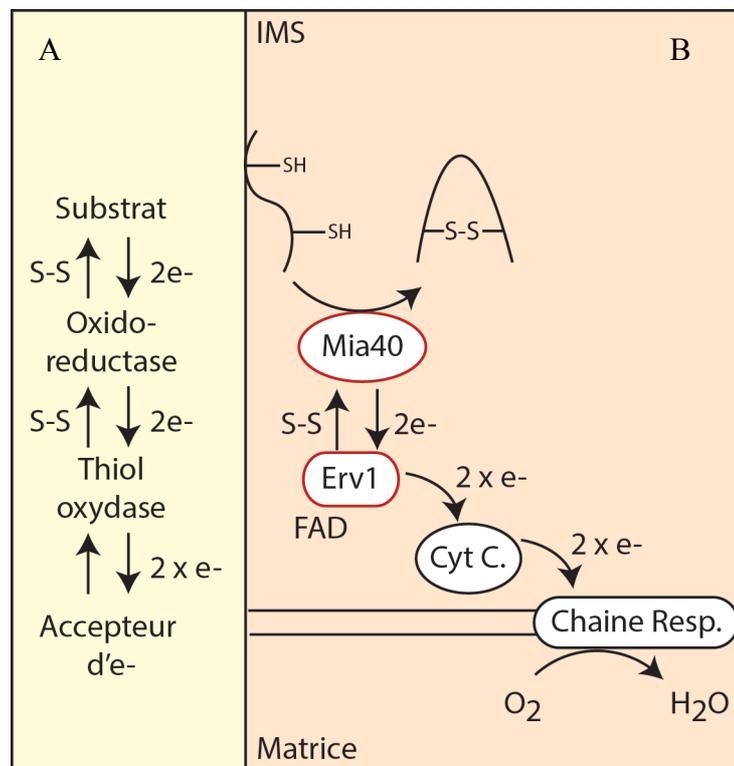


Figure 2 : Formation des ponts disulfures dans l'IMS.

(A) Flux d'électrons lors de la formation des ponts disulfures.

(B) Machinerie permettant la formation des ponts disulfures dans l'IMS. L'oxydase Mia40 permet l'oxydation des substrats dans le périplasma. Mia40 est réoxydée par Erv1. L'accepteur final d'électron dans des conditions d'aérobic est l'oxygène moléculaire, qui reçoit ses électrons par la chaîne respiratoire. L'accepteur d'électrons dans des conditions anaérobic est inconnu.

Schéma adapté de (Kojer and Riemer, 2014)

En 2005, la machinerie dite « MIA » constituée par l'oxydoréductase Mia40 et la thiol oxydase Erv1 a été identifiée comme celle permettant de former les ponts disulfures dans l'IMS (Chacinska et al., 2004; Mesecke et al., 2005). Mia40 est une protéine résidante de l'IMS, soluble chez les mammifères et plantes et ancrée dans la membrane externe de la mitochondrie chez la levure (Chacinska et al., 2004). Elle possède le motif catalytique Cys-Pro-Cys formant un pont disulfure transmis par échange thiol-disulfure à ses substrats (Terziyska et al., 2009). Mia40 est réoxydée par la flavoprotéine Erv1 (Mesecke et al., 2005). Erv1 comporte deux domaines Cys-x-x-Cys transférant les électrons provenant de Mia40 au cofacteur FAD (Lisowsky, 1992; Mesecke et al., 2005). Lorsqu'il est dans la forme FADH, Erv1 est réoxydé par la cytochrome c, elle-même, oxydée par la cytochrome c oxydase qui utilise l'oxygène moléculaire comme accepteur terminal d'électrons (Bihlmaier et al., 2007; Dabir et al., 2007). Ce relai est représenté **figure 2**.

Récemment, une étude suggère *in vitro* la capacité de Mia40 réduite à assurer l'isomérisation des ponts disulfures non natifs sur un de ses substrats Cox17 (Koch and Schmid, 2014), cependant ce rôle *in vivo* reste à prouver.

Pour une grande partie d'entre-elles, les protéines mitochondriales sont synthétisées dans le cytosol puis adressées à la mitochondrie par des signaux d'adressage spécifiques. Ces protéines sont ainsi transloquées au travers des membranes externes et internes de la mitochondrie. Pour la majorité de ces protéines, l'import dans l'IMS fait intervenir le complexe TOM (« outer mitochondrial membrane complex »). Cependant les petites protéines Tim ne portant pas de signaux d'adressage, la question de leur adressage était posée. La découverte du système MIA a répondu à cette question. En effet, après leur translocation dans l'IMS, l'oxydation des protéines TIM par le relai Erv1-Mia40 en stabilisant la conformation de ces protéines, bloque simultanément leur retrotranslocation dans le cytosol, et permet ainsi leur rétention dans l'IMS (Lu et al., 2004).

Les substrats de la machinerie MIA ont pour caractéristique commune, hormis de rares exceptions (Chatzi and Tokatlidis, 2013), de posséder les motifs CX3C, pour les protéines « TIM », ou CX9C, pour les protéines chaperons comme Cox17, Cox19.

3. La formation des ponts disulfures au cours du repliement oxydatif des protéines dans le RE

Comme nous l'avons déjà mentionné, la présence de ponts disulfures procure un gain de stabilité important pour les protéines sécrétées. Ces protéines sont transloquées au travers de la membrane du RE de façon cotraductionnelle ou post-traductionnelle via un complexe protéique appelé « translocon », dont le fonctionnement sera détaillé dans le chapitre 2. Le repliement des chaînes polypeptidiques dans leur structure tertiaire et quaternaire survient ensuite dans la lumière du RE grâce à l'action des protéines chaperons résidentes du RE. La formation de ponts disulfures sur ces substrats est catalysée par une machinerie redox composée de l'oxydase Ero1 et de la protéine disulfure isomérase (Pdi1), représenté **Figure 3**. Nous considérerons d'abord la machinerie d'oxydation. Dans un second temps, nous considérerons la question de l'isomérisation et de la réduction de ces ponts disulfures.

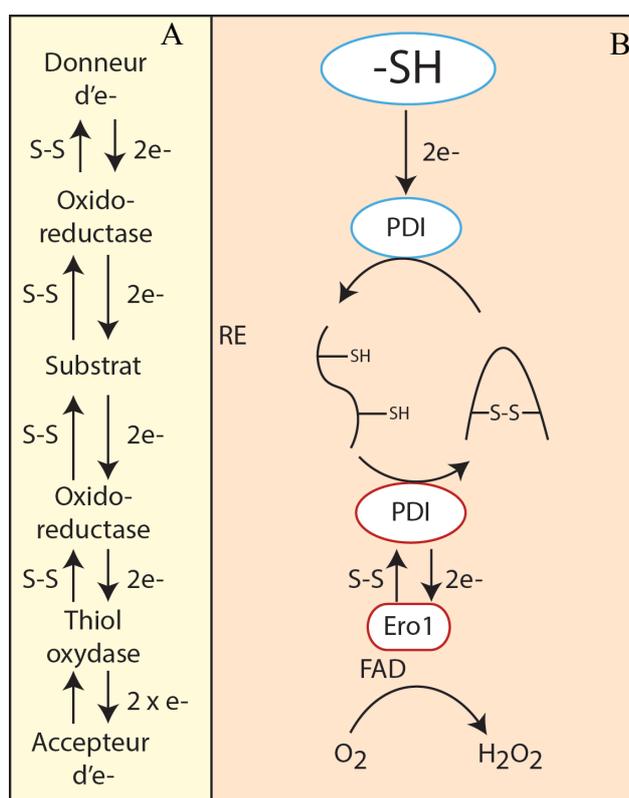


Figure 3 : Oxydation et réduction des ponts disulfures dans le RE.

(A) Flux d'électrons lors de la formation et la réduction des ponts disulfures dans le RE.

(B) L'oxydo-réductase PDI assure l'oxydation et la réduction des ponts disulfures. PDI est oxydée par Ero1, et l'accepteur final des électrons est l'oxygène moléculaire dans des conditions d'aérobie. L'accepteur en anaérobie est inconnu. PDI réalise également l'isomérisation et la réduction des substrats dans le lumen. Les électrons sont fournis par les thiols réduits entrants dans le lumen (protéines réduites et GSH).

Schéma adapté de (Kojer and Riemer, 2014)

a) La formation des ponts disulfures dans le RE repose sur le relai redox PDI/Ero1

(1) PDI forme les ponts disulfures sur les substrats

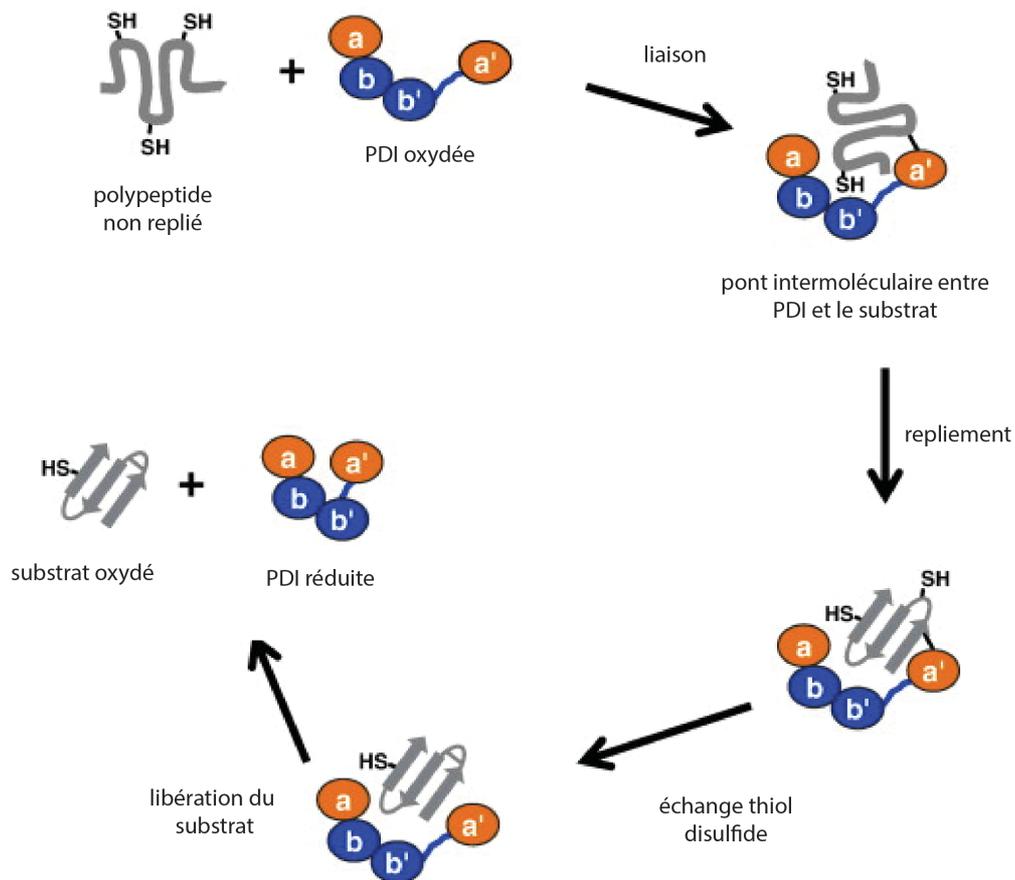


Figure 4 : Formation de ponts disulfures par PDI dans le RE

Schéma présentant la formation par la PDI d'un pont disulfure sur un substrat. PDI oxydée se lie à la chaîne polypeptidique via ses domaines b et b'. Un pont intermoléculaire peut donc être formé entre les cystéines catalytiques de la PDI et une cystéine réduite du substrat. Une réaction d'échange de thiol-disulfure prend alors place, permettant la formation d'un pont disulfure sur le substrat et réduisant la PDI, autorisant la libération du substrat. Schéma adapté depuis (Oka and Bulleid, 2013)

Dans les années 1960, le travail innovateur d'Anfinsen avait montré qu'*in vitro* l'utilisation de microsomes de rats permettait d'accélérer le repliement et donc la réactivation de l'enzyme ribonucléase. Ce groupe purifia ensuite de façon partielle l'activité des microsomes permettant cette accélération, identifiant ainsi la protéine disulfure isomérase (PDI), une

protéine très abondante du RE (2% des protéines totales du compartiment chez la levure) (Givol et al., 1964, 1965, Goldberger et al., 1963, 1964). La PDI est ensuite décrite comme une enzyme catalysant la formation des ponts disulfure *in vitro* (Goldberger et al., 1963). Ces travaux, en montrant que la PDI n'est oxydée par l'oxygène moléculaire que très lentement, suggéraient que cette enzyme n'est pas une oxydase, mais une oxydoréductase catalysant des réactions d'échanges thiol-disulfure (Thorpe and Coppock, 2007).

Ce n'est que dans les années 80 que le gène codant PDI fut cloné et que la séquence du polypeptide fut révélée, permettant une meilleure compréhension du fonctionnement de cette oxydoréductase grâce aux études structure-fonction (Edman et al., 1985). Pourtant il faudra attendre encore vingt ans pour l'identification de ses quatre domaines « thioredoxin fold » (Alanen et al., 2003; Pirmeskoski et al., 2004). Ces domaines sont appelées a, b, b' et a' ; la présence d'un domaine linker flexible sépare les domaines b' et a'. Du côté c-terminal, PDI porte également une petite extension appelée domaine c.

Les domaines a et a' sont catalytiques. Ils possèdent chacun un « thioredoxin fold » avec un motif actif de type CXXC et ont une très grande similitude entre eux. Un seul des deux domaines, a ou a', est suffisant pour catalyser la réaction d'échange thiol-disulfide *in vitro* (Alanen et al., 2006; Darby and Creighton, 1995).

Les domaines b et b' forment également chacun un « thioredoxin fold », mais ne possèdent pas de motifs CXXC, et ne sont que faiblement similaires aux domaines catalytiques a et a' (Kemink et al., 1997). Les cystéines présentes dans les domaines b et b' ne sont pas indispensables à l'activité oxydoréductase de PDI. L'étude *in vitro* des domaines isolés suggère en fait l'importance du domaine b' dans la liaison de la PDI à son substrat (Klappa et al., 2000).

Comme DsbA chez les procaryotes, et comme dans toute réaction d'échange thiol-disulfure, l'oxydation d'un substrat par la PDI est concomitante de la réduction des cystéines catalytiques de cette dernière. Pour permettre un cycle catalytique complet, PDI doit être réoxydée. Le cycle catalytique de la PDI est représenté **Figure 4**.

(2) Source du pouvoir oxydant dans le RE

(a) L'hypothèse GSSG

Le glutathion est un tripeptide redox très abondant dans les cellules. Le couple redox du glutathion GSH/GSSG constitue un standard pour la mesure des potentiels redox des molécules biologiques (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Les expériences de repliement oxydatif des polypeptides *in vitro* utilisent généralement le GSSG pour l'oxydation des thiols. En effet, le GSSG permet soit l'oxydation directe du substrat, soit l'oxydation de la PDI (Wetlaufer and Saxena, 1970). La présence de glutathion à la concentration de 1mM à un ratio [GSH]/[GSSG] de 5 :1 et est optimale pour le repliement de la ribonucléase A *in vitro* en présence de PDI (Lyles and Gilbert, 1991). Le glutathion serait-il l'oxydant permettant la formation des ponts disulfures dans le RE ?

Dans les années 1990, Lodish et collaborateurs réalisent la première mesure de l'état redox du glutathion présent dans la lumière du RE, grâce à l'utilisation d'un tétrapeptide redox acétylé (AcNYTC), capable de s'équilibrer avec le couple redox du GSH, et qui lorsqu'il est N-glycosylé dans le RE, reste séquestré dans ce compartiment. La comparaison de l'état redox des tétrapeptides glycosylés et non glycosylés permettait d'extrapoler les ratio GSH/GSSG dans le cytosol et le RE, permettant ainsi d'obtenir des valeurs de 30-100/1 dans le cytosol et 1-3/1 dans le RE (Hwang et al., 1992). Des études plus récentes utilisant des sondes redox, révélèrent un état redox du glutathion dans le cytosol encore plus réduit et permirent une détermination plus fine du ratio GSH/GSSG dans le RE (entre 0,7 et 1,2 /1) (Bass et al., 2004; Dixon et al., 2008; Gutscher et al., 2008).

La nature beaucoup plus oxydée du GSH dans le RE, en comparaison avec le cytosol, permettait à Lodish et ses collaborateurs de proposer que le GSSG constituait dans le RE la source oxydante nécessaire à la formation des ponts disulfures dans ce compartiment par le biais de PDI. Ces auteurs suggéraient l'existence d'un transport sélectif du GSSG dans le RE pour expliquer la différence d'état redox entre ce compartiment et le cytosol.

(b) Ero1

L'hypothèse de Lodish et collaborateurs fut totalement remise en cause à la fin des années 1990 par la découverte par les groupes de Kaiser et de Weismann d'un même et seul enzyme

rendant compte de l'activité oxydase du RE, la flavoprotéine Ero1, par le biais de cribles génétiques conduits chez la levure (Frاند and Kaiser, 1999; Pollard et al., 1998).

Le premier crible cherchait des mutants thermosensibles bloquant la sécrétion des protéines, et conduisit à l'identification de la mutation *ero1-1*, provoquant un défaut de repliement majeur des protéines dans le RE à 37°C (Frاند and Kaiser, 1999). Le deuxième crible consistait à identifier des gènes conférant une résistance accrue au reductant dithiothreitol DTT, lorsqu'ils étaient surexprimés. Le DTT inhibe la formation de ponts disulfures, et la surexpression du gène codant l'oxydase du RE permettrait de contrebalancer l'effet du DTT, conduisant ainsi au gène *ERO1* (Pollard et al., 1998).

Alors que la PDI transmet des ponts disulfures sur ses substrats par échange thiol-disulfure, la flavoprotéine Ero1 génère des ponts disulfures *de novo* sur la PDI, (Frاند and Kaiser, 1999; Pollard et al., 1998). En effet, chez les mutants *ero1-1* thermosensibles, la PDI s'accumule sous sa forme réduite dans le RE (Frاند and Kaiser, 1999). *In vitro*, un système simple contenant uniquement les protéines PDI et Ero1 permet de reconstituer le système de génération de ponts disulfures sur les protéines substrat. Même à de très faible concentration, Ero1 catalyse la formation de pont disulfures par PDI de façon bien plus efficace que GSSG (Tu et al., 2000). Le groupe de Kaiser montrait de plus en 1999 que dans le RE, le GSH est en compétition avec les cible du relai redox Ero1-PDI, faisant ainsi passer le GSH de statut d'oxydase du RE à celui de réductase (Cuozzo and Kaiser, 1999).

Ero1 est une protéine hautement conservée chez les eucaryotes. Découverte chez la levure, elle est présente chez l'Homme (Cabibbo et al., 2000), *Caenorhabditis elegans* (Harding et al., 2003), mais également dans le domaine végétal (e.g. *Arabidopsis Thaliana* (Dixon et al., 2003)).

(i) Structure/fonction d'Ero1

Ero1 est caractérisée structurellement par deux domaines (un domaine N-terminal et un domaine C-terminal) portants chacun deux résidus cystéines, appelées respectivement Cystéines de transfert et Cystéines catalytiques (voir figure 2) (Bertoli et al., 2004; Frاند and Kaiser, 2000). Les cystéines catalytiques sont situées proche du centre actif isoalloxazine du cofacteur FAD (Gross et al., 2004), et les cystéines de transfert sur une boucle flexible située à la surface de la protéine, ce qui permet à celle-ci d'adopter deux conformations (Bertoli et al., 2004; Gross et al., 2004).

Les cystéines de PDI réduites sont oxydées par transfert d'électrons sur la paire de cystéines de transfert du domaine C-terminal d'Ero1, via un processus d'échange de ponts disulfures (Frand and Kaiser, 2000; Sevier and Kaiser, 2006). Ces électrons sont ensuite transmis aux cystéines N-terminale puis au cofacteur FAD réduit en FADH₂. Enfin, le FADH₂ est réoxydé en FAD par transfert de ces deux électrons sur l'oxygène moléculaire, générant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Gross et al., 2004, 2006). Le mouvement de la boucle flexible d'Ero1 permet aux Cys de transfert d'interagir soit avec les Cys catalytiques soit avec la PDI (Gross et al., 2004). Cette boucle permettrait une meilleure interaction avec la PDI, en mimant le substrat préférentiel de cette protéine : un peptide non structuré, et de ce fait autoriserait de contrôler au mieux le phénomène d'oxydation des thiols, exclusivement au niveau de PDI (Sevier and Kaiser, 2006).

(ii) Production d'H₂O₂

Comme nous l'avons détaillé plus haut, chez les procaryotes, la formation des ponts disulfures est couplée à la chaîne respiratoire (Bader et al., 1999), qui réduit efficacement l'O₂ en eau. Chez les eucaryotes, la compartimentation cellulaire ne permet pas le couplage entre Ero1-PDI et la chaîne respiratoire.

Par contre, chez les eucaryotes, l'activité d'Ero1 conduit à la production d'H₂O₂ car l'enzyme utilise l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons pour la formation de ponts disulfures.

Il a été montré *in vitro* que, pour chaque pont disulfure catalysé par Ero1, il y a génération d'une molécule d'H₂O₂ (Gross et al., 2006; Tu and Weissman, 2002). De plus, l'utilisation de sondes permettant une mesure des taux de peroxyde d'hydrogène *in vivo* indique que le taux d'espèces réactives de l'oxygène dans le RE excède celle mesurée dans la mitochondrie, source bien caractérisée de ROS intracellulaire (Malinouski et al., 2011).

Chez les mammifères, des systèmes existent permettant la consommation des peroxydes produits dans le RE : une peroxyrédoxine (Prdx4) et deux glutarédoxines (Grx7, Grx8) sont capable de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau (Nguyen et al., 2011; Tavender and Bulleid, 2010; Zito et al., 2010). Ces enzymes, sans homologues chez la levure, permettent d'améliorer l'efficacité de la machinerie de repliement oxydatif. En effet ces enzymes, en réduisant le peroxyde d'hydrogène, oxydent aussi la PDI (Nguyen et al., 2011; Tavender and Bulleid, 2010; Zito et al., 2010).

Si ce système permettant la réduction du peroxyde d'hydrogène produit par Ero1 n'existe pas chez la levure, une étude suggère que ces ROS ont la propriété de signaler l'activité de l'oxydase. Sevier et collaborateurs ont montré en effet que l' H_2O_2 produit *in vivo*, probablement par Ero1, permet l'oxydation directe d'une cystéine portée par la protéine chaperon Hsp70 Kar2 (Homologue de BiP chez les mammifères). Cette, modification, probablement une oxydation en acide sulfénique, inhibe l'activité ATPase et chaperonne de Kar2, et promeut sa capacité holdase. De plus l'oxydation de Kar2 semble modifier son activité au niveau du translocon Sec61 et provoque un léger blocage de la translocation protéique à ce niveau (Wang et al., 2014). Cette étude suggère l'existence, au moins chez la levure, d'une réponse au peroxyde d'hydrogène dans le RE, permettant une protection face au stress oxydant en limitant l'agrégation des protéines du lumen et la charge en protéines du RE.

(iii) Régulation

L'activité d'Ero1 contribue à une formation d' H_2O_2 , en quantité relativement importante si l'on considère que certaines protéines sécrétées contiennent plusieurs ponts disulfures, ou que la formation correcte des ponts disulfures nécessite des cycles itératifs d'oxydation et de réductions. Il est également crucial de souligner que cette production d' H_2O_2 doit être particulièrement importante dans les cellules sécrétrices des métazoaires. Au vu de ce stress oxydant provoqué par l'activité d'Ero1, on peut comprendre pourquoi l'activité de cette flavoprotéine nécessite un contrôle et une régulation stricte.

Ero1 possède un système de régulation reposant sur deux paires de cystéines dites régulatrices qui, lorsqu'elles sont oxydées, limitent l'activité de l'oxydase. Ainsi, Ero1 régulerait sa propre fonction : son activité conduisant à oxyder le RE promouvrait indirectement la formation des ponts disulfures inhibant son activité (Sevier and Kaiser, 2008, Sevier et al., 2007)

Chez la levure, Ero1 possède trois paires de résidus Cys, (Cys 150 et Cys 295, Cys 143 et Cys 166 ainsi que Cys90 et Cys 349) pouvant être oxydé par PDI en ponts disulfures dits régulateurs (Sevier et al., 2007). Ces ponts disulfures stabilisent le domaine en boucle, très flexibles empêchant ainsi les Cys de transfert C-terminale d'oxyder la PDI (Sevier et al., 2007a). Les paires de cystéines régulatrices ne possèdent pas le même potentiel redox, la première (Cys150 et Cys295) est très électronégative et donc très stable alors que les paires

Cys90-Cys349 et Cys143-166 sont plus facilement réduites. En phase exponentielle de croissance, Ero1 est principalement sous forme oxydée, donc en apparence inactive, et un faible apport en pouvoir réducteur serait suffisant pour permettre son activité (Sevier et al., 2007a). La position de ces cystéines et de ces ponts disulfures sur Ero1 est décrite dans la [figure 5](#).

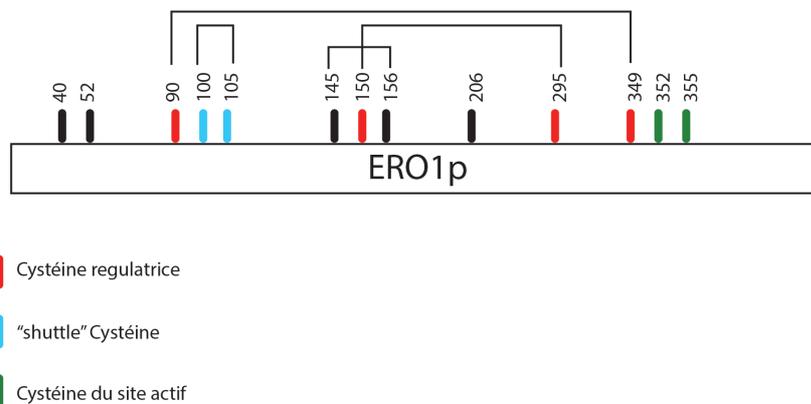


Figure 5 : Positions des cystéines et ponts disulfures d'Ero1 chez *S. cerevisiae*.

Ero1 chez *S. cerevisiae* possède deux longs ponts disulfures régulateurs (paires de cystéines rouges) Cys90-349 et Cys150-295. On note également la présence d'un pont disulfure entre les cystéines 145-156. De plus, Ero1 porte deux cystéines catalytiques (cystéines vertes) et deux cystéines « shuttle » (représentées en bleues).

L'activité de Ero1 peut être libérée de cette régulation en substituant l'une des paires de Cys régulatrices par des alanines (Ero1-C150A-C295A), cette mutation produisant une enzyme hyperactive (Sevier et al., 2007). Il a été montré que la surexpression d'Ero1^{C150A-C295A} est toxique, provoquant un arrêt de la croissance, qui peut être contrebalancé par un réductant comme du dithiothreitol (DTT). De façon paradoxale, la déplétion cellulaire en GSH permet également de mitiger la toxicité liée à la surexpression d'Ero1 hyperactif (Sevier et al., 2007).

Un autre moyen de contrôle de l'activité d'Ero1 est de moduler la disponibilité de FAD libre cellulaire, ou de FAD transportée dans le RE. Même si ce système n'a pas été démontré, il est

intéressant de souligner que l'une des cibles de la réponse UPR est le gène RIB1 contrôlant la première étape de la synthèse de la riboflavine (Travers et al., 2000).

(c) *Erv2*

Chez *S. cerevisiae*, une délétion du gène ERO1 est létale, suggérant qu'aucune autre oxydase ne peut se substituer à Ero1. Pourtant des études *in vitro* montrent que la sulfhydryl oxydase Erv2, un homologue de l'oxydase mitochondriale Erv1, est également capable de catalyser la formation de ponts disulfures (Gerber et al., 2001). La surexpression d'Erv2 permet la survie et la sécrétion dans un mutant invalidé pour le gène ERO1 ($\Delta ero1$) (Sevier et al., 2001), mais la délétion du gène ERV2 n'a que très peu d'impact sur la croissance cellulaire (Sevier et al., 2001).

Ces observations conduisent à penser qu'*in vivo*, Ero1 est le composant central de la machinerie de repliement oxydatif dans le RE, alors que l'action d'Erv2 est limitée à une catégorie de substrats non essentiels ou à des conditions de croissances particulières.

b) *L'isomérisation des ponts disulfures dans le RE est réalisée par PDI*

(a) *PDI*

Afin de permettre la formation de ponts disulfure natifs sur les substrats, il est essentiel de coupler le système d'oxydation des thiols à un système de réduction assurant l'isomérisation des ponts disulfures non natifs.

La réduction et l'isomérisation des ponts disulfures peuvent être catalysées par la PDI (Ellgaard and Ruddock, 2005). Cependant, si la PDI réduit les substrats, elle doit être à son tour réduite. *In vitro*, le GSH ou le DTT sont souvent utilisés comme donneurs d'électron. Par contre, l'isomérisation est une transposition des ponts disulfures sur le substrat, et si elle nécessite l'activité d'une PDI réduite, il n'y a pas dans ce cas-là de réaction d'oxydo-réduction.

(b) *Les protéines PDI-like*

En dépit de sa capacité à réaliser les réactions d'isomérisation et de réduction sur le substrat, on trouve essentiellement la PDI sous forme oxydée *in vivo* (Frandsen and Kaiser, 1999). Ce

résultat suggère que le rôle majeur de la PDI *in vivo* reste l'oxydation des thiols sur les substrats.

Certains auteurs suggèrent alors le rôle de protéines homologues de la PDI dans l'isomérisation et la réduction des ponts disulfures. Chez la levure il existe quatre gènes paralogues à la PDI (EUG1, MPD1, MPD2 et EPS1) et plus d'une douzaine chez l'Homme, qui diffèrent en taille, potentiel redox et protéines cibles (Ferrari and SÖling, 1999; Freedman et al., 1994; Kanai et al., 1998). Chez la levure comme chez l'Homme, ces homologues ne semblent pas capables d'interagir tous avec Ero1 (Sevier and Kaiser, 2002). Ces homologues de la PDI incapables d'interagir avec Ero1 pourraient agir préférentiellement en tant que réductases ou isomérases dans le RE.

c) L'état redox de la PDI est central pour le repliement protéique

Comme nous l'avons déjà vu, le repliement oxydatif de protéines *in vivo* nécessite un système d'oxydation pour former les ponts disulfures et un système de réduction des thiols, pour leur isomérisation lorsqu'ils sont non natifs et pour la réduction des protéines irrémédiablement mal repliées en vue de leur rétrotranslocation et de leur dégradation.

Chez les procaryotes, l'oxydation des thiols sur les substrats est réalisée par le système DsbA/DsbB alors que leur isomérisation est assurée par un second système, DsbC/D/G. Chez les eucaryotes, l'oxydation et la réduction semble assurée par la même protéine : la PDI (et les PDI-likes). Dans la mitochondrie, Mia40 paraît jouer le même rôle central que PDI.

Chez les métazoaires, une thiol-réductase Erdj4, possédant un domaine « thioredoxin fold » (CXXC), a été mise en évidence dans le RE. Cette réductase aurait un rôle dans la réduction des protéines en vue de leur dégradation par le système ERAD (ER associated degradation pathway). Cependant son rôle dans la réduction des ponts disulfures en vue de leur isomérisation reste indéterminé (Dong et al., 2008). De plus, cette réductase n'a aucun homologue chez les champignons.

Cette configuration suggère un rôle important chez la levure de l'état redox des PDI dans le contrôle du repliement protéique et de la sécrétion. L'état redox de la PDI est contrôlé par le fonctionnement de l'oxydase Ero1, qui oxyde la PDI, favorise la formation des ponts disulfures sur le substrat, et dont l'activité est strictement contrôlée en retour par la PDI.

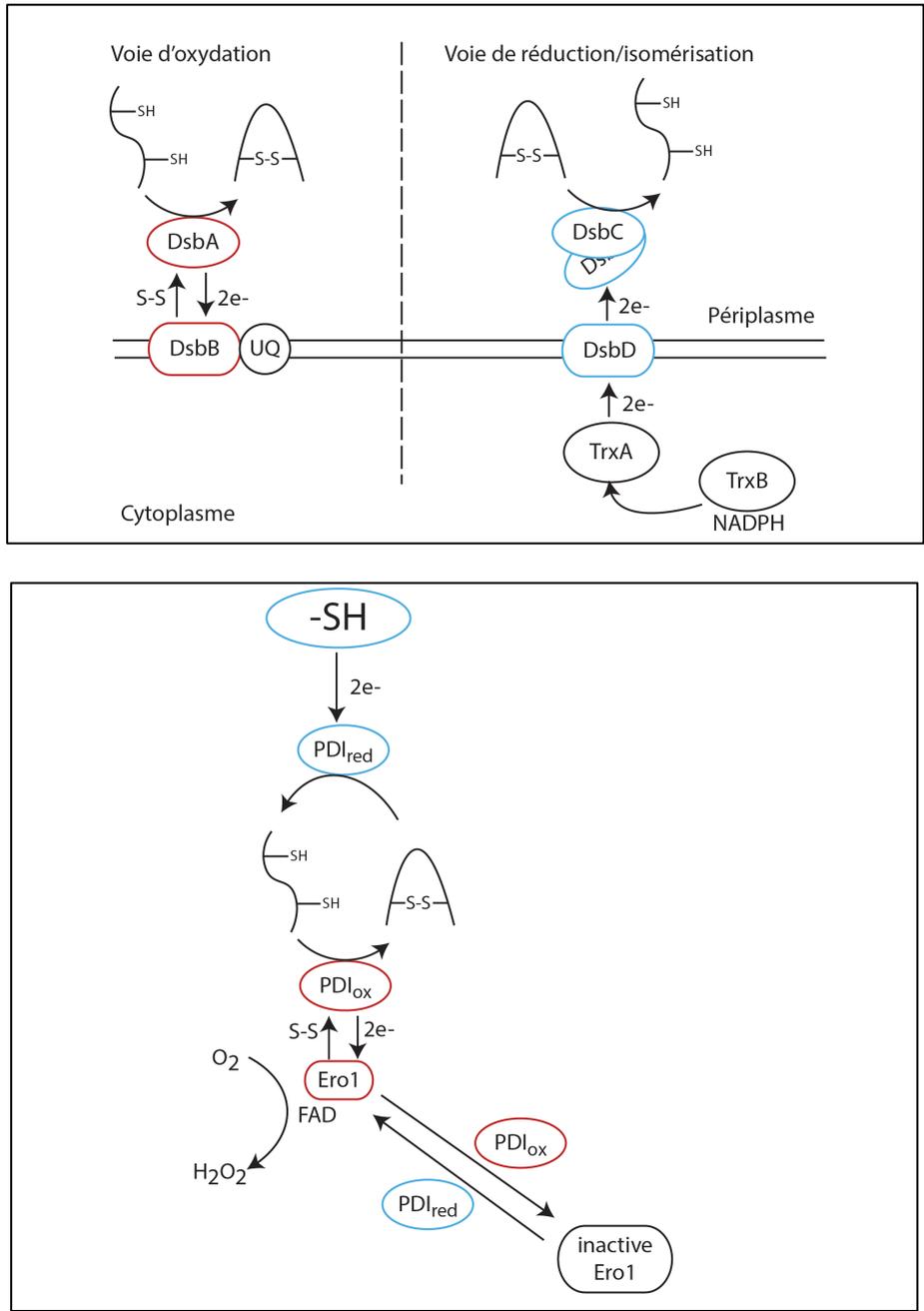


Figure 6 : Comparaison des voies de réduction et d'oxydation des thiols dans le périplasm bactérien et dans le RE

(A) Dans le périplasm bactérien, les voies de réduction (DsbC/DsbD) et d'oxydation (DsbA/DsbB) des thiols sont assurées par des acteurs indépendants. Même si DsbC et DsbA possèdent des potentiels redox proches, DsbB ne peut oxyder DsbC, et de la même façon DsbD ne peut réduire DsbA de façon efficace. On observe donc une séparation complète des acteurs assurant l'oxydation et la réduction des thiols. Cette séparation est causée par la multimérisation de DsbC qui prévient son oxydation par DsbB et permet son interaction avec la réductase DsbD.

(B) Dans le RE, l'oxydation et la réduction des thiols sont assuré par la PDI. Ainsi, l'état redox de la PDI permet une balance entre formation des ponts disulfures et leur isomérisation. Le ratio oxydé/réduit de la PDI est donc critique pour la sécrétion protéique. Une augmentation du ratio oxydé/réduit de la PDI conduit à la formation de ponts disulfures régulateurs sur Ero1, et son inactivation. *A contrario*, une augmentation en PDI réduite conduit à la réduction des ponts disulfures régulateurs d'Ero1 et à son activation.

Cependant, la nécessité d'un pouvoir réducteur dans le RE et sa source est une question sujette à débat. Un apport en thiol réduit, soit par les protéines non repliées ou le glutathion réduit serait nécessaire. En effet, chez les mammifères, le GSH est capable de réduire directement la PDI (Jessop and Bulleid, 2004) et est nécessaire pour limiter l'accumulation de ponts disulfures non natifs (Chakravarthi et al., 2006; Jansens et al., 2002). La machinerie oxydative du RE est comparée à celle du périplasme bactérien dans la **Figure 6**.

L'homéostasie redox dans le RE est donc cruciale pour la sécrétion des protéines. Un excès d'équivalent réduits, telle qu'une augmentation de la charge en protéine sécrétées provoquant une accumulation de PDI réduites, conduit à une activation du système Ero1, favorisant la formation de ponts disulfures sur le substrat. Cependant, une activation trop forte d'Ero1 s'avère également toxique pour la cellule.

II. Le RE : compartiment de la sécrétion protéique eucaryote

A. Translocation des protéines

Chez les eucaryotes, la voie de sécrétion classique est la voie RE-Golgi, qui débute par une translocation dans le lumen du RE des protéines sécrétées.

Cette première étape de la voie de sécrétion permet le transfert de la protéine à travers la membrane du RE. Cette translocation peut être soit cotraductionnelle (couplée à la traduction ribosomale) soit post-traductionnelle. Chez la levure on distingue deux complexes de translocation : le complexe Sec61 et le complexe Ssh1. Ces deux complexes sont représentés **Figure 7**.

1. Le complexe Sec61

Le complexe Sec61 est composé de trois protéines, Sec61, Sbh1 et Sss1 (Osborne et al., 2005). Sec61 est une protéine transmembranaire ayant 10 segments, alors que Sss1 et Sbh1 sont des protéines à un seul domaine transmembranaire. Sec61 et Sss1 sont essentielles à la survie cellulaire, au contraire de Sbh1, en raison de la présence d'un paralogue, la protéine Sbh2 (Rapoport, 2007).

Lors de la translocation cotraductionnelle, le peptide signal du polypeptide en voie de synthèse par le ribosome est reconnue par le complexe SRP (Signal recognition particle composé de 6 protéines, et d'un ARN7S (Brown et al., 1994; Siegel et al., 1987). Cette association provoque un arrêt transitoire de la traduction. Le complexe ribosome-SRP-protéine est adressé au niveau du récepteur SR à la membrane du RE, et se lie ensuite au niveau de Sec61. Le complexe Sec interagit avec Sec63, Sec72, et Sec72 également avec le complexe Sec lors d'une translocation cotraductionnelle (Brodsky et al., 1995). La traduction reprend et le polypeptide en cours de synthèse est transloqué à travers Sec61. Plusieurs protéines luminales, dont la protéine chaperon Kar2, interviennent pour stabiliser la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. Kar2 est recrutée au niveau du pore par Sec63.

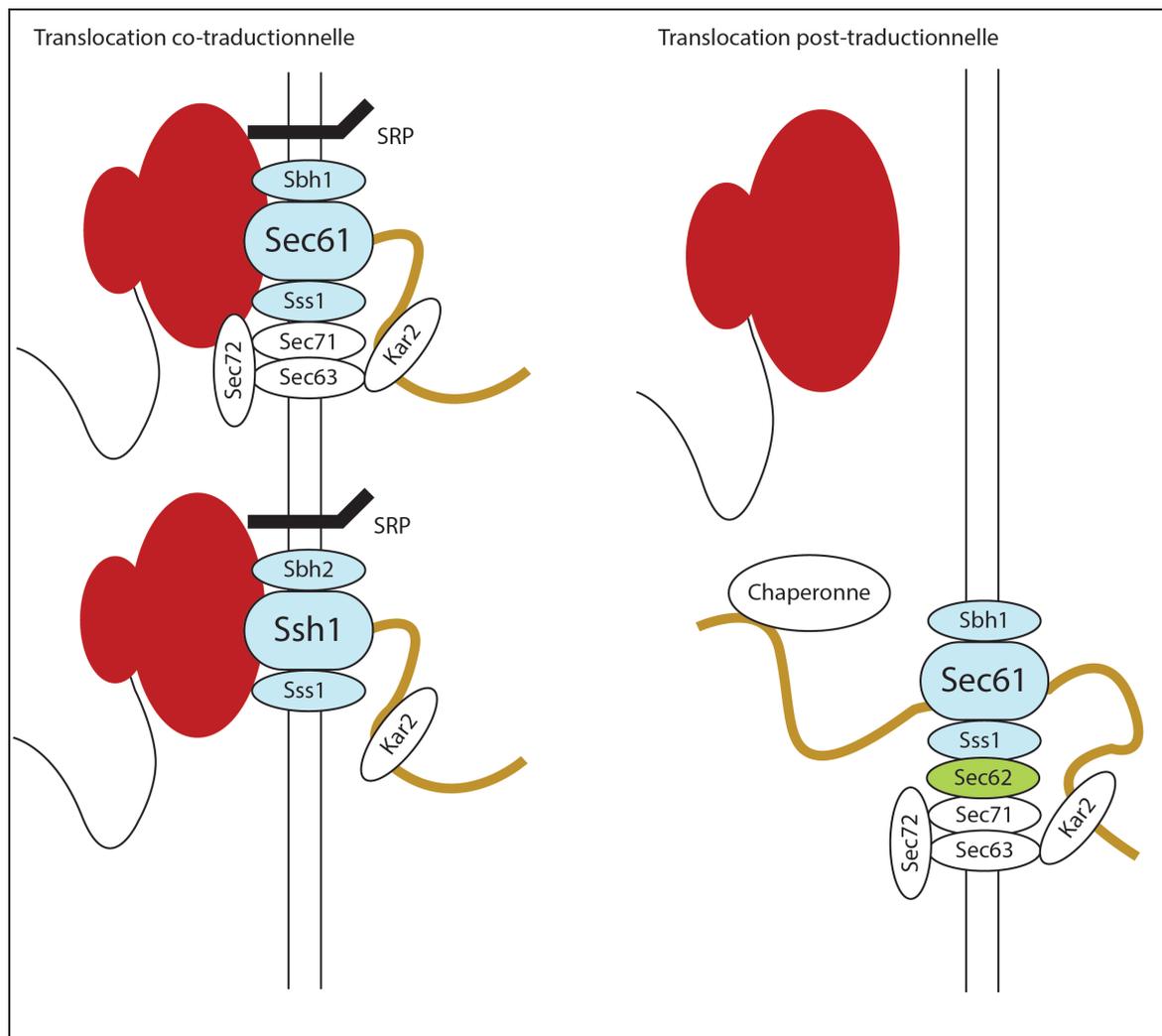


Figure 7 : Translocation protéique

(A) Translocation cotraductionnelle : au début de la traduction du polypeptide, la séquence signal est reconnue par la Signal Recognition Particle (SRP). Le complexe ribosome-polypeptide en cours de synthèse-SRP se lie au récepteur SRP à la membrane du RE. La traduction reprend et le polypeptide en cours de synthèse est inséré à travers le pore, dans le complexe Sec61 ou Ssh1.

(B) Translocation post-traductionnelle : la translocation du polypeptide intervient après la traduction dans le cytosol. Plusieurs protéines chaperons cytosoliques interviennent pour stabiliser le polypeptide et permettre sa translocation par le complexe Sec61.

Le complexe Sec61 s'associe à Sec62, Sec63, Sec71 et Sec72 pour permettre la translocation post-traductionnelle. Lors de celle-ci, la translocation de la protéine a lieu après la synthèse complète ribosomale. Les protéines chaperons Hsp70 interviennent pour stabiliser le polypeptide non-replié et prévenir son agrégation (Ssa1, Ydj1...) (Plath and Rapoport, 2000). Sec62 reconnaît le peptide signal de la protéine et permet sa translocation à travers Sec61.

L'association de ces différents complexes est représentée **figure 7**.

a) *Translocation des protéines*

Sec61 forme le translocon proprement dit (Plath and Rapoport, 2000). L'interface des segments transmembranaire 2/3 et 7/8 constituent la "porte latérale" du translocon permettant l'insertion dans la membrane des protéines membranaires (Van den Berg et al., 2004). Vue en coupe, le translocon a une forme en sablier. Du côté luminal, le pore est occlus par une boucle courte située entre les segments transmembranaires 1 et 2, appelé "plug".

La translocation cotraductionnelle des protéines par le système débute par la liaison du ribosome avec Sec61. Cette interaction permet l'ouverture partielle (ou « priming ») du translocon : la « lateral gate » est alors partiellement ouverte permettant à la séquence signal de s'y intercaler. L'entrée dans le pore de la séquence signal permet alors l'ouverture complète de Sec61. Cette ouverture se caractérise par un élargissement du pore et un mouvement du plug vers l'extérieur, ce qui libère la lumière du pore (Deitermann et al., 2005; Smith et al., 2005; Trueman et al., 2011). Le polypeptide s'engage alors dans le pore alors que la séquence signal reste associée à la porte latérale. Une fois que le polypeptide a quitté le pore, le plug revient en place et bloque le translocon dans sa conformation fermée.

b) *Perméabilité aux petites molécules*

La structure du translocon soulève la question de sa perméabilité aux petites molécules, ions et métabolites. Le maintien de perméabilité est particulièrement important chez les procaryotes afin d'assurer le maintien du gradient de proton, crucial pour la production d'énergie chez les procaryotes. Les études d'électrophysiologie réalisées sur SecY (homologue de Sec61 chez *E. coli*), montrent une imperméabilité du pore aux ions et aux molécules d'eau (Saparov et al., 2007).

L'étude ultrastructurale de SecY a montré que les déterminants de cette imperméabilité résident dans la structure même du pore. Ainsi, le plug et la constriction centrale du pore comprenant 6 résidu hydrophobes et appelée « ring », ont un rôle majeur dans l'imperméabilité du translocon (Van den Berg et al., 2004). Lors de l'ouverture du pore, ce « ring » s'ouvre mais reste néanmoins « collé » autour du polypeptide en cours de translocation assurant l'imperméabilité du système (Schiebel and Wickner, 1992). Lorsque le substrat a quitté le translocon, le plug revient au centre du pore et bloque tout passage de petites molécules. Ce modèle permet d'expliquer le maintien d'une imperméabilité membranaire lors d'une translocation post et cotraductionnelle. Si l'imperméabilité

membranaire est cruciale à la survie chez les bactéries, le pore connectant le cytosol au milieu extérieur, celle-ci est sans doute moins critique chez les eucaryotes, où des échanges de petites molécules entre le RE et le cytosol pourraient être réalisés par le biais de Sec61. Cette idée est renforcée par l'observation que la délétion du plug chez *S. cerevisiae* est viable et n'entraîne qu'un faible défaut de translocation (Jenne et al., 2006).

Au contraire, des études réalisées sur le RE de cellules eucaryotes par le groupe de Johnson ont conduit à un modèle où le ribosome du côté cytosolique et la protéine chaperon BiP du côté luminal assurent l'imperméabilité du pore lors de la translocation (Hamman et al., 1998). Néanmoins, des études de microstructures électroniques suggèrent un espace de 12-15Å entre le ribosome et l'entrée du pore suffisant pour laisser passer des petites molécules (Beckmann et al., 2001; Ménétret et al., 2000), remettant ainsi en cause la validité de du modèle de Johnson. De plus, ce modèle n'explique pas comment l'imperméabilité membranaire est maintenue lors de la translocation post-traductionnelle.

Les enzymes du RE nécessitent certains cofacteurs, apportés au RE à partir du cytosol par des transporteurs spécifiques. Cependant, peu de transporteurs du RE ont été à ce jour étudiés pour leur perméabilité vis-à-vis des petites molécules (Berninsone and Hirschberg, 1998; Hirschberg et al., 1998; Ishida and Kawakita, 2004). Lomax et collaborateurs ont mesuré les échanges de Ca^{2+} entre le RE et le cytosol, et ont observé qu'étonnamment la puromycine provoque un efflux de Ca^{2+} important à partir du RE (Lomax et al., 2002). La puromycine est un antibiotique qui provoque la terminaison de la traduction et le relargage du polypeptide naissant par le ribosome (Rajasekaran et al., 1995; Simon and Blobel, 1991; Traut and Monro, 1964). Dans le cas des ribosomes situés au niveau du RE, ces polypeptides en cours de synthèse sont libérés dans la lumière du RE, la sous-unité 60S du ribosome restant liée au translocon. Ces résultats suggèrent que le translocon lié à un ribosome inactif permet le passage de petites molécules.

Ce modèle est appuyé par les travaux de Wonderlin (Heritage and Wonderlin, 2001; Roy and Wonderlin, 2003), qui montrent la perméabilité de la membrane du RE à une petite molécule neutre, le 4-methyl-umbelliferyl- α -D-glucopyranoside, dont le flux entrant est mesurable par l'activité d'une α -glucosidase résidante du RE. L'étude suggère que le RE est perméable à cette molécule lorsque des ribosomes vides sont liés à sa surface. De même, un traitement à la puromycine augmente les flux entrants dans le RE de l'acide UDP-glucuronique, mais semble

ne pas modifier de façon significative les flux de glutathion et de glucose-6-phosphate (Lizák et al., 2006).

Ces résultats sont importants au regard des études de Nicchitta et collaborateurs qui suggèrent qu'environ 2/3 des sous-unités 60S restent liées au translocon après la fin de la traduction. Ces complexes ribosomes-translocon vides, dont la régulation est aujourd'hui méconnue, pourraient avoir un impact majeur sur la signalisation cellulaire ER-dépendante et le maintien des gradients entre ER et cytosol.

2. Le complexe Ssh1

Bien que découvert il y a presque vingt ans, le rôle du complexe Ssh1 reste assez mal compris. Ce complexe est composé d'un paralogue de Sec61, Ssh1, de Sbh2 et de Sss1. Ce complexe ne s'associe pas à Sec62 et Sec63 et est, de ce fait, complètement dédié à la translocation cotraductionnelle. Contrairement au complexe Sec61, l'inactivation du complexe Ssh1 n'est pas létale (Finke et al., 1996). Dans des conditions de croissance normale, le complexe Ssh1 est aussi abondant dans la cellule que le complexe Sec61, et près de 60% des protéines transloquées empruntent ce canal. Il semble que ce complexe Ssh1 ne reconnaît que certains peptides signaux très hydrophobes (Wittke et al., 2002). Un seul substrat spécifique du complexe Ssh1 est à ce jour identifié, il s'agit de Sec71 (Spiller and Stirling, 2011).

3. Kar2

- **Rôle de Kar2 dans la translocation protéique**

Kar2, l'homologue de BiP chez les mammifères, est une Hsp70 très abondante dans le RE. Kar2 joue plusieurs rôles : en association avec les protéines co-chaperons Lhs1 et Sil1, Kar2 intervient dans la translocation des protéines dans le RE. Lhs1 et Kar2 interagissent séquentiellement avec le polypeptide en cours de translocation, de façon coordonnée et assurent sa translocation en empêchant son mouvement de retour vers le cytosol (De Keyzer et al., 2009). Sil1, quant à lui n'interagit pas avec la protéine en cours de translocation mais avec Kar2 (Yan et al., 2011). *In vitro*, Sil1 stimule le recrutement de Kar2 par Sec63 (Kabani et al., 2000).

- **Kar2 est une protéine chaperon majeure du RE**

En plus de son rôle dans la translocation protéique, Kar2 a un rôle de protéine chaperon, permettant le repliement des protéines. Comme toutes les Hsp70, Kar2 possède un domaine ATPase N-terminal et un domaine C-terminal capable de lier ses substrats, ayant une plus grande affinité pour les peptides hydrophobiques (Blond-Elguindi et al., 1993; Flynn et al., 1989). Dans la forme liée à l'ATP, Kar2 lie ses substrats avec faible affinité, mais cette liaison stimule l'activité ATPase, et l'hydrolyse de l'ATP en ADP augmente alors l'affinité de liaison. L'échange entre la molécule d'ADP et une molécule d'ATP, stimulée par les facteurs d'échange Lhs1 et Sil1, diminue l'affinité pour les substrats. Ces cycles de liaison-relargage permettent au polypeptide d'acquies progressivement sa conformation (Flynn et al., 1989). Les co-chaperones de la familles Hsp40 du RE, Sec63 (Sadler, 1989; Scidmore et al., 1993), Scj1 (Schlenstedt et al., 1995; Silberstein et al., 1998), et Jem1 (Nishikawa and Endo, 1997) activent de façon très important l'activité ATPase de Kar2.

- **Régulation de l'activité de Kar2 par oxydation**

Une étude récente a montré que l'activité de Kar2 pouvait être régulée par oxydation de la cystéine 63, située au niveau du site de liaison de l'ATP. Dans des conditions de surexpression du mutant Ero1 hyperactif, (Ero1*), le peroxyde d'hydrogène produit oxyde la cys63 dans la forme acide sulfénique (Wang et al., 2014), et le glutathion se condense à cette forme pour former un adduit covalent (Wang and Sevier, 2016). Ces deux modifications inhibent l'activité ATPase de Kar2, et convertissent cette dernière dans une forme fonctionnelle de « holdase » c'est-à-dire ayant une affinité forte pour les substrats. Dans des conditions de stress oxydant du RE, cette fonction holdase semble en constituer un mécanisme de protection, car elle limite la formation d'agrégats protéiques dans le RE et en prévient la surcharge en bloquant la translocation de nouvelles protéines (Wang et al., 2014). Cette régulation de l'activité de Kar2 ne semble pas être un mécanisme « tout ou rien », puisque la proportion de Kar2 oxydée augmente avec la sévérité du stress impliqué (Wang and Sevier, 2016).

La fonction de sécrétion du RE repose donc sur plusieurs complexes protéiques assurant la translocation des polypeptides ainsi que le repliement de ces derniers dans leur forme native, fonctionnelle. Une augmentation brutale de la charge protéique du RE ou un stress conduisant à l'accumulation de protéines mal repliées dans le lumen nécessite la mise en place de voies

de réponse cellulaire permettant une adaptation des capacités du RE aux besoins de sécrétion cellulaire. Ces voies de réponse seront explorées dans le paragraphe suivant.

B. Stress RE

Par définition, un stress est la réponse d'un système biologique à une perturbation de son fonctionnement normal.

Le RE est un compartiment complexe, central pour de nombreuses fonctions cellulaires, notamment la synthèse lipidique, l'homéostasie du calcium intracellulaire, et bien sûr c'est le premier compartiment qu'empruntent les protéines destinées à être sécrétées. Chez la levure, le RE est également important dans la synthèse de la paroi cellulaire. Dans ce compartiment, les protéines sécrétées vont être maturées : elles vont acquérir leur conformation native et subir des modifications post-traductionnelles, notamment la N-glycosylation (Hubbard and Ivatt, 1981; Kornfeld and Kornfeld, 1985), et la formation de ponts disulfures intra ou intermoléculaires évoquée dans le paragraphe précédent (Fewell et al., 2001). Un système de contrôle de qualité permet de trier les protéines correctement repliées, qui seront transportées vers le golgi via des vésicules émanant du RE, de celles qui ne le sont pas et qui seront routées vers le cytosol pour leur dégradation par le protéasome (Ellgaard et al., 1999).

La perturbation d'une des fonctions du RE provoque un stress désigné sous le terme « stress du RE ». Historiquement, le stress du RE causé par l'accumulation de protéines anormalement repliées a été intensément étudié. Au contraire, peu d'études documentent la réponse à un stress du RE causée par une perturbation de la synthèse de la paroi cellulaire, du métabolisme lipidique ou du calcium.

Chez la levure, diverses méthodes sont utilisées pour provoquer un stress du RE : la surexpression de protéines incapables de se replier, l'augmentation de la charge protéique au niveau du RE, l'inhibition de la N-glycosylation par la tunicamycine, ou du repliement oxydatif par le DTT.

Box 1 : Le système ERAD

Un système de contrôle qualité des protéines du RE permet l'élimination des protéines mal repliées et potentiellement toxique pour la cellule. La prise en charge et l'élimination de ces protéines aberrantes repose sur une action coordonnée du système de dégradation associé au RE (système ERAD) (McCracken and Brodsky 1996) et la réponse UPR.

Contrairement à ce qui a été longtemps supposé, le système ERAD ne repose pas sur des protéases résidentes du RE. Bien que ces substrats soient présents et sélectionnés dans le RE, ils sont ensuite rétro-transloqués dans le cytoplasme où ils seront dégradés.

- Reconnaissance des protéines irrémédiablement mal repliées

La reconnaissance du substrat du système ERAD doit être suffisamment précise pour reconnaître les protéines irrémédiablement mal repliées des protéines en cours de repliement. Cette reconnaissance repose sur l'activité de protéines chaperons, capables de reconnaître les zones hydrophobes exposées des protéines en cours de repliement (Bukau and Horwich 1998).

Chez les mammifères il a de plus été proposé que l'association chaperonne-protéine démarre un « chronomètre » qui permette de sélectionner le substrat du système ERAD (Cabral *et al.* 2001). Ce chronomètre repose sur la présence ou l'absence d'un résidu mannose sur le substrat. La présence d'une chaîne de mannose trop courte (moins de 9 résidus) empêche la glucosidase II du RE de le reconnaître et d'y ajouter un glucose terminal. La présence de ce glucose permet à la protéine d'être reconnue par le cycle calnexine, et si à la fin de ce cycle, la protéine cible est toujours mal repliée, elle peut ré-entrer dans le cycle calnexine grâce à l'action de l'UDP-glucose qui ajoute un nouveau résidu glucose sur la protéine (Caramelo *et al.* 2003). En parallèle, les résidus mannoses sont clivés aléatoirement par les mannosidases du RE, stoppant l'entrée de la protéine dans les cycles calnexine et provoquant son entrée dans le système ERAD. Les acteurs permettant le passage du substrat entre ces deux systèmes reste inconnu, bien qu'une lectine liant spécifiquement les courtes chaînes de mannose a été identifiée chez les mammifères (Braakman 2001). On notera que certains substrats du système ERAD ne sont pas glycosylés, et que certains acteurs majeurs permettant la mise en place de ce chronomètre sont absents chez certains organismes tels que *S. cerevisiae*, laissant supposer l'existence d'un autre système permettant la reconnaissance des protéines irrémédiablement mal repliées.

- Rétro-translocation du substrat

La rétro-translocation du substrat dans le cytoplasme impliquerait la protéine du RE Sec61, impliqué également dans la translocation des protéines dans le RE (Plempner *et al.* 1997, Wiertz *et al.* 1997, Pilon *et al.* 1997). La force qui permet cette rétrotranslocation provient de trois sources différentes : une extraction médiée par les protéines chaperons, médiée par une polyubiquitination ou médiée par le protéasome.

- Dégradation protéolytique.

La dégradation des substrats de l'ERAD se réalise dans le cytosol par le protéasome. La dégradation des substrats du protéasome est assurée par trois activités protéolytiques : une activité trypsine, chymotrypsine et une activité peptidyl-glytamy I. La reconnaissance du substrat du protéasome est assurée par une protéine liant les chaînes polyubiquitine (Lam *et al.* 2007).

Pour revue voir Vembar and Brodsky 2009

Deux mécanismes adaptatifs principaux sont mis en place par la cellule pour répondre à ces perturbations au niveau du RE : (1) l'augmentation de la capacité de sécrétion du RE (induction de protéines chaperons du RE, de la taille du compartiment...) (2) la diminution de la charge protéique du RE, qui passe par une diminution de la synthèse protéique. L'induction de la machinerie de dégradation associée au RE (ERAD) - **Voir Encadré 1** - est également observée dans la réponse au stress du RE. Ces mécanismes d'adaptation au stress du RE sont en grande partie régulés par la voie de réponse dite « UPR » (unfolded response pathway). Cependant, d'autres voies de réponses sont également activées lors d'un stress RE. Ainsi, la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) Slt2 est activée par le stress du RE (tunicamycine, hypoxie...) (Chen and Thorner, 2007; Chen et al., 2005). Peu étudiée, cette voie est cependant cruciale pour assurer la survie de la cellule au stress RE.

1. Réponse UPR

a) Activation de la voie UPR

Chez *S. cerevisiae*, la réponse UPR est initiée par le senseur Ire1, une protéine kinase transmembranaire du RE (Cox et al., 1993; Mori et al., 1996). Ire1 comporte dans sa portion cytoplasmique un domaine endoribonucléase et un domaine kinase. Dans sa portion luminale, Ire1 possède un domaine permettant la dimérisation de la protéine (Tirasophon et al., 1998; Wang et al., 1998). La protéine chaperon Kar2 lie la partie luminale d'Ire1, maintenant ainsi cette dernière inactive.

L'accumulation de protéines mal repliées dans le lumen promeut la dimérisation d'Ire1, soit par interaction directe de cette dernière avec les protéines mal repliées (Credle et al., 2005; Pincus et al., 2010), soit par dissociation de l'interaction entre Ire1 et Kar2 (Bertolotti et al., 2000; Kimata et al., 2004; Okamura et al., 2000; Shamu and Walter, 1996). La dimérisation d'Ire1 permet la trans-autophosphorylation de cette dernière par le domaine kinase cytosolique, et l'activation de l'activité nucléase d'Ire1 (Liu et al., 2002; Shamu and Walter, 1996). La phosphorylation d'Ire1 n'est cependant pas nécessaire pour l'activation de la fonction RNase (Papa et al., 2003). Le substrat de l'activité RNase est l'ARNm codant le facteur de transcription Hac1 (Nikawa et al., 1996; Nojima et al., 1994). L'activation d'Ire1 permet l'épissage non conventionnel d'un intron de 252pb à l'extrémité 3' de l'ARNm de *HAC1*, libérant deux exons re-ligués par une tARN ligase (Rgl1/Trl1) (Sidrauski et al., 1996).

Cet épissage de l'ARNm de *HAC1* a pour effet d'éliminer un atténuateur traductionnel présent en 3' de l'ARNm, et de permettre la traduction du messenger *HAC1* (Rüegsegger et al., 2001).

b) Cibles de la voie UPR

Le facteur de transcription Hac1 reconnaît une séquence promotrice UPR (Unfolded protein response Element) (Kohno et al., 1993; Mori et al., 1996), et permet ainsi l'activation de la transcription d'environ 400 gènes chez la levure (Travers et al., 2000), dont de nombreuses protéines chaperons du RE, la machinerie de repliement oxydatif (Ero1, PDI), et également celle de l'ERAD et de la biosynthèse lipidique (Cox et al., 1997; Travers et al., 2000).

Les gènes cibles de la voie UPR sont nombreux, et leur expression est dépendante de la perturbation du RE étudié, ce qui suggère l'existence de co-régulateurs de l'UPR. De plus, environ un tiers des promoteurs UPR sont activés lors d'un stress RE de façon indépendante de la voie Hac1/Ire1 (Shamu and Walter, 1996; Travers et al., 2000). Une étude suggère l'intervention du facteur Sin4 dans l'activation de la transcription de gènes de l'UPR par une stimulation directe de l'activité de la polymérase II, indépendante de l'axe Ire1-Hac1 (Schröder et al., 2003).

- **Taille du RE**

La taille et la forme du RE peuvent varier au cours du cycle cellulaire (Federovitch et al., 2005). Ainsi, chez les cellules de mammifères, la différenciation de lymphocytes en cellules actives sécrétant de grandes quantités d'anticorps requiert l'expansion importante de leur RE (Wiest et al., 1990). De la même façon, chez la levure, lors d'un stress RE, une notable expansion du RE est observée. Cette expansion qui nécessite l'activation de la synthèse lipidique par la voie UPR passe par la néosynthèse de feuillettes du RE périphérique. Ce mécanisme cellulaire semble en lui-même permettre la diminution du stress RE (Schuck et al., 2009), peut-être en évitant l'agrégation de protéines mal repliées par simple dilution.

- **État redox du RE**

S'il semble évident que le DTT provoque un stress RE, par la réduction de l'état redox du RE qu'il impose, il est intéressant de noter que d'autres stress du RE, comme la tunicamycine, la déplétion en inositol, ou l'augmentation de la charge sécrétoire, provoquent aussi une réduction de l'état redox du RE (Merksamer et al., 2008). Ces résultats suggèrent un lien entre

homéostasie redox du RE, machinerie de repliement oxydatif et la voie de contrôle qualité du RE. À l'état basal, les mutants de la voie UPR ($\Delta ire1$ et $\Delta hac1$) présentent un état redox du RE semblable à celui d'une souche sauvage, mais un stress RE provoque une réduction du RE plus intense et plus prolongée chez ces mutants (Merksamer et al., 2008).

c) *Retour à l'homéostasie*

L'activité des protéines codées par les gènes de la voie UPR permet la résolution du stress RE en augmentant les capacités de sécrétion de la cellule. Cependant, le retour à une situation homéostatique nécessite l'inactivation d'Ire1. Le domaine kinase cytosolique d'Ire1 permet l'atténuation de l'activité exonucléase lorsque le stress RE est résolu (Chawla et al., 2011; Rubio et al., 2011). Les mutants exprimant Ire1 n'ayant pas d'activité kinase sont capables d'activer leur activité RNase, de cliver l'ARNm d'*HAC1*, et d'induire les cibles de la voie UPR comme une souche sauvage. Cependant, l'inactivation d'Ire1 après la résolution du stress semble impossible chez ces mutants. Ce défaut d'inactivation de l'activité d'Ire1 provoque un stress RE chronique chez ces mutants et une survie diminuée face au stress RE (Rubio et al., 2011).

Il est important de noter que la réponse UPR peut être détectée en l'absence de tout stress (Kuhn et al., 2001; Schröder et al., 2000), cette réponse UPR basale permettant notamment une régulation de la capacité de sécrétion de la cellule en fonction de la disponibilité en nutriments du milieu.

Chez les mammifères, il est possible de diviser la réponse au stress RE en trois grandes phases : (1) l'adaptation, qui passe notamment par l'activation de la voie UPR, une diminution de la charge sécrétoire, une induction des protéines chaperons résidentes du RE et des composants de l'ERAD. Cette réponse peut permettre un retour à l'homéostasie et une fin de stress RE. Cependant, dans le cas d'un stress prolongé, (2) une étape d'alarme est alors mise en jeu (Tabas and Ron, 2011). Lors de cette étape, la cellule passe d'un état pro-survie à un état pro-apoptotique. (3) Enfin, l'apoptose met en jeu une voie de mort cellulaire mitochondriale classique (Oakes et al., 2003).

Chez la levure, une relation entre stress RE et mort cellulaire programmée est également observée, ce qui sera détaillé dans les paragraphes suivants.

2. Stress RE et mort cellulaire

(1) Mort cellulaire programmée et ER stress

La mort cellulaire programmée chez la levure a été mise en évidence en 2002 par l'équipe de Madeo. Aujourd'hui, de nombreuses études démontrent l'induction chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* d'une mort cellulaire programmée en réponse à certains stress. Ainsi, des homologues des protéines mammifères impliquées dans la mort cellulaire ont été identifiées chez la levure, en particulier la métacaspase Yca1 (Madeo et al., 2002), Aif1 (Wissing et al., 2004) et l'endonucléase Nuc1 (Büttner et al., 2007).

Bien que la majorité des études s'intéressent au rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire programmée chez la levure, quelques études montrent un lien majeur entre mort cellulaire programmée et stress du RE.

- **Caractéristiques de la mort cellulaire programmée liée au stress RE chez la levure**

Une perturbation de la fonction de sécrétion du RE (e.g. la tunicamycine, le DTT), de synthèse lipidique (déplétion en inositol), ou de l'homéostasie calcique du RE (déplétion en calcium) induit la mort cellulaire chez *S. cerevisiae*.

Guerin et collaborateurs ont été les premiers à montrer la présence d'un phénomène de mort cellulaire programmée induite chez *S. pombe* lors d'un stress du RE provoqué par la déplétion en inositol. Cette étude montre le rôle de d'une caspase *pca1*, de la calnexine *cxn1* et de la voie UPR dans cette voie de mort cellulaire programmée (Guérin et al., 2008).

- **Identification de trois voies de mort cellulaire programmées liées au RE**

La mort cellulaire associée au stress RE a principalement été étudiée dans le cadre de l'inhibition de la N-glycosylation par la tunicamycine. Trois types de voies de mort cellulaire programmé ont été mis en évidence chez *S. cerevisiae*.

Hauptmann et collaborateurs rapportent l'existence d'une mort cellulaire de type apoptotique associée au défaut de glycosylation dans le RE. Les cellules présentent une condensation du noyau, une fragmentation de leur ADN, un pic de production de ROS et la mise en jeu d'une

activité caspase, caractéristiques d'une mort apoptotique (Hauptmann et al., 2006). Cette voie de mort cellulaire met en jeu une protéase du golgi, Kex1, et l'inactivation du gène codant cette protéase conduit à une diminution de l'activité caspase et de la production de ROS en réponse à la tunicamycine (Hauptmann and Lehle, 2008). Ce type de mort cellulaire est cependant uniquement présent chez des cellules cultivées en milieu YPD, pauvre en osmolytes. L'ajout d'osmoprotecteurs dans le milieu diminue l'occurrence de ce type de mort cellulaire, ce qui suggère une mort par lyse des cellules (Dudgeon et al., 2008). La typologie de la mort cellulaire est cependant critiquée dans des études postérieures se basant sur des méthodes plus poussées d'analyse, et révélant une absence de fragmentation de la chromatine et d'externalisation de la phosphatidyl sérine (Dudgeon et al., 2008).

En milieu synthétique, deux types de morts cellulaires liées à un stress du RE ont été rapportées, toutes deux précédées d'une accumulation de ROS, sans aucun autre stigmate caractéristique de l'apoptose.

Le premier type de mort cellulaire est observé en présence de concentrations élevées des phéromones de la reproduction. Dans ce cas, l'accumulation de ROS et la mort cellulaire associée sont indépendantes de l'activité mitochondriale. La mort cellulaire est dépendante du transporteur plasmique du Ca^{2+} à basse affinité Fig1 (Muller et al., 2001; Zhang et al., 2006). La mort cellulaire serait liée ici à une destruction de la paroi cellulaire, partiellement dégradée lors de la reproduction (Erdman et al., 1998).

Un autre type de mort cellulaire est observée en réponse à l'exposition aux phéromones de la reproduction, à la tunicamycine et au DTT (Kim et al., 2012). L'accumulation de ROS visible avant la mort cellulaire est dépendante de la respiration mitochondriale. La mort cellulaire repose ici sur l'activité d'une V-ATPase vacuolaire, responsable de l'acidification de la vacuole et de sa perméabilisation. Cette mort cellulaire de type nécrotique est inhibée par l'activation de la MAPK Slt2, de l'activité du transporteur calcique à haute affinité Cch1, de la voie de la calcineurine (Bonilla and Cunningham, 2003) et est stimulée par Hsp90, une protéine chaperon cellulaire majeure (Dudgeon et al., 2008).

(2) ERSU et arrêt du cycle cellulaire

Chez *S. cerevisiae*, le RE cortical (cRE) est transmis de la cellule mère à la cellule fille lors de la division cellulaire. Chez cet organisme, le stress du RE active une voie de surveillance (ERSU : ER stress surveillance pathway), contrôlée par la MAP kinase Slt2, mais

indépendante de l'UPR, provoquant un retard de cytokinèse et prévenant la transmission cRE de la cellule mère à la fille. Dans des conditions de stress du RE chronique, la cellule fille meurt par défaut d'acquisition du RE (Babour et al., 2010).

Le retard de transmission du cRE de la cellule mère à la cellule fille conduit à un délai de progression du cycle cellulaire en phase G2 lié à l'activation de Swe1, une protéine kinase inhibant la kinase cycline-dépendante Cdc28 (Loewen et al., 2007 JBC) (Mizunuma et al., 1998). En croissance, l'activité de Swe1 est réprimée par différents mécanismes (Ma et al., 1996; Tanaka and Nojima, 1996) (Russell et al., 1989). Cependant, cette répression est levée lors du stress du RE, en lien avec l'activation de la voie Slt2 MAPK, et d'autres facteurs indéterminés. En effet, d'autres études suggèrent que l'arrêt du cycle cellulaire au cours du stress du RE et dépendant de Swe1, est partiellement indépendant de Slt2 (Bonilla and Cunningham, 2003).

Box 2 : Le système thioredoxine

Chez *S. cerevisiae*, le système thioredoxine se compose de deux acteurs : les thioredoxines (Trx) qui catalysent la réduction des résidus cystéines des protéines cibles, et la thioredoxine réductase (Trr) qui permet la régénération des thioredoxines oxydées en thioredoxines réduites grâce à l'oxydation de NADPH. Il existe deux systèmes distincts chez *S. cerevisiae*, un présent dans le cytosol (Trx1, Trx2 et Trr1) et un présent dans la matrice mitochondriale (trx3 et Trr2) (Pedrajas et al. 1999, Williams 1976).

- Thioredoxines

Les thioredoxines sont de petites oxydoréductases à thiol très conservées au cours de l'évolution. Elles sont caractérisées par un motif dit « Thioredoxin fold », (Collet and Messens, 2010). Les thioredoxines réalisent une réduction des résidus Cys cible grâce au mécanisme d'échange de ponts disulfures, catalysé par leur motif catalytique CXXC.

- Thioredoxine réductase

La thioredoxine réductase est une oxydoréductase très conservée dans les différents domaines du vivant. Cette enzyme a été pour la première fois purifiée à cause de sa capacité à réduire une thioredoxine peroxydase en présence de thioredoxines (Chae *et al.* 1994) Elle porte deux domaines structuraux dits « Rossman fold », qui sont classiquement présents dans les protéines liant des nucléotides et notamment le cofacteur NAD. Ce « Rossman fold » est constitué de 6 feuillets β parallèles et 4 hélices α . L'un des domaines « Rossman fold » de la thioredoxine réductase lie le cofacteur FAD, et le second lie le NADPH (Williams *et al.* 1992). Trr1 porte de plus deux résidus Cys catalytiques Cys 142 et Cys 145, présents dans un motif CXXC.

- Rôles physiologique du système Thioredoxine

Dans le cytosol, le système thioredoxine a un rôle majeur dans le contrôle thiol-redox. Il assure ainsi la réduction d'enzymes cellulaires cruciales. Ainsi la délétion Δ TRX1 Δ TRX2 est viable mais affecte le cycle cellulaire, en présentant une phase S très longue et un intervalle G1 très court. Une des hypothèses expliquant ce phénotype est le rôle des Trx dans la réduction de la RNR (ribonucléotide réductase), enzyme clef de la synthèse d'ADN.

Ces mutants sont également défectueux dans l'assimilation du sulfate, du fait du rôle de réductase pour la 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate réductase qui convertit le 3phosphoadenosine 5phosphosulfate (PAPS) en sulfite (Muller 1991). De plus une délétion de Δ TTRR1 provoque une auxotrophie pour la méthionine (Machado *et al.* 1997, Pearson and Merrill, 1998).

Ce système a aussi un rôle majeur dans le **contrôle thiol-redox de protéines régulatrices**. Ainsi une délétion Δ TTRR1 affecte également le cycle cellulaire, notamment au niveau de la transcription des gènes régulés lors du passage de la phase G1 à S (Machado *et al.* 1997). De plus, une telle délétion affecte l'activité de la protéine p53 (tumor suppresser gene) chez la levure (Pearson and Merrill 1998).

Ce système joue également un rôle dans la **protection et la régulation de la réponse au stress oxydant** provoqué par les peroxides, arsenate ou peroxy-nitrate. Les mutants Δ TRX2 ou Δ TTRR1 sont ainsi sensibles au peroxyde d'hydrogène (Kuge and Jones 1994) mais résistants au diamide, oxydant des groupements thiols (Muller 1996).

Ce système absent de l'IMS et du RE, est toutefois présent dans la matrice mitochondriale (Pedrajas *et al.* 1999).

[Pour revue voir Collet and Messens, 2010 ; Chae *et al.* 1994]

III. Le système du glutathion : homéostasie et compartimentation

Il existe deux voies de contrôle de l'état redox du résidu cystéines dans la cellule : les systèmes de la thiorédoxine et du glutathion. Ces deux voies indépendantes sont très conservées, depuis les procaryotes jusqu'aux mammifères.

Ces deux systèmes ont une organisation fonctionnelle quasi-identique : la réduction des ponts disulfures est assurée par échange thiol-disulfure par une oxidoréductase terminale (la thiorédoxine ou la glutarédoxine). La thiorédoxine est recyclée dans sa forme réduite par la thiorédoxine réductase, une flavoprotéine utilisant le NADPH comme pouvoir réducteur. La glutarédoxine est quant à elle réduite par le GSH. Le GSH oxydé (GSSG) est enfin réduit par la glutathione réductase, une flavoprotéine utilisant également le NADPH comme pouvoir réducteur.

Chez *S. cerevisiae*, ces deux systèmes ne sont pas redondants, ayant chacun des rôles cellulaires distincts et souvent spécifiques de compartiments (Toledano et al., 2007). Dans ce chapitre, nous considérerons chez *S. cerevisiae* le système du glutathion, ses rôles physiologiques et sa régulation. Le système de la thiorédoxine est abordé dans **l'encadré n°2**.

A. Le système du glutathion

Chez *S. cerevisiae*, le système du glutathion comporte, outre le GSH, deux glutarédoxines dithiol, Grx1 et Grx2, et une glutathione réductase, Glr1. Grx2 et Glr1 sont exprimés dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale, alors que Grx1 n'est que cytosolique (Outten and Culotta, 2004; Pedrajas et al., 2002; Porras et al., 2006). Il existe aussi cinq glutarédoxines monothiols, Grx3 et Grx4 exprimées dans le cytosol, Grx5 dans la matrice mitochondriale, Grx6 et Grx7 dans l'appareil de Golgi, et enfin Grx8, une enzyme assimilée aux Grxs et dont l'activité et le rôle sont encore peu connus (Eckers et al., 2009; Herrero et al., 2006; Mesecke et al., 2008). À l'exception de Grx6 et Grx7, le rôle des glutarédoxines monothiols est essentiellement lié au métabolisme du fer (Rouhier et al., 2010), et elles ne seront donc pas abordées ici.

Les différents acteurs du système du glutathion sont représentés **figure 8**.

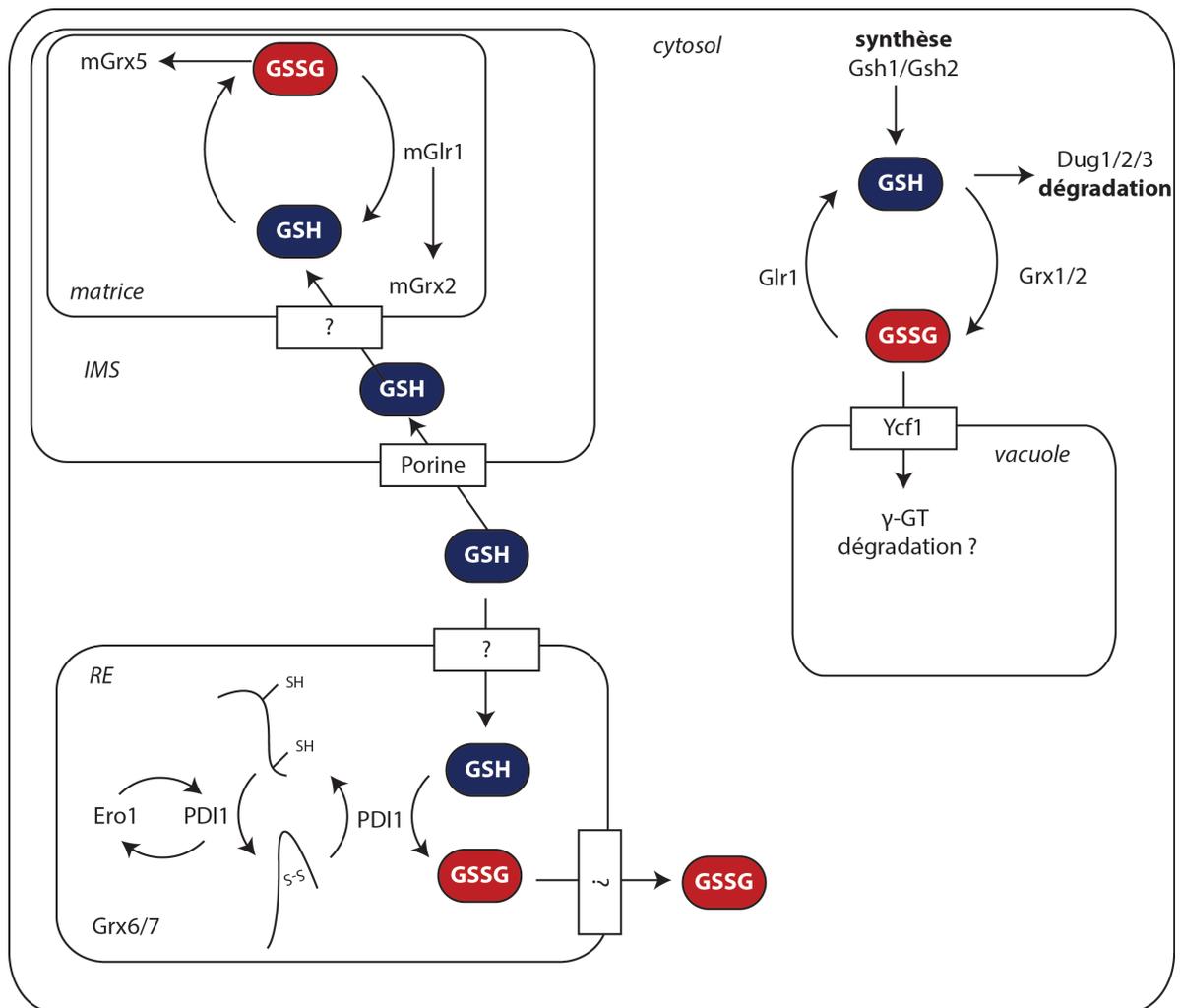


Figure 8 : Distribution des acteurs du système du glutathion dans la cellule eucaryote.

Le cytosol contient le système du glutathion complet. Le GSH est synthétisé par l'action de la γ -glutamyl synthase (Gsh1) et de la GSH synthase (Gsh2), et est dégradé par la voie Dug1/2/3. Dans le RE et l'IMS la voie du glutathion est très restreinte. Hormis la présence de glutathion, hormis la présence des Grx6 et 7 dans le RE. Dans le RE, la machinerie de repliement oxydatif Ero1-PDI permet la génération de GSSG. Dans ces deux compartiments, le GSH est apporté par un import de GSH et un export de GSSG non défini. Le GSSG cytosolique est rapidement réduit par la Glr1 ou séquestré dans la vacuole par l'ABC transporteur Ycf1. Dans la vacuole, le devenir du GSSG n'est pas clairement établi. La matrice mitochondriale est un compartiment presque indépendant du cytosol pour son homéostasie redox. Elle dépend toutefois d'un import de GSH uniquement dans le cytosol.

Abréviations utilisées : RE = Reticulum endoplasmique ; IMS = mitochondrial intermembrane space ; γ -GT = γ -glutamyl transpeptidase.

1. Le glutathion

a) Synthèse du glutathion

Le glutathion est un tripeptide comprenant glutamate, cystéine et glycine. Il est synthétisé par l'action de deux enzymes, la glutamyl-cystéinyl synthétase (codée par le gène *GSH1*) qui catalyse la condensation de la L-cystéine et du L-glutamate en position γ du carbone du glutamate, puis de la glutathion synthétase (codée par le gène *GSH2*) qui permet la condensation du résidu glycine en position N-terminale de la cystéine (Mooz and Meister, 1967). Gsh1 est très conservée dans tous le domaine du vivant. Cette enzyme est soumise chez les mammifères à un rétrocontrôle négatif par le produit de la réaction, le GSH, selon un mécanisme d'inhibition compétitif (Meister, 1995). L'importance physiologique de ce rétrocontrôle n'est pourtant pas clairement établie chez la levure.

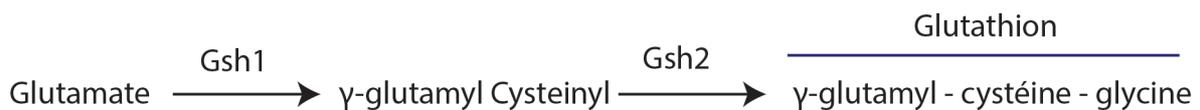


Figure 9 : Biosynthèse du GSH chez *S. cerevisiae*.

Le GSH est synthétisé via deux étapes ATP-dépendantes. Lors de la première étape, la γ -glutamyl synthase (Gsh1) catalyse la formation d'un dipeptide : le γ -glutamyl-cystéine. Dans la seconde étape, la GSH synthase (Gsh2), catalyse la ligation avec un résidu glycine.

b) Dégradation du glutathion

Le glutathion n'est dégradé que lorsqu'il est dans sa forme réduite, GSH. Différentes voies de dégradation du GSH sont aujourd'hui connues.

(1) Le cycle γ -glutamyl

Dans le cycle γ -glutamyl, la dégradation est initiée de façon extracellulaire par l'action de la γ -glutamyl transpeptidase exprimée à la membrane plasmique, qui clive le GSH en cysteinylglycine (Cys-Gly) et glutamate. Le glutamate et la cysteinylglycine sont réimportés dans la cellule ou la cysteinylglycine est clivée par une dipeptidase.

L'étude du système du glutathion chez la levure a remis en cause la notion d'un turnover très lent du glutathion par le cycle γ -glutamyl établie chez les mammifères (Jaspers et al., 1985). En effet, les données de métabolomique ont permis de montrer que chez la levure le turnover rapide du GSH est en fait très rapide (Baudouin-Cornu et al., 2012).

Chez *S. cerevisiae* l'inactivation du gène codant la γ -glutamyl transpeptidase ne prévient pas la dégradation du GSH. En effet, ce mutant de levure reste capable d'utiliser le GSH comme source de soufre (Kumar et al., 2003).

(2) Le système Dug

Une autre voie de dégradation du GSH chez la levure, la voie Dug, fut identifiée lors d'un crible génétique ciblant des mutants incapables d'utiliser le GSH comme source de soufre (Ganguli et al., 2007). Le système de dégradation Dug comporte trois enzymes Dug1, Dug2 et Dug3, et permet la dégradation du GSH dans le cytosol (Ganguli et al., 2007). Ce système semble prépondérant chez la levure, puisque l'inactivation de l'un des trois gènes de ce système rend la cellule incapable d'utiliser le GSH comme source de soufre.

Dug2 et Dug3 catalysent le clivage du lien γ -glutamyl entre le glutamate et la cystéine et Dug1 assure le clivage du peptide Cys-Gly généré (Kaur et al., 2009).

(3) ChaC1

Récemment, une nouvelle famille d'enzyme ChaC a été identifiée chez les mammifères. ChaC1 et son homologue chez la levure codé par YER163c sont localisés dans le cytosol (Mungrue et al., 2009). Les enzymes de la famille ChaC contiennent un repliement caractéristique des γ -glutamyl cyclotransferase (γ -GCT). Les données *in vivo* chez la levure et *in vitro* montrent que l'activité de ChaC1 permet le clivage de la liaison γ -glutamyl du glutathion. La surexpression de ChaC1 murin chez la levure conduit à une forte déplétion en glutathion (Kumar et al., 2012).

c) Fonctions redox du GSH

La fonction enzymatique principale du GSH dans le cytosol est de réduire la glutarédoxine oxydée. Cependant, le GSH peut aussi réduire directement d'autres formes d'oxydation du résidu Cys, en particulier la forme acide sulfénique (-SOH) en se condensant avec ce dernier, ce qui conduit à la formation d'un pont intermoléculaire entre les deux entités ou S-

glutathionylation. La forme S-glutathionylée du GSH est ensuite réduite par la glutarédoxine, ce qui recycle les Cys du substrat et du GSH dans leur forme réduite -SH. La S-glutathionylation protège le substrat d'une oxydation irréversible dans les formes Cys-SO₂H (sulfinylation) ou Cys-SO₃H (sulfonation) (Grant et al., 1999; Shelton and Mieyal, 2008). La S-glutathionylation des protéines est également considérée comme une modification post-traductionnelle régulant l'activité de certaines protéines comme la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la protéine tyrosine phosphatase 1B, c-Jun, la sous-unité p50 de NFκB, la caspase-3, and Ras (Grant et al., 1999). Chez la levure, la S-glutathionylation des protéines semblerait importante comme moyen de protection des thiols au cours de la réponse au stress H₂O₂, (Grant et al., 1999; Shenton and Grant, 2003; Spector et al., 2001). Le rôle et l'importance de la S-glutathionylation restent néanmoins controversés, puisque d'autres études concluent à une importance minimale de ce phénomène chez la levure (Le Moan et al., 2006) et l'Homme (Hansen et al., 2009).

2. Glutathion réductase

Dans le cytosol, la régénération du GSH à partir de GSSG est réalisée par la glutathion réductase, flavoprotéine qui utilise des électrons provenant du NADPH pour effectuer cette réduction (Muller, 1996). En l'absence de la Glr1, ce rôle peut être assuré par la *trx2* et la *Trr1* (Tan et al., 2010) et par la glutarédoxine *grx2* (Morgan et al., 2013). Cependant, l'inactivation de la GSH réductase conduit à une accumulation cellulaire importante de GSSG (Muller, 1996), ce qui suggère fortement que Glr1 est l'enzyme prépondérante dans la réduction de GSSG, les autres enzymes n'intervenant qu'en cas de défaut de Glr1.

3. Les glutarédoxines

Les glutarédoxines dithiols sont des oxydoréductases proches structuralement et fonctionnellement des thiorédoxines, et dont la fonction enzymatique est de réduire les ponts disulfures par échange thiol-disulfure grâce à leur site catalytique Cys-Pro-Tyr-Cys.

Leur mécanisme d'action est identique à celui des thiorédoxines : dans un premier temps, le résidu Cys le plus N-terminal procède à une attaque nucléophile sur l'une des deux résidus Cys impliqués dans le pont disulfure, conduisant à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire. Ce pont est ensuite attaqué par le second résidu Cys de la glutarédoxine, transposant le pont intermoléculaire en un pont intramoléculaire. Ce dernier est réduit par le GSH, avec formation d'un pont disulfure entre le résidu Cys le plus N-terminal du domaine

catalytique de la glutarédoxine et le GSH, ensuite réduit par une seconde molécule de GSH, libérant ainsi une molécule de GSSG et la glutarédoxine sous forme réduite (Yang and Wells, 1991).

Comme nous l'avons vu plus haut, la glutarédoxine catalyse également la réaction de glutathionylation, activité qui nécessite uniquement le concours du résidu Cys N-terminal du domaine catalytique. Lors de cette réduction, la glutarédoxine formera un pont disulfure avec le GSH, secondairement réduit par une deuxième molécule de GSH, libérant la Grx réduite et du GSSG (Bushweller et al., 1992).

B. Compartmentation du système du glutathion

Les fonctions physiologiques du système du glutathion ne sont encore que très peu élucidées, et ne peuvent être abordées sans avoir préalablement considéré sa distribution cellulaire.

Nous avons déjà vu que le cytosol est le siège de la synthèse et de la dégradation du GSH. Cependant, le GSH est présent dans tous les compartiments de la cellule eucaryote, RE, IMS, peroxyosomes, vacuoles (le noyau sera ici assimilé au cytosol). Nous avons vu aussi que les deux Grxs dithiols, Grx1 et Grx2, ainsi que la Glr1 sont présentes dans le cytosol, et, à l'exception de Grx1, également présentes dans la mitochondrie. Ainsi le cytosol et la matrice mitochondriale sont les seuls compartiments comportant un système du GSH complet (GSH, Grx, Glr).

L'introduction récente de biosenseurs redox s'équilibrant spécifiquement avec le couple du glutathion, les sondes rxYFPs et roGFPs (voir paragraphe V), ont montré qu'il existait une grande disparité de l'état redox du GSH entre les différents compartiments de la cellule eucaryote (**Voir Table 1**). Cette disparité de l'état redox entre compartiments est le reflet probable de différences parfois très importantes dans l'activité redox du GSH, encore très incomplètement élucidées, et suggère l'existence de systèmes de transports et de régulation permettant de maintenir ces différences.

Dans un premier temps, les acteurs permettant l'homéostasie redox du glutathion dans les différents compartiments cellulaires seront abordés. Puis les rôles du glutathion dans la cellule seront explorés en prenant en compte cette compartmentation du glutathion.

compartiment	sonde	Valeur (référence)
Cytosol	rxYFP	-284 mV (Dardalhon et al., 2012), -291± 3 mV (Hu et al., 2008), -289 mV (Østergaard et al., 2004)
	roGFP2	-349± 3 mV (Ayer et al., 2012)
	Grx1-roGFP2	-306 mV (Kojer et al., 2015)
	roGFP2-Grx1	-320 mV (Morgan et al., 2013)
ER	rxYFP	-236 mV (Delic et al., 2010)
IMS	rxYFP	255 ± 3 mV (Hu et al., 2008)
	Grx1-roGFP2	-301 ± 5 mV (Kojer et al., 2015)
Matrice mitochondriale	rxYFP	-296± 5 mV (Hu et al., 2008)
	roGFP2	-357 ± 3 mV (Ayer et al., 2013)
	Grx1-roGFP2	-301 ± 3 mV (Kojer et al., 2015)
noyau	rxYFP	-291 mV (Dardalhon et al., 2012)
peroxysome	roGFP2	-342± 4 mV (Ayer et al., 2013)
	Grx1-roGFP2	-380 mV (Elbaz-Alon et al., 2014)

Table 1 : Mesures de l'état redox du glutathion chez *S. cerevisiae* dans la littérature

Cette table récapitule les différentes mesures de l'état redox du glutathion chez *S. cerevisiae* dans la littérature à ce jour. Les mesures sont classées par compartiment considéré et prennent note de la sonde utilisée.

1. Maintenance de l'homéostasie intracellulaire du glutathion

a) Le cytosol : maintenance d'un état redox très réduit

L'avènement des senseurs redox a permis la mesure dans les différents compartiments de l'état redox du glutathion. Dans le cytosol, ces sondes enregistrent un état redox extrêmement réducteur (**voir Table 1**).

L'homéostasie redox du glutathion dans ce compartiment repose donc sur un système permettant le maintien de cet environnement réducteur, qui sera abordé dans un premier temps.

Le cytosol est le compartiment cellulaire le plus volumineux. Également siège de la synthèse du glutathion, les systèmes permettant un contrôle de la concentration absolue en glutathion dans ce compartiment sont eux aussi cruciaux pour comprendre l'homéostasie redox cellulaire. Ces systèmes seront abordés dans un second temps.

(1) L'état redox du cytosol est maintenu réduit par la réduction et séquestration du GSSG

La grande majorité des études menées sur l'homéostasie redox du glutathion s'appuyaient sur des mesures du glutathion cellulaire total, approche n'apportant aucune information quant à la compartimentation du glutathion. Les données de glutathion total cellulaire sont souvent assimilées à celles du glutathion cytosolique, le compartiment le plus volumineux. Cependant, si ces mesures en glutathion total suggèrent un ratio cellulaire GSH : GSSG de 30-100 : 1 chez une cellule sauvage (Muller, 1996), les mesures utilisant les sondes redox suggèrent au contraire un ratio d'environ 50000:1 dans le cytosol (Gutscher et al., 2008; Østergaard et al., 2004).

Cherchant à expliquer cette différence, en 2013, Morgan *et al.* montrent que le transporteur Ycf1 présent à la membrane de la vacuole (Morgan et al., 2013) est capable de transporter du GSSG non complexé de façon spécifique. Des études antérieures montrent qu'un traitement H₂O₂, provoquant une accumulation de GSSG dans la cellule, ne cause pas pour autant une oxydation du glutathion cytosolique. Morgan et collaborateurs montrent en effet, que le GSSG produit dans le cytosol suite à un stress oxydant est importé dans la vacuole par le transporteur Ycf1. *S. cerevisiae* possède deux transporteurs ABC vacuolaires de la famille des « Multidrug Resistance Proteins » (MRP) capables de transporter le glutathion : le yeast cadmium factor-1 (Ycf1) et du bile pigment transporter-1 (Bpt1). Ces transporteurs permettent l'accumulation dans la vacuole des conjugués du glutathion (Li et al., 1996; Sharma et al., 2003), mais seul Ycf1 est capable de transporter le GSSG.

Le système Ycf1 permet donc une séquestration vacuolaire du GSSG. Dans le cytosol, la glutathion réductase Glr1, et accessoirement Trx2 et la Grx2, complètent ce système en

réduisant le GSSG en GSH dans le cytosol assurant le caractère réducteur de ce compartiment (Morgan et al., 2013). Le devenir du GSSG vacuolaire n'est pas connu.

(2) Import et export du glutathion dans le cytosol

(a) *HGT1*

Chez les procaryotes comme les eucaryotes, le transport de peptides est un processus actif ATP-dépendant, indépendant du transport d'acide aminé. Chez les mammifères, les plantes et les levures, le transport des peptides est H⁻ dépendant ou Na⁺ dépendant. Il existe plusieurs familles de transporteurs de peptides, dont les transporteurs de de la famille des OPT et celle des MFS (major facilitator subfamily).

Les transporteurs de la famille OPT sont présents chez les champignons, les eubactéries et Archées et les plantes. Cependant aucun transporteur de cette famille n'a été identifié chez les métazoaires autres que les plantes (Yen et al., 2001). La famille OPT se divise en deux sous-groupes : les PT (peptide transport) qui transportent oligopeptides et glutathion et les YS (Yellow sStrip) qui transportent des conjugués métaux-acides aminés (Lubkowitz, 2006). *S. cerevisiae*, comme la plupart des levures et des plantes, possède plusieurs membres de la famille OPT : Hgt1 (Opt1) et Opt2 sont des PT, alors que YGL114W (Opt3) est une YS.

HGT1 (High affinity Glutathione Transporter) est localisé à la membrane plasmatique, et est le seul transporteur de glutathion cellulaire chez la levure. Ainsi la double mutation $\Delta gsh1\Delta hgt1$ est létale chez *S. cerevisiae*, puisque ce mutant ne peut ni importer le GSH, ni le synthétiser (Bourbouloux et al., 2000). HGT1 transporte le GSH et le GSSG avec haute affinité ($K_m \sim 50\mu M$) ainsi que d'autres peptides tels que la methionine enkephalin (Tyr-Gly-Gly-phe-Met), avec une affinité moindre (Bourbouloux et al., 2000). Très faiblement exprimé chez une cellule sauvage, l'expression de ce transporteur est augmentée en conditions de carences soufrées.

(b) *Export de glutathion chez S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, trois transporteurs impliqués dans l'export de glutathion ont été identifiés. Gex1 et son paralogue Gex2 sont des antiporteurs proton/glutathion, et leur surexpression conduit à une déplétion de la cellule en glutathion et à une acidification du cytoplasme. Ces transporteurs semblent appartenir au groupe des transporteurs MFS (Dhaoui et al., 2011). En 2012, le transporteur ABC ADP1, renommé GXA1, est décrit chez *S. cerevisiae* comme ayant

un rôle dans l'export de glutathion. De façon identique à GEX1 et GEX2, la surexpression de GXA1 conduit à une accumulation de glutathion dans le milieu de culture (Kiryama et al., 2012).

(3) La concentration totale de glutathion cytosolique est régulée

La concentration totale cellulaire en glutathion, est d'environ 7 à 10mM chez la levure. Cependant certains stress peuvent conduire à une synthèse accrue de GSH. La synthèse de glutathion est sous le contrôle de plusieurs régulateurs transcriptionnels, en réponse à certains stress.

- **Yap1**

Le régulateur Yap1 régule l'expression de la grande majorité des gènes codant le système du glutathion : GSH1, GSH2, GRX1, GRX2, GRX3 et GLR1.

Une activation de la synthèse de GSH par Yap1 est observée en réponse à l'H₂O₂, au diamide, à différents composés électrophiles comme le diethyl maleate, aux métaux lourds (Cd, Pb) ou encore au stress thermique (Azevedo et al., 2003; Delaunay et al., 2000; Sugiyama et al., 2000).

- **Le système Msn2-Msn4**

Msn2-Msn4 régule la synthèse de GSH (GSH1), et de certaines glutarédoxines (GRX1, GRX2, GRX6, GRX7). Une augmentation de la synthèse de glutathion dépendante de Msn2-4 est observée notamment lors de l'exposition aux métaux lourds (ex. cadmium) (Jin et al., 2008).

- **Met4**

Met4 active les gènes de biosynthèse des acides aminés soufrés en réponse à une carence en soufre, dont ceux intervenant dans la synthèse du glutathion (GSH1 et GSH2) et également GRX2, GRX3, et GRX8 (Lee et al., 2010; Thomas and Surdin-Kerjan, 1997; Wheeler et al., 2003).

En retour, le GSH inhibe la transcription dépendante de Met4, et donc celle de ses propres gènes de biosynthèse (Wheeler et al., 2003).

b) *La mitochondrie*

(1) Le contrôle redox du GSH dans la matrice mitochondriale est indépendante de celle du cytosol

Le cytosol et la matrice mitochondriale sont les deux compartiments contenant une voie complète et autonome du glutathion et des thiorédoxines.

Les mutations des gènes codant les systèmes cytosoliques ou mitochondriaux révèlent une indépendance totale du contrôle redox du GSH dans ces deux compartiments (Trotter and Grant, 2005). L'inactivation de Glr1 provoque une accumulation de GSSG dans le cytosol et la matrice mitochondriale, mais l'expression de la forme cytosolique de Glr1 seule dans une souche invalidée pour GLR1 ($\Delta glr1$) ne corrige que l'état redox du GSH dans le cytosol. Au contraire, l'expression seule de la forme matricielle de Glr1 corrige l'état redox du GSH dans la matrice, et n'a qu'un effet mineur dans le cytosol, lié à un adressage mitochondrial de Glr1 incomplet (Hu et al., 2008; Kojer et al., 2012).

Cette indépendance entre matrice mitochondriale et cytosol est également démontrée par l'inactivation de Pos5, une NADH kinase mitochondriale responsable de la production de NADPH à partir du NADH, conduit à une oxydation forte de l'état redox de la matrice, sans aucun effet sur le cytosol (Strand et al., 2003).

(2) L'état redox de l'IMS dépend de celui du cytosol

Contrairement à la matrice mitochondriale, l'état redox du glutathion dans l'IMS est semblable à celui du cytosol (Kojer et al., 2012). De plus, des observations suggèrent une complète dépendance de l'état redox de l'IMS vis-à-vis du cytosol. En effet, l'inactivation de la forme cytosolique de Glr1 conduit à l'oxydation de ce compartiment, et de l'IMS. L'inactivation de Por1, une porine de la membrane externe de la mitochondrie, provoque l'oxydation de l'IMS, et suggère que cette porine importerait le GSH dans l'IMS ou exporterait le GSSG de l'IMS vers le cytosol.

L'inactivation de Pos5, bien qu'elle conduise à une oxydation de la matrice mitochondriale, n'a aucun effet sur l'état redox du glutathion de l'IMS, démontrant encore l'indépendance redox de ces deux compartiments (Kojer et al., 2012).

c) *Le RE*

Comme nous l'avons vu, l'IMS et le RE comportent tous deux un relai redox et, pour permettre le bon fonctionnement de ces systèmes d'oxydation, l'homéostasie redox à l'intérieur de ces compartiments est cruciale.

L'activité d'Ero1 dans le RE provoque une oxydation du GSH en GSSG (Sevier et al., 2007). Cette formation de GSSG dans le RE reflète la réduction de la PDI par le GSH afin d'assurer la réduction des ponts disulfures dans ce compartiment (Cuozzo and Kaiser, 1999; Molteni et al., 2004; Tu et al., 2000). D'autres auteurs suggèrent plutôt une oxydation du GSH dans le RE par le peroxyde d'hydrogène produit par l'oxydase (Haynes et al., 2004).

Dans le RE, aucun système connu ne permet le recyclage du GSSG en GSH. Nous ne connaissons pas non plus les systèmes responsables de l'import et de l'export de GSH vers et hors du RE. Certains auteurs avancent la possibilité d'un import de GSH et un export de GSSG dans ces compartiments. En effet, des études menées chez les mammifères montrent que le GSH et le GSSG sont transportés dans le RE, avec une préférence pour le GSH sur le GSSG (Bánhegyi et al., 1999). De plus, l'existence d'un transport du glutathion dans le RE est également fortement suggérée par l'étude des flux intracellulaire de GSH *in vivo*. (Kumar et al., 2011).

Si l'existence d'un tel transporteur est suggérée, son identité est par contre inconnue. Chez les mammifères, les travaux de Bánhegyi suggèrent un rôle pour le transporteur calcique RyR1 (ryanodine receptor calcium channel type 1) dans le transport de GSH dans le RE (Csala et al., 2001). Cependant aucune preuve définitive pour étayer cette hypothèse n'a jamais été apportée et RyR1 n'existe pas chez la levure.

2. Rôle du glutathion

Par son abondance et ses propriétés redox, le glutathion est considéré classiquement comme un tampon redox de la cellule, une définition qui reste extrêmement difficile à illustrer en termes moléculaires et physiologiques, et qui d'autre part occulte certainement d'autres fonctions du GSH dans la cellule eucaryote.

L'absence de connaissances précises des fonctions du GSH est principalement liée aux obstacles expérimentaux dans l'étude de ce tripeptide redox *in vivo*. Hormis quelques exceptions que nous verrons, les approches biochimiques jusqu'à ce jour se sont cantonnées au dosage du GSH cellulaire total et de son état redox, la petite taille de cette molécule ne permettant ni des approches de biochimie, ni de biologie cellulaire. L'utilisation de biosenseurs redox s'équilibrant avec le couple redox du GSH constitue une avancée expérimentale majeure pour aborder la question du rôle cellulaire du GSH. Celles-ci ont déjà permis d'établir une disparité de l'état redox du GSH d'un compartiment à l'autre, et mettent en lumière l'absence d'information biologique pertinente des dosages de glutathion cellulaires totaux.

a) *La fonction essentielle du GSH est liée à son rôle dans le métabolisme du fer*

Chez *S. cerevisiae*, la délétion du gène *GSH1* ($\Delta gsh1$) n'est pas viable en l'absence d'un apport de GSH exogène (Grant et al., 1996; Spector et al., 2001; Wu and Moye-Rowley, 1994). Au contraire, la délétion d'autres acteurs du système du glutathion comme le gène *GLR1* ou celle simultanée de *GRX1* et *GRX2* sont parfaitement viables, et ne causent aucun phénotype, hormis une accumulation de GSSG en l'absence de Glr1. Pourtant l'invalidation simultanée de *GRX1*, *GRX2*, *GRX3*, *GRX4* et *GRX5* est létale (Grant et al., 1996). Ces résultats indiquent donc que le GSH a une fonction essentielle à la survie cellulaire, et que cette fonction n'est pas partagée avec la voie de la thiorédoxine (Spector et al., 2001). De très faibles quantités de GSH sont suffisantes pour permettre la croissance de la souche $\Delta gsh1$, contredisant l'idée que la fonction essentielle du GSH est liée à son rôle présumé de tampon redox, qui suppose une grande abondance du tripeptide. De plus, ni le dithiothreitol (DTT), ni la croissance en anaérobiose ne permettent de récupérer la viabilité de $\Delta gsh1$, ce qui élimine l'idée d'une fonction du GSH dans la dégradation d'espèces réactives de l'oxygène, ou dans la réduction de certains thiols pour expliquer son rôle essentiel (Spector et al., 2001).

Une analyse transcriptomique de la souche $\Delta gsh1$ après déplétion en GSH a permis de mettre en évidence une forte altération du métabolisme du fer, caractérisée notamment par l'activation du régulon Aft1/Aft2 contrôlant l'import de fer et son trafic intracellulaire (Kumar et al., 2011). Dans cette souche déplétée, l'activation d'Aft1/2 est liée à un défaut majeur de maturation des protéines cytosoliques essentielles portant un centre Fe-S (Kumar et al., 2011; Sipos et al., 2002). De plus, la croissance de la souche $\Delta gsh1$ est partiellement

restaurée en présence de fer exogène. Ces éléments suggèrent que la fonction essentielle du GSH est liée à son rôle dans le métabolisme du fer. Cette fonction est, également partagée avec Grx3 et Grx4, et serait donc centrale dans l'assemblage des protéines à centre Fe-S, et à toutes les protéines incorporant le fer, comme la ribonucléotide réductase (Mühlenhoff et al., 2010).

La fonction essentielle du GSH dans le métabolisme du fer, occulte ses autres rôles, du fait de la mort cellulaire rapide observée en conditions de déplétion. Un rôle majeur du GSH dans l'assemblage des centres Fe-S au sein de la matrice mitochondriale est également fortement suggéré.

b) Le rôle physiologique du GSH dans le RE est controversé

Nous avons vu précédemment qu'une régulation de l'état redox de la PDI et d'Ero1 est critique pour la formation des ponts disulfures natifs sur les protéines sécrétés. L'importance de l'homéostasie redox dans ce compartiment a permis d'émettre l'hypothèse d'un contrôle redox de la sécrétion protéique.

Dans le RE, le GSH semble agir en compétition avec la formation de ponts disulfures sur les protéines cibles de la PDI (Cuozzo and Kaiser, 1999). De plus, chez les mammifères le GSH réduit directement la PDI (Jessop and Bulleid, 2004) et sa déplétion conduit à une accumulation de ponts disulfures non-natifs sur les protéines sécrétés (Chakravarthi et al., 2006; Jansens et al., 2002; Molteni et al., 2004). De nombreux auteurs ont donc suggéré un rôle du glutathion comme source de pouvoir réducteur dans le RE, fonction critique pour le repliement oxydatif des protéines sécrétées. Ces observations sont proches de celles faites par le groupe de Hermann dans l'IMS, qui montraient que le GSH aurait un impact bénéfique sur l'efficacité de l'oxydase de Mia40 (Bien et al., 2010), en favorisant la réduction des ponts disulfures non natifs, en vue de leur isomérisation (Kojer et al., 2012).

Ces résultats sont cependant en contradiction avec une étude récente, dans laquelle les auteurs suggèrent que le glutathion n'intervient pas dans le contrôle redox de la sécrétion dans le RE. Cette étude repose sur l'expression de l'enzyme Chac1, capable de dégrader le glutathion en cysteinylglycine (Cys-Gly), dans le lumen du RE. De façon surprenante, cette déplétion en glutathion n'a pas d'effet mesurable sur l'induction de l'UPR ou sur la sécrétion de protéines possédant un pont disulfure (Tsunoda et al., 2014).

c) *Le système du GSH est un système secondaire dans le contrôle thiol-redox intracellulaire*

Dans le cytosol de *S. cerevisiae*, le système thiorédoxine a un rôle prépondérant sur les régulations redox connues : la réduction de la ribonucléotide réductase (RNR) (Camier et al., 2007), enzyme cruciale qui permet la génération des desoxyribonucléotides à partir des ribonucléotides ; le catabolisme de l'H₂O₂ par les peroxirédoxines et les GSH peroxydases ; l'assimilation du soufre ; la réduction des méthionine sulfoxyde réductases... Paradoxalement, aucune cible redox du système du glutathion dans le cytosol n'a été identifiée à ce jour. De plus, dans une souche $\Delta glr1\Delta gsh1$, aucune modification de l'état redox des résidus cystéines cellulaire n'est observée, même après déplétion en GSH. Au contraire, dans une souche dans laquelle la thiorédoxine réductase et les deux thiorédoxines cytosoliques ont été délétées, on observe une augmentation très importante de l'oxydation des résidus Cys du protéome (Le Moan et al., 2006).

Ces observations suggèrent que le GSH n'a qu'un rôle limité dans le contrôle thiol-redox cellulaire. Chez les mammifères, le GSH participe à la détoxification des peroxydes en tant que réductant des glutathion peroxydases (GPxs). Chez la levure, les thiorédoxines et peroxirédoxines réalisent cette réduction (Delaunay et al., 2002; Tanaka et al., 2005). Le GSH pourrait cependant avoir un rôle de protection dans l'oxydation irréversible de résidus cystéines dans les formes sulfinate et sulfonate, en se condensant aux formes sulfenate d'oxydation de ces résidus pour former des adduits de type S-glutathion (Shenton and Grant, 2003).

d) *Phénotypes de délétion de GLR1 et des Grx dithiols*

- **Dans le cytosol**

L'invalidation de la *GLR1*, *GRX1* et *GRX2* ne produit que des phénotypes mineurs tels qu'une légère sensibilité aux peroxydes, et une sensibilité à l'anion superoxyde pour $\Delta grx1$ (Grant et al., 1996; Luikenhuis et al., 1998; Muller, 1996; Spector et al., 2001). Le seul phénotype remarquable de ces souches est leur résistance au diamide (Luikenhuis et al., 1998; Muller, 1996), d'ailleurs partagée avec les mutants des thiorédoxines cytosoliques. Cette résistance au diamide est paradoxale, et reste inexplicée.

- **Dans la mitochondrie**

La matrice mitochondriale, contrairement au RE et à l'IMS possède des systèmes complets pour la voie du glutathion et de la thiorédoxine. Ainsi, dans ce compartiment, une thiorédoxine (Trx3) et une thiorédoxine réductase (Trr2) sont présentes (Pedrajas et al., 1999) ainsi que Grx2 et Glr1 (Gladyshev et al., 2001; Kelner and Montoya, 2000). De plus, la NADH kinase Pos5 assure une source de NADPH mitochondriale, permettant une indépendance redox complète de ce compartiment vis-à-vis du cytosol.

Ce compartiment possède une 1-Cys peroxirédoxine (Prx2), dont le rôle dans la protection contre les peroxydes serait majeur (Greetham and Grant, 2009). Dans la matrice, le système du glutathion et de la thiorédoxine assure la réduction de cette Prx2. (Greetham and Grant, 2009). En effet, *in vitro*, le GSH forme sur Prx2 oxydé un adduit de type S-glutathion, ensuite réduit par Grx2, Trx3 ou encore Trr2 (Greetham and Grant, 2009; Pedrajas et al., 2000).

Dans la matrice mitochondriale le rôle principal des système thiorédoxine et du glutathion est donc la protection contre les ROS en permettant l'activité de Prx1

e) Autres rôles du GSH

De plus, le glutathion, de par sa capacité de chélation des métaux a un rôle important dans la **résistance aux métaux lourds et composés électrophiles** (Penninckx, 2002). Enfin, le glutathion aurait un rôle dans **la régulation de la mitophagie**, puisque sa déplétion chimique ou génétique stimule ce phénomène, alors qu'un apport de glutathion l'inhibe (Deffieu et al., 2009).

IV. Outils d'étude des flux du glutathion et de sa compartimentation cellulaire

A. Sondes redox

La biologie des thiols et leurs implications redox a longtemps été sujette à des limitations techniques. Ainsi, les fonctions cellulaires du glutathion ont longtemps été difficiles à accéder expérimentalement. En raison de sa petite taille, le GSH ne se prête pas à l'approche biochimique classique : lors de la lyse cellulaire, il est perdu dans la phase métabolique. De plus, à cause de sa très grande abondance cellulaire, l'imagerie par fluorescence ne peut identifier sa localisation cellulaire, même lorsqu'un bon anticorps est disponible.

Les outils génétiques permettent d'inactiver la biosynthèse de GSH et d'en épuiser la cellule, cependant cet épuisement n'est pas spécifique de compartiment. De plus le GSH est essentiel à la vie en raison de son rôle dans métabolisme du fer dans le cytosol (Kumar et al., 2011), et sa déplétion survenant d'abord dans le cytosol déclenche la mort cellulaire avant son épuisement dans les organelles.

Le développement de biosenseurs redox s'équilibrant spécifiquement avec le couple redox du glutathion a permis d'aborder l'étude du GSH *in vivo*. Basés sur une « yellow fluorescent protein redox-active » (rxYFP) ou sur une « green fluorescent protein redox-active (roGFPs) », ces biosenseurs ont permis d'établir la carte de l'état redox du glutathion à l'équilibre dans les différents compartiments de la cellule eucaryote, montrant des différences très importantes de cette variable, et en particulier le contraste entre le cytosol très réduit, et le RE très oxydé.

1. Mécanismes des sondes rxYFP et roGFPs

Les senseurs redox rxYFP et roGFP ont été développés par modification de la « yellow fluorescent protein » (YFP) et de la « green fluorescent protein » (GFP), par introduction de deux résidus cystéines sur deux feuillets β adjacents à la surface de la protéine, à proximité du chromophore. La formation d'un pont disulfure entre ces deux résidus entraîne une modification structurale mineure de la protéine, mais change aussi les caractéristiques d'émission de fluorescence du chromophore.

Suite au développement de ces sondes, il est apparu rapidement qu'elles s'équilibrent *in vivo* de façon exclusive avec le couple redox du glutathion (Meyer et al., 2007; Østergaard et al., 2004; Schwarzländer et al., 2008). Cette équilibration est catalysée par la glutarédoxine, par échange thiol-disulfure entre le glutathion et le senseur (Østergaard et al., 2004). Cet équilibre redox entre la sonde et le pool du glutathion cellulaire obéit à une relation Nernstienne (Gutscher et al., 2008; Østergaard et al., 2004).

L'état redox de la sonde est donc égal à celui du glutathion. Pour les sondes roGFP, l'état redox est obtenu par la mesure de fluorescence émise par la sonde, qui diffère dans la forme oxydée et réduite. Le caractère ratiométrique de ces sondes permet d'obtenir par mesure de fluorescence le rapport réduit/oxydé de la sonde indépendamment de sa concentration. *A contrario*, la sonde rxYFP n'est pas ratiométrique et son état redox est classiquement déterminé par western blot. La formation du pont disulfure intramoléculaire modifie en effet la migration de la sonde lors dans des conditions non réductrices. La séparation des formes oxydées et réduites sur western blot permet une mesure ratiométrique de l'état d'oxydation de cette sonde.

Notre étude utilisant exclusivement les sondes rxYFP, les implications et limitations applicables à la mesure fluorométrique des sondes redox ne sera pas explorées ici. Pour revue sur ce sujet voir (Schwarzländer et al., 2016)

In vivo, les premières mesures ont été menées dans le cytosol de *S. cerevisiae* avec la rxYFP (Østergaard et al., 2001). La fusion à la sonde de séquences d'adressage spécifiques permet cependant leur localisation dans les compartiments de la cellule eucaryote.

2. Limites de l'utilisation des sondes redox

-Impacts de l'expression des sondes redox sur la physiologie cellulaire

À notre connaissance, aucune donnée ne rapporte de phénotypes chez la levure liés à l'expression de de rxYFP ou de roGFP dans le cytosol ou le RE. Cependant, la surexpression de roGFPs dans la matrice mitochondriale, avec ou sans fusion avec un domaine Grx, provoque un défaut de croissance chez *S. cerevisiae*. Même si les causes de ce phénomène sont aujourd'hui inconnues, il est important de garder à l'esprit que l'expression de ces sondes n'est pas neutre pour la physiologie cellulaire.

De plus, l'utilisation de sondes grx1-rxYFP ou grx1-roGFPs soulève la question de leur impact redox potentiel sur la cellule, en particulier dans des compartiments où l'activité Grx endogène est absente, ou limitée. Ainsi, dans une souche $\Delta grx1\Delta grx2$, dans laquelle la concentration cellulaire du GSSG est légèrement accrue, l'expression de Grx1-roGFP2 permet une restauration de la concentration en GSSG (Morgan et al., 2013).

L'expression d'une sonde fusionnée à un domaine Grx peut aussi avoir des effets sur l'état redox de protéines endogènes. Ainsi, une étude a récemment mis en lumière l'impact de l'activité glutarédoxine d'une fusion Grx1-roGFP exprimée dans l'IMS sur l'état redox de Mia40, probablement via son équilibration avec le couple redox du glutathion (Kojer et al., 2015).

-Limitations dans la mesure des sondes redox

Chaque sonde possède une gamme dynamique de mesure spécifique. Ainsi, les sondes rxYFP et roGFP – y compris les variants aux potentiels standard les plus électronégatifs – sont fortement réduites dans certains compartiments cellulaires tels que le cytosol (Meyer and Dick, 2010). De ce fait, ces sondes ne peuvent détecter de changement vers des états plus réduits dans ces compartiments (Schwarzländer et al., 2008). À l'inverse, dans certains compartiments cellulaires fortement oxydants tels que le RE, certaines sondes redox sont déjà très fortement oxydées (e.g. roGFP1 et roGFP2). Il est donc important de prendre en compte les spécificités de chaque sonde et de l'état redox des compartiments dans lesquels elles sont exprimées afin de pouvoir réaliser des mesures rigoureuses.

L'équilibration des sondes avec le couple redox du glutathion repose sur l'activité glutarédoxine. De ce fait, l'expression des sondes rxYFP ou roGFPs dans des compartiments cellulaires dépourvus de Grx endogène soulève la question de ce qui est mesuré. Ainsi, dans le peroxysome ou l'IMS, une mesure de l'état redox du glutathion nécessite l'utilisation de sondes redox fusionnées avec un domaine Grx1 (Ayer et al., 2012; Elbaz-Alon et al., 2014; Hu et al., 2008; Kojer et al., 2012). Dans le RE, malgré l'absence de Grxs endogènes, l'équilibration de la sonde avec le pool du glutathion s'effectue de façon efficace, bien que légèrement ralentie, probablement via l'activité de la PDI (Tsunoda et al., 2014). La nature du couple redox s'équilibrant avec les sondes redox dans le cytosol en l'absence de Grx est inconnue. Cependant, cette équilibration est extrêmement lente en comparaison de l'équilibration obtenue avec une sonde à la Grx1 (Morgan et al., 2013).

La prise en compte des variations intracellulaires de pH est également importante. En effet, l'intensité de fluorescence des sondes redox varie en fonction du pH (Østergaard et al., 2001, Østergaard et al., 2004). Cependant, la sensibilité au pH des sondes roGFPs pour des valeurs de pH physiologique reste négligeable. En effet, les modifications d'intensité de fluorescence due à une modification de pH sont proportionnelles dans les deux longueurs d'ondes utilisée comme mesure (Albrecht et al., 2011; Aller et al., 2015; Gutscher et al., 2008; Lohman and Remington, 2008; Schwarzländer et al., 2008; Wolf et al., 2014). Pourtant, l'utilisation de la rxYFP en western blot a montré que le pH alcalin de la matrice mitochondriale (pH = 8) contribue à une dynamique d'équilibration modifiée de la sonde (Dardalhon et al., 2012). Notre étude porte sur le cytosol et le RE, or ces deux compartiments possèdent un pH très similaire (Kim et al., 1998; Kneen et al., 1998; Wu et al., 2000).

- Spécificité de la mesure

Les sondes rxYFP et roGFPs ont une très forte spécificité vis-à-vis du couple redox du glutathion, même s'il reste possible que ces sondes interagissent avec d'autres couples redox. Il est cependant important de noter qu'aucune interaction avec les systèmes redox cellulaires, en particulier celui de la thiorédoxine, n'a été documentée. De même, une oxydation directe de la sonde par le peroxyde d'hydrogène semble très limitée, du fait de la très faible réactivité chimique de leurs résidus Cys. En fait, la fusion entre la GSH peroxydase Orp1 et roGFP2 (Orp1-roGFP2) est nécessaire pour conférer à la sonde redox la grande réactivité d'Orp1 vis-à-vis du peroxyde, et d'enregistrer des changements dans la concentration intracellulaire de cet oxydant.

B. Système HGT1

HGT1, déjà évoqué plus haut, est un transporteur à haute affinité pour le glutathion localisé à la membrane plasmique de la cellule de chez *S. cerevisiae* (Bourbouloux et al., 2000). Nous présenterons ici les caractéristiques des cellules surexprimant HGT1 (appelées dans ce manuscrit « cellules HGT1 »), car elles ont constitué avec les sondes redox du GSH un outil unique dans la réalisation de notre projet.

La surexpression d'HGT1 (cellules HGT1) n'a aucun impact sur la concentration en glutathion lorsque les cellules sont cultivées en milieu dépourvu en glutathion (Kumar et al., 2011). Cependant, la présence dans le milieu de culture de faibles quantités de glutathion,

qu'il s'agisse du GSH ou du GSSG, provoque chez les cellules HGT1 une mort cellulaire, et une inhibition de croissance (**Figure 10**) (Kumar et al., 2011).

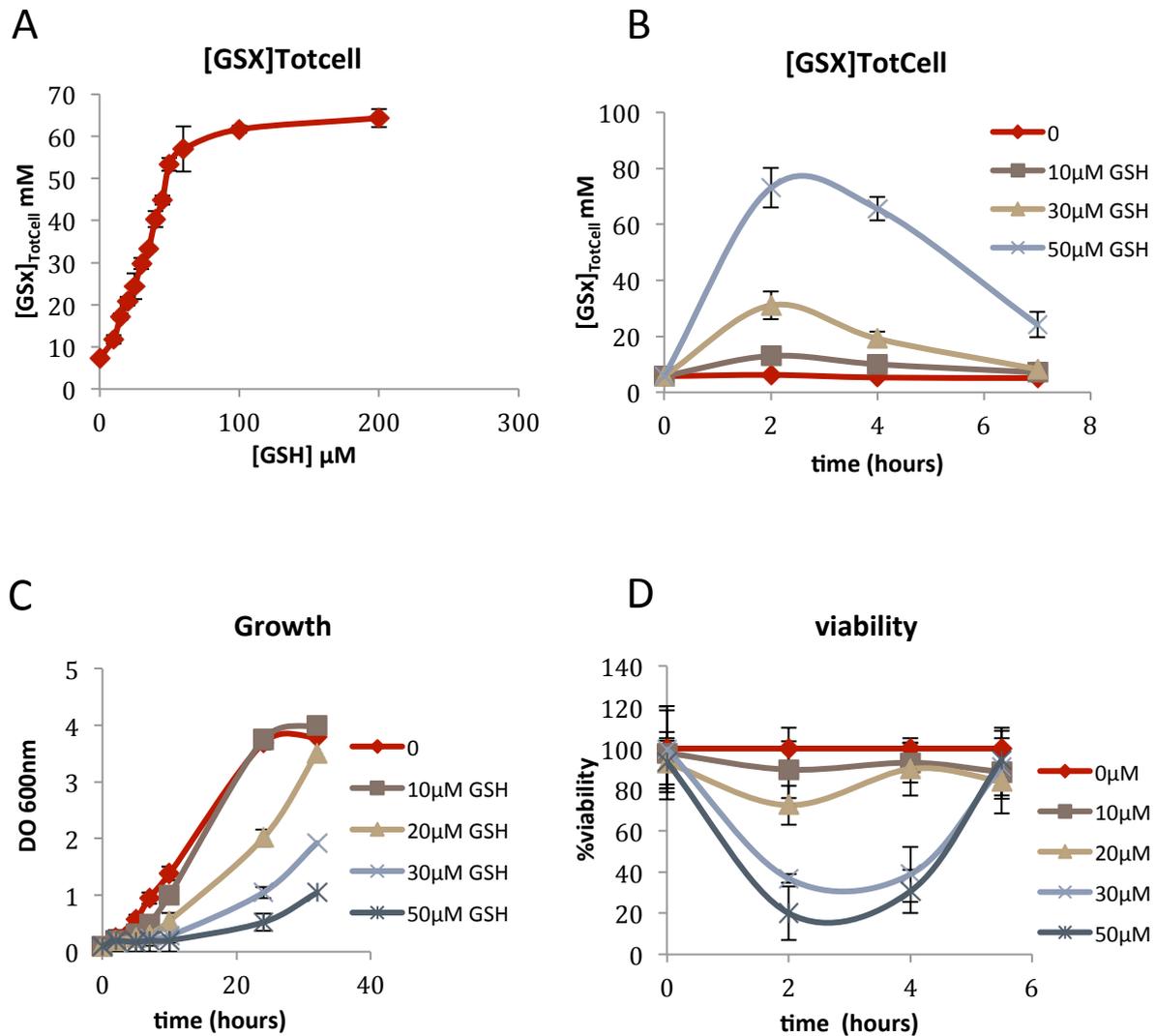


Figure 10 : La surexpression du transporteur HGT1 provoque une accumulation de glutathion intracellulaire causant une perte de viabilité et un défaut de croissance.

(A) Concentration en glutathion total intracellulaire ($[\text{GSx}]_{\text{TotCell}}$) dans une cellule HGT1 exposée pendant une heure à une dose croissante de GSH exogène.

(B) Concentration en $[\text{GSx}]_{\text{TotCell}}$ dans une cellule HGT1 exposée à différentes concentrations de GSH exogène au cours du temps.

(C) Croissance d'une souche HGT1 exposée à différentes concentrations de glutathion exogène.

(D) Viabilité d'une souche HGT1 exposée à différentes concentrations de glutathion exogène.

Résultats adaptés de (Kumar et al., 2011)

Cette toxicité est corrélée à une augmentation très importante de la concentration en glutathion total intracellulaire, proportionnelle à la quantité de GSH ajoutée, jusqu'à un plateau atteint lorsque le GSH est présent à la concentration de 50 μ M (**Figure 10**). Ce plateau est probablement lié à une saturation du transport de glutathion par HGT1, dont le Km est de 50 μ M (Bourbouloux et al., 2000). L'accumulation cellulaire du GSH dans les cellules HGT1 est très rapide, dans les minutes suivant l'ajout de GSH dans le milieu, et reste importante pendant plusieurs heures (**Figure 10**). Le retour à une concentration normale de glutathion ne semble pas être dû à un efflux de glutathion, mais à la dégradation du glutathion par la voie Dug (Kumar et al., 2011).

Chez des cellules HGT1 en présence de GSH, on observe l'induction de la voie UPR ainsi qu'un blocage de la sécrétion protéique. On note également la réduction quasi totale d'Ero1 et de Pdi1, reflétant donc un stress réducteur du RE. Les cinétiques de réduction de ces protéines suggèrent une diffusion rapide du GSH du cytosol au RE, puis une rétention du glutathion dans le RE (Kumar et al., 2011).

Ce système HGT1 permet donc l'augmentation des flux intracellulaires de glutathion du cytosol vers les organelles cellulaires.

V. Objectifs de la thèse

Bien que classiquement considéré comme un tampon redox dans la cellule, les fonctions physiologiques du glutathion sont mal comprises. En effet, cette définition concerne les fonctions enzymatiques, voir biochimiques de ce tripeptide redox et non son rôle dans la physiologie de la cellule. L'utilisation récente de biosenseurs redox en équilibre avec le glutathion a permis d'établir l'existence d'une disparité de l'état redox du GSH d'un compartiment à l'autre. Cette observation soulève deux questions importantes : (1) quel est l'importance physiologique de ces disparités ? (2) quels sont les systèmes permettant le maintien de ces gradients ?

Problématique

Dans le RE, le glutathion joue un rôle méconnu et controversé. Dans ce compartiment, le système du glutathion est extrêmement limité, et la maintenance de son homéostasie redox suppose l'existence de flux de glutathion depuis le cytosol. Les mécanismes permettant l'homéostasie du glutathion et les flux intracellulaires dans le RE compartiments sont encore méconnus.

Objectif

Notre objectif est de permettre une meilleure compréhension du rôle physiologique du tripeptide redox dans le RE, encore très mal connu et controversé. Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes fixé comme but d'élucider les systèmes cellulaires permettant le trafic du GSH et du GSSG entre le cytosol et le RE

Stratégies

- Flux de glutathion entre RE et cytosol

Notre projet s'attache à apporter une description *in vivo* des flux intracellulaires de GSH entre cytosol et RE. La surexpression du transporteur HGT1 permet de modifier rapidement et drastiquement le contenu cytoplasmique en glutathion, et l'utilisation des sondes redox permet de visualiser les flux intracellulaire qui en découlent (Kumar et al., 2011). Nous avons donc utilisé ce système afin d'établir les grandes caractéristiques du transport de glutathion dans le RE.

Certains stress tels que le stress thermique ou l'exposition à l'arsenite provoquent une forte augmentation de la synthèse en GSH dans le cytosol. Afin de confirmer dans des conditions

plus physiologiques les caractéristiques obtenues avec le système HGT1, nous avons réalisé une étude des flux de GSH induits par ces stress.

- Identification d'un transporteur du GSH dans le RE

Dans le but d'identifier les acteurs du transport du GSH dans le RE chez *S. cerevisiae*, deux approches ont été utilisées.

(i) L'accumulation de GSH dans une cellule HGT1 conduit à une perte de viabilité et un défaut de croissance, lié à l'impact du GSH sur le RE (Kumar et al., 2011). Sur cette observation, nous avons réalisé un crible génétique afin d'identifier des mutations conférant une résistance face à l'accumulation de GSH cytosolique. En effet, une mutation diminuant le transport de GSH dans le RE permettrait une meilleure survie à une exposition au GSH. Cependant, ce crible a permis l'identification de mutations limitant la toxicité du GSH sans modifier les flux de GSH dans le RE.

(ii) Une approche gène candidats a également été utilisée. L'importance du translocon dans le transport des petites molécules nous a conduits à évaluer l'implication du complexe Sec dans le transport de GSH dans le RE.

- Rôle du glutathion dans le RE

Dans le RE, le rôle du glutathion a été exploré principalement dans des conditions de déplétion du GSH. Comme mentionné précédemment, cette approche a conduit à des résultats contradictoires.

À l'opposé des études utilisant une déplétion, les cellules HGT1 permettent d'étudier l'effet d'une augmentation de la concentration du glutathion dans le RE, et d'une réduction du RE E_{GSH} . Ce système permet donc une nouvelle approche pour l'étude de l'impact du GSH sur le fonctionnement de la machinerie de repliement oxydatif et sur la sécrétion protéique. Kumar et collaborateurs montrent qu'une augmentation de glutathion intracellulaire dans des cellules HGT1 provoque un blocage de la sécrétion protéique, l'activation forte de la voie de réponse au stress RE et est accompagné d'une perte de viabilité cellulaire et un ralentissement de croissance (Kumar et al., 2011).

Nous avons cherché à identifier les voies de réponses cellulaires mises en jeu dans la réponse au stress RE provoqué par le GSH dans une cellule HGT1, afin de mieux comprendre le phénotype de toxicité au glutathion observé dans ces cellules HGT1.

Résultats - Chapitre 1

CHAPITRE 1 : ETUDE DES FLUX DE GLUTATHION ENTRE CYTOSOL ET RE.....	75
A. INTRODUCTION	75
B. RESULTATS	77
1. LA CONCENTRATION ABSOLUE EN GLUTATHION EST EN EQUILIBRE ENTRE CYTOSOL ET RE.....	77
2. TRANSPORT DE GSH DANS LE RE.....	81
3. REGULATION DE L'IMPORT DE GSH DANS LE RE.	90
4. LE GSSG EST EGALEMENT IMPORTE DANS LE RE	99
C. DISCUSSION.....	106

VI. Chapitre 1 : Etude des flux de glutathion entre cytosol et RE

A. Introduction

La découverte récente de la compartimentalisation du glutathion dans les cellules eucaryotes nécessite aujourd'hui des études analysant les fonctions physiologiques du glutathion dans chacune des organelles de la cellule. Cependant cette tâche est rendue difficile par un manque de moyens expérimentaux permettant de les aborder. Comme nous l'avons noté dans l'introduction, le rôle essentiel du glutathion dans le métabolisme du fer dans le cytosol limite l'approche génétique. De plus, les études utilisant une approche biochimique compartiment-spécifique sont difficiles en raison de la très petite taille du tripeptide. Ainsi, pour approcher les fonctions du GSH nous avons choisi d'étudier les mécanismes qui assurent sa distribution cellulaire et le maintien de son état redox dans chacun des compartiments de la cellule.

Au cours de ma thèse, je me suis spécifiquement intéressée aux modalités de transport et au contrôle redox du glutathion dans le RE, compartiment dans lequel le rôle du glutathion reste débattu. Chez *S. cerevisiae*, la synthèse du GSH, le contrôle de son état redox par la GSH réductase et sa dégradation prennent place dans le cytosol (et la matrice mitochondriale pour ce qui est de la GSH réductase). Ces activités sont toutes totalement absentes dans le RE. Le maintien de la concentration absolue et de l'état redox du GSH dans le RE suppose donc l'existence de flux de GSH et de GSSG entre RE et cytosol, et de mécanismes contrôlant ces flux.

- **Outils de l'étude**

Pour décrire les flux de glutathion entre le RE et le cytosol de *S. cerevisiae*, nous avons utilisé une souche surexprimant le transporteur plasmatique du glutathion HGT1 (Bourbouloux et al., 2000). Dans ce manuscrit, ces cellules seront appelées souche (cellules) HGT1. L'ajout de glutathion dans le milieu de culture de cellules HGT1 provoque une augmentation rapide et importante de la concentration intracellulaire de glutathion (Kumar et al., 2011). Le GSH accumulé dans la cellule se distribue ensuite dans les autres compartiments cellulaires, comme le RE.

Le système HGT1 permet donc de créer des flux intracellulaires de GSH qui sont ensuite suivis par des sondes redox exprimées dans différents compartiments cellulaires.

Dans cette étude, nous avons utilisé deux sondes :

(1) La sonde rxYFP, qui s'équilibre avec le couple redox du GSH, et permet de calculer le E_{GSH} dans un compartiment donné.

(2) Nous avons également utilisé la sonde 1-Cys-Grx1, la glutarédoxine cytosolique dans laquelle le résidu Cys résolutif est substitué par un résidu Ser. Cette seconde sonde est également en équilibre avec le couple redox du GSH.

Sachant que la sonde rxYFP s'équilibre avec le GSH de façon proportionnelle à $[\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]$ et que l'équilibration de 1-Cys-Grx1 avec le GSH est proportionnelle à $[\text{GSH}]/[\text{GSSG}]$, il est possible d'extraire les valeurs absolues de $[\text{GSH}]$, $[\text{GSSG}]$, et de $[\text{GSx}] = [\text{GSH}] + 2[\text{GSSG}]$ dans un compartiment donné (Montero et al., 2013).

Nous avons exprimé ces deux sondes dans nos deux compartiments d'étude : le cytosol et le RE. Ces sondes ont été adressées dans le RE par l'ajout de la séquence signal Mns1 à l'extrémité N-terminale des sondes et d'un signal de rétention HDEL à l'extrémité C-terminale. La localisation correcte des sondes dans les souches utilisées et lors des traitements a été vérifiée par fractionnement cellulaire ([voir Annexe 2](#)).

Comme présenté en introduction, la présence d'une glutarédoxine est nécessaire pour catalyser l'échange thiol-disulfure entre le couple du glutathion et la sonde rxYFP. Dans le RE, il n'y a pas de glutarédoxine, mais la PDI assure l'équilibration de la sonde redox avec le couple du glutathion (Tsunoda et al., 2014). Nous avons néanmoins confirmé les valeurs d' E_{GSH} dans le RE mesuré dans un premier temps par la sonde RE-rxYFP, avec une sonde fusionnée à un domaine Grx1 (RE-grx1-rxYFP). L'utilisation des deux sondes a toujours permis d'obtenir des valeurs de RE E_{GSH} identiques ([Annexe 1](#)).

- **Problématiques de l'étude**

Dans ce chapitre, après avoir étudié les concentrations absolues de glutathion dans le RE et le cytosol à l'état de base, nous nous intéresseront aux caractéristiques des flux de glutathion entre ces deux compartiments dans une souche HGT1. Le système HGT1 étant un moyen très artificiel permettant l'étude des flux intracellulaire de glutathion, nous avons également utilisé des conditions plus physiologiques où ces flux peuvent être également observés (stress thermiques et exposition aux métaux lourds).

Enfin, dans une seconde partie de cette étude nous montrerons l'existence d'une régulation des flux de glutathion dans le RE.

B. Résultats

1. La concentration absolue en glutathion est en équilibre entre cytosol et RE.

Dans cette étude, trois concentrations différentes de glutathion ont été mesurées et comparées.

1) La concentration en glutathion dans le cytosol $[GSx]_{cyt}$. Cette concentration est calculée à partir de l'état d'oxydation des sondes Cyt-rxYFP et Cyt-1-Cys-Grx1. Ces sondes permettent également de calculer les concentrations de GSH et de GSSG dans le compartiment ($[GSH]_{cyt}$ et $[GSSG]_{cyt}$).

2) La concentration en glutathion dans le RE $[GSx]_{RE}$. Comme dans le cytosol, cette concentration est calculée à partir des sondes RE-rxYFP et RE-1-Cys-Grx1, et l'on peut en déduire les concentrations de GSH ($[GSH]_{RE}$) et de GSSG ($[GSSG]_{RE}$).

3) La concentration en glutathion total cellulaire $[GSx]_{TotCell}$. La détermination de $[GSx]_{TotCell}$, $[GSH]_{TotCell}$ et $[GSSG]_{TotCell}$, est réalisée sur des lysats cellulaires totaux par dosage spectrophotométrique.

a) $[GSx]_{Cyt}$ est supérieure à $[GSx]_{TotCell}$

Le cytosol est le compartiment le plus volumineux de la cellule (environ 50% du volume total), et semble contenir la majorité du glutathion intracellulaire (Morgan et al., 2013). Cependant, la présence de structures volumineuses (ribosomes, réseau d'actine...) a conduit certains auteurs à estimer le volume réel de cytoplasme à environ 25% du volume cellulaire total chez une levure *S. pombe* (Tom Pollard, communication personnelle).

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer la concentration de glutathion dans le cytosol ($[GSx]_{cyt}$) en conditions basales. Classiquement, cette valeur est approximée par la mesure du glutathion cellulaire total ($[GSx]_{TotCell}$). Afin de vérifier la validité de cette hypothèse, nous avons exprimé les sondes rxYFP (Cyt-rxYFP) et 1-Cys-Grx1 (Cyt-1-Cys-Grx1) dans une souche sauvage. Cependant, dans le cytosol d'une telle souche, l'état redox du GSH est très réduit. Les deux sondes cyt-rxYFP et cyt-1-Cys-Grx1 sont donc ici en dehors de leur domaine de linéarité, nous empêchant de déterminer $[GSx]_{cyt}$.

Un mutant délété pour la glutathion réductase cytosolique (*Aglr1*) possède un contenu en glutathion total cellulaire $[GSx]_{TotCell}$ très proche de ce qui est mesuré dans une souche sauvage. En revanche, l'absence de GSH réductase rend l'état redox du GSH cytosolique plus oxydé, ce qui permet l'utilisation des sondes redox. Ainsi, l'état redox cytosolique (Cyt E_{GSH}) d'une souche *Aglr1* est plus oxydé que celui mesuré dans une souche sauvage (-246 ± 2 mV vs > -295 mV).

Nous avons ainsi calculé pour une souche *Δglr1* une valeur de $[GSx]_{Cyt} = 31 \text{ mM}$ (**Table 1**). En parallèle, nous avons mesuré dans cette souche la concentration cellulaire totale ($[GSx]_{TotCell}$) sur lysats cellulaires totaux à $7.14 \pm 1 \text{ mM}$. On note donc une valeur très fortement supérieure de $[GSx]_{Cyt}$ par rapport à ce qui est mesuré pour $[GSx]_{TotCell}$.

L'utilisation des sondes redox permettent de calculer un $[GSx]_{Cyt}$ est 4,5 fois supérieur à ce qui est mesuré par dosage spectrophotométrique pour $[GSx]_{TotCell}$. Cette donnée surprenante est cependant renforcée par des observations estimant le volume cytoplasmique à 20-30% du volume cellulaire total (Communication personnelle Tom Pollard).

b) $[GSx]_{RE}$ est égale à $[GSx]_{Cyt}$

La **Table 1** compare les valeurs de $[GSx]$, $[GSH]$, $[GSSG]$ et E_{GSH} dans le RE et dans le cytosol d'une souche sauvage et d'une souche *Δglr1*. Comme attendu, l'état redox du RE est plus oxydant que celui du cytosol dans une souche sauvage. Nous notons également que l'état redox du RE dans *Δglr1* est plus oxydé que dans la souche sauvage.

Les sondes redox nous permettent de calculer $[GSx]_{RE}$. La valeur de $[GSx]_{ER}$ calculée est très similaire à $[GSx]_{Cyt}$ dans la souche *Δglr1* ($31 \pm 1.5 \text{ mM}$ vs $31 \pm 1 \text{ mM}$).

Nous mesurons donc à l'état basal un équilibre des concentrations en glutathion de part et d'autre de la membrane du RE.

Table 1

		$[GSx]$ (mM) ¹	$[GSH]$ (mM)	$[GSSG]$ (mM)	E_{GSH} (mV)	$[GSH]/[GSSG]$
Wt	ER ²	30 ± 2	$29,6 \pm 2$	0.6 ± 0.04	-242 ± 2	42 ± 2
	TotCell ³	7 ± 1	6.6 ± 1	0.4 ± 0.05		
<i>Δglr1</i>	ER ²	$31,5 \pm 1$	29 ± 1	$1,2 \pm 0.03$	-235 ± 3	23 ± 2
	Cytosol ⁴	31 ± 1	30 ± 1	0.5 ± 0.03	-246 ± 2	51 ± 3
	TotCell ³	7.54 ± 1	6 ± 1	$0,9 \pm 0.05$		

Table 1. Paramètres du glutathion mesurés dans une souche sauvage (WT) et *Δglr1*.

¹ $[GSx] = [GSH] + 2[GSSG]$

²Valeurs calculées à partir des mesures obtenues par les sondes ER-rxYFP et ER-1-Cys-Grx1

³Valeurs mesurées à partir du lysat total

⁴Valeurs calculées à partir des mesures obtenues par les sondes Cyt-rxYFP and Cyt-1-Cys-Grx1

Les valeurs de RE E_{GSH} mesurées dans une souche sauvage avec une sonde RE-rxYFP-Grx1
 $RE E_{GSH} = -243 \pm 7 \text{ mV}$. Dans une souche *Δglr1* cette sonde permet d'obtenir un RE $E_{GSH} = -235 \pm 5 \text{ mV}$

c) Le GSSG cellulaire est accumulé dans la vacuole

Dans le cytosol le GSSG est rapidement réduit ou séquestré dans la vacuole (Morgan et al., 2013). Le dosage de GSSG sur les lysats cellulaires $[GSSG]_{TotCell}$ prend en compte ce pool de glutathion oxydé.

En effet, dans la **table 1** on note que la valeur de $[GSSG]_{TotCell}$ mesurée pour la souche *Δglr1* est plus importante que $[GSSG]_{Cyt}$ mesurée par les sondes redox (0.5 ± 0.05 vs $0,9 \pm 0.03$ mM).

Comme démontré par Morgan et collaborateurs, l'accumulation vacuolaire de GSSG empêche de déterminer $[GSSG]_{Cyt}$ à partir de $[GSSG]_{TotCell}$.

Dans le RE, la valeur de $[GSSG]_{RE}$, mesurée dans la souche *Δglr1* est deux fois plus importante que ce qui est mesuré dans le cytosol ($1,2 \pm 0.03$ mM vs 0.5 ± 0.03 mM).

Les données présentées ici nous permettent de conclure :

(i) Le pool de glutathion total est principalement constitué du glutathion cytosolique, cependant ce compartiment ne représente qu'un faible pourcentage du volume cellulaire total. La concentration en glutathion cytosolique sera donc approximée en multipliant la concentration totale cellulaire par 4,5.

(ii) Dans des conditions basales, on mesure une concentration équivalente en glutathion total dans le RE et le cytosol.

Nos mesures sont en contradictions avec les observations de Montero et collaborateurs qui montrent dans des cellules mammifères le maintien d'un fort gradient de concentration en glutathion entre cytosol et RE (Montero et al., 2013). En effet, ils déterminent dans cette étude une concentration en glutathion total dans le RE ($[GSx]_{RE}$) plus de deux fois supérieure à la concentration en glutathion total cellulaire ($[GSx]_{TotCell}$). Cependant, il est important de noter que dans cette étude, la $[GSx]_{TotCell}$ est assimilée à la concentration en glutathion total cytosolique ($[GSx]_{Cyt}$). Le maintien d'un tel gradient de concentration entre deux compartiments a des implications majeures sur le transport du glutathion et suggère un pompage actif du glutathion cytosolique dans le RE.

(ii) Nos résultats confirment les observations de Morgan et collaborateurs, qui rapportent une concentration réelle en GSSG dans le cytosol très faible et inférieure à $[GSSG]_{TotCell}$ (Morgan et al., 2013). Ces auteurs mettent en évidence le rôle de la vacuole dans la séquestration de ce pool de glutathion oxydé. La séquestration du GSSG dans la vacuole prévient donc l'utilisation de $[GSSG]_{TotCell}$ comme approximation de $[GSSG]_{Cyt}$.

- **Conséquences de ces résultats pour la suite de l'étude**

Dans la suite de cette étude, les différentes concentrations seront mesurées de la façon suivante :

(1) $[GSx]_{RE}$, $[GSH]_{RE}$ et $[GSSG]_{RE}$ sont calculées à partir des sondes RE-rxYFP et RE-grx1-cys.

(2) $[GSx]_{TotCell}$, $[GSH]_{TotCell}$ et $[GSSG]_{TotCell}$ sont mesurées sur les lysats cellulaires totaux.

(3) $[GSx]_{Cyt}$ est approximée à 4,5 fois $[GSx]_{TotCell}$

Du fait de la séquestration du GSSG dans la vacuole, le $[GSSG]_{Cyt}$ ne peut être estimé, mais est considéré très faible dans nos expériences.

d) *L'activité d'Ero1 permet le maintien du RE E_{GSH} .*

Une équilibration des concentrations de GSH de part et d'autre de la membrane du RE suppose une dépendance de l'état redox du GSH entre les deux compartiments.

Dans ces conditions, il est possible de s'interroger sur les acteurs permettant le maintien de l'homéostasie redox. Si nos résultats suggèrent une équilibration du glutathion entre RE et cytosol, comment le RE E_{GSH} est-il maintenu oxydé ? Des études ont montré précédemment l'importance de l'activité d'Ero1 dans la production luminale de GSSG (Sevier et al., 2007), nous avons donc étudié l'impact d'une modulation de l'activité de cette oxydase sur l'état redox du glutathion dans le RE.

Le mutant *ero1-1* est un mutant thermosensible d'Ero1 ayant une affinité réduite pour son cofacteur FAD (Tu and Weissman, 2002). L'activité d'oxydase chez ce mutant est abolie à 37°C, et conduit à une réduction complète de la Pdi1 (Sevier et al., 2007). Afin de déterminer l'importance du fonctionnement d'Ero1 dans le maintien du RE E_{GSH} , nous avons exprimé la sonde RE-rxYFP dans ce mutant cultivé à 24°C ou 37°C.

À 24°C, le RE E_{GSH} mesuré dans ce mutant est légèrement plus réduit que dans une souche sauvage (-0,250 mV vs -0,240mV dans une WT), et devient encore plus réduit à 37°C (**Figure 1A**). Au bout de 4h à 37°C, la sonde RE-rxYFP est complètement réduite chez ce mutant. De même, à 37°C le ratio $[GSH]_{RE}/[GSSG]_{RE}$ est très réduit (**Figure 1B**). Cependant, aucune différence en terme de $[GSx]_{TotCell}$, $[GSH]_{TotCell}$ ou $[GSSG]_{TotCell}$ n'est observée dans ces conditions.

L'activité d'Ero1 est donc critique pour le maintien d'un E_{GSH} oxydé dans le RE, et son absence conduit à une réduction forte de ce compartiment.

Figure 1

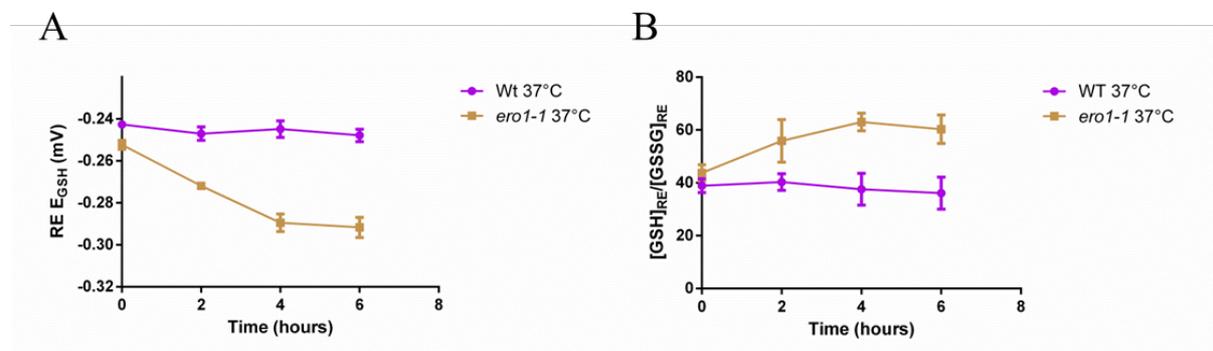


Figure 1. Importance de l'activité d'Ero1 dans le maintien de l'état redox luminal du glutathion.

(A) Potentiel redox du glutathion dans le RE ($RE E_{GSH}$), calculé à partir de l'état d'oxydation de la sonde RE-rxYFP et (B) RE GSH/GSSG, obtenu à partir de l'état d'oxydation de la sonde RE-1-Cys-Grx1, dans une souche sauvage (violet) ou *ero1-1* (orange), en phase exponentielle à 37°C. Les souches sont cultivées à 24°C et sont exposées à 37°C à T0.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

2. Transport de GSH dans le RE

Les flux de GSH existant entre RE et cytosol ont précédemment été décrits *in vitro*, sur des vésicules isolées (microsomes) (Bánhegyi et al., 1999). Ces études établissent une entrée de GSH dans les microsomes selon un système de diffusion facilitée. Les caractéristiques d'une diffusion facilitée sont : (1) un transport dépendant du gradient de concentration de part et d'autre de la membrane, (2) ce transport est saturable.

La surexpression du transporteur membranaire à haute affinité du glutathion HGT1 (Souches HGT1), permet une accumulation du glutathion proportionnellement à sa concentration dans le milieu de culture (Kumar et al., 2011). L'utilisation des cellules HGT1 permet donc de faire varier *in vivo* les concentrations cytosoliques, et les sondes redox permettent de mesurer son impact sur la concentration luminale en glutathion (Kumar et al., 2011). Nous avons utilisé ce système afin de caractériser les flux de GSH entre cytosol et RE.

a) *Caractéristiques du transport de GSH dans le RE*

Nous avons mesuré l'effet d'une augmentation des concentrations cytosoliques de GSH sur le transport de ce dernier entre le cytosol et le RE, après ajout de glutathion dans le milieu de culture de cellules HGT1. La localisation de la sonde RE-rxYFP et RE-1-Cys-grx1 dans ces conditions a été vérifiée par fractionnement cellulaire ([Annexe 1](#)).

- **Le GSH est transporté dans le RE selon un gradient de concentration et ce transport est saturable**

Nous avons estimé les valeurs de $[GSx]_{Cyt}$ ($4,5*[GSx]_{TotCell}$) et de $[GSx]_{RE}$, une heure après l'ajout de quantités croissantes de GSH dans le milieu de cellules HGT1 ([Figure 2](#)).

Comme décrit précédemment (Kumar et al., 2011), $[GSx]_{Cyt}$ augmente proportionnellement à la concentration de GSH ajouté dans le milieu de culture. À l'état basal, la valeur de $[GSx]_{Cyt}$ est de 30mM et atteint un plateau de 275mM, pour des quantités de GSH ajouté dans le milieu de 50 μ M ou plus correspondant à la saturation du transport du GSH par HGT1 ([Figure 2A](#)).

$[GSx]_{RE}$ augmente également, de façon parallèle à $[GSx]_{Cyt}$, pour atteindre un plateau à 150mM pour une quantité de GSH dans le milieu de 30 μ M ou plus ([Figure 2A](#)).

Nous voyons donc que l'augmentation de $[GSx]_{Cyt}$ provoque une augmentation équivalente de $[GSx]_{RE}$, ce qui suggère un transport de GSH selon le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane du RE. Cependant, nous observons aussi une saturation de ce transport pour des quantités de GSH dans le milieu de 30 μ M.

Nous observons ici que l'import du GSH depuis le cytosol vers le RE est réalisé selon un gradient de concentration en GSH de part et d'autre de la membrane. Ce transport est saturable à forte concentration, ce qui est conforme à la définition d'une diffusion facilitée. Ce résultat suggère l'existence d'un transporteur de GSH à la membrane du RE.

Figure 2

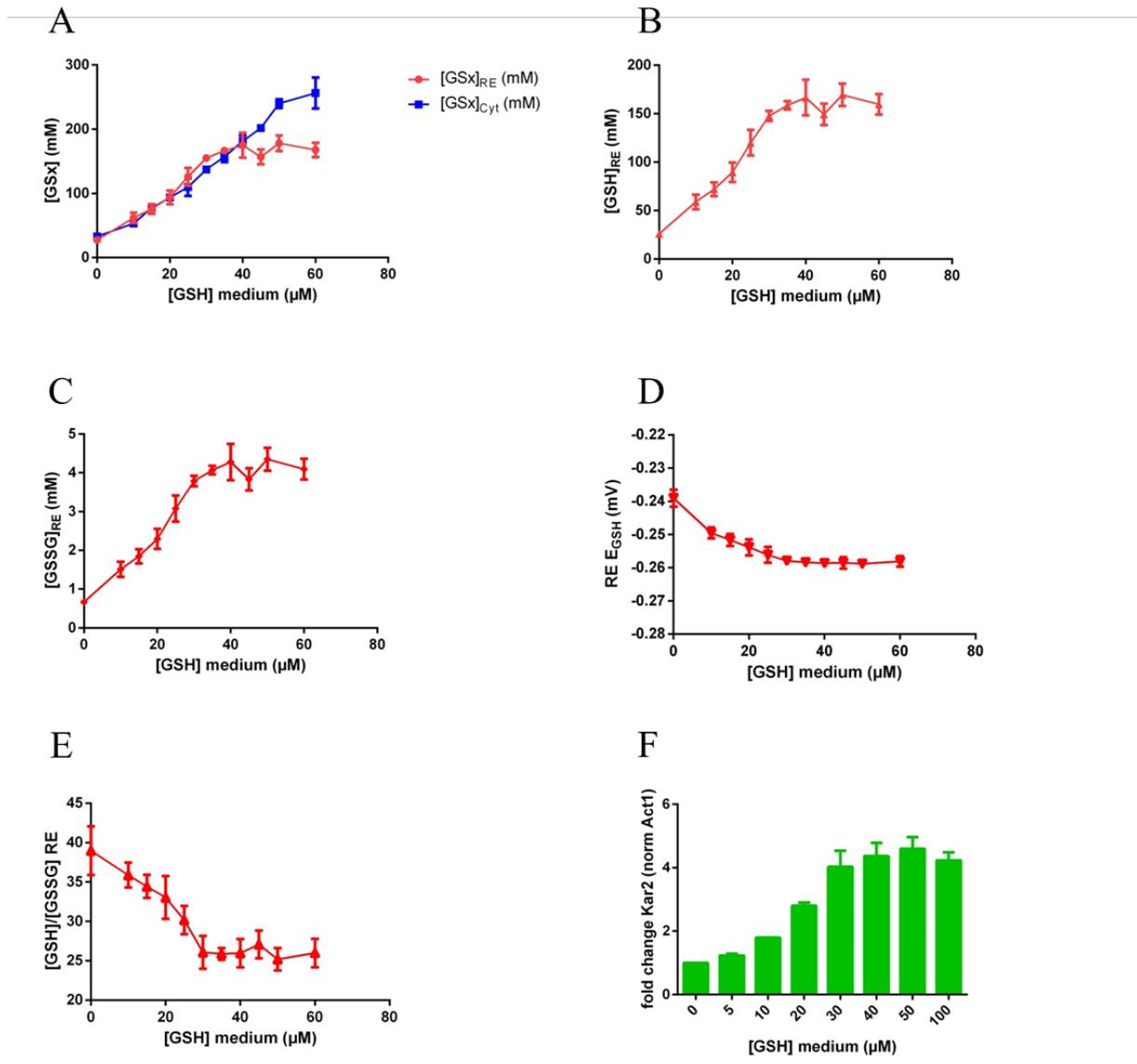


Figure 2. Le GSH est transporté dans le RE selon une diffusion facilitée saturable.

Valeur de **(A)** total $[\text{GSx}] = [\text{GSH}] + 2[\text{GSSG}]$, **(B)** glutathion réduit $[\text{GSH}]$, **(C)** glutathion oxydé $[\text{GSSG}]$ mesurée dans le cytosol (Cyt) et dans le RE (RE) dans des cellules HGT1 en phase exponentielle incubées une heure en présence de GSH. La concentration cytosolique est estimée à 4,5 fois la concentration des lysates cellulaires totaux

Les valeurs de **(D)** potentiel redox du glutathion dans le RE ($\text{RE } E_{\text{GSH}}$), sont calculées à partir de l'état d'oxydation de la sonde RE-rxYFP et le **(E)** ratio $[\text{GSH}]/[\text{GSSG}]$ dans le RE est calculé à partir du degré d'oxydation de la sonde RE-1-Cys-Grx1. Ces données permettent le calcul des données **A-C**.

(F) Le niveau d'expression de *KAR2* a été mesuré par qPCR dans des cellules HGT1 en phase exponentielle incubées une heure en présence de GSH.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

b) Devenir du GSH dans le RE

- **Accumulé dans le RE, le GSH est oxydé en GSSG.**

Dans les conditions précédemment décrites, c'est-à-dire une heure après l'ajout de quantités croissantes de GSH dans le milieu de cellules HGT1, nous avons également déterminé les valeurs de [GSH] et [GSSG] dans le RE. Dans ces conditions, l'augmentation de la concentration en glutathion mesurée dans le RE est principalement due à une accumulation de GSH (**Figure 2B**), provoquant une diminution du RE E_{GSH} (**Figure 2D**). Cette forte réduction du RE E_{GSH} a des conséquences sur la machinerie Ero1-PDI. Dans ces conditions, une réduction du RE engendre une réduction d'Ero1, provoquant son activation (Kumar et al., 2011). Cette activité accrue de la machinerie Ero1-PDI doit avoir pour conséquence une oxydation du GSH en GSSG (Sevier et al., 2007).

En effet, nous observons en parallèle de l'accumulation de GSH dans le RE, une augmentation de [GSSG]_{RE} d'une valeur basale de 0,5mM à un plateau de 4mM (**Figure 2C**). L'augmentation de [GSSG]_{RE} est responsable de la légère oxydation du ratio [GSH]_{RE}/[GSSG]_{RE} (**Figure 2E**).

Cette modification de l'état redox du GSH dans ces conditions induit également un stress du RE, comme le révèle l'induction de la transcription du gène KAR2, cible de la réponse UPR. L'amplitude de cette induction observée est également proportionnelle à la concentration de GSH ajouté dans le milieu des cellules HGT1, et atteint un plateau pour 30-40μM de GSH ajouté (**Figure 2F**).

L'import du GSH dans le RE, en créant un stress réducteur du RE induit une forte activation de la machinerie redox Ero1-PDI et conduit à une production de GSSG luminale.

- **Devenir du glutathion dans le RE**

Nous avons cherché à déterminer le devenir du glutathion accumulé dans le RE. Pour cela, nous avons étudié l'évolution des concentrations en glutathion dans le RE et la cellule au cours du temps après ajout de 10μM, 30μM et 50μM de GSH dans le milieu de culture des cellules HGT1.

Les cinétiques à 10μM et 30μM montrent une accumulation du glutathion au cours du temps très similaire dans les deux compartiments (**Figure 3A - B**). Au contraire, l'exposition à 50μM conduit à une accumulation de GSx plus importante dans le cytosol que dans le RE (**Figure 3C**). Celle-ci est due à la saturation du transport du glutathion dans le RE observable à forte concentration de glutathion décrite précédemment (**voir Figure 1A**). Afin d'éviter cet effet de saturation du transport de GSH dans le RE, nous avons choisi d'étudier le devenir du glutathion après son accumulation dans le RE lors d'un ajout de 30μM de GSH dans le milieu.

Figure 3

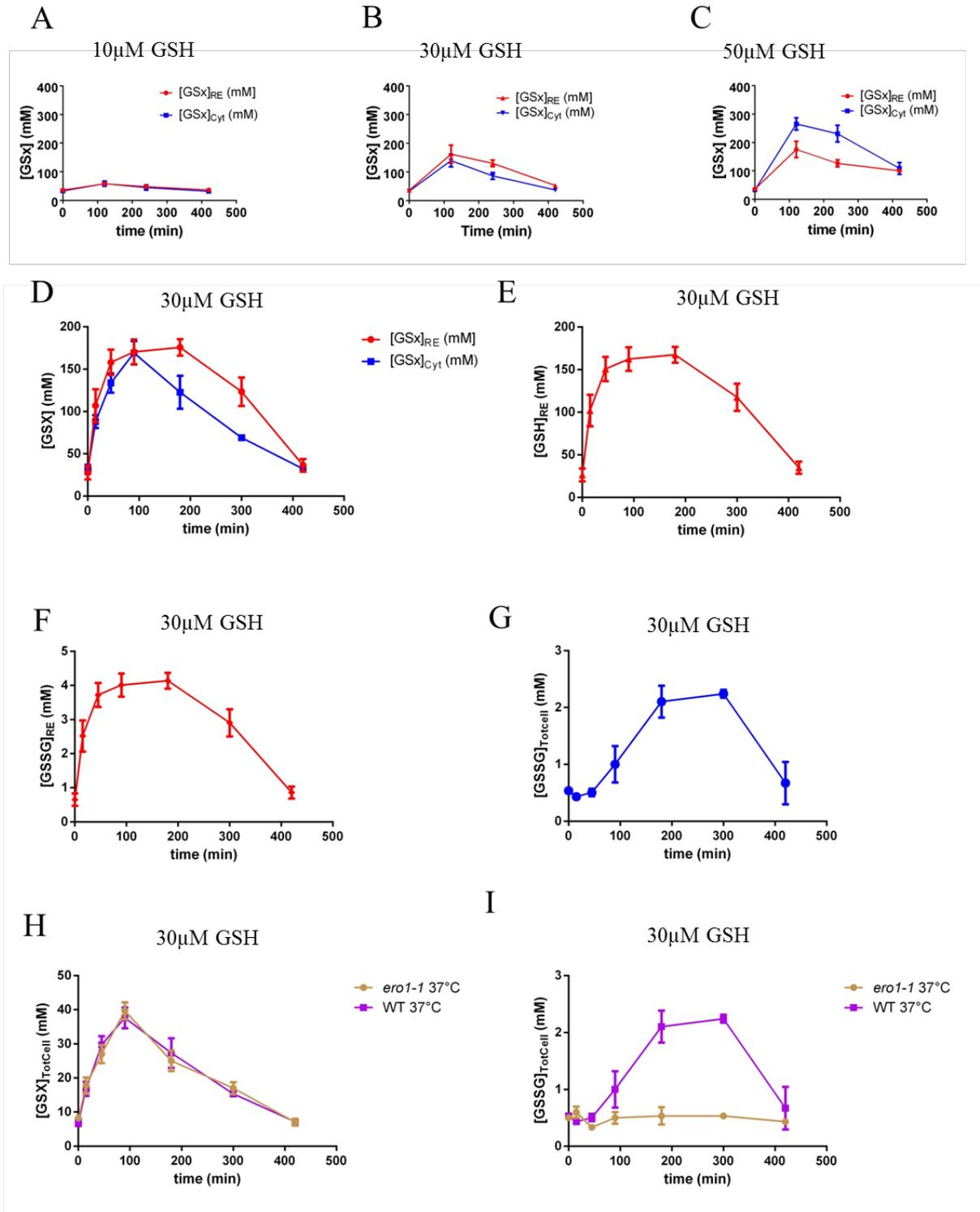


Figure 3. Le transport du glutathion dans le RE est unidirectionnel.

(A-C) Valeurs de total $[GSx] = [GSH] + 2[GSSG]$ mesurées dans le cytosol (Cyt) et le RE (RE) de cellules HGT1 en phase exponentielle incubées en présence de (A) 10 μ M de GSH, (B) 30 μ M de GSH ou (C) 50 μ M de GSH. Les valeurs de concentration de glutathion obtenues pour le RE ont été calculées à partir de l'état d'oxydation des sondes RE-rxYFP et RE-1-Cys-Grx1. La concentration cytosolique est estimée à 4,5 fois la concentration des lysats cellulaires totaux.

(D-F) Valeurs de (D) total $[GSx] = [GSH] + 2[GSSG]$, (E) glutathion réduit [GSH], (F) glutathion oxydé [GSSG] mesurées dans les lysats cellulaires (TotCell) et dans le RE (RE) dans des cellules HGT1 en phase exponentielle incubés en présence de 30 μ M GSH. Les valeurs de concentrations en glutathion dans le RE ont été calculées à partir des mesures de l'état d'oxydation des sondes RE-rxYFP et RE-1-Cys-Grx1. L'utilisation d'une sonde RE-Grx1-rxYFP donne un résultat équivalent (Annexe 2). La concentration cytosolique est estimée à 4,5 fois la concentration des lysats cellulaires totaux.

(G-H) Valeurs de (G) total $[GSx] = [GSH] + 2[GSSG]$, (H) glutathion oxydé [GSSG] mesurées dans les lysats cellulaires (Totcell) et dans le RE (RE) dans des cellules sauvages ou *ero1-1* exprimant HGT1 en phase exponentielle à 37°C et exposées à 30 μ M de GSH. Les valeurs de concentrations en glutathion dans le RE ont été calculées à partir des mesures de l'état d'oxydation des sondes RE-rxYFP et RE-1-Cys-Grx1.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

En présence de 30 μ M de GSH, le $[GSx]_{Cyt}$ atteint un maximum de 170mM à 1,5 heures, puis revient à sa valeur de base au bout de 7 heures (**Figure 3D**). Le retour à la normale de cette concentration dans la cellule est lié à la dégradation du GSH par la voie de dégradation cytosolique Dug (Kumar et al. 2011). Un retour à une concentration lumineuse normale implique donc un export du glutathion hors du RE.

La cinétique du $[GSx]_{RE}$ suit celle de $[GSx]_{Cyt}$. Cependant, le retour à une concentration de base est beaucoup plus lent dans le RE (**Figure 3D**).

L'observation de cinétiques d'entrée et de sortie du GSH différentes indique des vitesses d'import et d'export du GSH distinctes. Ces différences entre les cinétiques d'entrée et de sortie du GSH indiqueraient des mécanismes d'import et d'export distincts.

• Devenir du GSSG produit dans le RE

Lors d'une exposition à 30 μ M de GSH dans une souche HGT1, on note une augmentation très forte de $[GSSG]_{RE}$ correspondant à l'oxydation de GSH dans le RE décrite précédemment (**Figure 3E**). De plus, on observe une augmentation du $[GSSG]_{TotCell}$, atteignant plus de 2mM après 5 heures (**Figure 3G**). Nous avons cherché à déterminer si cette accumulation de GSSG dans la cellule est provoquée par une production lumineuse de glutathion oxydé.

Présenté précédemment, le mutant *ero1-1* est un mutant thermosensible de l'oxydase luminale Ero1. L'activité d'oxydation dans ce mutant est abolie à 37°C, et conduit à une réduction complète de la Pdi1 (Sevier et al., 2007a). Afin de déterminer l'importance du fonctionnement d'Ero1 dans cette production de GSSG, nous avons utilisé une souche HGT1-*ero1-1* exposée à 30µM de GSH.

Nous observons que l'augmentation du $[GSSG]_{TotCell}$ dans une souche HGT1 est liée l'activité d'Ero1 dans le RE puisqu'elle est absente chez un mutant *ero1-1* à température restrictive dans ces conditions (**Figure 3H-I**). Le GSSG produit dans le RE est probablement exporté et séquestré dans la vacuole, puisque nous ne voyons pas de changement du E_{GSH} cytosolique tout au long de la cinétique (data not shown). Le système d'export du GSSG hors du RE reste toutefois non identifié.

Dans le système HGT1, le GSH est importé dans le RE selon une diffusion facilitée. L'accumulation de GSH dans le RE provoque une production luminale de GSSG.

Un retour à des concentrations cytosoliques en glutathion normales est permis par l'activation des voies de dégradation Dug. Dans le RE, le retour à une concentration basale de glutathion est plus lent que dans le cytosol. Cette observation surprenante pose de nombreuses questions quant à l'export du glutathion hors du RE.

c) Stress physiologiques conduisant à un flux de glutathion dans le RE.

Le système HGT1 permet d'observer les conséquences d'une variation drastique de la concentration cytosolique en GSH sur les flux intracellulaires de glutathion. Nous avons cherché à identifier d'autres conditions permettant de faire varier les concentrations cellulaires en glutathion afin de confirmer dans des conditions plus physiologiques les observations réalisées avec les cellules HGT1.

Certains stress sont identifiés dans la littérature comme provoquant une augmentation de la concentration cellulaire en glutathion. C'est le cas notamment du stress thermique et d'une exposition aux métaux lourds comme l'arsénite.

Au contraire, une déplétion cellulaire en glutathion peut être réalisée dans une souche $\Delta gsh1$, souche incapable de synthétiser le glutathion. Il est ainsi possible de dépléter en glutathion rapidement en cultivant la souche dans un milieu minimum dépourvu de glutathion exogène (Spector et al., 2001).

Nous avons étudié l'effet de ces variations en glutathion cytosolique sur les concentrations de glutathion dans le RE.

Figure 4

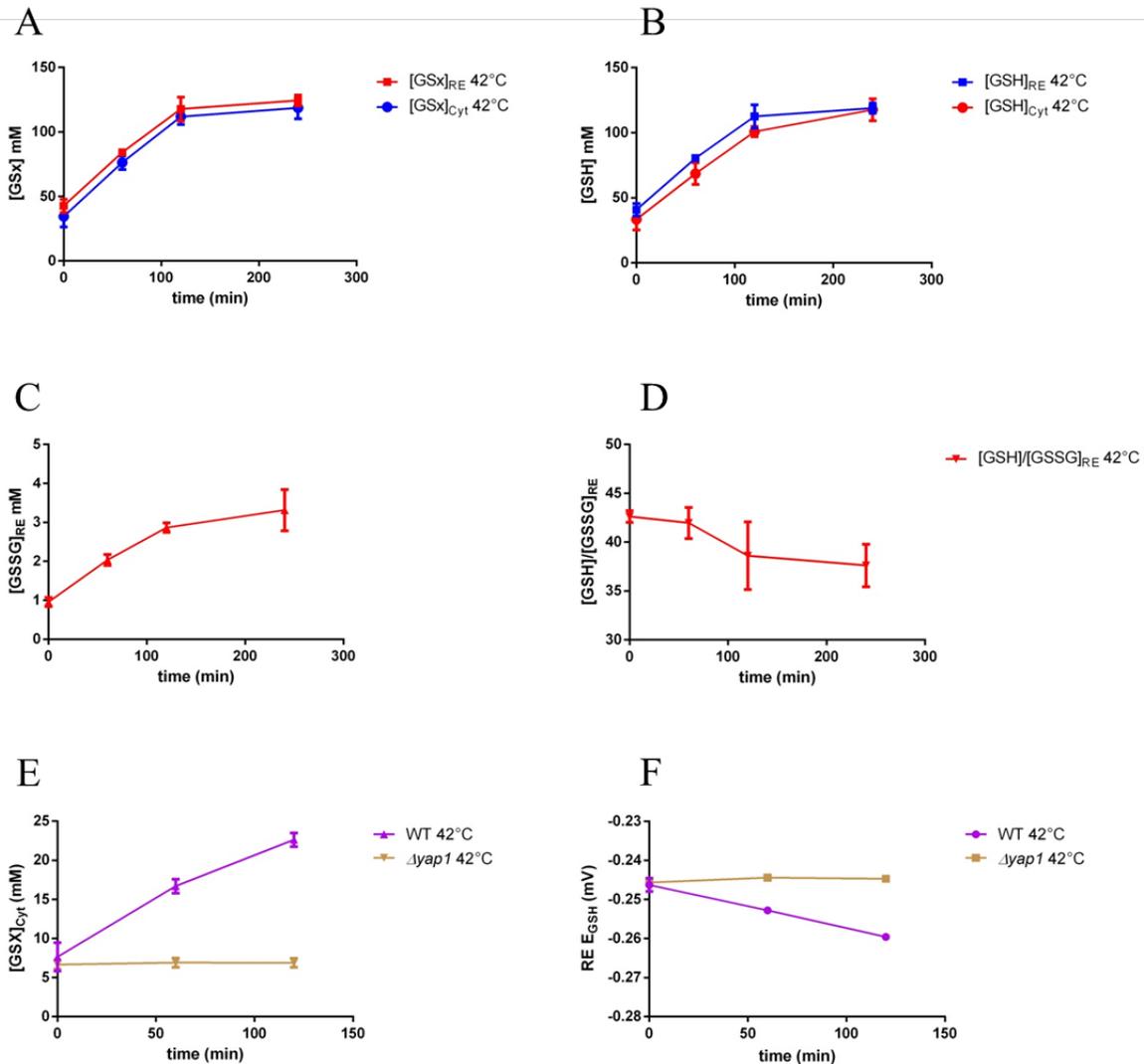


Figure 4. le stress thermique induit une synthèse accrue de GSH et une réduction du RE

(A, B, C, D) Valeurs de (A) total $[GSx] = [GSH] + 2[GSSG]$, (B) glutathion réduit $[GSH]$ (C) glutathion oxydé $[GSSG]$ mesurées dans le cytosol (Cyt) et dans le RE (RE) dans des cellules sauvages en phase exponentielle incubées à 42°C. Les cellules ont été pré-cultivées à 30°C jusqu'en phase exponentielle, puis incubées à 42°C. Les valeurs de concentration en glutathion dans le RE ont été calculées à partir des mesures de l'état d'oxydation des sondes RE-rxYFP et RE-1-Cys-Grx1. La concentration cytosolique en glutathion est estimée à 4,5 fois la concentration des lysats cellulaires totaux.

(E, F) Valeurs de (E) glutathion total cytosolique $[GSx]_{Cyt}$ et de (F) l'état redox du glutathion dans le RE ($RE E_{GSH}$) dans des cellules sauvages (Wt) ou $\Delta yap1$ incubées à 42°C. La concentration cytosolique en glutathion est estimée à 4,5 fois la concentration des lysats cellulaires totaux.

Les données présentés sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendant \pm l'écart type (sd).

- **Stress thermique**

Le stress thermique induit une synthèse accrue de GSH dépendante de Yap1 (Sugiyama et al., 2000). Dans des cellules sauvages incubées à 42°C, nous observons en effet une augmentation lente mais

significative de $[GSx]_{Cyt}$ atteignant 20-25mM après 4 heures (**Figure 4A**). $[GSx]_{ER}$ augmente de façon parallèle à l'augmentation de $[GSx]_{Cyt}$ (**Figure 4A**). Nous voyons aussi une augmentation de $[GSSG]_{ER}$ de 0.8 à 3mM (**Figure 4C**), reflétant l'activation d'Ero1 secondaire à l'import de GSH dans le RE.

Dans la souche $\Delta yap1$, aucune augmentation de $[GSx]_{TotCell}$ ni réduction de RE E_{GSH} n'est observée, confirmant la dépendance de l'import de GSH à la concentration cytosolique en glutathion (**Figure 4E- F**).

- **Traitement par l'arsénite**

L'arsénite, comme d'autres métaux lourds, provoque une synthèse accrue de GSH (Thorsen et al., 2007) (**Figure 5A**). Cette augmentation de la concentration en glutathion total est accompagnée d'une augmentation similaire du GSH dans le RE (**Figure 5A**). Dans ces conditions, le $[GSSG]_{RE}$ augmente légèrement alors que $[GSSG]_{TotCell}$ ne change pas (**Data not shown**), suggérant une activation d'Ero1, trop faible pour provoquer une accumulation significative de GSSG dans la vacuole.

En conclusion, le stress thermique ou un traitement à l'arsénite provoquent une augmentation de la concentration de GSH dans le cytosol, et en accord avec le principe de diffusion facilitée, nous observons un import de GSH au RE équilibrant les concentrations du tripeptide de part et d'autre de la membrane du RE. Ces données valident dans un contexte plus physiologique les données observées par le système HGT1.

Figure 5

Arsénite 2mM

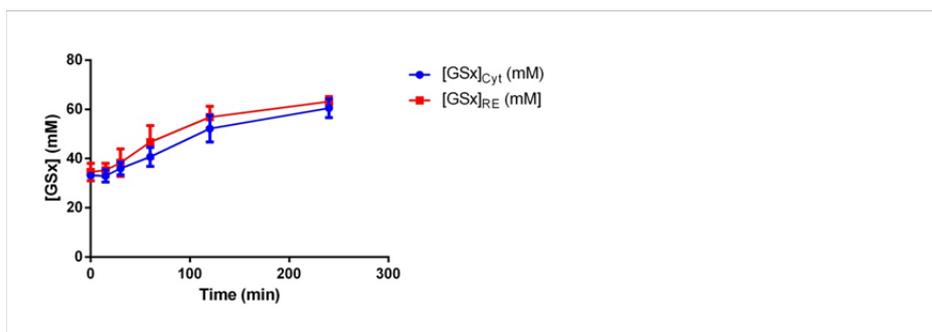


Figure 5. Un traitement à l'arsénite induit une synthèse accrue de GSH et une réduction du RE.

Valeurs de glutathion total $[GSx] = [GSH] + 2[GSSG]$ mesurées dans le cytosol (Cyt) et dans le RE (RE) dans des cellules sauvages en phase exponentielle incubées en présence de 2 mM de $NaAsO_2$ (Arsénite). Les valeurs de concentrations en glutathion dans le RE ont été calculées comme présenté figure 4. La concentration cytosolique en glutathion est estimée à 4,5 fois la concentration des lysats cellulaires totaux.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd).

- **Déplétion en glutathion cytosolique**

Comme mentionné précédemment, l'effet d'une déplétion en GSH peut être observée en utilisant une souche *Δgsh1* cultivée sans apport de glutathion exogène (Spector et al., 2001). La croissance d'une souche *Δgsh1* dans un milieu dépourvu de glutathion conduit à une diminution lente de $[GSx]_{Cyt}$ au cours du temps qui atteint 1mM après 7 heures. Dans ces conditions, $[GSx]_{RE}$ reste parfaitement équivalente à $[GSx]_{Cyt}$ (**Figure 6**). Contrairement à ce qui est observé dans le système HGT1 (**voir Figure 3**), la vitesse de déplétion dans le RE et le cytosol est ici équivalente.

Une déplétion en glutathion cytosolique conduit à une déplétion équivalente dans le RE.

3. Régulation de l'import de GSH dans le RE.

Le mutant $Ero1^{C150AC295A}$ est dépourvu de l'un des ponts disulfures régulateurs contrôlant négativement l'activité de cette oxydase. L'expression de ce mutant hyperactif conduit à une toxicité cellulaire (Sevier et al., 2007) dont les causes sont mal connues. La surexpression du mutant $Ero1^{C150-C295}$ provoque l'oxydation de la protéine chaperon luminale Kar2, par la formation d'un acide sulfénique sur l'unique cystéine (Cys63) située au niveau du site de liaison à l'ATP (Wang et al., 2014). Cette oxydation prévient l'activité ATPase de l'enzyme, change son activité chaperonne en activité holdase. Elle protège ainsi la cellule contre la toxicité du mutant $Ero1^{C150AC295A}$ en diminuant la translocation protéique dans le RE et en évitant la formation d'agrégats protéiques dans ce compartiment (Sevier et al., 2007).

Figure 6

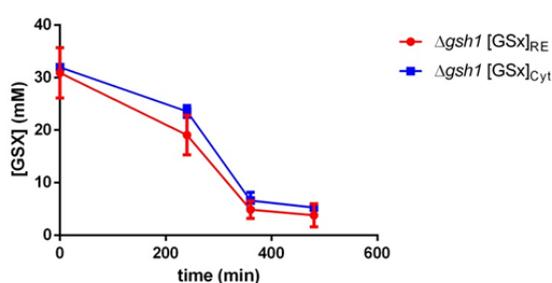


Figure 6 : La déplétion cellulaire en glutathion conduit à une déplétion similaire dans le RE.

Concentration en glutathion total $[GSx] = [GSH] + 2[GSSG]$ dans le cytosol (Cyt) et le RE (RE) dans une souche *Δgsh1* lors d'une déplétion en glutathion.

La souche a été cultivée en phase exponentielle dans un milieu minimum contenant 1 mM de GSH, puis les cellules sont lavées et mises en culture dans un milieu sans glutathion. Les valeurs de glutathion total cellulaire et du RE ont été déterminées comme décrit précédemment. La concentration cytosolique en glutathion est estimée à 4,5 fois la concentration des lysats cellulaires totaux.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

Nous avons montré précédemment que, dans une cellule HGT1, l'exposition à du GSH exogène provoque une réduction du RE et une activation forte de Ero1. Cette réduction du RE a également un effet toxique sur les cellules HGT1 (Kumar et al., 2011). Dans ces conditions, une oxydation de Kar2 par Ero1 est envisageable et cette régulation pourrait avoir un impact sur la toxicité du GSH dans le RE.

a) *L'import de GSH dans le RE est régulé par l'oxydation de Kar2.*

- **L'import de GSH dans le RE provoque une oxydation de Kar2**

Figure 7

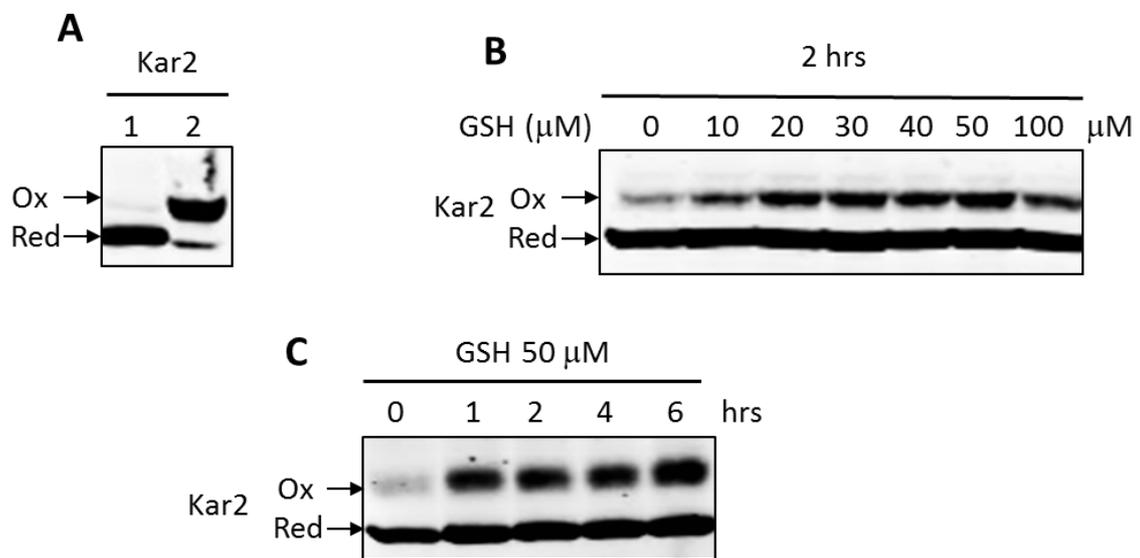


Figure 7. La réduction du RE E_{GSH} dans le système HGT1 conduit à l'oxydation de Kar2.

Western blot de Kar2 (A), les échantillons protéiques ont été réduits au DTT et alkylés par du NEM (Ligne 1) ou du Mal-PEG-maleimide (2) et servent de contrôle de la migration de la forme réduite et oxydée de Kar2 respectivement. (B) Les cellules HGT1 ont été incubées 2 heures avec une concentration croissante de GSH, les lysats protéiques de ces cellules ont été alkylés avec du NEM, puis réduits et alkylés avec du Mal-PEG-maleimide. (C) Les cellules HGT1 ont été incubées en présence de 50 μM de GSH et traitées comme en B.

Les données présentées sont représentatives de ce qui a été observé pour au moins deux expériences indépendantes.

Nous avons d'abord cherché à comprendre si l'import de GSH dans le RE provoquait l'oxydation de Kar2. L'oxydation de Kar2 a été étudiée par alkylation différentielle des résidus Cys oxydés (**Figure 7A**).

Lors de l'ajout de GSH dans le milieu de culture de cellules HGT1, nous observons une augmentation de l'oxydation de Kar2, très faible à l'état basal. Cette oxydation est proportionnelle à la quantité de

GSH ajoutée dans le milieu de culture, atteignant un plateau à partir de 30µM de GSH (**Figure 7B**). L'oxydation de Kar2 concerne au maximum environ 30% de la protéine totale.

L'activité accrue de Ero1 dans une souche HGT1 exposée à du GSH exogène est suffisante pour observer une oxydation significative de Kar2. Nous avons donc cherché à identifier l'impact possible de l'oxydation de Kar2 sur la toxicité liée au GSH et sur les flux du tripeptide dans le RE.

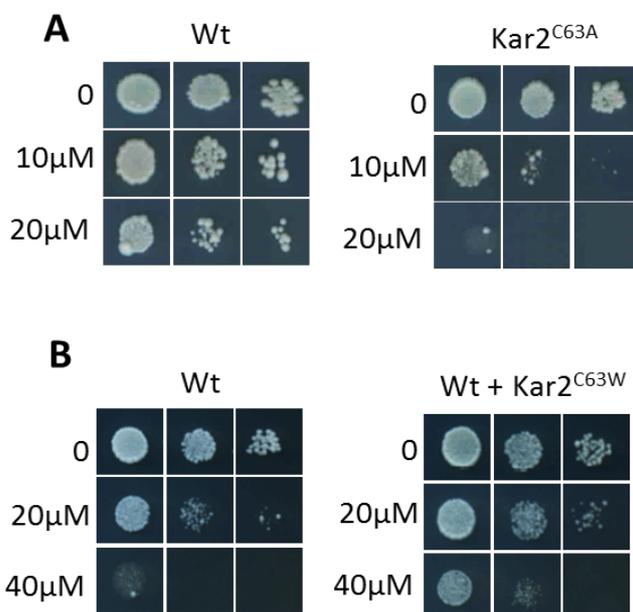
- **Les mutations Kar2^{C63A} et Kar2^{C63W} modifient la sensibilité au GSH des souches HGT1**

Les mutations Kar2^{C63A} et Kar2^{C63W}, substituant la Cys63 en Ala ou en Trp miment respectivement les formes réduite et oxydée de l'enzyme (Wang et al., 2014). KAR2 est un gène essentiel et son allèle Kar2-C63A est viable, et peut donc être exprimé en tant que seule copie de *KAR2*. En revanche, la mutation KAR2-C63W est non viable mais peut-être coexprimée avec une copie sauvage du gène, l'effet de cette mutation étant dominante (Wang et al., 2014).

Nous avons testé l'effet de ces mutants sur la toxicité du glutathion. La sensibilité des souches HGT1 exprimant Kar2^{C63A} ou Kar2^{C63W} a été évaluée par croissance sur milieu solide contenant du GSH, et une mesure de la viabilité après exposition au GSH. Nous observons que la souche Kar2^{C63A} est beaucoup plus sensible au GSH qu'une souche sauvage, et ce pour les deux tests utilisés (**Figure 8, A, C**). En revanche la souche HGT1 exprimant Kar2^{C63W} est beaucoup plus résistante à la toxicité du GSH (**Figure 8, B, C**).

L'oxydation de Kar2 permet une protection contre la toxicité du GSH. Nous avons ensuite examiné l'effet de ces mutations sur les flux de GSH dans le RE.

Figure 8



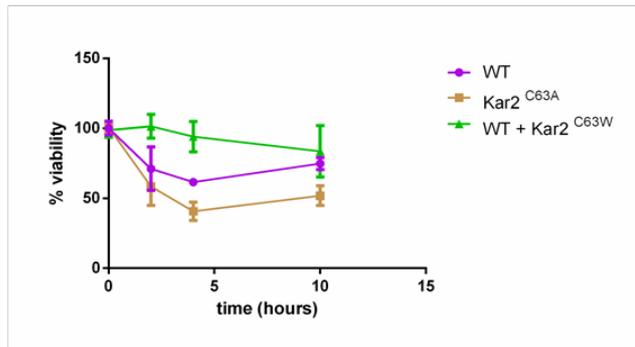
C

Figure 8. Les mutations KAR2-C63A et KAR2-C63W modifient la sensibilité au GSH de cellules HGT1.

Tolérance au GSH lors de croissance sur milieu solide contenant la concentration indiquée de GSH. (A) Une souche sauvage HGT1 (Wt) et une souche HGT1 exprimant la forme mutante Kar2^{C63A} ont été étudiées. (B) une souche sauvage HGT1 (Wt) et une souche exprimant la forme sauvage de Kar2 et la forme mutée Kar2^{C63W} ont été utilisées. Les résultats présentés sont représentatifs de ce qui a été observé pour au moins deux expériences indépendantes.

(C) Viabilité des mêmes cellules que présentées en A et B exposées à 50 μ M de GSH.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

- **Les mutations Kar2^{C63A} et Kar2^{C63W} altèrent les flux de glutathion entre RE et cytosol**

Nous avons examiné les flux de GSH dans les souches et HGT1 exprimant Kar2^{C63A} lors d'une exposition à 30 ou à 50 μ M de GSH (Figure 9).

En présence de 30 μ M de GSH, nous n'observons pas d'altération de l'import de GSH dans le RE dans les cellules HGT1 exprimant KAR2^{C63A} (Figure 9A et C). En revanche, en présence de 50 μ M de GSH, la mesure de [GSX]_{RE} montre qu'il y a perte de la saturation observée dans la souche sauvage. Ainsi, les valeurs de [GSX]_{RE} et [GSX]_{Cyt} sont très élevées et identiques dans cette souche (Figure 9B et D).

À l'opposé, dans les cellules HGT1 exprimant Kar2^{C63W}, le transport du GSH dans le RE est significativement inhibé, quelles que soient les quantités de GSH ajoutées dans le milieu. En effet, les valeurs de [GSX]_{RE} sont toujours inférieures à celles de [GSX]_{Cyt} (Figure 9 E, F).

Ces résultats suggèrent que l'oxydation de Kar2 est responsable du phénomène de saturation de l'import de GSH. Sachant que l'import de GSH dans le RE active Ero1 par réduction, et que cette activation conduit à la production d'H₂O₂ in situ qui oxyde Kar2, nos résultats suggèrent que l'import de GSH est régulé via l'activation indirecte d'Ero1.

Figure 9

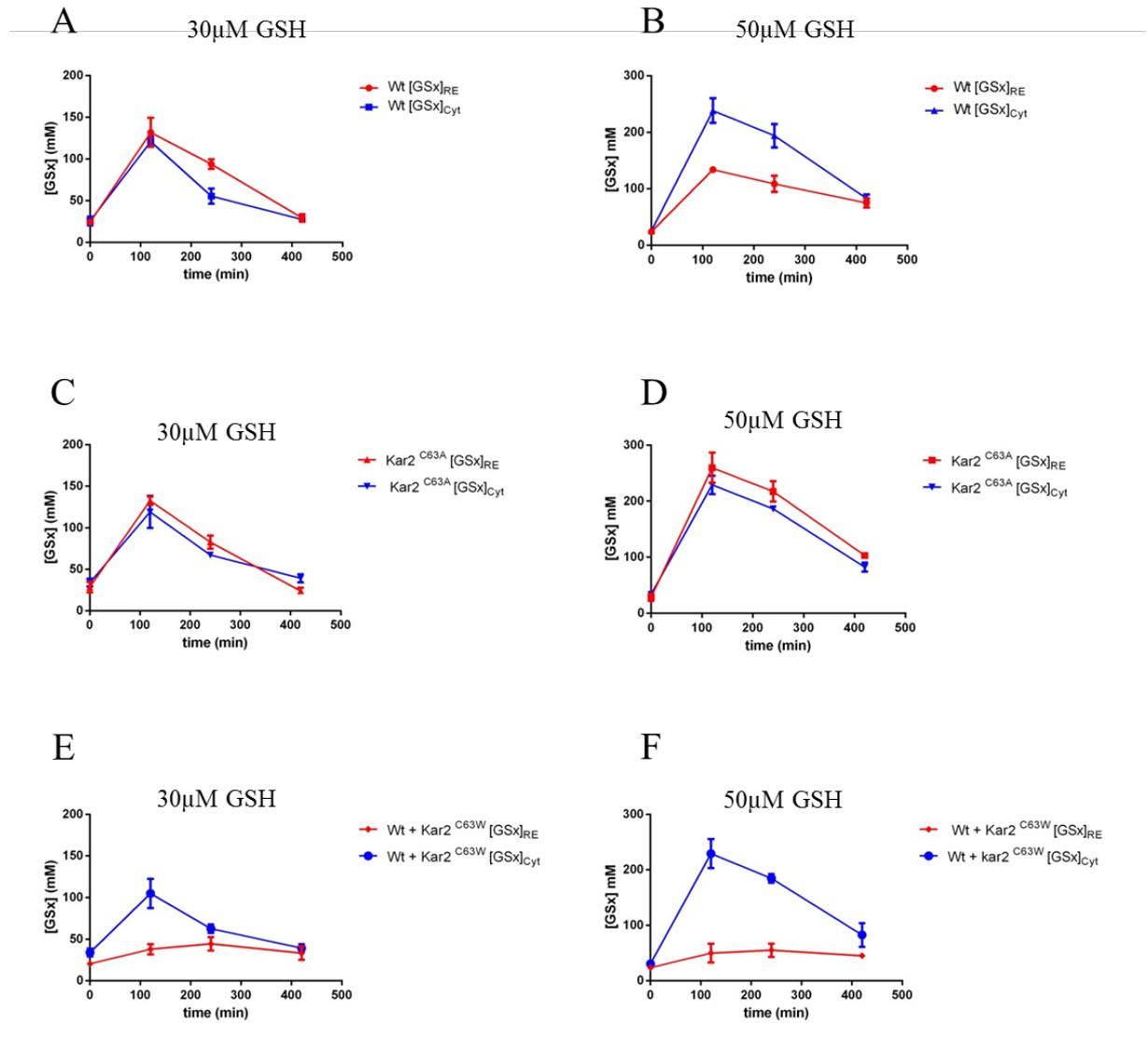


Figure 9 : L'import du GSH dans le RE est prévenu par l'oxydation de Kar2.

Les souches HGT1 présentées dans la figure 6 ont été utilisées pour mesurer le glutathion total ([GSx]) dans le cytosol (Cyt) et dans le RE (RE), après incubation avec 30 μM de GSH (figures de gauche) ou 50 μM de GSH (figures de droite). (A-B) souche HGT1 Wt (C-D) Souche HGT1 exprimant la forme mutante Kar2^{C63A} (E-F) Souche sauvage exprimant la forme sauvage de Kar2 et la forme mutée Kar2^{C63W}.

Les valeurs de concentration en glutathion dans le RE ont été calculées en utilisant les sondes RE-rxYFP et RE-1-Cys-Grx1. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants ± l'écart type (s.d.).

b) *Interaction fonctionnelle entre induction d'Ero1 par la voie UPR et régulation de l'import de GSH dans le RE*

Nous avons donc un système reposant sur un interplay entre l'activité d'Ero1 provoqué par la réduction du RE, l'oxydation de Kar2 et la régulation des flux intracellulaires de glutathion. Afin de confirmer ce modèle, nous avons étudié l'importance du niveau d'activité d'Ero1 dans la régulation des flux de glutathion intracellulaire.

- **L'hyperactivité d'Ero1 stimule la synthèse cellulaire du glutathion et son import dans le RE**

Figure 10

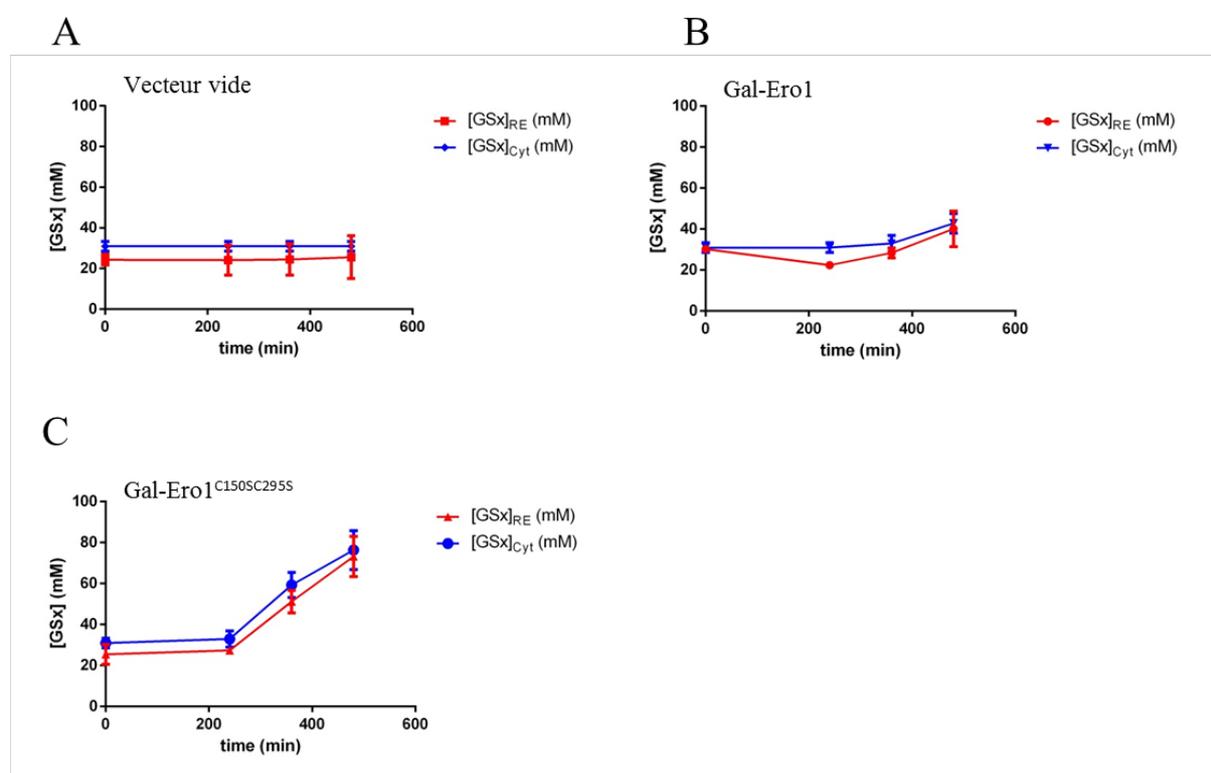


Figure 10. La surexpression de Ero1^{C150SC295S} conduit à une augmentation de la concentration en glutathion cellulaire et du RE.

Valeurs de glutathion total cytosolique [GSx]_{cyt} dans des cellules en phase exponentielle dans un milieu galactose portant (A) un vecteur vide, (B) le construit Gal-Ero1-myc, comprenant Ero1 sauvage portant le tag myc sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose, ou (C) le construit Gal-Ero1^{C150SC295S}-myc comprenant la forme hyperactive d'Ero1 portant le tag myc sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose. Les souches sont cultivées dans un milieu contenant 2% de raffinose jusqu'en phase exponentielle, puis sont lavées et mises en culture dans un milieu contenant 2% de galactose.

L'induction de Ero1 dans ces conditions est vérifiée par Western blot anti-myc (data not shown)

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants ± l'écart type (sd).

Le mutant Ero1^{C150AC295A} possède une activité oxydase dérégulée, car il est incapable de former l'un de ses ponts disulfure régulateurs. Selon le principe d'une diffusion facilitée du GSH dans le RE, l'activité d'Ero1, oxydant le GSH en GSSG devrait stimuler l'import de GSH. Nous avons surexprimé Ero1^{C150AC295A} à partir d'un promoteur inductible par le galactose. Cette surexpression provoque une augmentation de [GSx]_{RE}, qui atteint la valeur de 17mM, 8 heures après le début de la culture en milieu galactose (**Figure 10A**). De façon surprenante, nous observons une augmentation de [GSx]_{Cyt} dans ces conditions qui atteint la valeur de 80mM, 8 heures après le début de l'induction d'Ero1^{C150AC295A}. La concentration en GSSG augmente également, dans les lysats cellulaires totaux (Sevier et al. 2007) et dans le RE (**data not shown**).

La surexpression d'Ero1 sauvage provoque également une augmentation de [GSx]_{Cyt} et [GSx]_{RE}, cependant inférieure à celle observée avec Ero1^{C150AC295A}.

Ainsi l'activation d'Ero1 stimule-t-elle un import de GSH dans le RE par une activation concomitante de la biosynthèse cellulaire de GSH. En effet une synthèse accrue semble être déclenchée par le stress du RE lié à la surexpression d'Ero1^{C150AC295A}. Ces résultats suggèrent que l'activité d'Ero1 stimule l'import de GSH dans le RE, renforçant l'idée d'une interaction fonctionnelle entre activation d'Ero1 et import de GSH.

- **L'UPR est un paramètre essentiel dans l'induction de l'activité d'Ero1 et l'import de GSH dans le RE**

La réponse UPR, activée lors d'un stress RE, permet une résolution du stress RE par l'activation transcriptionnelle de nombreuses cibles. Parmi celles-ci, on note la machinerie Ero1-PDI et la protéine chaperon Kar2. Nous avons donc cherché à déterminer l'importance de cette induction de la machinerie Ero1-PDI sur l'oxydation de Kar2 et sa régulation des flux de GSH dans le RE.

Comme nous l'avons vu précédemment, un traitement à 30µM de GSH sur une souche HGT1 provoque une oxydation de Kar2 après 1 heure d'exposition. Au contraire, une absence d'oxydation de Kar2 dans ces conditions est observée dans une souche $\Delta ire1$ (**Figure 11A**). L'absence d'oxydation de Kar2 dans un mutant $\Delta ire1$ conduit à une perte de la saturation de l'entrée de GSH observée à forte concentration de glutathion. On observe ainsi une réduction accrue du GSH lors d'une exposition à 50µM de GSH par rapport à ce qui est observé à 30µM dans une souche HGT1- $\Delta ire1$, contrairement à ce qui est observé pour une souche sauvage (**Figure 11B-C**). La surexpression d'Ero1 ou de son mutant hyperactif Ero1^{C150AC295A} permet de restaurer l'oxydation de Kar2, indiquant que la synthèse d'Ero1 accrue par la voie UPR est critique pour l'interplay entre GSH, Kar2 et Ero1 (**Figure 11D**).

Nos résultats indiquent donc que l'induction de la voie UPR lors de l'ajout de GSH dans le milieu de souches HGT1, permettant l'expression accrue d'Ero1, permet l'oxydation de Kar2.

Figure 11

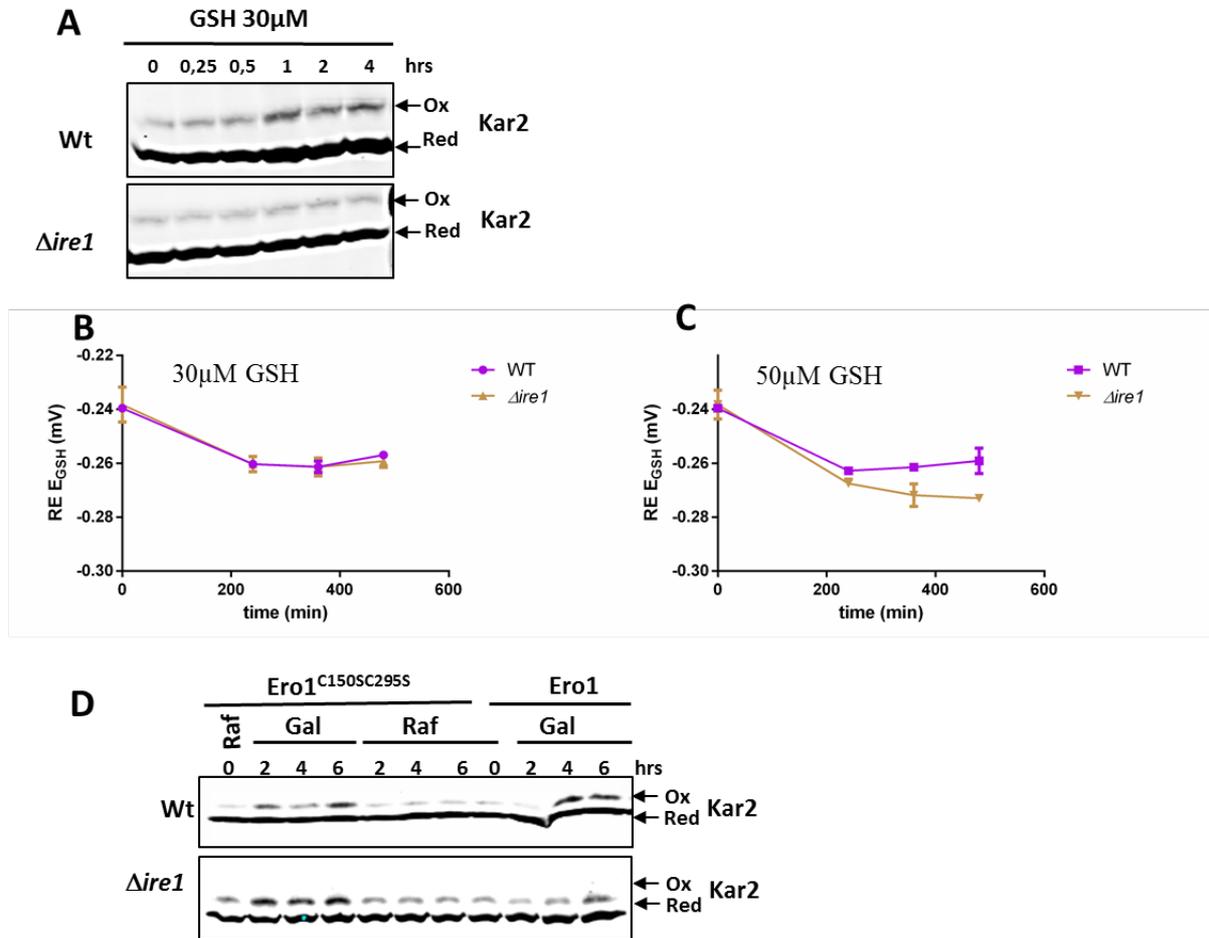


Figure 11 : Importance de la réponse UPR dans l'oxydation de Kar2

(A) Western blot de Kar2. La souche sauvage HGT1 (Wt) et HGT1-*Aire1* (*Aire1*) exposées à 30 μM de GSH. Les échantillons protéiques ont été traités comme présenté précédemment.

(B-C) $RE E_{\text{GSH}}$ dans une souche HGT1 (Wt) et une souche HGT1-*Aire1* (*Aire1*) exposées à (E) 30 μM ou (F) 50 μM de GSH. Le $RE E_{\text{GSH}}$ est calculé à partir de l'état d'oxydation de la sonde RE-rxYFP. Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd).

(D) Souches Wt et *Aire1* portant Ero1 sauvage ou Ero1^{C150AC295A} sous le contrôle d'un promoteur inducible au galactose (Gal). Les souches sont cultivées en phase exponentielle dans un milieu contenant du raffinose (Raf), puis sont lavées et mises en culture dans un milieu contenant 2% de galactose (Gal)

- Une exposition à la tunicamycine induit un stress RE, une oxydation de Kar2 et un influx de GSH dans le RE.

La tunicamycine (Tm) est un inhibiteur de la N-glycosylation des protéines du RE, classiquement utilisée pour provoquer un stress RE.

Nous avons mesuré les flux de GSH au RE après traitement par la Tm (**Figure 12**). Nous observons que le traitement d'une souche sauvage avec 1µg/ml de Tm, provoque une augmentation de $[GSx]_{RE}$ d'une valeur de base de 30mM jusqu'à 60mM. Cependant, comme nous l'avons déjà observé lors de la surexpression d'Ero1, une augmentation de $[GSx]_{Cyt}$ est également observée.

Figure 12

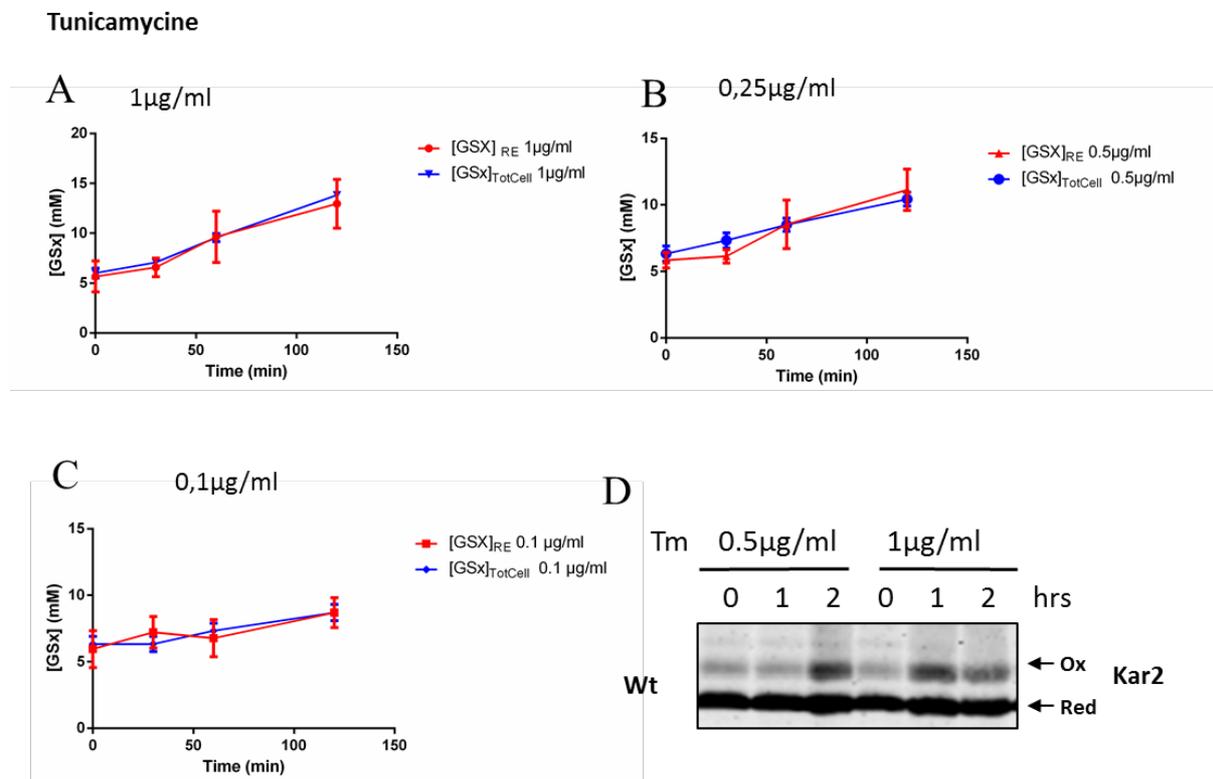


Figure 12. Un traitement à la tunicamycine induit une synthèse accrue de GSH et une réduction du RE.

(A, B, C) Valeurs de glutathion total cytosolique $[GSx]_{Cyt}$ dans des cellules en phase exponentielle exposées à (A) 1µg/ml, (B) 0,25µg/ml (C) 0,1µg/ml de tunicamycine.

Les données présentées sont la moyenne de trois répliquats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd).

(D) Western blot de Kar2. La souche sauvage exposée à 1 ou 0,25µg/ml de tunicamycine. Les échantillons protéiques ont été traités comme présenté précédemment.

Sachant qu'un stress du RE intense provoque une mauvaise localisation des sondes redox (Rubio et al., 2011), nous avons testé de plus faibles doses de Tm. Nous observons également une élévation des valeurs de $[GSx]_{RE}$ et de $[GSx]_{Cyt}$ en présence de Tm à une concentration de 0,25 et 0,1 $\mu\text{g/ml}$, (**Figure 12B-C**). La bonne localisation des sondes ER-rxYFP et ER-1-Cys-Grx1 a été vérifiée par fractionnement cellulaire (**Annexe 1**). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Papa montrant une réduction du RE en réponse à la Tm (Merksamer et al., 2008).

Nous avons aussi examiné l'oxydation de Kar2 en réponse à la Tm (**Figure 12D**) et observons une oxydation de Kar2 dans ces conditions. Il est cependant important de noter que la vitesse d'oxydation augmente avec la concentration de Tm, puisqu'elle est visible 1 heure après le début du traitement avec 1 $\mu\text{g/mL}$ de Tm, et 2 heures après un traitement avec 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de Tm.

Lors d'un traitement à la tunicamycine, nous observons la présence d'un import de GSH dans le RE et d'une oxydation de Kar2. La vitesse d'oxydative de Kar2 lors du traitement la Tm renforce l'idée d'un rôle critique de l'induction d'Ero1 par l'UPR dans cette interaction.

4. Le GSSG est également importé dans le RE

L'étude des flux de GSSG existants entre RE et cytosol est difficile *in vivo*. L'homéostasie redox du GSH dans le cytosol est maintenue par la GSH réductase, et également par Grx2 et Trx2, ainsi que par la séquestration du GSSG dans la vacuole par le transporteur Ycf1 (Morgan et al., 2013). Afin de déterminer si le GSSG est également importé dans le RE depuis le cytosol, nous avons utilisé des cellules HGT1 et évalué les flux intracellulaires résultants d'une exposition au GSSG.

- **Une oxydation cytosolique a un impact sur RE E_{GSH}**

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la perturbation du système d'homéostasie redox cytosolique, dans un mutant $\Delta glr1$ a pour conséquence une oxydation de E_{GSH} cytosolique et luminal (**Table 1 et Figure 13A-B**). Chez des mutants $\Delta glr1\Delta ycf1$ ou $\Delta glr1\Delta ycf1\Delta grx2\Delta trx2$, on note également une oxydation du RE E_{GSH} et du ratio $[GSH]_{RE}/[GSSG]_{RE}$, suggérant encore une fois une certaine équilibration des états redox cytosolique et du RE (**Figure 13B et C**). La mesure du RE E_{GSH} dans le mutant $\Delta glr1\Delta ycf1\Delta grx2\Delta trx2$ est toutefois limitée par l'oxydation complète de la sonde RE-rxYFP. Ce résultat renforce l'idée d'une dépendance de l'état redox luminal à l'état redox cytosolique.

Figure 13

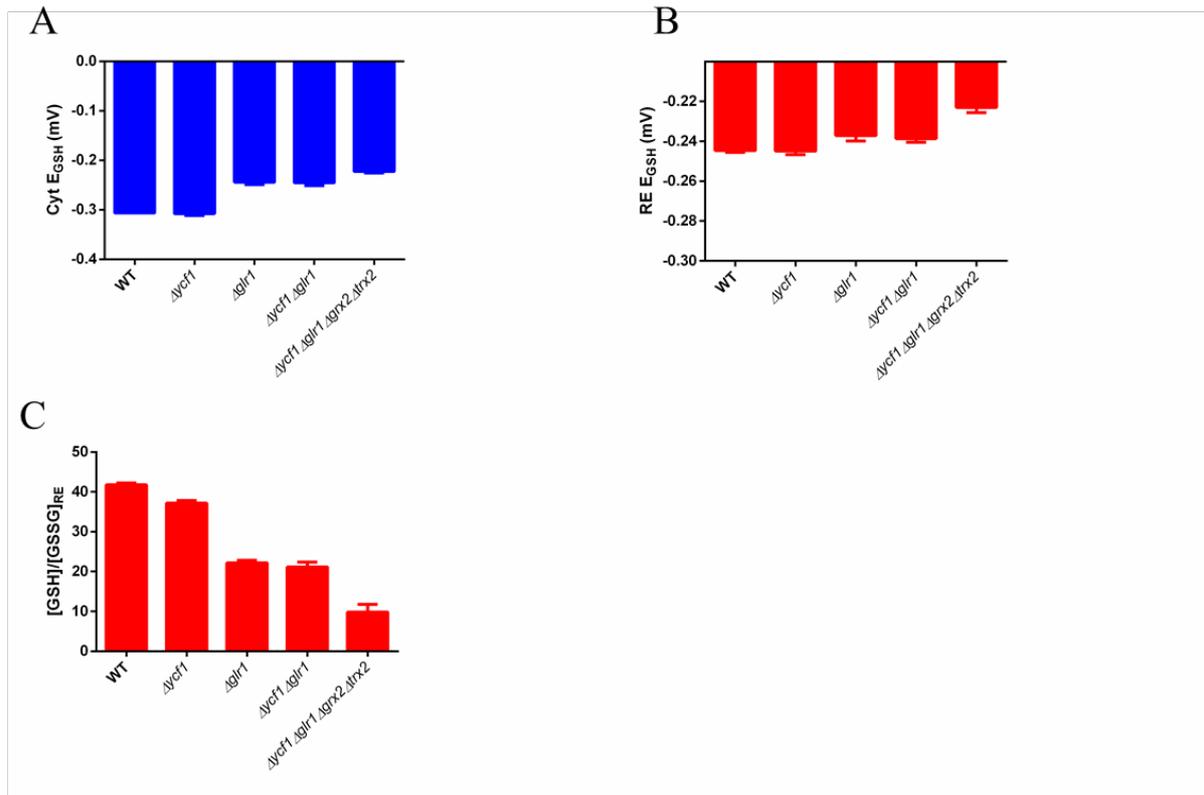


Figure 13. Une oxydation cytosolique provoque une oxydation du RE.

Valeurs de **(A)** l'état redox du glutathion cytosolique (Cyt E_{GSH}), **(B)** et du RE (RE E_{GSH}). Ces valeurs d' E_{GSH} sont calculées à partir des sondes Cyt-rxYFP et RE-rxYFP respectivement. **(C)** Valeurs du ratio [GSH]/[GSSG] dans le RE, cette valeur est calculée à partir de l'état d'oxydation de la sonde RE-1-Cys-Grx1. Ces valeurs ont été mesurées pour des souches sauvages (Wt), $\Delta yef1$, $\Delta glr1$, $\Delta glr1 \Delta yef1$ et $\Delta glr1 \Delta yef1 \Delta grx2 \Delta trx2$ en phase exponentielle de croissance.

Les données présentées sont la moyenne de trois répliquats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd).

- **Le GSSG accumulé dans le cytosol est rapidement réduit, masquant ainsi les flux intracellulaires.**

L'exposition d'une souche HGT1 à $15 \mu\text{M}$ de GSSG conduit à une augmentation forte de $[GSx]_{\text{TotCell}}$, très proche de ce qui est mesuré pour l'ajout de $30 \mu\text{M}$ GSH (**Figure 14A et B**). $[GSH]_{\text{TotCell}}$ mesuré lors de l'ajout de $15 \mu\text{M}$ de GSSG révèle que l'accumulation de glutathion cellulaire est principalement due à une concentration élevée de GSH (**Figure 14C**). Si, dans ces conditions, une accumulation de plus de 4mM de GSSG dans la cellule est observable dès 15 minutes d'exposition, on note que la $[GSSG]_{\text{totcell}}$ diminue rapidement et revient à un niveau basal après 5 heures (**Data not shown**). L'accumulation de glutathion dans les cellules HGT1 lors d'une exposition à $15 \mu\text{M}$ de GSSG étant majoritairement sous forme de GSH, il n'est pas surprenant de mesurer une accumulation de $[GSx]_{\text{RE}}$, majoritairement provoquée par une augmentation de $[GSH]_{\text{RE}}$ (**Figure 14E**) et une réduction du RE E_{GSH} (**data not shown**). $[GSSG]_{\text{RE}}$ augmente lentement, probablement à cause de l'activité d'Ero1 dans ces conditions de réductions du RE.

Figure 14

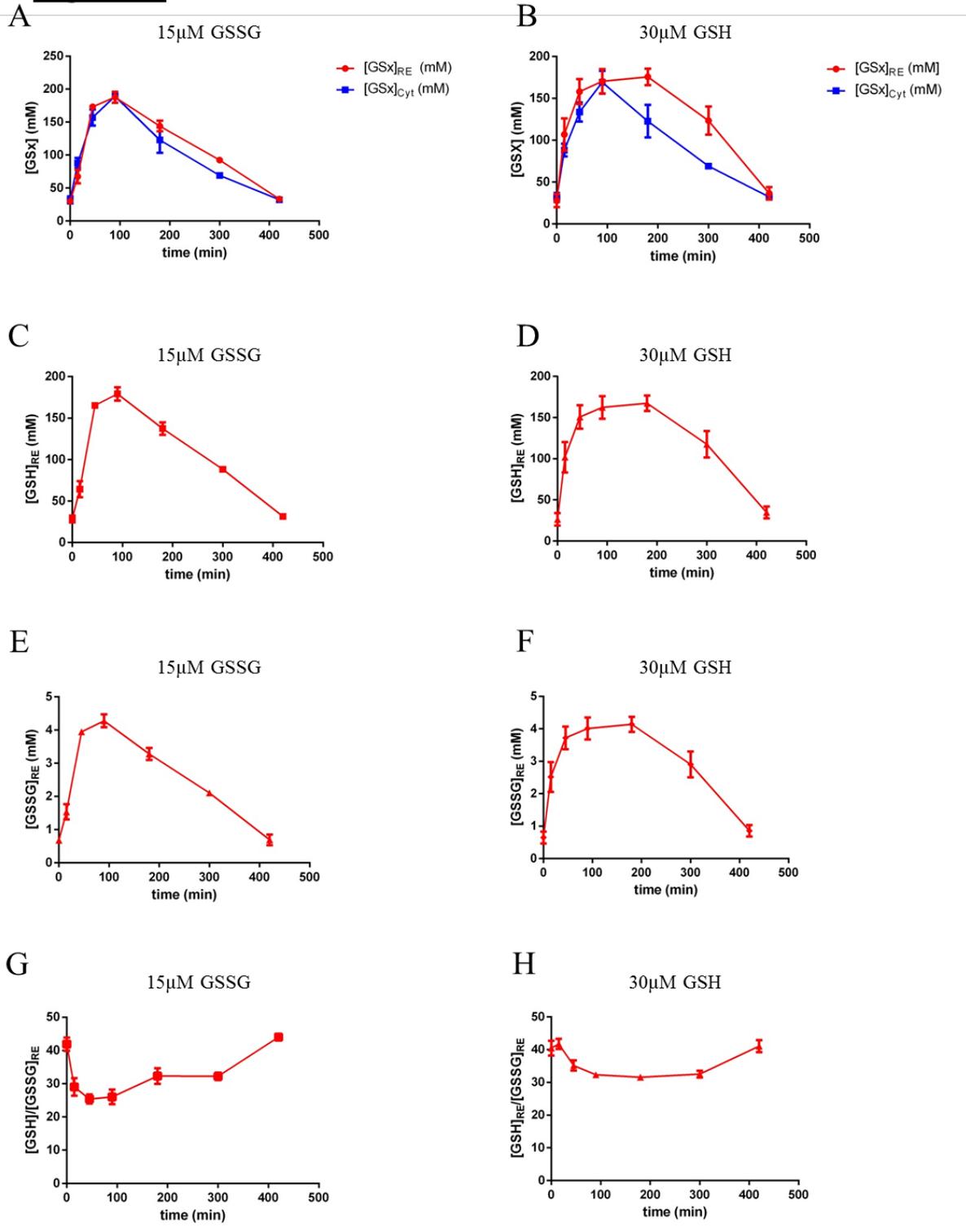


Figure 14 : Dans une souche HGT1, l'exposition au GSSG provoque une accumulation de GSH dans la cellule et le RE.

(A, C, E, G) Valeurs de (A) total $[GSx] = [GSH] + 2[GSSG]$, (C) glutathion réducté $[GSH]$ (E) glutathion oxydé $[GSSG]$ mesurées dans le cytosol (Cyt) et dans le RE (RE) et (G) du ratio $[GSH]/[GSSG]$ dans le RE pour des cellules HGT1 exposées à 15 μM de GSSG.

(B, D, F, H) Valeurs de (B) total $[GSx] = [GSH] + 2[GSSG]$, (D) glutathion réducté $[GSH]$ (F) glutathion oxydé $[GSSG]$ mesurées dans le cytosol (Cyt) et dans le RE (RE) et (H) du ratio $[GSH]/[GSSG]$ dans le RE pour des cellules HGT1 exposées à 30 μM de GSH.

Les valeurs de concentration en glutathion dans le RE ont été calculées en utilisant les sondes RE-rxYFP et RE-1-Cys-Grx1. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (s.d.).

On note toutefois que le ratio $[GSH]_{\text{RE}}/[GSSG]_{\text{RE}}$, mesuré lors de l'ajout de 30 μM de GSH ou 15 μM GSSG sur des cellules HGT1, est distinct dans ces deux conditions. L'ajout de 30 μM de GSH conduit à une diminution lente du ratio $[GSH]_{\text{RE}}/[GSSG]_{\text{RE}}$ du fait de la production de GSSG par Ero1. *A contrario*, l'exposition au GSSG provoque une diminution rapide du ratio qui est visible dès 15 minutes, suggérant une entrée de GSSG dans ces conditions (**Figure 14G H**).

- **Flux de GSSG chez les mutants *Δglr1*, *Δycf1* et *Δglr1Δycf1***

La rapide réduction cytosolique du GSSG en GSH et la séquestration du GSSG dans la vacuole limitent l'étude des flux de GSSG entre cytosol et RE dans une souche sauvage. Afin de trouver des conditions qui permettent une accumulation plus importante de GSSG dans le cytosol, nous avons utilisé les souches mutantes *Δglr1*, *Δycf1* et *Δglr1Δycf1* surexprimant HGT1. L'utilisation du mutant *Δglr1Δycf1Δgrx2Δtrx2* dans cette étude est en revanche impossible du fait de la complète oxydation des sondes RE-rxYFP et RE-grx1-1cys, prévenant la mesure des concentrations de glutathion dans le RE.

Les mutants surexprimant HGT1 ont été exposés à 15 μM de GSSG. L'accumulation de $[GSx]_{\text{TotCell}}$ est très similaire pour tous les mutants à ce qui est observé pour une souche sauvage (**Figure 15A**). Cependant, l'accumulation de GSH et de GSSG est distincte selon les mutants.

La délétion de la réductase cytosolique dans le mutant *Δglr1* surexprimant HGT1 permet lors de l'ajout de 15 μM dans le milieu de culture une accumulation importante de GSSG dans la vacuole (**Figure 15C**). Au contraire, la délétion du transporteur vacuolaire du GSSG dans la souche *Δycf1* provoque une diminution drastique de l'accumulation de $[GSSG]_{\text{TotCell}}$ en limitant la séquestration du GSSG dans la vacuole et en laissant ce pool de glutathion disponible pour la réduction par la Glr1 (**Figure 15C**). Le double mutant *Δglr1Δycf1* permet quant à lui une accumulation plus importante de GSSG cytosolique que le mutant *Δycf1* qui reste transitoire, car le glutathion oxydé entrant dans la cellule, s'il ne peut être accumulé dans la vacuole, est toutefois très lentement réduit en GSH par les Grx2 et Trx2 cytosoliques (Morgan et al., 2013).

Figure 15

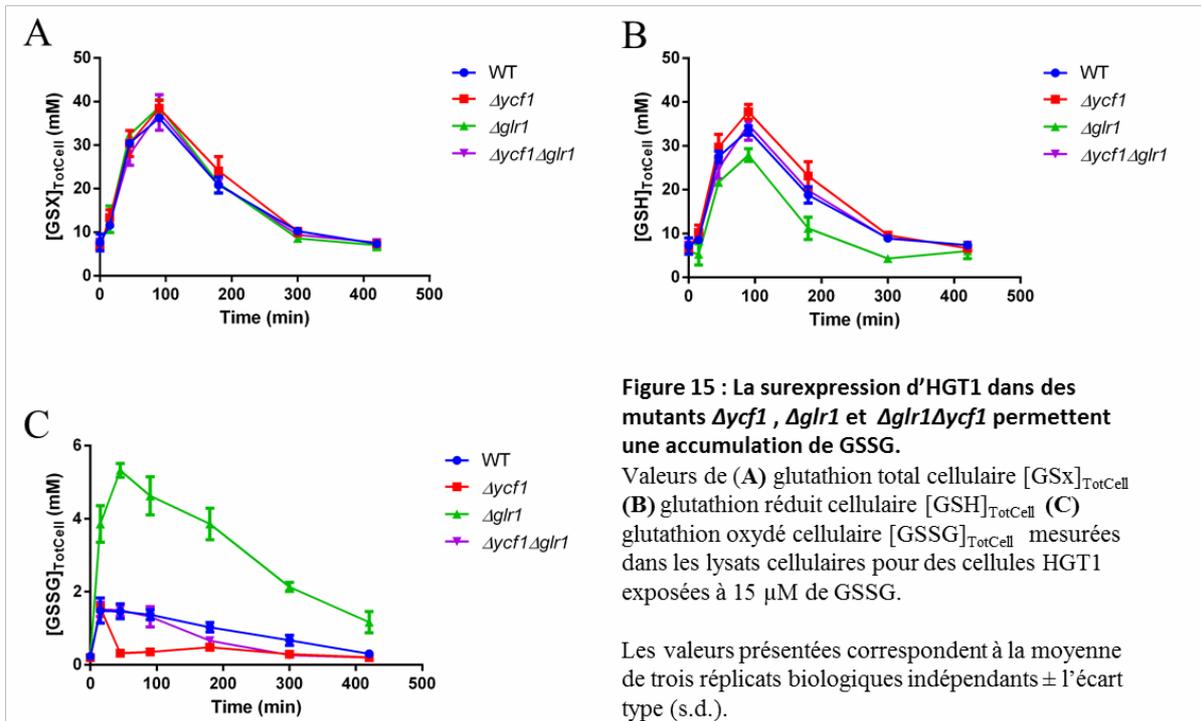
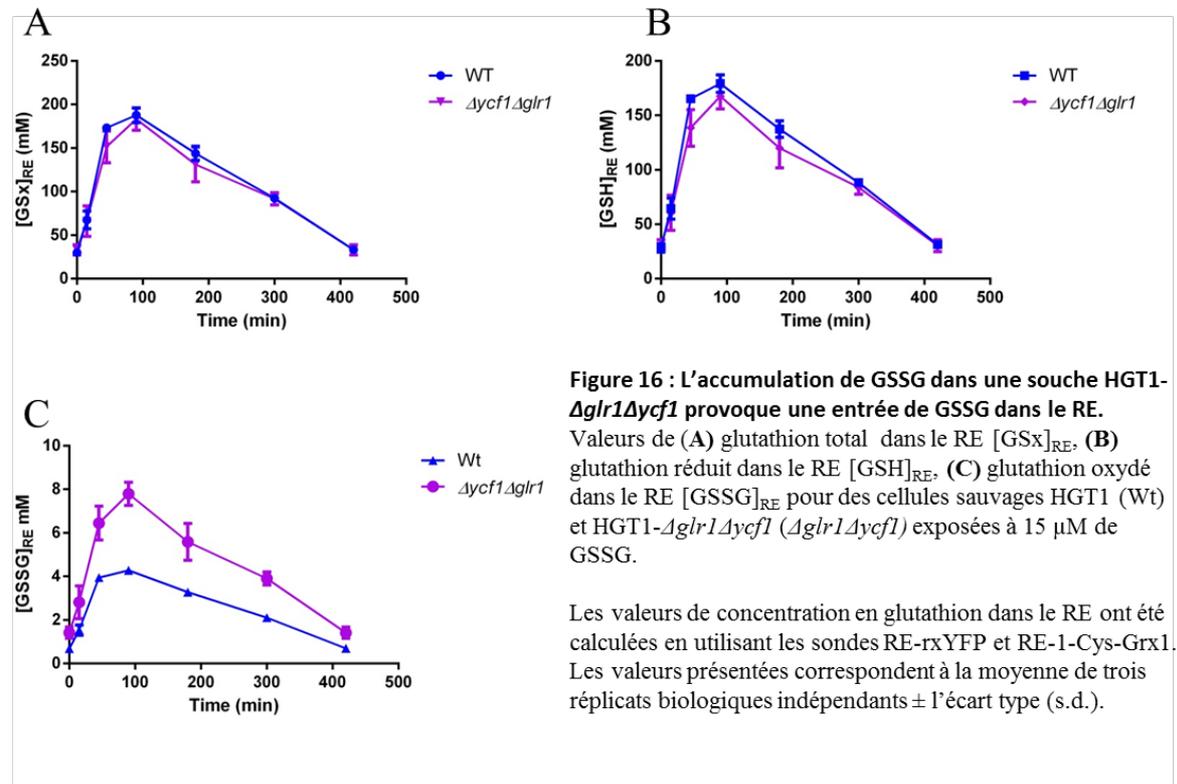


Figure 16



L'utilisation de ces mutants dans le système HGT1 permet donc une modulation des taux de GSSG accumulés dans le cytosol lors d'un ajout de GSSG dans le milieu de culture. Afin de démasquer des flux intracellulaires de GSSG, l'effet dans le RE de l'ajout de 15µM de GSSG a été observé dans une souche HGT1 sauvage et un mutant *Δglr1Δycf1*. On observe une accumulation de [GSx]_{RE} identique chez la souche sauvage et chez le mutant. Cette accumulation est similaire à celle qui est observée pour [GSx]_{TotCell} (**Figure 16A**). On remarquera que l'absence de séquestration du GSSG dans la vacuole dans le mutant *Δglr1Δycf1* ne provoque pas une accumulation significativement différente de GSx dans le RE, puisque cette séquestration n'implique qu'environ 1mM de GSSG. Dans les deux souches, l'augmentation de [GSx]_{RE} est principalement due à une augmentation de [GSH]_{RE} (**Figure 16B**). Même si l'accumulation cytosolique de GSSG dans la souche *Δglr1Δycf1* est limitée par l'activité de réduction de la Grx2 et Trx2, on observe toutefois une augmentation de [GSSG]_{RE} accrue dans le mutant par rapport à ce qui est observé pour une souche sauvage (**Figure 16C**). Ces données montrent que l'accumulation de GSSG dans le cytosol chez une souche *Δglr1Δycf1* conduit à une entrée de GSSG dans le lumen.

- **Flux de GSSG dans le mutant *Δglr1Δycf1Δgrx2Δtrx2***

Dans des cellules de la souche HGT1-*Δglr1Δycf1Δgrx2Δtrx2*, on observe une accumulation transitoire de GSSG extrêmement importante après ajout de 15µM de GSSG dans le milieu (**Figure 17A-C**). Afin d'étudier les flux de glutathion vers le RE chez ce mutant pour lequel l'utilisation des sondes dans le RE est rendue impossible en raison de son état d'oxydation majeur, les cellules ont été traitées au DTT. Après lavage, les cellules sont cultivées dans un milieu sans ou en présence de 30µM de GSSG, et la vitesse de ré-oxydation de la sonde du RE est monitorée. On note que l'ajout de GSSG dans le milieu conduit à une ré-oxydation plus rapide de la sonde RE-rxYFP (**Figure 17D**), renforçant l'idée d'un flux de GSSG entrant dans RE lorsque celui-ci est accumulé dans le cytosol.

Figure 17

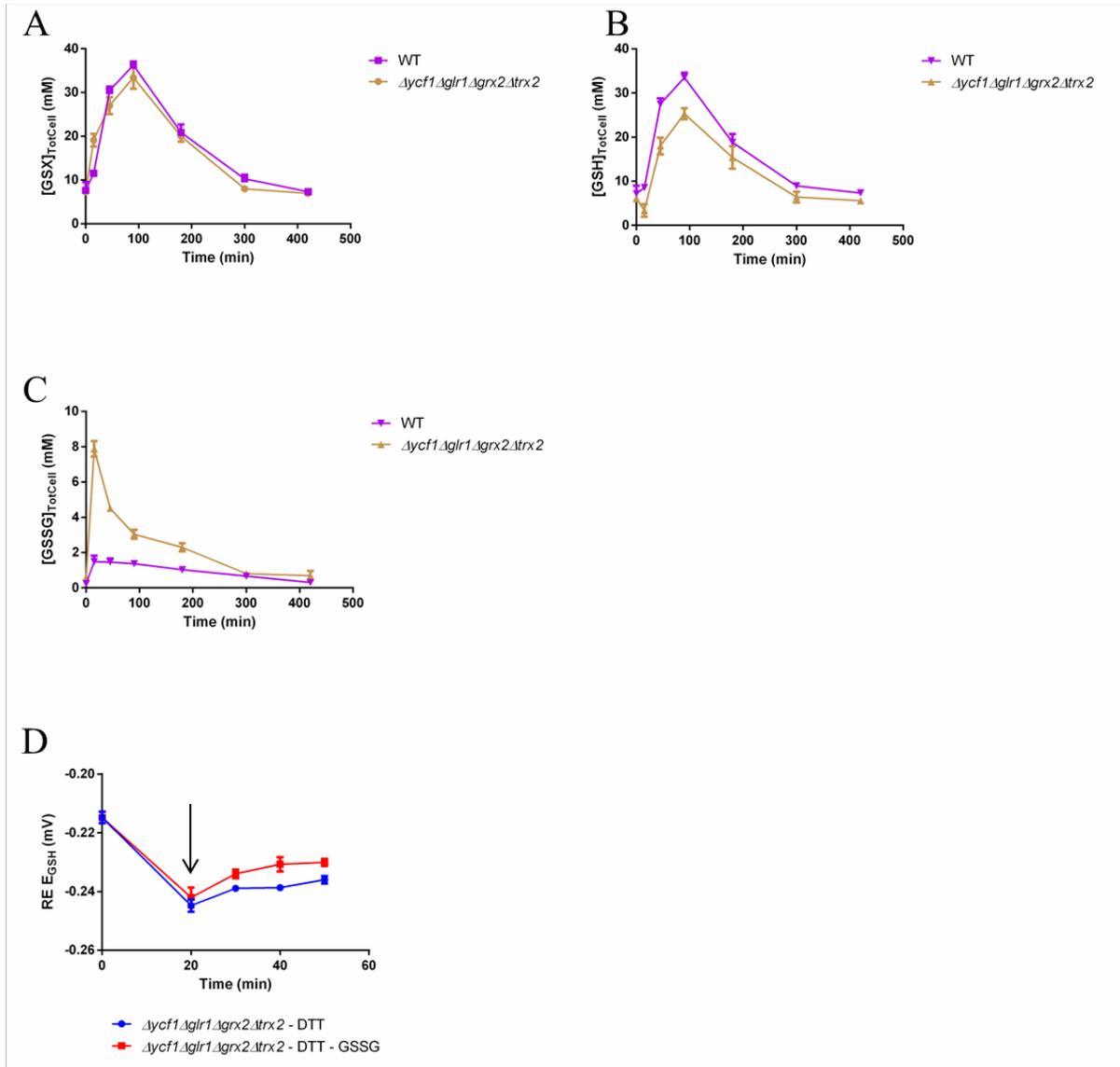


Figure 17 : L'accumulation de GSSG dans une souche HGT1- $\Delta glr1 \Delta ycf1 \Delta grx2 \Delta trx2$ provoque une entrée de GSSG dans le RE.

(A, B, C) Valeurs de (A) glutathion total cellulaire $[GSx]_{TotCell}$, (B) glutathion réduit cellulaire $[GSH]_{TotCell}$, (C) glutathion oxydé cellulaire $[GSSG]_{TotCell}$ mesurées dans les lysats cellulaires de la souche sauvage HGT1 (Wt) et de la souche HGT1- $\Delta glr1 \Delta ycf1 \Delta grx2 \Delta trx2$ ($\Delta glr1 \Delta ycf1 \Delta grx2 \Delta trx2$) exposées à 15 μM de GSSG.

(D) État redox du glutathion dans le RE ($RE E_{GSH}$) dans une souche HGT1- $\Delta glr1 \Delta ycf1 \Delta grx2 \Delta trx2$ ($\Delta glr1 \Delta ycf1 \Delta grx2 \Delta trx2$). Les cellules ont été traitées 20 minutes avec 200 μM de DTT, puis lavées (flèche) et mises en culture dans un milieu contenant ou non 30 μM de GSSG.

Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (s.d.).

C. Discussion

- **Les concentrations cytosolique et luminale en glutathion sont en équilibre**

L'utilisation des sondes RE-rxYFP et RE-1-cys-Grx1 permet la détermination des concentrations absolues en glutathion dans le lumen. Un système similaire a été précédemment utilisé dans des cellules HeLa, lors d'une étude montrant une concentration $[GSx]_{RE}$ très supérieure à la concentration cellulaire totale en glutathion, assimilée à la concentration cytosolique (Montero et al., 2013). Nos données, au contraire, suggèrent une concentration équivalente entre les deux compartiments cellulaires. On note toutefois que Montero et collaborateurs n'ont pas réalisé une détermination précise de la concentration en glutathion cytosolique, et utilisent la détermination totale cellulaire. Chez les mammifères, aucune donnée ne suggère une telle équivalence.

Nos observations sont renforcées par l'utilisation du système HGT1 ou de divers stress induisant une synthèse accrue de glutathion dans le cytosol. En effet, nos données montrent que toute augmentation de la concentration en GSH cytosolique provoque une augmentation équivalente dans le RE.

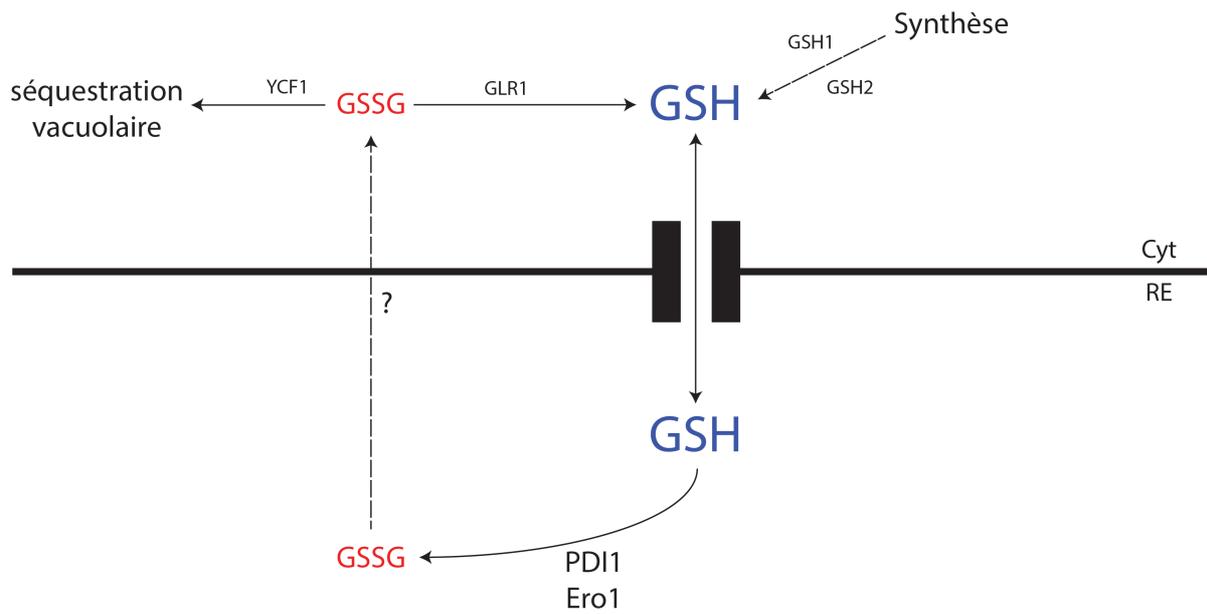
- **Le GSH et GSSG sont importés dans le RE selon un gradient de concentration**

L'utilisation de cellules HGT1 permet la mise en évidence des flux intracellulaire de glutathion. Précédemment, ces flux ont principalement été décrits *in vitro*, sur des microsomes isolés (Bánhegyi et al., 1999). Dans ce système, le GSH est importé dans le RE selon un transport présentant les caractéristiques d'une diffusion facilitée : le transport décrit est bidirectionnel, dépend de la concentration en GSH et est saturable (Bánhegyi et al., 1999). Cette même étude conclue à un transport très lent voire inexistant de GSSG dans le RE.

Notre étude permet une approche de ces flux intracellulaires *in vivo*. Le transport de GSH observé dans notre système permet également de conclure à un transport du GSH selon un transport facilité, saturable pour des concentrations de $[GSH]_{Cyt} > 30$ mM. De plus, l'augmentation de la concentration cytosolique en GSSG permet la mise en évidence l'import possible de GSSG dans le RE. Le maintien de l'homéostasie redox cytosolique est assuré par l'activité de la glutathion réductase Glr1 (et dans une moindre mesure Grx2 et Trx2), et par la séquestration du GSSG dans la vacuole par le transporteur Ycf1. Ce système assure le maintien d'un environnement extrêmement réducteur dans le cytosol, prévenant toute accumulation de GSSG dans ce compartiment. Ainsi, l'entrée de GSSG dans le RE est très probablement exclue dans des conditions physiologiques.

1. Conditions basales

$$[GSx]_{Cyt} = [GSx]_{RE}$$



2. Augmentation de la concentration cytosolique en GSH

$$[GSx]_{Cyt} > [GSx]_{RE}$$

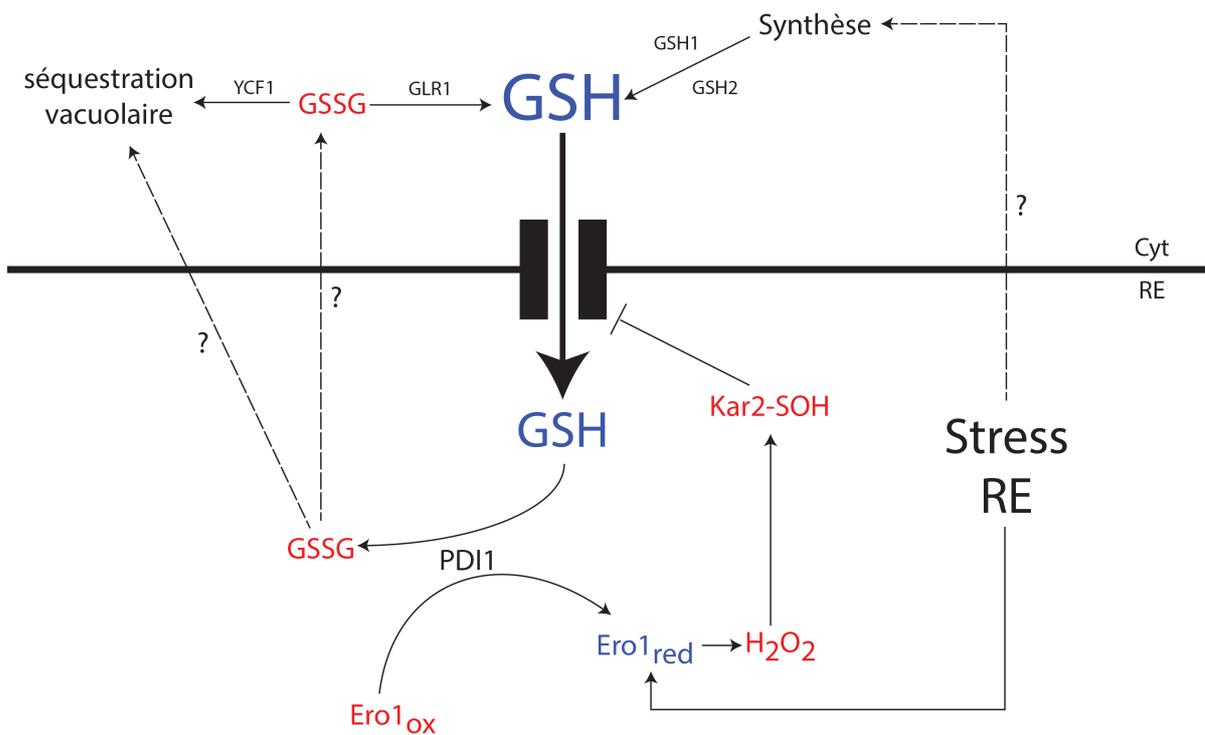


Figure 18: Modèle de transport du GSH

(1) En conditions basales :

Dans des conditions normales de croissance, la concentration cytosolique et lumenale en glutathion s'équilibre grâce à une diffusion facilitée du GSH. Le RE E_{GSH} est maintenu oxydé par l'activité du relai Ero1-PDI, permettant une production dans le RE en GSSG. L'export du GSSG et son devenir sont encore inconnus.

(2) Lors d'une augmentation de la concentration cytosolique en GSH

Une synthèse accrue de GSH lors d'un stress ou l'accumulation cytosolique du GSH dans les cellules HGT1 provoque un flux entrant de GSH dans le RE. Les concentrations en GSH de part et d'autre de la membrane s'équilibrent par diffusion. L'augmentation de la concentration lumenale en GSH provoque une réduction du RE E_{GSH} qui indirectement provoque la réduction et l'hyper-activation de l'oxydase Ero1. La modification du RE E_{GSH} provoque également l'activation des voies de réponses au stress RE, permettant une synthèse accrue de la machinerie Ero1/PDI et de la chaperonne Kar2. L'hyperactivité d'Ero1 dans un RE réduit conduit à une production de peroxydes d'hydrogène, oxydant l'unique cystéine de Kar2. L'oxydation de Kar2 modifie son activité chaperonne en activité holdase et Kar2 oxydée limite les échanges de GSH entre cytosol et RE. L'activité accrue d'Ero1 dans ces conditions permet également une production importante de GSSG dont le devenir reste inconnu.

Les abréviations utilisées sont : GSH = glutathion réduit ; GSSG = glutathion oxydé ; Ero1_{ox} = Ero1 inactif ; Ero1_{Red} = Ero1 hyperactif ; Kar2_{Red} = Kar2 réduit ; Kar2_{Ox} = forme oxydée de Kar2 portant un acide sulfénique sur la cystéine 63.

• Entrée de GSH et accumulation de glutathion lumenal

L'utilisation de cellules HGT1 permet une accumulation transitoire de glutathion dans la cellule. Après un pic d'accumulation à environ 1 heure, on observe une diminution progressive de la concentration cellulaire en glutathion est observée. Ce retour à une concentration normale de glutathion est principalement dû à l'activation des voies de dégradation du glutathion cytoplasmique (Voies Dug) (Kumar et al., 2011). Dans ces conditions, la concentration en glutathion dans le RE revient également à des concentrations basales mais de façon plus lente. Ce résultat suggère une équilibration plus lente des concentrations lumenales et cytosoliques dans ces conditions. Plusieurs pistes de réflexion peuvent être avancées pour mieux comprendre ce phénomène. (i) L'export de glutathion hors du RE ne concerne pas le même transporteur que l'import, et celui-ci a une vitesse de transport moindre. Cette hypothèse est cependant en contradiction avec les observations menées *in vitro*, qui concluent à un transport du GSH bi-directionnel dans le RE, caractéristique d'une diffusion facilitée (Bánhegyi et al., 1999).. (ii) L'augmentation de la concentration lumenale en GSH et la réduction du RE E_{GSH} qui l'accompagne provoquent un fort stress RE, ainsi que la mise en place des voies de réponses cellulaires à ce stress. Cette réponse cellulaire peut être à l'origine d'une modification du transport de glutathion. On note d'ailleurs que cet export ralenti de glutathion hors du RE n'est pas observé lors d'une délétion en glutathion cellulaire dans la souche *Δgsh1*. Cette idée sera discutée dans le paragraphe ci-dessous.

- **L'oxydation de Kar2 régule l'entrée de GSH dans le RE.**

Wang et collaborateurs mettent en évidence l'oxydation de Kar2 dans des conditions d'hyperactivité d'Ero1 (Wang et al., 2014). La forte réduction du RE lors d'une exposition au GSH d'une souche HGT1 provoque une réduction indirecte et l'activation de cette oxydase (Kumar et al., 2011). Dans ces conditions, nous observons également une oxydation de la protéine chaperon. De plus, nos données suggèrent que cette oxydation limite l'entrée de GSH dans le RE à forte concentration. Ainsi, on observe pour un mutant Kar2^{C63A}, ne pouvant être oxydé, une entrée de GSH dans le RE non saturable à forte concentration de GSH.

Si l'import et l'export de GSH dans le RE sont en effet réalisés par un unique transporteur, il est possible d'imaginer un impact de l'oxydation de Kar2 sur l'export de GSH hors du RE. Observé après 1 à 2 heures d'exposition au GSH chez une cellule HGT1, l'oxydation de Kar2 reste importante jusqu'à 7 heures d'exposition. On note également que l'export lent du GSH hors du RE semble être significativement diminué dans un mutant Kar2^{C63A}. Ces résultats suggèrent que l'export lent du glutathion hors du RE peut être également expliqué par une limitation du transport de GSH par l'oxydation de Kar2.

Le mécanisme conduisant à cette régulation du transport de glutathion par l'oxydation de Kar2 reste inconnu, cependant, la protéine chaperon Kar2 possède un rôle majeur dans la translocation protéique dans le RE et interagit avec le système Sec, ce qui nous a conduit à étudier l'implication du translocon Sec61 et ses partenaires dans le transport du GSH. Cette étude est développée dans le Chapitre 2.

- **Importance physiologique du modèle**

L'utilisation des souches HGT1 permet une accumulation forte et très rapide de GSH dans les cellules. Des conditions aussi extrêmes ne sont certainement pas des cas physiologiquement rencontrés par les cellules. Cependant, la synthèse accrue de glutathion observée lors d'un stress thermique ou tout autre stress RE permet une augmentation relativement rapide de la concentration en glutathion cellulaire, et nous montrons ici que ceci a également un impact sur le RE E_{GSH}. Malgré tout, les concentrations atteintes pour les stress que nous avons étudiés restent trop faible pour observer un effet de saturation, mettant en cause la pertinence physiologique de cette régulation.

Il est toutefois intéressant de noter qu'une oxydation forte de Kar2 est également observée lors d'un traitement tunicamycine (**data not shown**) et lors de l'expression du mutant Ero1 hyperactif (Wang et al., 2014), suggérant un rôle de cette oxydation de Kar2 dans ces conditions sur les flux de glutathion.

De plus, cette étude met en évidence un lien entre stress RE et contenu cellulaire en GSH. La synthèse accrue de GSH dans le cytosol en réponse à un stress RE est également observée chez certaines plantes (Ozgur et al., 2014). Ces observations permettent de suggérer l'importance du GSH dans le RE dans ces conditions. Cependant, chez les mammifères, une déplétion cellulaire en GSH est au contraire observée lors de stress RE intense, tels que celui induit par un traitement à la tunicamycine (Malhotra et al., 2008).

Résultats – Chapitre 2

<u>Introduction</u>	113
<u>Résultats</u>	113
<u>Recherche du transporteur de glutathion par l'approche de gènes candidats</u>	113
<u>Le complexe Ssh1 permet le transport de GSH dans le RE</u>	116
<u>Relation entre transport du glutathion et translocation protéique</u>	117
<u>Activité du translocon et transport du glutathion</u>	123
<u>Discussion</u>	127

VII. Chapitre 2 : Le GSH est transporté par Sec61 dans le RE

A. Introduction

Nous avons précédemment décrit les caractéristiques du transport de glutathion entre le cytosol et le RE. Ces résultats, présentés dans le chapitre 1 indiquent l'existence d'une équilibration entre les concentrations cytosolique et luminale de glutathion. Cette équilibration s'effectuant via une diffusion facilitée de glutathion, nos résultats suggèrent l'existence d'un transporteur de glutathion à la membrane du RE.

Afin d'identifier les acteurs assurant le transport de GSH dans le RE, nous avons mis en place deux approches différentes.

- (i) L'accumulation de GSH dans une cellule HGT1 conduit à une perte de viabilité et un défaut de croissance, lié à l'impact du GSH sur le RE (Kumar et al., 2011). Sur cette observation nous avons réalisé un crible génétique afin d'identifier des mutations conférant une résistance face à l'accumulation de GSH cytosolique. En effet, une mutation diminuant le transport de GSH dans le RE permettrait une meilleure survie à une exposition au GSH. Ce crible a permis l'identification de mutations limitant la toxicité du GSH mais sans modification des flux de GSH dans le RE.
- (ii) Dans le chapitre 1, nous montrons l'importance de la protéine chaperon luminale Kar2 dans la régulation des flux de GSH dans le RE. L'association de Kar2 et Sec61 étant cruciale pour la translocation protéique, nous avons étudié le rôle du translocon dans le transport du GSH. Ces résultats sont présentés ci-dessous.

B. Résultats

1. Recherche du transporteur de glutathion par l'approche de gènes candidats

Comme nous l'avons vu précédemment, la forte accumulation de GSH dans les cellules HGT1 provoque une inhibition de la croissance et une perte de viabilité cellulaire, principalement provoquées par son impact sur le RE (Kumar et al., 2011). Afin d'identifier le transporteur du GSH dans le RE, nous avons cherché des délétions ou des mutations provoquant une toxicité réduite du GSH lorsqu'il est accumulé dans la cellule grâce au système HGT1. Le rôle de Kar2 dans la régulation des flux de

GSH nous a conduits à évaluer le rôle du translocon et de ses partenaires dans le transport du GSH. Nous avons ainsi étudié la mutation *sec61-2*, allèle thermosensible du gène essentiel *SEC61* (Deshaies et al., 1991).

Figure 1

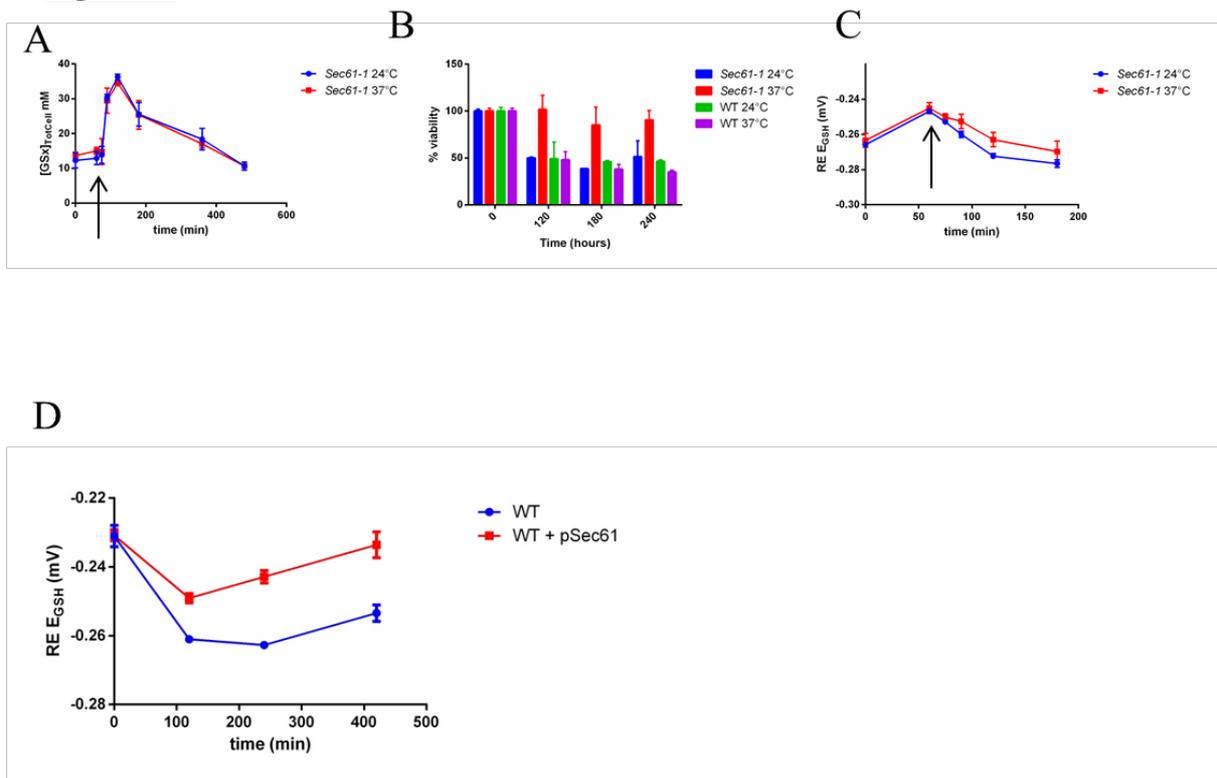


Figure 1. Mise en évidence du rôle du translocon Sec61 dans le transport de GSH

(A, B) Valeurs de (A) glutathion total cellulaire ([GSx]_{TotCell}) dans des cellules (B) Viabilité cellulaire (capacité à se diviser après exposition au stress) pour une souche HGT1-*Sec61-2* (*sec61-2*). Les cellules HGT1 ont été cultivé en phase exponentielle à 24°C, puis ont été exposé ou non à 37°C pendant 45 minutes. Les cellules ont ensuite été incubés en présence de 30 µM GSH (flèche).

(C) État redox du glutation dans le RE (RE E_{GSH}) pour une souche HGT1-*Sec61-2* (*sec61-2*) incubées à 24°C ou 37°C exposées à 30 µM de GSH. Les cellules ont été cultivés à 24°C jusqu'en phase exponentielle, puis incubées ou non à 37°C pendant 45 minutes avant l'ajout de 15 mM de diamide. Exposées au diamide pendant 15 minutes, les cellules ont été lavées (flèche), et incubées en présence de 30 µM de GSH.

(D) État redox du GSH dans le RE (RE E_{GSH}) dans des cellules HGT1 sauvage (Wt) ou surexprimant le gène SEC61 (Wt+ pSec61), exposées à 30µM de GSH.

Les données présentées sont la moyenne de trois répliquats biologiques indépendants ± l'écart type (sd)

- **Phénotype de résistance au GSH de la souche *sec61-2***

La fonction essentielle de Sec61 dans la translocation des protéines dans le RE pouvait laisser envisager une expression diminuée d'Hgt1 à la membrane, empêchant l'accumulation intracellulaire du GSH. Nous avons donc vérifié si le mutant *sec61-2* permet une accumulation de GSH intracellulaire. L'incubation en présence de GSH d'une souche HGT1-*sec61-2* permet une accumulation de GSH intracellulaire similaire à la température permissive (24°C) ou restrictive (37°C), ce qui indique une expression correcte d'Hgt1 dans ces conditions (**Figure 1A**).

Nous avons ensuite examiné le phénotype de tolérance au GSH de la souche HGT1-*sec61-2*. À 24°C, nous observons que ce mutant est aussi sensible qu'une souche sauvage à la présence de 30 µM de GSH. Cependant, le mutant HGT1-*sec61-2* garde une viabilité importante lors d'une exposition au GSH à 37°C (**Figure 1B**). La mutation thermosensible *sec61-2* à 37°C permet donc une tolérance significativement accrue vis-à-vis de la toxicité du GSH, suggérant une diminution des flux entrant dans le RE dans ces conditions.

- **Transport du GSH dans le RE chez *sec61-2***

Afin d'étudier le transport du GSH dans le RE, la sonde RE-rxYFP a été exprimée dans des cellules HGT1-*Sec61-2*. La sonde mesure dans cette souche un ratio d'oxydation extrêmement réduit, (**Figure 1C**) vraisemblablement due à une mauvaise localisation de la sonde, partiellement localisée dans le cytosol (**Annexe 2**). Un traitement au diamide est donc nécessaire afin d'oxyder la sonde RE-rxYFP mal localisée exprimée chez ce mutant, puis la réduction de la sonde après lavage des cellules est observée en présence ou non de GSH (**Figure 1C**). La vitesse de re-réduction est diminuée à 37°C par rapport à celle observée à 24°C, ce qui suggère une diminution de l'import dans le RE à la température restrictive. Malgré la localisation imparfaite de la sonde RE-rxYFP, ces résultats mis en relation avec ceux obtenus en terme de viabilité cellulaire, suggèrent un rôle de Sec61 dans le transport de GSH.

Ces données suggèrent que le translocon Sec61 intervient dans le transport du GSH vers le RE. Cependant, la localisation imparfaite de la sonde RE-rxYFP reste une limitation importante pour l'étude des flux de glutathion dans ces mutants. Nous avons donc cherché à démontrer l'implication de Sec61 en utilisant une autre méthode de déplétion en translocons fonctionnels.

- **Déplétion en translocons fonctionnels**

La surexpression du seul gène SEC61 permet une diminution du nombre de translocons fonctionnels, du fait de la titration de Sbh1 et de Sss1 par l'excès de Sec61 (Trueman et al., 2011). Nous avons donc cloné le gène SEC61 sous son propre promoteur dans un plasmide 2µ. Ce plasmide est maintenu dans la cellule sous un grand nombre de copies (50-100 copies/cellule), assurant une surexpression du gène cloné, 45 fois supérieure à ce qui est observé pour le gène sauvage (vérification par qPCR)

Dans ces conditions, nous observons qu'après l'ajout de 30 μM de GSH dans le milieu de culture des cellules HGT1 surexprimant SEC61, que la réduction du RE est significativement moindre que celle qui est observée dans les cellules HGT1 (**Figure 1D**). La surexpression de Sec61, conduisant en réalité à une déplétion en translocons fonctionnels, diminue l'import de GSH dans le RE.

Ce résultat impliquant le rôle du translocon Sec61 dans le transport du GSH, nous nous sommes intéressés au rôle de l'homologue de Sec61, Ssh1, dans ce transport.

2. Le complexe Ssh1 permet le transport de GSH dans le RE

Le complexe Ssh1, composé de Ssh1 associé à Sbh2 et à Sss1 est non essentiel. Sa délétion n'implique qu'un phénotype mineur en terme de défaut de croissance ou de sécrétion (Chen et al., 2005). De même, un mutant HGT1- Δ ssh1 ne montre pas de phénotypes particuliers en termes de sensibilité au GSH (**data not shown**), suggérant que le transport de GSH n'est pas modifié par cette délétion, du fait de la présence abondante de Sec61. Afin d'étudier l'implication de ce second complexe dans le transport de GSH, nous avons observé l'effet d'une surexpression de ce complexe sur les flux de glutathion entrant dans le RE.

Figure 2

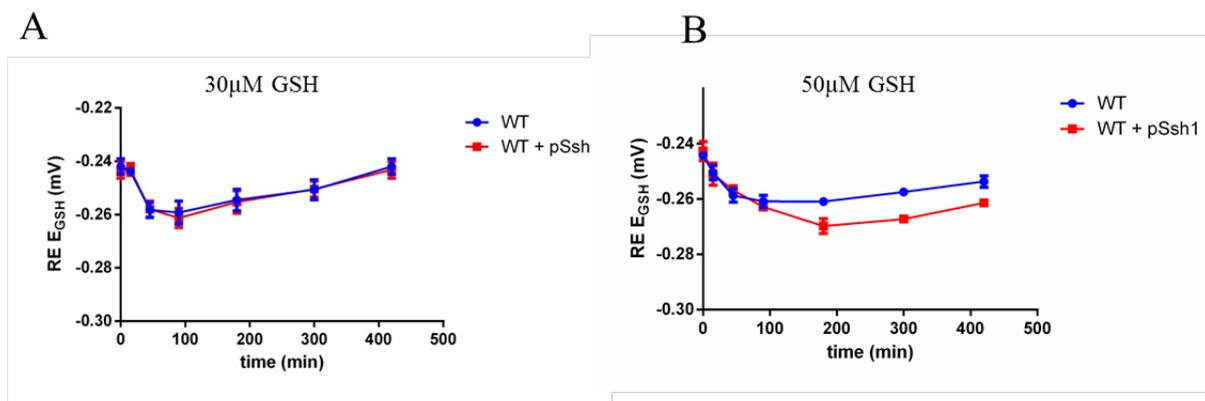


Figure 2. Le complexe Ssh1 assure le transport de GSH dans le RE

(A, B) État redox du GSH dans le RE ($\text{RE } E_{\text{GSH}}$) dans des cellules HGT1 sauvages (Wt) ou surexprimant le complexe Ssh1, soit les gènes SSH1, SBH2 et SSS1 (Wt+ pSsh1), exposés à (A) 30 et à (B) 50 μM de GSH.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

La surexpression des trois gènes du complexe Ssh1 (*SSH1*, *SBH2* et *SSS1*) permet d'augmenter le nombre de translocons Ssh1 fonctionnels exprimés à la membrane du RE. Nous avons donc surexprimé ces trois gènes dans des cellules HGT1. Dans ces conditions, nous observons que la réduction du RE après addition de 30 μM de GSH est similaire à celle d'une cellule (**Figure 2A**). En revanche, lorsque l'on ajoute 50 μM de GSH dans le milieu, la réduction du RE est beaucoup plus

importante, ce qui suggère que dans cette condition génétique il n'y a plus de saturation du transport de GSH (**Figure 2B**).

Ces résultats suggèrent l'implication du complexe Ssh1 dans le transport de GSH dans le RE. On note une surprenante perte de saturation du transport de glutathion lors d'une surexpression du complexe Ssh1.

3. Relation entre transport du glutathion et translocation protéique

Chez les eucaryotes, la voie de sécrétion protéique débute par une translocation des protéines sécrétées dans le lumen du RE. Cette première étape de la voie de sécrétion permet le transfert de la protéine à travers la membrane du RE. Cette translocation peut être soit co-traductionnelle (couplée à la traduction ribosomale) soit post-traductionnelle. La translocation co-traductionnelle est assurée par le complexe protéique Sec61 composé du pore Sec61 associé aux protéines transmembranaire Sbh1 et Sss1 (Osborne et al., 2005). Elle peut également être assurée par le complexe Ssh1, composé de Ssh1 paralogue de Sec61, associé à Sbh2 et Sss1. Lors de la translocation co-traductionnelle, la synthèse du peptide signal de la protéine par le ribosome est reconnue par le complexe SRP (Signal Recognition Particle) (Brown et al., 1994; Siegel et al., 1987). Cette association provoque un arrêt transitoire de la traduction. Le complexe ribosome-SRP-protéine est ensuite amené au niveau d'un récepteur à la membrane du RE, permettant la reprise de la traduction. Puis la protéine en cours de synthèse est transloquée à travers Sec61 ou Ssh1.

La translocation post-traductionnelle est assurée par le complexe Sec61 associé à Sec62 et Sec63 (Jermy et al., 2006). Lors de la translocation post-traductionnelle, la translocation de la protéine a lieu après la synthèse de la protéine. De nombreuses protéines cytosoliques interviennent pour stabiliser le polypeptide non-repliée (e.g. Ssa1, Ydj1...) (Plath and Rapoport, 2000). Sec62 reconnaît le peptide signal de la protéine et permet sa translocation à travers Sec61.

Afin de mieux définir comment le translocon permet le transport du GSH, et savoir si ce transport est couplé à la translocation protéique, nous avons étudié les relations entre translocation protéique dans le RE et flux de GSH intracellulaire. Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact d'un blocage de la traduction protéique sur les flux de GSH avant de nous intéresser à l'effet d'une inhibition de la translocation co- et post-traductionnelle.

Figure 3

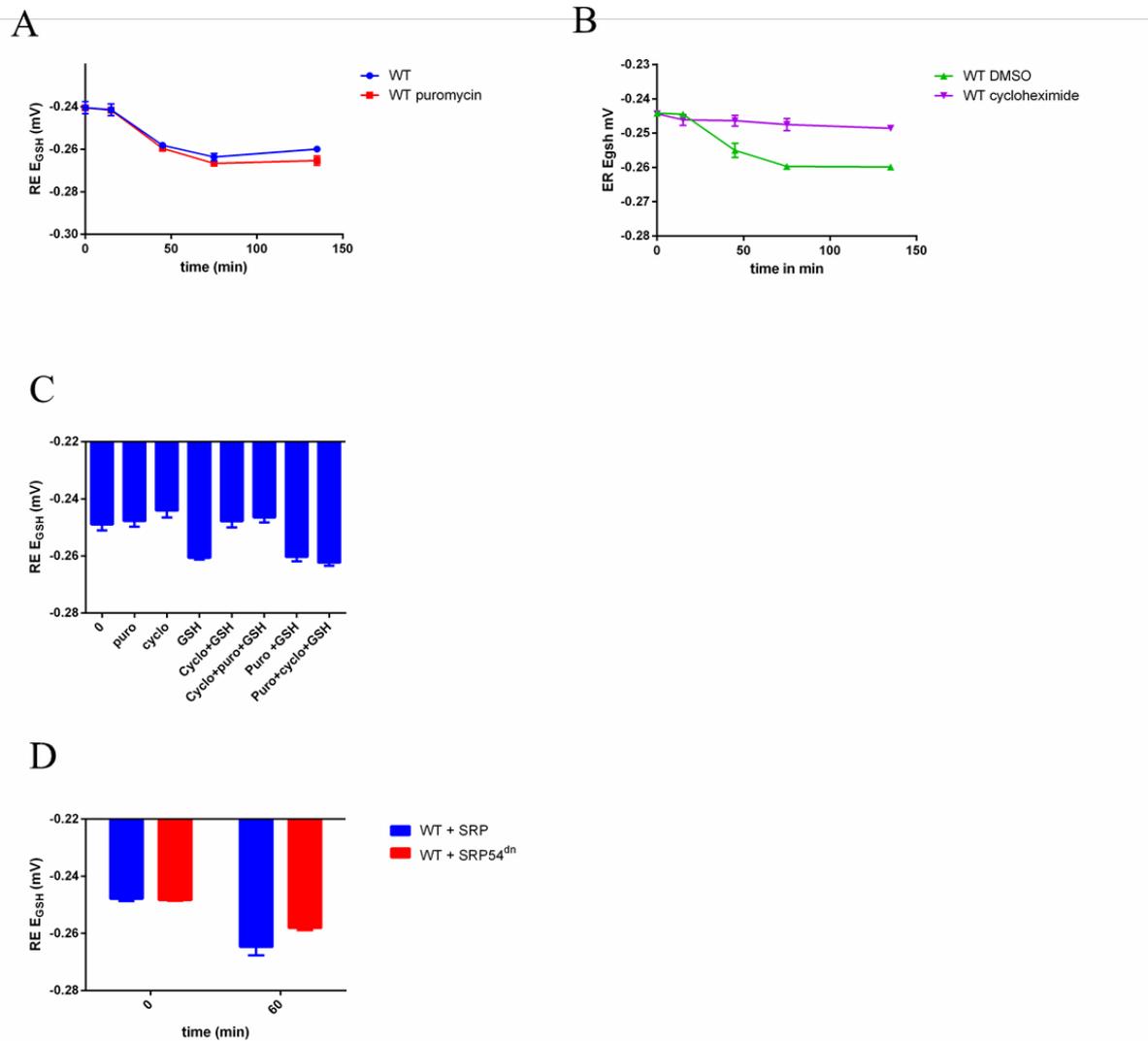


Figure 3 : Impact de la liaison ribosome-translocon sur le transport de GSH dans le RE.

(A, B) Etat redox du GSH dans le RE (RE E_{GSH}) en présence de 30µM de GSH, dans des cellules HGT1- $\Delta erg6\Delta pdr1\Delta pdr3$. (A) Un traitement de 15 minutes de cycloheximide (CHX, 200mg/ml) ou de DMSO à été réalisé avant ajout du GSH dans le milieu. (B) Un traitement de 20minutes de Puromycine (2mM) à été réalisé avant ajout de GSH dans le milieu de culture.

(C) Etat redox du GSH dans le RE (RE E_{GSH}) en présence 30µM de GSH, dans des cellules HGT1- $\Delta erg6\Delta pdr1\Delta pdr3$. Les cellules ont été traitées avec de la puromycine (2mM, 20min) ou du cycloheximide (200mg/ml 15 min) ou une combinaison des deux dans l'ordre noté avant exposition au GSH.

(D) Etat redox du GSH dans le RE (RE E_{GSH}) en présence de 30µM de GSH, dans des cellules HGT1 (Wt) exprimant SRP54 sauvage ou SRP54^{dn}. L'expression des SRP54 sauvage ou mutée est sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose. Les cellules sont cultivés en milieu contenant 2% de raffinose jusqu'en phase exponentielles, puis l'induction est réalisée dans un milieu contenant 2% de galactose pendant 3 heures. 30µM de GSH est ensuite ajouté dans le milieu de culture pendant 1heure. L'induction de SRP54^{dn} dans un milieu galactose provoque un important ralentissement de la croissance cellulaire.

Les données présentés sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendant \pm l'écart type (sd)

a) *Effet de l'inhibition de la traduction protéique sur le transport de GSH*

Afin de mieux comprendre le transport du GSH par le translocon, nous avons étudié l'inhibition de la traduction protéique sur le transport de glutathion. Deux molécules sont fréquemment employées pour provoquer une inhibition de la traduction protéique : le cycloheximide et la puromycine.

La puromycine, en s'incorporant à la chaîne polypeptidique en cours de synthèse, provoque une terminaison prématurée de la traduction et une dissociation des sous-unités ribosomales (Blobel and Sabatini, 1971). *S. cerevisiae* est naturellement résistante à une exposition à la puromycine. Nous avons donc utilisé une souche de *S. cerevisiae* rendue sensible à la puromycine par inactivation des facteurs de transcription Pdr1 et Pdr3, régulant la résistance aux xénobiotiques et antibiotiques, et de la méthyltransférase Erg6 ($\Delta\text{egr6}\Delta\text{pdr1}\Delta\text{pdr3}$) (Cary et al., 2014). Chez cette souche, l'effet de la puromycine sur la traduction est visible dès 15 minutes de traitement avec 2 mM de puromycine (Cary et al., 2014). Lorsque cette souche exprime HGT1, la réduction du RE après l'ajout de 50 μM de GSH est identique, qu'il y ait eu ou non un traitement préalable de 15 minutes avec 2 mM de puromycine (**Figure 3A**).

Le résultat obtenu avec un traitement puromycine indique que le transport de GSH ne nécessite pas de néosynthèse des protéines, et donc que l'effet des mutations de Sec61 ne peut pas être lié au défaut d'expression d'un autre transporteur à la membrane du RE.

Le cycloheximide (CHX) provoque un blocage de la translocation des ribosomes lors de la traduction protéique (Schneider-Poetsch et al., 2010; Seiser and Nicchitta, 2000). Contrairement à la puromycine, nous observons qu'un traitement de 10 minutes avec le CHX inhibe totalement la réduction du RE lors de l'ajout de GSH (**Figure 3B**), l'accumulation cellulaire de glutathion restant inchangée dans ces conditions (**Annexe 3**).

Un effet opposé est donc observé pour deux composés permettant l'inhibition de la traduction protéique. Ces différences peuvent s'expliquer par l'état de la liaison des ribosomes au translocon dans ces conditions. En effet, après un traitement à la puromycine, les polypeptides naissants en cours de translocation cotraductionnelle sont expulsés dans le RE, et les sous-unités ribosomales se détachent. Cependant, la sous-unité 60S du ribosome reste en place sur Sec61 (Adelman et al., 1973; Seiser and Nicchitta, 2000; Simon and Blobel, 1991). Au contraire, un traitement au cycloheximide provoque un blocage de la traduction au cours de l'élongation, et n'engendre pas une dissociation des ribosomes. Au niveau du RE, les ribosomes actifs sont donc stabilisés, et les polypeptides en cours de translocation restent bloqués au sein du pore (Seiser and Nicchitta, 2000). Il est donc concevable que

les différents états du ribosome sur le translocon expliquent les phénotypes opposés que nous observons.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié l'effet d'un prétraitement à la puromycine sur les flux observés après traitement au CHX et inversement. En effet, un prétraitement à la puromycine conduit à une dissociation des ribosomes et ne doit donc pas permettre l'action du CHX. Inversement, le prétraitement au CHX bloque les ribosomes en cours de traduction, prévient l'incorporation de la puromycine par le ribosome.

Nous avons ainsi observé que la puromycine, comme le CHX, étaient capable de prévenir les effets propres de l'autre drogue (**Figure 3C**).

Ces résultats suggèrent que la liaison du ribosome au translocon est importante pour le transport du GSH. Ainsi, la stabilisation d'un ribosome impliquée dans la traduction d'un polypeptide, en voie de translocation bloque totalement le transport de GSH. On en déduit donc l'existence d'une compétition entre transport de glutathion et translocation des polypeptides dans le RE par Sec61. Au contraire, l'augmentation du nombre de ribosomes inactifs associés aux translocons n'a aucun effet sur le flux de glutathion entrant dans le RE. Cependant dans une souche HGT1, l'entrée de glutathion observé permet une équilibration rapide et complète des concentrations cytosolique et luminale en glutathion (voir résultats - chapitre 1). L'entrée de glutathion dans le RE étant déjà maximale, l'absence d'effet sur ce flux de l'augmentation du nombre de ribosomes inactifs liés à Sec61 ne permet pas de conclure quant à l'importance de ceux-ci dans le transport de GSH.

Afin de répondre à cette question, nous avons cherché à diminuer le nombre de ribosomes liés à la membrane du RE, et à observer son effet sur le flux de GSH dans le RE.

b) Inhibition de la translocation co-traductionnelle

Au vu des résultats précédents, nous nous sommes intéressés à l'importance de la translocation co-traductionnelle dans les flux de glutathion. Plus spécifiquement, nous avons voulu savoir si la liaison du ribosome au translocon est nécessaire au transport du GSH.

Pour étudier plus avant l'interaction ribosomes-translocon, nous avons analysé l'effet de la surexpression du mutant transdominant de SRP54 (Gal-SRP54^{DN}). SRP54 est la sous-unité centrale de SRP liant la séquence signal du polypeptide naissant, et permet d'adresser le complexe ARNm-ribosome-polypeptide naissant au niveau du récepteur SRP, nommé SR. Par défaut d'hydrolyse du

GTP, la mutation SRP54^{DN} bloque le ribosome et son ARNm au niveau du SR, et empêche la translocation depuis le SR au translocon. Cette séquestration des complexes ARNm-ribosomes-polypeptides a pour effet secondaire de diminuer le nombre de ribosomes liés au translocon. La mutation étant dominante, elle est active lorsque la protéine est surexprimée dans une cellule sauvage. Nous avons donc surexprimé SRP54^{DN} à partir d'un promoteur inductible par le galactose (promoteur Gal1) (Mutka and Walter, 2001) dans une cellule exprimant par ailleurs HGT1 et la sonde RE-rxYFP. Lorsque cette souche est incubée 3 heures en milieu galactose, la réduction du RE après l'addition de GSH est significativement diminuée comparée à ce qui est observé dans les mêmes cellules incubées en milieu glucose (**Figure 3D**).

Ce résultat montre l'importance de la liaison ribosomes-translocon au cours de la translocation cotraductionnelle dans le transport de GSH par Sec61. La présence de ribosomes au niveau du RE semble importante pour assurer le transport de glutathion dans le RE. Nous avons vu précédemment que la présence d'un ribosome actif au niveau du translocon bloque le transport du GSH par ce dernier. La diminution du nombre de ribosomes actifs au niveau du RE ne peut être responsable du phénotype observé chez le mutant SRP54^{DN}. Nous en déduisons donc que l'expression du mutant SRP54^{DN} diminue également le nombre de ribosomes inactifs liés aux translocons, et que la présence de ceux-ci à la membrane du RE est critique pour le transport du GSH par Sec61.

c) Inhibition de la translocation post-traductionnelle

Les résultats présentés précédemment suggèrent donc que le transport de GSH est indépendant de la translocation protéique dans le lumen, mais nécessite la présence de ribosomes inactifs à la membrane.

Pour confirmer cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une inhibition de la translocation post-traductionnelle sur le transport de glutathion. Ce type de translocation étant indépendant de la présence de ribosomes au niveau de Sec61, il ne devrait pas avoir d'impact sur le transport de GSH.

Nous avons donc examiné les mutants thermosensibles *sec62-1* (**Figure 4A, B, C**) (Deshaies et al., 1991) et *sec63-1* (**Figure 4D, E, F**) (Rothblatt et al., 1989) codant respectivement *SEC62* et *SEC63*, les gènes essentiels pour la translocation post-traductionnelle. Lorsqu'elles sont incubées en présence de GSH, les cellules HGT1-*sec62-1* et HGT1-*sec63-1*, accumulent une quantité de GSH équivalente tant à 24°C qu'à 37°C. Cependant, contrairement à ce que nous avons observé pour HGT1-*sec61-2*, la sensibilité de ces mutants reste identique aux deux températures (**Figure 4B et E**). De la même façon

que pour la mutation *sec61-2*, la sonde RE-rxYFP est extrêmement réduite dans les cellules *sec61-2* et *sec63-1*. Nous avons donc utilisé un protocole similaire à celui employé précédemment pour le mutant *Sec61-2* afin d'évaluer le flux entrant de GSH au RE. Contrairement à ce nous avons observé pour HGT1-*sec61-2*, la vitesse de réduction du RE par l'addition de GSH est similaire à 24°C et à 37°C (**Figure 4C et F**).

Il semble donc que le transport du glutathion soit indépendant de l'activité de Sec62 et Sec63. Ces deux protéines étant essentielles à la translocation post-traductionnelle, nos résultats suggèrent une indépendance du transport du glutathion et de cette voie de translocation.

Figure 4

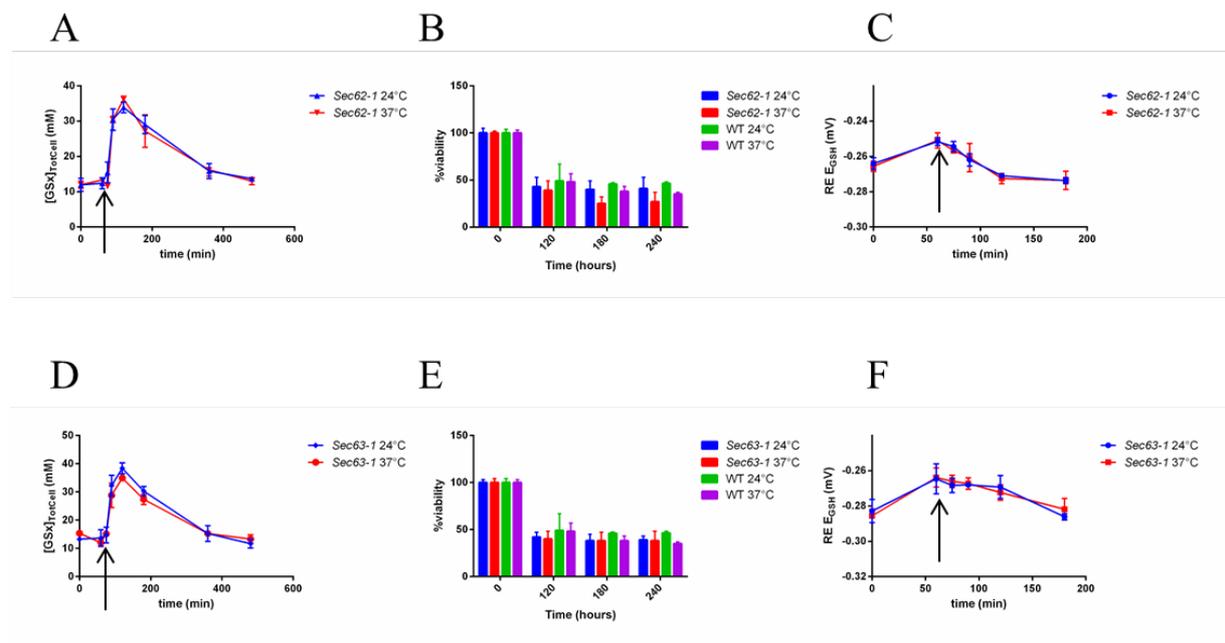


Figure 4. Mise en évidence du rôle du translocon Sec61 dans le transport de GSH

(A, B) Valeurs de (A) glutathion total cellulaire ([GSx]_{TotCell}) dans des cellules (B) Viabilité cellulaire (capacité à se diviser après exposition au stress) pour une souche HGT1-*Sec62-1* (*sec62-1*). Les cellules HGT1 ont été cultivées en phase exponentielle à 24°C, puis ont été exposées ou non à 37°C pendant 45 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de 30 μ M de GSH (flèche).

(C) État redox du glutathion dans le RE (RE E_{GSH}) pour une souche HGT1-*Sec62-1* (*sec62-1*) incubées à 24°C ou 37°C exposées à 30 μ M de GSH. Les cellules ont été cultivées à 24°C jusqu'en phase exponentielle, puis incubées ou non à 37°C pendant 45 minutes avant l'ajout de 15 mM de diamide. Exposées au diamide pendant 15 minutes, les cellules ont été lavées (flèche), et incubées en présence de 30 μ M de GSH.

(D, E, F) Expériences similaires que présentées en (A, B et C) menées sur la souche HGT1-*Sec63-1* (*Sec63-1*)

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

4. Activité du translocon et transport du glutathion.

En l'absence de protéines en cours de translocation, le translocon est dans une conformation fermée. La liaison du ribosome traduisant un nouveau polypeptide au niveau du pore induit un changement de conformation appelé amorçage ou « priming ». La liaison de la séquence signal du polypeptide en voie de traduction au niveau de la porte latérale du translocon induit un changement de conformation qui a été caractérisé par les études fonctionnelles et structurales, de préouverture du pore. L'engagement du polypeptide naissant dans le pore complète cette ouverture dans la conformation dite ouverte.

Nous avons cherché à comprendre l'impact des transitions entre les formes ouvertes et fermées de Sec61 sur les flux de GSH dans le RE.

- **Un défaut d'ouverture du pore Sec61 limite l'entrée du GSH dans le RE.**

Le résidu N302 du domaine transmembranaire TM7 de Sec61 appartient à un motif régulant la transition entre la conformation ouverte et fermée du translocon. La substitution de ce résidu par un acide aminé polaire (N302D) stabilise le pore dans sa conformation ouverte, alors qu'une substitution par un acide aminé hydrophobe (N302L) stabilise la conformation fermée (Trueman et al., 2011). Nous avons testé l'effet de ces deux mutations sur le transport de GSH. Des souches portant l'un ou l'autre de ces allèles comme seule copie de *SEC61* et dans lesquelles HGT1 et RE-rxYFP étaient exprimées ont été utilisées. Sachant qu'un défaut de translocation par le complexe Sec61 induit une surexpression du complexe Ssh1 (Trueman et al., 2011), la mutation Sec61^{N302L} a été aussi étudiée dans une souche dans laquelle le gène *SSH1* était invalidé. Nous avons d'abord vérifié chez tous ces mutants que la surexpression d'HGT1 et que la localisation de la sonde RE-rxYFP n'étaient pas affectées (**Annexe 1 et 2**).

Comme le montre la faible réduction du RE après ajout de GSH dans le milieu, dans le mutant, Sec61^{N302L}, la stabilisation du pore sous sa forme fermée limite l'import du GSH dans le RE. Il est très intéressant de noter que, lorsque le mutant est exprimé dans un contexte $\Delta ssh1$, le défaut d'import du GSH est beaucoup plus important (**Figure 5A**). *A contrario*, la mutation Sec61^{N302D} n'altère pas l'import de GSH dans le RE (**Figure 5B**).

La mutation Sec61 Δ L7 correspond à une délétion de toute la boucle 7 protubérante dans la lumière du RE, et située entre les domaines transmembranaires 6 et 7. Cette mutation semble aussi stabiliser la conformation fermée de Sec61, et limiter la transition vers la conformation ouverte (Schäuble et al., 2012). Il a ainsi été montré que cette mutation induit un défaut de translocation post-traductionnel, une croissance ralentie et une sensibilité au froid (Tretter et al., 2013). Cette délétion induit également un défaut structurel plus important puisqu'elle conduit à un défaut d'interaction avec les acteurs de l'ERAD cytosolique.

Figure 5

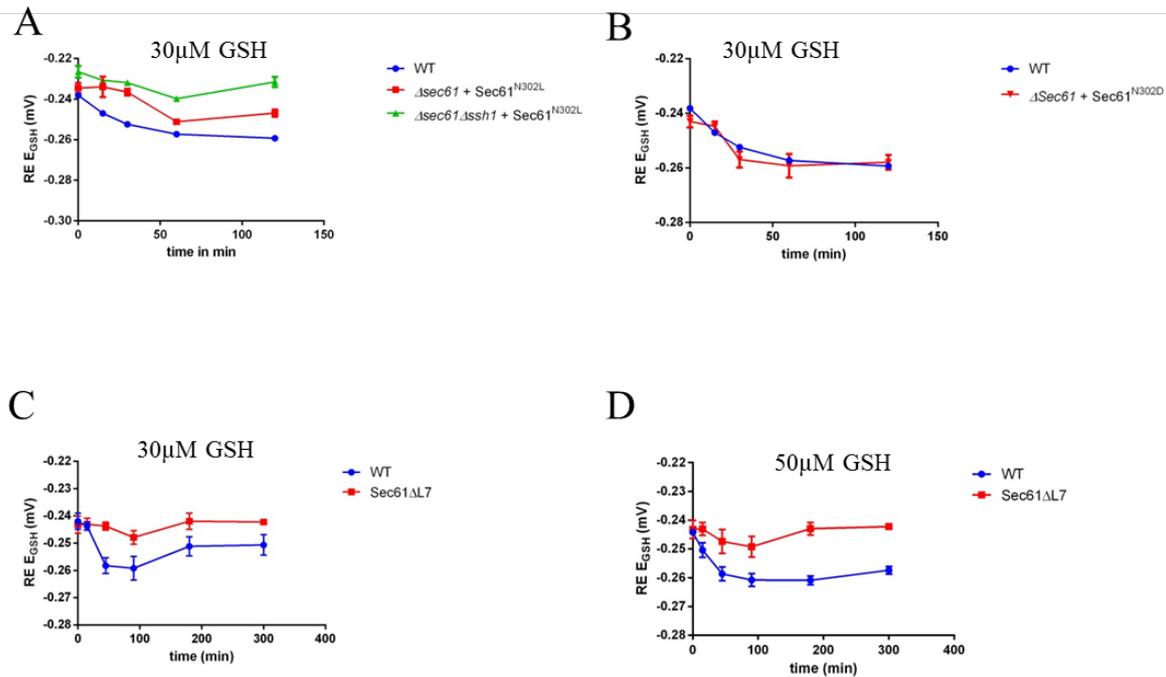


Figure 5 : Un défaut d'ouverture du pore Sec61 limite l'entrée du GSH dans le RE.

(A, B) État redox du GSH dans le RE ($RE E_{GSH}$) en présence de 30 μ M de GSH dans des cellules HGT1- $\Delta sec61$, ou HGT1- $\Delta sec61 \Delta ssh1$ exprimant Sec61 sauvage (Wt), ou les formes mutées Sec61^{N302L} (A) ou Sec61^{N302D} (B).

(C, D) État redox du GSH dans le RE ($RE E_{GSH}$) en présence de (C) 30 μ M ou (D) 50 μ M de GSH, dans des cellules HGT1- $\Delta sec61$, exprimant la forme sauvage de Sec61 (Wt) ou Sec61 Δ L7.

Les données présentées sont la moyenne de trois répliquats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

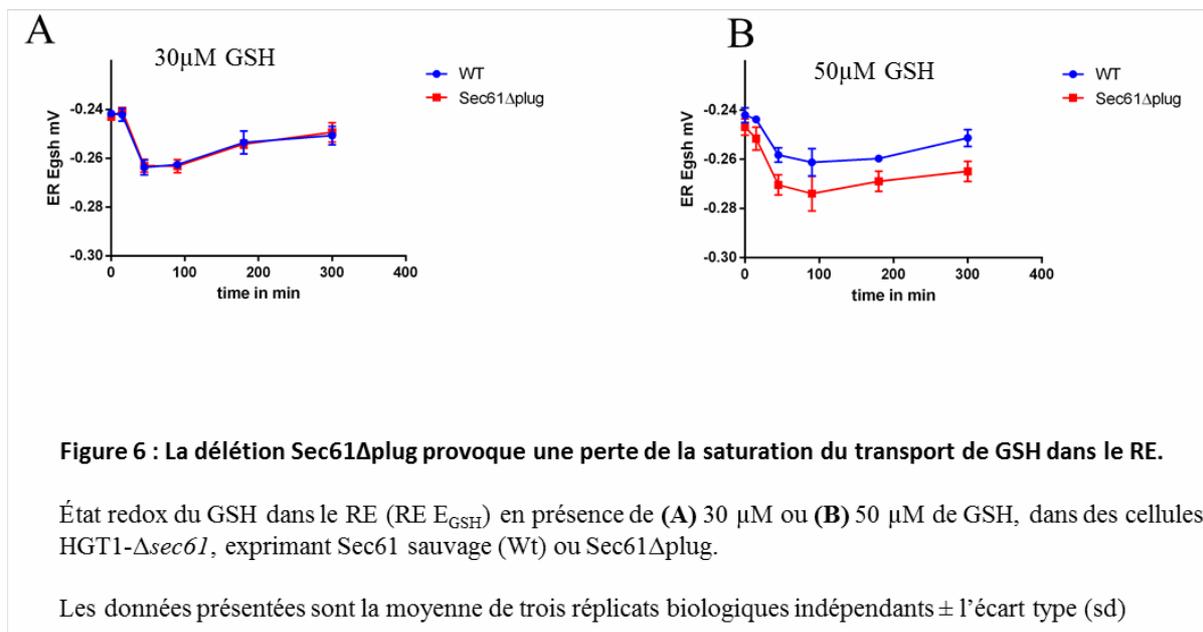
Nous avons donc étudié l'effet de cette mutation sur le transport de GSH dans une souche HGT1. Nous avons vérifié par fractionnement cellulaire la localisation correcte de la sonde RE-rxYFP et que cette mutation n'altère pas l'expression d'HGT1 (Annexe 1). Comme chez le mutant Sec61^{N302L}, nous observons une diminution importante de l'import de GSH au RE, puisque la réduction du RE est faible après addition de 30 μ M et de 50 μ M de GSH dans le milieu (**Figure 5C et D**). Cette diminution de l'import de GSH peut être expliquée par le défaut d'ouverture du pore muté ou par la diminution des translocons fonctionnels (estimée à environ 60-70% du contenu en translocons fonctionnels d'une souche sauvage) (Tretter et al., 2013).

Ces données obtenues grâce à des mutants affectant la transition de la conformation ouverte à la conformation fermée de Sec61 supportent l'hypothèse du rôle du translocon dans le transport du GSH au RE. Elles montrent également que les deux complexes de translocation cotraductionnels, Sec61 et Ssh1, sont capables d'assurer le transport de GSH.

- **La perte du domaine « plug » luminal conduit à une perte de régulation du transport de GSH par Kar2.**

Le translocon Sec61 possède un domaine luminal dit « plug », constitué par une boucle située entre les domaines transmembranaires TM1 et TM2. Ce domaine bloque la face luminale du pore, et permet d'assurer l'imperméabilité du translocon chez l'homologue bactérien SecY (Van den Berg et al., 2004). Chez la levure, une mutation Sec61 Δ plug ne provoque qu'un défaut très mineur de translocation protéique et aucun défaut de croissance (Junne et al., 2006, 2007).

Figure 6



Nous avons évalué l'effet de cette mutation sur le transport de GSH, après s'être assuré de la bonne expression de HGT1 et de la localisation correcte de de RE-rxYFP (Annexe 1 et 3). De façon très similaire à ce que nous avons observé dans des cellules surexprimant le complexe Ssh1, nous voyons ici aussi une perte de la saturation du transport de GSH. En effet, nous observons une réduction accrue du RE après addition de 50 μM de GSH, alors que cette réduction est similaire à celle des cellules sauvages en présence de 30 μM de GSH (**Figure 6**).

La mutation Δ plug supprime la saturation du transport, qui est déterminée par l'état d'oxydation de Kar2 (voir chapitre I). Ce résultat confirme le rôle de Sec61 dans le transport de GSH, et son importance dans la saturation du transport observé à fortes concentrations de GSH. Ce résultat suggère un mécanisme pour le rôle de Kar2 dans le contrôle du phénomène de saturation : Kar2 d'empêcherait l'ouverture de la face luminale du canal en bloquant le plug en position de fermeture.

L'ensemble des données présentées dans ce chapitre permettent de conclure que les translocons Sec61 et Ssh1 servent au transport du GSH dans le RE. Bien que non démontré, il semble que le rôle du translocon dans ce transport soit exclusif, vu l'effet majeur de certaines mutations sur le transport de GSH. De plus, nos résultats suggèrent que le translocon est actif dans le transport de GSH lorsqu'il est lié par un ribosome inactif. Ils permettent enfin de suggérer que la forme oxydée de Kar2 inhibe le transport du GSH en favorisant la fermeture de la lumière du pore au niveau luminal par le domaine plug.

C. Discussion

La question de la perméabilité du translocon est cruciale pour comprendre les interactions entre RE et cytosol. En effet, comprendre les échanges entre cytosol et RE de petites molécules ou d'ions, comme le glutathion ou les ions Ca^{2+} est primordial pour la signalisation et la physiologie cellulaire.

Ainsi, l'observation d'une régulation des flux de GSH entre cytosol et RE par le niveau d'oxydation de Kar2 (Chapitre 1) nous a conduits à considérer le rôle de Sec61 dans le transport du GSH.

- **Les pores Sec61 et Ssh1 transportent le GSH**

Nos données suggèrent que la diminution de translocons Sec61 fonctionnels diminue les flux entrant de GSH dans le RE. Ainsi, l'utilisation du système HGT1 et de la mutation thermosensible *Sec61-1* diminue les flux de GSH entrant dans le RE à la température restrictive. De même, en surexprimant le gène SEC61 pour diminuer la disponibilité cellulaire en translocons fonctionnels, nous avons observé une diminution des flux de glutathions dans le RE.

Ce résultat impliquant le rôle du translocon Sec61 dans le transport du GSH, nous nous sommes alors intéressés au rôle du paralogue de Sec61, Ssh1 dans ce transport. Ssh1 est constitutivement et faiblement exprimé, et sa délétion n'entraîne aucun phénotype particulier en termes de défaut de croissance ou de sécrétion (Chen et al., 2005).. De même, un mutant HGT1-*Δssh1* ne montre pas de phénotypes particuliers en termes de sensibilité au GSH (**data not shown**), suggérant que le transport du GSH n'est pas modifié par cette délétion, assuré par Sec61. Cependant, la surexpression du complexe Ssh1 (Ssh1, Sbh2, Sss1) conduit à une entrée accrue de GSH à forte concentration (au-delà de 50 μM de GSH). Cette dérégulation du transport du glutathion mesurable à de fortes concentrations de GSH indique que le complexe Ssh1 est également capable de transporter le GSH dans le RE. Cependant, dans les conditions normales, son rôle reste mineur par rapport au complexe Sec61.

- **Comment le GSH est-il transporté ?**

Nous avons ensuite cherché à identifier les caractéristiques de ce transport de glutathion par le translocon.

- (i) Le transport de GSH dans le RE est indépendant de la translocation protéique*

La puromycine est un antibiotique qui provoque la terminaison de la traduction et provoque un relargage du peptide par le ribosome (Rajasekaran et al., 1995; Simon and Blobel, 1991; Traut and Monro, 1964). Sur les ribosomes situés au niveau de la membrane du RE, un traitement à la puromycine conduit à un relargage des peptides en cours de synthèse dans le lumen par le translocon et une dissociation de la petite sous-unité du ribosome. Nos données montrent que qu'un arrêt de la traduction et de la translocation protéique par un traitement puromycine n'a pas d'influence sur les

flux de GSH entre cytosol et RE. Ceci suggère que le transport des protéines dans le RE et le transport du glutathion par le translocon sont des phénomènes indépendants.

Le rôle central de Sec61 dans la physiologie du RE peut être source de nombreux artefacts expérimentaux. Ainsi, une activité diminuée de Sec61 peut conduire à une diminution de l'expression des protéines luminales et membranaires, notamment des transporteurs situées dans la membrane du RE. Une activité diminuée de Sec61 peut être alors indirectement responsable d'un transport diminué de substrats. La dissociation entre translocation protéique et transport du GSH nous permet de penser que le translocon joue un rôle direct dans le transport du glutathion.

(ii) *Le transport de GSH par le translocon est indépendant du système de translocation post-traductionnel*

Si la mutation thermosensible *Sec61-1* possède un impact important sur le transport de glutathion dans le RE, les mutations *Sec62-1* et *Sec63-1* ne montrent au contraire aucun phénotype suggérant une altération du flux de glutathion entre RE et cytosol. Ces données indiquent que le transport du glutathion est indépendant du système de translocation post-traductionnel. En revanche, il semble dépendant du système de translocation co-traductionnel ; une idée renforcée par le phénotype de surexpression du complexe Ssh1, qui est exclusivement impliqué dans ce second type de translocation.

(iii) *Un transport du GSH par un translocon ouvert et inactif.*

Sec61 est une protéine transmembranaire composée de 10 segments formant un pore. Vu en coupe, le pore présente une forme de sablier, dont la constriction centrale appelée « ring » est composée de 6 résidus hydrophobes. Du côté luminal, le pore est bloqué par une hélice appelée « plug ». L'étude structurelle de SecY, suggère un rôle majeur du « plug » et du « ring » dans l'imperméabilité du translocon aux petites molécules (Van den Berg et al., 2004). Cette imperméabilité membranaire est nécessaire à la survie des bactéries, puisque le pore connecte le cytosol au milieu extérieur. Chez les eucaryotes, elle est sans doute moins cruciale, et des échanges ER-cytosol seraient permis par Sec61.

Ainsi, Sec61 semble perméable à certains ions comme le Ca^{2+} (Lomax et al., 2002), et à certaines petites molécules neutres (Heritage and Wonderlin, 2001; Roy and Wonderlin, 2003; Lizák et al., 2006). Ces études suggèrent que la liaison du ribosome avec Sec61 provoque une modification structurelle du pore, provoquant une « pré-ouverture » du pore et permettant l'insertion de la séquence signal du substrat dans le pore (Voorhees and Hegde, 2016). Cette pré-ouverture semble suffisante pour le passage de certaines petites molécules (Roy and Wonderlin, 2003). Ces résultats sont important au regard des études de Nicchitta et collaborateurs qui suggèrent qu'environ 2/3 des sous-unités 60S restent liées au translocon après une terminaison normale de leur traduction (Seiser and Nicchitta, 2000). Ces complexes ribosomes-translocon vides et inactifs, dont la régulation aujourd'hui

est méconnue, pourraient avoir un impact majeur sur la signalisation cellulaire ER-dépendante et le maintien des gradients de petites molécules entre ER et cytosol.

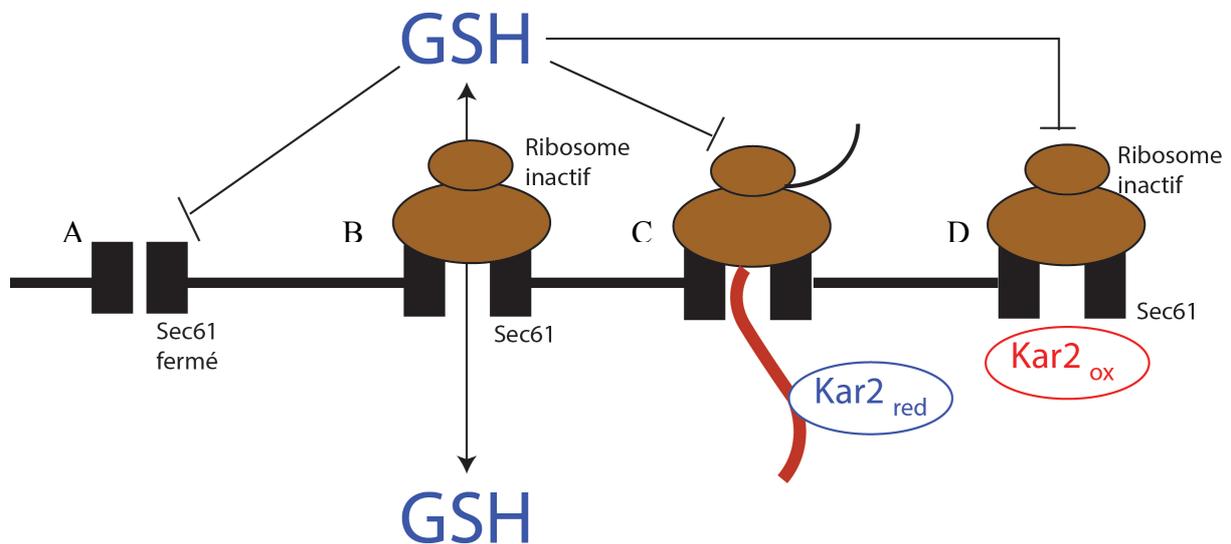


Figure 7 : Diffusion du GSH dans le RE par des complexes ribosomes-Sec61 inactifs

Quatre complexes ribosomes-translocons peuvent être mis en évidence. (A) A l'état de base, le translocon est fermé, et l'entrée de GSH par le pore est impossible. (B) la liaison ribosome-translocon permet une préouverture du pore et une diffusion de petites molécules est observée. (C) La translocation protéique par Sec61 bloque le passage du glutathion à travers le pore. (D) l'interaction de Sec61 avec la forme oxydée de Kar2 prévient les flux de glutathion à travers le pore.

Dans ce schéma n'est pas représenté le complexe Ssh1, capable de transporter le GSH, mais dont le rôle dans les conditions physiologiques semble limité. Egalement, le transport du GSSG n'est pas figuré ici puisque les acteurs de son transport ne sont pas identifiés.

Les abréviations utilisées sont : GSH = glutathion réduit ; Kar2_{Red} = Kar2 réduit ; Kar2_{Ox} = forme oxydée de Kar2 portant un acide sulfénique sur la cystéine 63.

La présence d'un peptide en cours de translocation dans le pore Sec61 empêche ainsi le transport des petites molécules par le translocon (Roy and Wonderlin, 2003). Un traitement au CHX provoque un blocage de la traduction protéique lors de l'étape de translocation, conduisant à une stabilisation des ribosomes sur la membrane du RE, et un blocage du peptide en cours de translocation au sein de Sec61 (Schneider-Poetsch et al., 2010; Seiser and Nicchitta, 2000). Nos résultats montrent qu'une exposition au CHX perturbe en effet le transport de GSH dans le RE, suggérant une compétition entre translocation protéique et transport du GSH par Sec61.

La transition entre la forme ouverte et fermée du translocon semble critique pour le transport du GSH par le translocon. Ainsi, nous montrons que la mutation Sec61^{N302L}, stabilisant le pore sous sa forme

fermée, provoque un défaut majeur de transport du GSH. La mutation Sec61 Δ L7, modifiant l'efficacité de transition entre les formes ouvertes et fermées du pore, affecte le transport de glutathion de manière similaire. En revanche, la délétion de la boucle luminale 7 engendre probablement une modification structurelle majeure qui empêche de tirer de solides hypothèses quant à l'impact d'une telle mutation sur le transport du GSH.

Contrairement à ce qui est observé pour d'autres petites molécules comme l'acide glucuronique (Lizák et al., 2006), une stabilisation de la forme ouverte de Sec61 par la mutation Sec61^{N302L}, ou par un traitement puromycine, ne permet pas une entrée accrue de GSH dans le RE. Nos résultats sont en accord avec ce qui a été observé concernant les flux de GSH *in vitro* dans des microsomes de mammifères (Lizák et al., 2006). Nous observons en effet un équilibre parfaite et rapide des concentrations en GSH entre le cytosol et le RE pour des concentrations inférieures à 30 μ M de GSH cytosolique. La stabilisation de l'ouverture de Sec61 ou une disponibilité accrue en translocon n'a donc pas d'impact sur les flux observés. La grande disponibilité en GSH cytosolique (environ 7 mM de GSH dans le cytosol) peut expliquer cette équilibration parfaite par diffusion facilitée à travers le RE. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans ce processus nécessite l'utilisation de méthodes permettant une détermination plus fine et instantanée des concentrations en glutathion cytosoliques et luminales.

Le modèle établi par les travaux de Wonderline souligne l'importance de la liaison entre ribosomes et Sec61 dans le transport des petites molécules. En effet, la liaison du ribosome au translocon permet une pré-ouverture du pore, confirmé par des études structurales récentes (Voorhees and Hegde, 2016). La présence de ribosomes vides, mais liés au translocon, permet donc le passage de petites molécules à travers le pore, et nos données suggèrent que le GSH peut être également transporté dans ces conditions. Diminuer l'interaction entre ribosomes et Sec61 par l'expression de la mutation dominante SRP54^{dn} provoque une diminution des flux de GSH entrant dans le RE. Le transport de GSH dans le RE semble donc dépendant de la liaison ribosomes-Sec61.

- **Rôle de Kar2 dans la régulation du transport du GSH**

Les données présentées dans le chapitre 1 permettent de conclure à un rôle de l'oxydation de la protéine chaperon luminale Kar2 dans la régulation du transport du GSH : à forte concentration de GSH, la forme oxydée de Kar2 limite l'entrée de GSH dans le RE.

Les travaux de Zimmermann et collaborateurs ont établi l'existence chez les mammifères d'une « fuite » de Ca²⁺ luminal dans le RE via le translocon (Lang et al., 2011). Cette fuite d'ions est limitée par l'interaction cytosolique de la calmoduline avec Sec61 (Schäuble et al., 2012). La présence de l'homologue mammifère de Kar2, BiP, dans le lumen permet également de limiter l'efflux de calcium

hors du RE. Leurs données indiquent qu'une diminution de la concentration de BiP conduit à une fuite accrue de Ca^{2+} dans le cytosol. Ils identifient le site d'interaction entre BiP et Sec61 comme étant proche de la tyrosine 344 de la boucle luminale 7. Cette interaction permet donc de limiter l'efflux de calcium via le translocon.

Nous avons étudié l'effet de la délétion de la boucle 7 sur les flux de GSH. Mais le mutant Sec61 Δ L7 possède un défaut structurel majeur et une instabilité structurelle conduisant à un défaut de l'import de GSH dans le RE. Ce mutant ne permet donc pas d'étudier l'importance de la liaison Kar2 à Sec61.

On remarque cependant que la délétion de la boucle formant le « plug » sur Sec61 conduit à une perte de la saturation observée à forte concentration de GSH. Structurellement, la boucle L7 recouvre en partie le « plug » au niveau luminal de Sec61. Il est donc possible d'imaginer une perte de l'interaction Kar2-Sec61 chez ce mutant. Mais la nature et le site de l'interaction entre la forme oxydée de Kar2 avec Sec61 reste à déterminer.

Résultats Chapitre 3

VIII. CHAPITRE 3 : MODIFICATION DE L'ETAT REDOX DU GLUTATHION DANS LE RE ET IMPACTS SUR LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE133

A. INTRODUCTION 133

B. RESULTATS 133

1. IMPACTS D'UNE MODIFICATION DU RE E_{GSH} SUR LA PHYSIOLOGIE DU RE 133

2. MORT CELLULAIRE ASSOCIEE AU STRESS REDUCTEUR DU RE 139

3. RALENTISSEMENT DE CROISSANCE ASSOCIEE AU STRESS REDUCTEUR DU RE 147

C. DISCUSSION 151

VIII. Chapitre 3 : Modification de l'état redox du glutathion dans le RE et impacts sur la physiologie cellulaire

A. Introduction

Le RE constitue le premier compartiment par lequel transitent les protéines membranaires ou destinées à la sécrétion. Dans le lumen du RE, ces substrats acquièrent leur structure ternaire et quaternaire et subissent quelques modifications post-traductionnelles. Une glycosylation insuffisante, un défaut de formation de ponts disulfures ou de repliement protéique dans le RE conduisent à un stress du RE et permettent la mise en place de voies de réponses cellulaires associées.

Dans des cellules HGT1 exposées à du GSH exogène, la réduction forte du RE conduit à un stress RE révélé par l'induction de la réponse UPR dans ces conditions. On note également dans ces conditions un blocage de la sécrétion protéique, une mortalité cellulaire et une croissance fortement ralentie (Kumar et al., 2011).

La présente étude s'intéresse à l'impact sur la physiologie du RE d'une modification de l'état redox du GSH dans ce compartiment, que ce soit une réduction ou une oxydation du RE E_{GSH} . De plus, nous avons cherché à identifier des voies de réponses cellulaires impliquées dans la mort cellulaire et le ralentissement de croissance observé chez les souches HGT1 exposées au glutathion.

B. Résultats

1. Impacts d'une modification du RE E_{GSH} sur la physiologie du RE

a) La réduction du RE E_{GSH} conduit à une induction des voies de signalisation du stress RE

- **Activation de la voie UPR**

Kumar et collaborateurs montrent que l'accumulation de GSH dans une souche HGT1 provoque une réduction forte et transitoire du RE E_{GSH} et des protéines résidentes du lumen telles que PDI et Ero1 (Kumar et al., 2011). Cet impact sur le RE se caractérise par un défaut de la maturation de la carboxypeptidase Y (CPY), une protéine dont le repliement fonctionnel nécessite la formation de 5 ponts disulfures et son transport dans la vacuole (Kumar et al., 2011). Dans les cellules HGT1,

l'addition de GSH dans le milieu provoque une induction rapide de la voie UPR, visible dès 5 minutes après addition de GSH dans le milieu (Kumar et al., 2011). L'induction de la transcription du gène codant pour la protéine chaperon luminale KAR2 par la voie UPR est visible à de faibles concentrations de GSH (5 μ M de GSH dans le milieu) et atteint un plateau à partir de 30 μ M de GSH (**figure 1A**).

Lors d'un ajout de GSH croissant dans le milieu de cellules HGT1, les concentrations cellulaires ($[GSX]_{cell}$) et RE ($[GSX]_{ER}$) en GSX sont égales jusqu'à 30 μ M de GSH dans le milieu. Pour des concentrations de GSH supérieures dans le milieu, $[GSX]_{ER}$ atteint un plateau dès 30 μ M de GSH. *A contrario*, $[GSX]_{cell}$ continue d'augmenter, et atteint un plateau à 50 μ M de GSH (**Figure 1B**) correspondant à la saturation du transporteur HGT1 (Bourbouloux et al., 2000). Ces résultats montrent que l'induction de l'UPR dans les cellules HGT1 est directement dépendante de l'accumulation du GSH dans le RE et de l'intensité de réduction du RE et indépendante de la concentration en glutathion cytosolique.

Figure 1

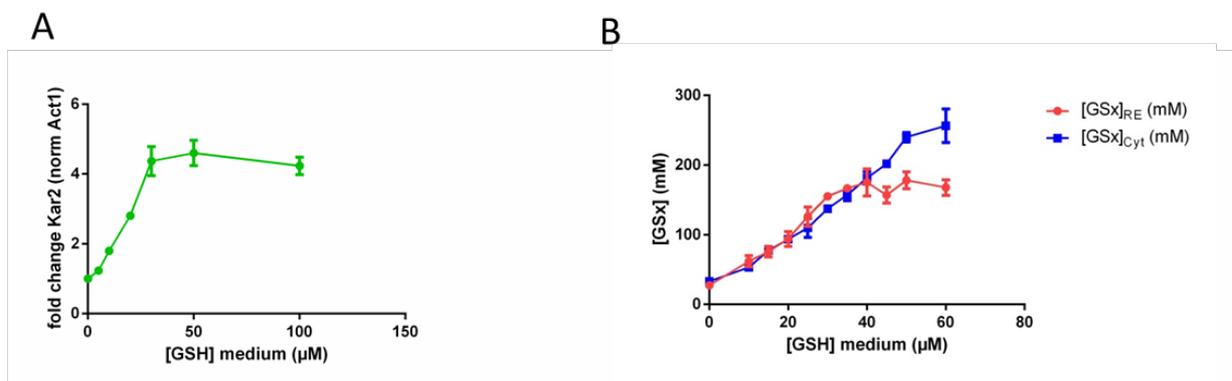


Figure 1. L'augmentation de la concentration en glutathion dans le RE provoque l'induction de la voie UPR.

(A) Niveau d'expression transcriptionnel du gène *KAR2*. Les cellules HGT1 en phase exponentielle ont été exposées à une dose croissante de GSH pendant une heure. Le contenu en ARNm est extrait et le niveau d'expression de *KAR2* est évalué par RT-qPCR, le niveau d'expression d'*ACT1* est utilisé comme normalisateur.

(B) Valeur de total $[GSx] = [GSH] + 2[GSSG]$, mesuré dans les lysats cellulaires (TotCell) et dans le RE (RE) dans des cellules HGT1 en phase exponentielle incubées une heure en présence de GSH.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

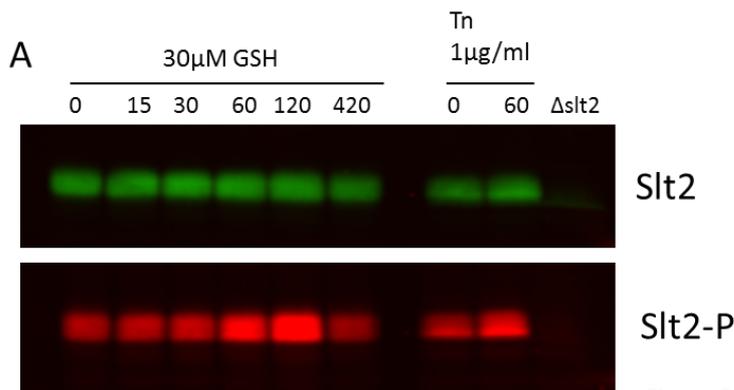
- **Activation de la voie MAPK Slt2**

La protéine kinase Slt2 (ou Mpk1) intervient dans la voie d'intégrité de la paroi cellulaire (cell wall integrity pathway CWI). Cette voie permet le maintien de la forme et de l'intégrité de la paroi cellulaire lors de la croissance et division cellulaire (Klis et al., 2002). Slt2 est également activée en réponse à divers stress environnementaux par la double phosphorylation d'une thréonine et d'une tyrosine (Davenport et al., 1995; Ketela et al., 1999; Martin et al., 1993; Zarzov et al., 1996).

L'activation par phosphorylation de Slt2 et son importance pour la survie cellulaire a été ainsi montrée pour de divers stress RE, tels qu'un traitement tunicamycine, DTT ou hypoxique (Chen et al., 2005).

Nous avons donc cherché à étudier l'implication de cette voie MAPK lors de la réponse au stress induit par l'exposition au GSH chez une souche HGT1.

Figure 2



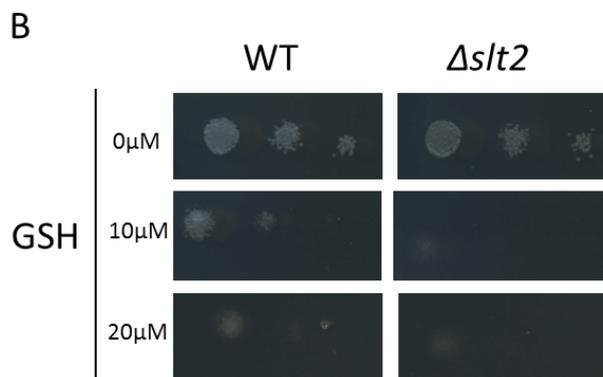
Slt2

Slt2-P

Figure 2. La réduction du RE dans le système HGT1 conduit à une activation de la voie MAPK Slt2.

(A) Western blot de la MAPK Slt2 (blot Slt2) et de sa forme phosphorylée (blot Slt2-P). Une souche sauvage HGT1, exposée à 30 µM de GSH (lignes 30 µM de GSH), ou à 1 µg/ml de tunicamycine (Tm 1 µg/ml). La ligne $\Delta Slt2$ correspond à un échantillon protéique d'une souche $\Delta Slt2$ en phase exponentielle.

(B) Tolérance au GSH lors de la croissance sur milieu solide contenant la concentration indiquée de GSH. Une souche sauvage HGT1 (Wt) et une souche HGT1- $\Delta Slt2$ ont été étudiées. Les résultats présentés sont représentatifs de ce qui a été observé pour au moins deux expériences indépendantes.



Lors d'une exposition à 30 μ M de GSH, une phosphorylation accrue de Slt2 est observée dès 1 heure de traitement. L'état de phosphorylation de la protéine revient à son état basal à 7 heures de traitement (**figure 2A**). L'activation de la voie Slt2 MAPK lors d'une exposition au GSH d'une souche HGT1 soulève son importance pour la survie cellulaire. En effet, un mutant Δ slt2 surexprimant HGT1 présente une sensibilité extrêmement accrue à une exposition au GSH (**figure 2B**).

L'accumulation de GSH dans les cellules HGT1 conduit donc à un fort stress RE. Nous observons en effet dans ces conditions, une activation de deux voies principales de réponse au stress RE : la voie UPR et la voie MAPK.

- **Dépendance entre les voies UPR et MAPK Slt2**

Des données récentes rapportent une certaine dépendance entre les voies UPR et Slt2 MAPK lors d'un stress RE. Scrimale et collaborateurs montrent que l'activation de Slt2 par des agents perturbant l'homéostasie de la paroi conduit à une activation accrue de la voie UPR par une augmentation du splicing de l'ARNm de HAC1 par Ire1p (Scrimale *et al.*, 2009). De même, l'activation de la voie Slt2 MAPK stabilise Hac1p lors de la double exposition à un stress thermique et tunicamycine (Pal *et al.*, 2007). Le splicing de l'ARN_m de HAC1 par Ire1p a été étudié chez des cellules HGT1 en présence de 30 μ M de GSH. Pour une cellule sauvage surexprimant HGT1, la forme courte de l'ARNm de HAC1 est visible dès 30 minutes et persiste jusqu'à 4 heures d'exposition au GSH. Une souche Δ slt2 surexprimant HGT1 présente un splicing de l'ARNm de HAC1 réduit en intensité et en temps (**figure 3A**). Ce défaut d'induction de la voie UPR dans un mutant Δ slt2 ne peut être expliqué par un défaut d'expression du transporteur HGT1 ou de l'entrée de GSH dans le RE (**figure 3B et C**). Ces résultats montrent donc une activation accrue de la voie UPR par la voie MAPK lors d'une réduction de l'E_{GSH} du RE et confirme une dépendance de la voie UPR vis-à-vis de l'activation de Slt2 lors d'un stress RE.

La réduction du RE EGSH dans une cellule HGT1 provoque un stress RE important, révélé par l'activation des voies de réponse au stress RE : la voie UPR et Slt2 MAPK. On note l'importance de ces deux voies dans la survie au stress réducteur, puisque des souches HGT1- Δ ire1 et HGT1- Δ slt2 présentent une sensibilité accrue à une exposition au GSH. L'étude des deux voies suggère également une certaine interdépendance des deux voies de réponse cellulaire, conformément à ce qui a été observé pour d'autres stress RE.

Figure 3

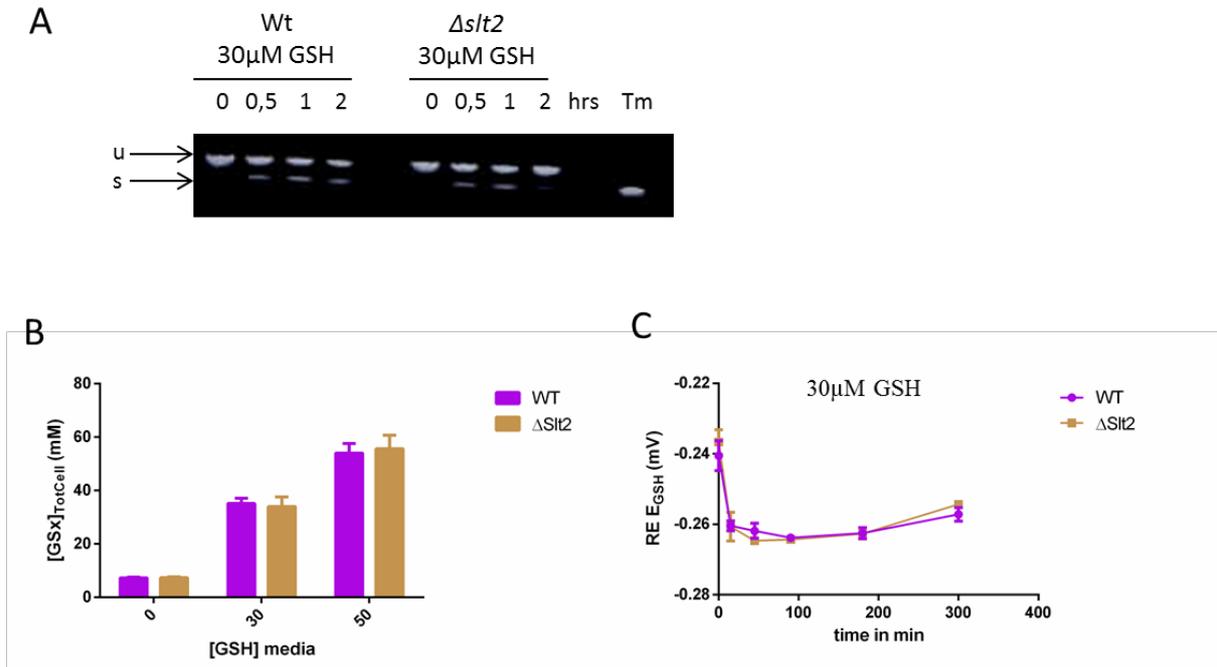


Figure 3. L'activation de la voie MAPK Slit2 permet une activation accrue de la voie UPR.

(A) Clivage de l'ARNm de HAC1 dans une souche sauvage HGT1 (Wt) ou HGT1-ΔSlit2 (ΔSlit2) exposées à 30 μM de GSH ou à un traitement à 2 μg/ml de tunicamycine pendant 1 heure (ligne Tm). Les cellules en phase exponentielles ont été exposées au GSH, le contenu en ARNm total a été extrait, et après RT et PCR, la taille des ADNc de HAC1 a été évaluée par migration sur gel d'agarose. Deux tailles sont observées, une taille complète (u) et une forme clivée (s).

(B) Valeur de total [GSx] = [GSH] + 2[GSSG], mesurée dans les lysats cellulaires (TotCell) dans des cellules HGT1 sauvage (Wt) ou HGT1-ΔSlit2 (ΔSlit2) en phase exponentielle incubées une heure en présence de GSH.

(C) État redox du glutathion dans le RE (RE E_{GSH}) des cellules HGT1 sauvages (Wt) ou HGT1-ΔSlit2 (ΔSlit2) en phase exponentielle incubées en présence de 30μM de GSH.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants ± l'écart type (sd)

b) L'oxydation du RE E_{GSH} conduit à une induction des voies de signalisation du stress RE

Comme discuté précédemment, une modification de l'état redox du glutathion cytosolique provoque une modification équivalente du RE E_{GSH} (Voir résultats chapitre 1). Les mutants affectés dans le système réducteur du glutathion cytosolique présentent ainsi un Cyt E_{GSH} et du RE E_{GSH} sensiblement plus oxydé (figure 4A et B). Il est cependant important de noter que la mesure du RE E_{GSH} dans les mutants Δycf1Δglr1Δgrx2Δtrx2 est faussée par les limitations redox de la sonde ER rxYFP. Nous avons utilisé ce phénotype particulier afin d'étudier l'impact d'une oxydation du RE E_{GSH}.

Les mutants *Δglr1* et *Δycf1Δglr1Δgrx2Δtrx2* présentant un RE E_{GSH} plus oxydés montrent une induction basale accrue de Kar2, suggérant une activation constitutive de la voie UPR (**figure 4C**). Cette activation de la voie UPR révèle un stress RE constitutif chez ces mutants par ailleurs non affectés dans leur croissance cellulaire. Cette pré-activation constitutive de la voie UPR explique la plus grande résistance de la souche *Δycf1Δglr1Δgrx2Δtrx2* à un traitement tunicamycine (**figure 4D**).

Nous observons donc qu'une oxydation du RE E_{GSH} conduit également à un stress RE, révélé par l'induction de la voie UPR. Les résultats obtenus pour une réduction ou une oxydation du RE E_{GSH} montrent l'importance de l'homéostasie redox du glutathion sur la fonction de sécrétion du RE.

Figure 4

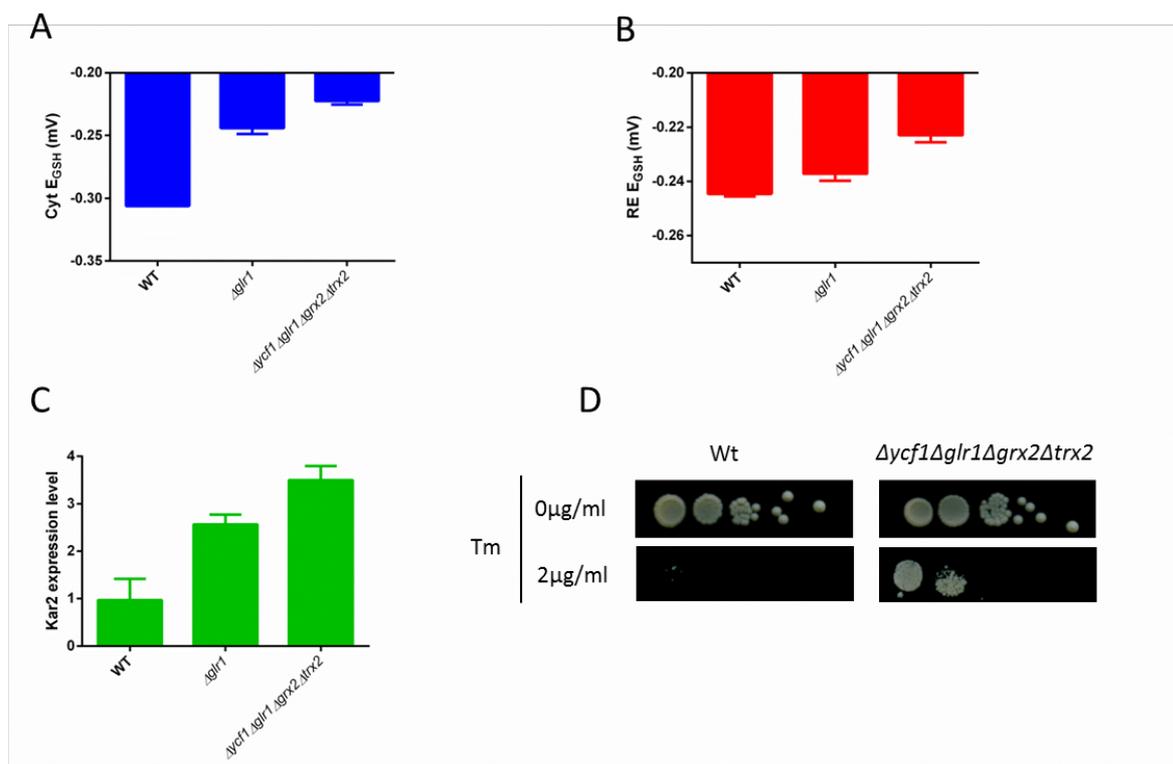


Figure 4. L'oxydation de l'état redox du RE conduit à une activation constitutive de la voie UPR.

État redox du glutathion (A) dans le cytosol (Cyt E_{GSH}) ou (B) dans le RE (RE E_{GSH}) pour des cellules sauvages (Wt), *Δglr1* ou *Δycf1Δglr1Δgrx2Δtrx2* en phase exponentielle. Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

(C) Niveau d'expression transcriptionnel du gène *KAR2*. Le niveau d'expression de *KAR2* est évalué comme présenté précédemment. Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

(D) Tolérance à une exposition à 2 μ g/ml de tunicamycine (Tm) lors de croissance sur milieu solide. Une souche sauvage (Wt) et une souche *Δycf1Δglr1Δgrx2Δtrx2* ont été étudiées. Les résultats présentés sont représentatifs de ce qui a été observé pour au moins deux expériences indépendantes

2. Mort cellulaire associée au stress réducteur du RE

Lors d'une exposition à la tunicamycine, Cunningham et collaborateurs montrent que le stress RE conduit à la mise en place d'une mort cellulaire programmée non apoptotique (Kim et al., 2012). Cette mort cellulaire programmée nécrotique implique une acidification de la vacuole par une V-ATPase vacuolaire et une perméabilisation vacuolaire, sous la dépendance de la protéine kinase Torc1 et du complexe protéique Ego (Ego1-Ego3) (Kim and Cunningham, 2015).

L'activation de la voie stress MAPK Slt2 permet l'induction d'un système de transport haute affinité du Ca^{2+} . Cette induction provoque une augmentation du Ca^{2+} cytosolique et l'activation de la calmoduline et de la calcineurine (Martin et al., 2011; Muller et al., 2001). Cette dernière permet une inhibition de la mort cellulaire programmée lors d'un traitement tunicamycine.

Le stress RE provoqué par une réduction du RE dans la souche HGT1 conduit à une toxicité cellulaire importante. Afin de mieux comprendre la toxicité du GSH dans ces conditions, nous avons analysé la sensibilité de souches HGT1 en termes de viabilité et mort cellulaire, puis nous nous sommes intéressés à l'implication de la mort cellulaire programmée nécrotique dans la toxicité du GSH observée.

a) La toxicité du GSH sur une souche HGT1 est liée à une perte de viabilité cellulaire et d'une augmentation de la mort cellulaire

La viabilité cellulaire couramment mesurée par un compte des CFU (« colony forming unit ») après exposition à un stress, correspond à la capacité des cellules à produire une descendance. La mesure de la viabilité cellulaire est donc à différencier d'une mesure de la mort cellulaire. Cette différence a été particulièrement mise en lumière par les travaux de Cunningham et collaborateurs sur le stress RE par traitement tunicamycine.

Un traitement tunicamycine, en inhibant la N-glycosylation des protéines du RE, conduit à l'activation forte des voies de réponses au stress RE (UPR et MAPK) (Chen et al., 2005). Elle conduit à une perte de viabilité cellulaire, mais ne provoque aucune mort cellulaire dans un milieu minimum (**Figure 5A et 5B**).

Au contraire, l'exposition à 30 μ M de GSH conduit à une perte de viabilité (**figure 5A**) mais également à une augmentation de la mort cellulaire (**figure 5B**) chez une souche surexprimant HGT1.

Figure 5

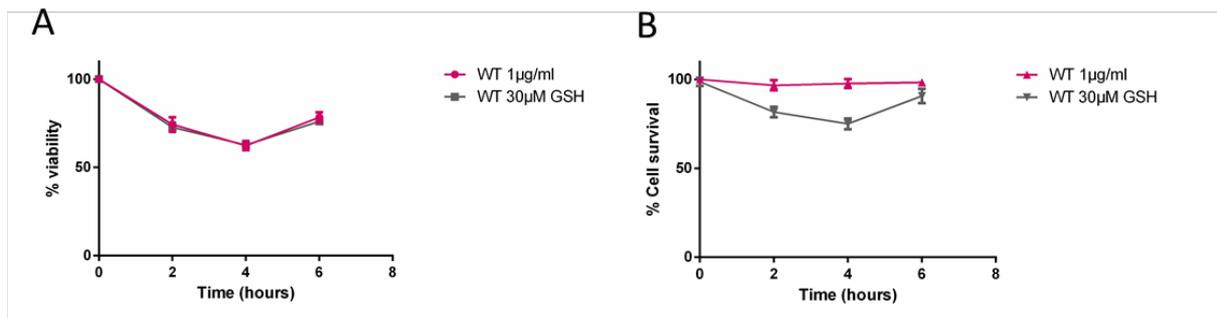


Figure 5. Toxicité du GSH et de la tunicamycine.

Effet d'un traitement à 1 μ g/ml de tunicamycine (Tm) ou de 30 μ M de GSH sur des cellules HGT1 sauvages (Wt). L'effet est mesuré en termes de (A) viabilité cellulaire (capacité à former des CFU après exposition) ou de (B) survie cellulaire (dénombrement des morts cellulaires par coloration au bleu trypan). Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

La sensibilité au GSH d'une souche HGT1 regroupe donc deux phénomènes distincts : une perte de viabilité cellulaire et une mort cellulaire. Contrairement à un stress RE provoqué par une exposition à la tunicamycine, une mort cellulaire est observée pour une souche sauvage HGT1 en présence de GSH.

b) La toxicité est directement liée à l'intensité du stress RE

Kumar et collaborateurs montrent que l'exposition au GSH conduit à une viabilité décrie chez les souches HGT1 (Kumar et al., 2011). Cette diminution de la viabilité cellulaire est observée dès 2 heures d'exposition jusqu'à 6 heures, où le taux de viabilité revient à 90% (**figure 5A**).

Afin d'explorer le lien entre diminution de la viabilité cellulaire et réduction du RE, des tests de viabilités ont été menés chez des souches présentant une accumulation réduite de GSH dans le RE (Voir Résultats chapitre 2). Ainsi le mutant Sec61 Δ L7 surexprimant HGT1 présente une réduction réduite du RE comparée à une souche sauvage, malgré une accumulation normale de GSH dans la cellule (**figure 6A**). Ce mutant présente une viabilité améliorée ainsi qu'une mort cellulaire diminuée face au stress GSH (**figure 6B et 6C**).

Figure 6

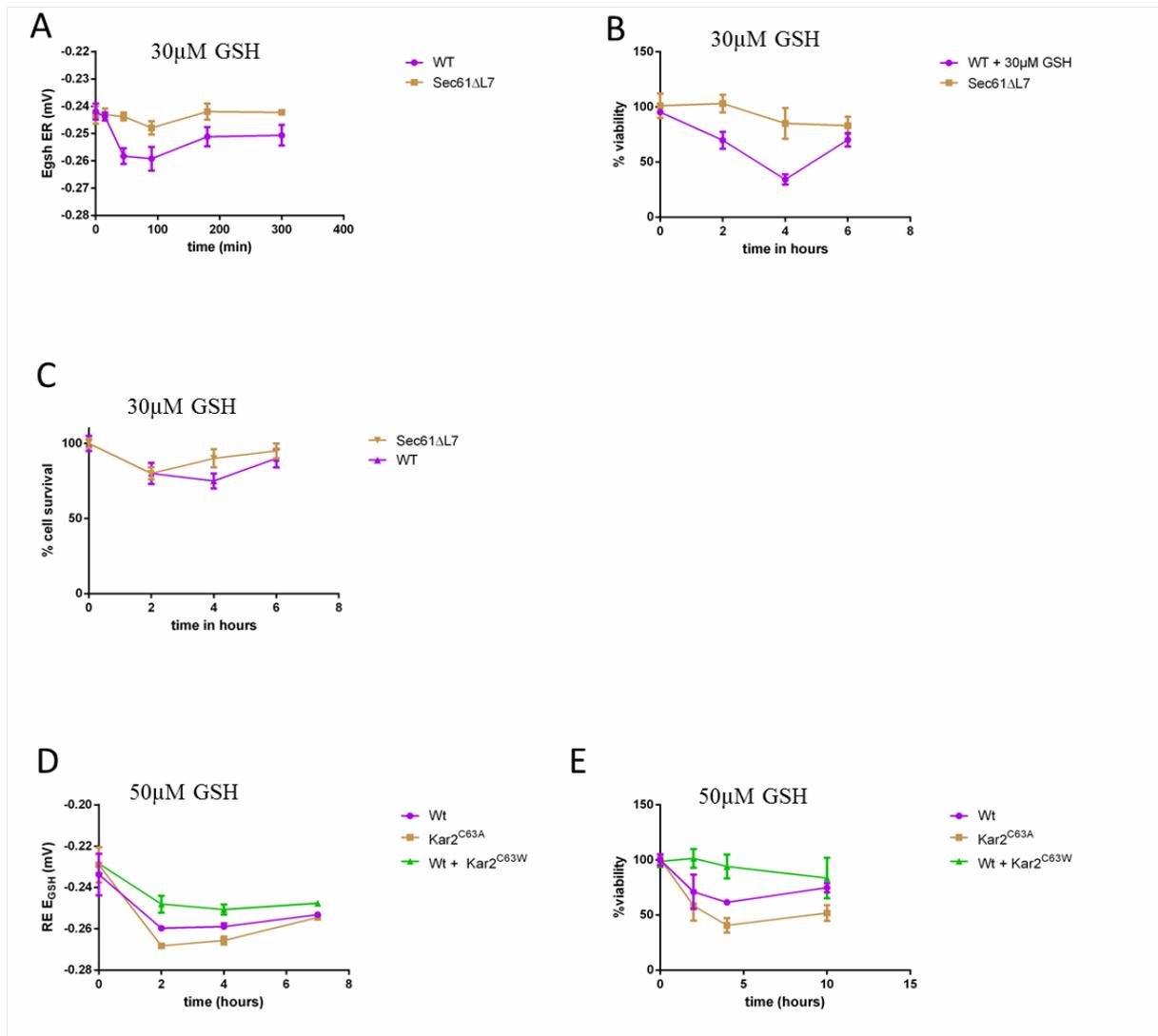


Figure 6. La toxicité du GSH dans le système HGT1 est due à son impact sur le RE.

(A, B, C) Effet d'un traitement de 30 μM de GSH sur des cellules HGT1 sauvages (Wt), ou portant la forme mutée de Sec61ΔL7 (Sec61ΔL7). L'effet est mesuré en termes de (A) variation de l'état redox du glutathion dans RE (RE E_{GSH}) ou de (B) viabilité cellulaire (capacité à former des CFU après exposition) ou de (C) survie cellulaire (dénombrement des morts cellulaires par coloration au bleu trypan). Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants ± l'écart type (sd)

(D, E) Effet d'un traitement de 50 μM de GSH sur des cellules HGT1 sauvages (Wt), une souche HGT1 exprimant la forme mutante Kar2^{C63A} (Kar2^{C63A}) et une souche sauvage exprimant la forme sauvage de Kar2 et la forme mutée Kar2^{C63W} (Kar2^{C63W}) ont été utilisées. L'effet est mesuré en termes de (D) variation de l'état redox du glutathion dans RE (RE E_{GSH}) ou de (E) viabilité cellulaire. Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants ± l'écart type (sd)

De même, certaines mutations sur la protéine chaperon luminale Kar2 influencent le flux entrant de GSH dans le cytosol (voir résultats chapitre 1). Rapidement, l'expression du mutant KAR2^{C63A} provoque une accumulation accrue de GSH dans le RE après exposition d'une souche HGT1 à 50 µM de GSH. *A contrario*, la mutation KAR2^{C63W} conduit à une accumulation diminuée de GSH dans ces conditions (**figure 6D**). Lors d'une exposition à 50 µM de GSH, le mutant KAR2^{C63A} surexprimant HGT1 présente une viabilité cellulaire diminuée, à l'opposé de ce qui est observé dans ces conditions pour le mutant KAR2^{C63W} (**figure 6E**).

Nous observons donc qu'une diminution de la réduction du RE dans une souche HGT1 conduit à une toxicité diminuée. L'effet de ces mutations confirment donc l'idée d'un lien fort entre toxicité du GSH et réduction du RE, et montrent que la toxicité du GSH dans une souche HGT1 est uniquement liée à son impact sur le RE.

c) Rôle de la voie de mort cellulaire programmée nécrotique dans la toxicité du GSH

- La réponse UPR n'a pas d'impact sur la mort cellulaire ni sur la viabilité cellulaire lors d'un stress réducteur

L'activation de la voie UPR est une réponse cellulaire majeure permettant une adaptation au stress RE. Afin d'évaluer l'importance de la réponse UPR dans la survie au stress GSH dans une souche HGT1, nous avons analysé la toxicité du GSH pour une souche HGT1- *Δire1*.

L'impact de la voie UPR dans la survie à l'exposition de GSH a été exploré en testant le taux de viabilité d'une souche HGT1-*Δire1* exposé à différentes concentrations. À des concentrations de GSH assurant une réduction similaire du RE, une souche *Δire1* ne présente pas une viabilité diminuée par rapport à une souche sauvage (**Figure 7A**). De même, la mort cellulaire observée chez un mutant *Δire1* surexprimant HGT1 est équivalente à celle observée pour une souche sauvage (**figure 7B**).

Ces données suggèrent une indépendance des voies liées à la mort cellulaire en présence de GSH et la voie de réponse UPR.

Comme mentionné précédemment, lors d'une exposition à la tunicamycine, la viabilité cellulaire d'un mutant *Δire1* est diminuée (Chen et al., 2005) (**Figure 7C**). Cependant, la mort cellulaire observée lors d'un traitement à la tunicamycine n'est pas modifiée par l'activation de la voie UPR (Kim et al., 2012) (**Figure 7D**).

Figure 7

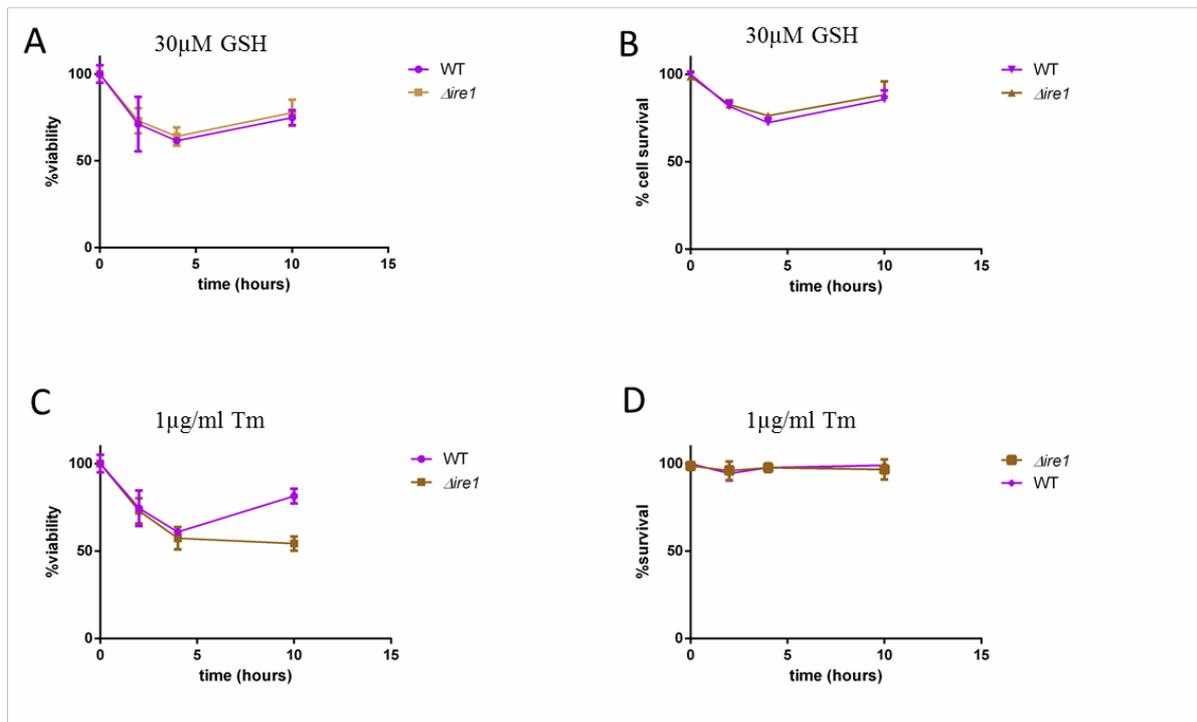


Figure 7. La réponse UPR n'a pas d'effet sur la toxicité du GSH dans une souche HGT1.

(A, B) Effet d'un traitement de 30 μ M de GSH sur des cellules HGT1 sauvages (Wt), HGT1-*Δire1* (*Δire1*). L'effet est mesuré en termes de (A) viabilité cellulaire (capacité à former des CFU après exposition) ou de (B) survie cellulaire (dénombrement des morts cellulaires par coloration au bleu trypan).

(C, D) Effet d'un traitement de 1 μ g/ml de tunicamycine (Tm) sur des cellules HGT1 sauvage (Wt), HGT1-*Δire1* (*Δire1*). L'effet est mesuré en termes de (C) viabilité cellulaire ou (D) survie cellulaire.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

- **L'activation d'une mort cellulaire programmée est responsable de la mortalité observée dans les souches HGT1.**

Une voie de mort cellulaire programmée non apoptotique a été mise en évidence lors de divers stress RE, tels qu'une exposition à la tunicamycine, au DTT, ou aux phéromones de mating... (Kim et al., 2012). Elle implique l'acidification des peroxyosomes et de la vacuole par la V-ATPase sous le contrôle de la voie Tor1 (Kim and Cunningham, 2015). Les mutations *Δvma2* et *Δvma4* permettent d'inhiber le fonctionnement de la V-ATPase et préviennent la mise en place de la mort cellulaire programmée (Kim et al., 2012). Nous avons cherché à évaluer l'implication de cette mort cellulaire programmée dans la toxicité du GSH chez une souche HGT1.

Un mutant HGT1-*Δvma2* ou HGT1-*Δvma4* (sous-unités fonctionnelles de la V-ATPase) est moins sensible à une exposition au GSH (figure 8E), et présentent une viabilité accrue par rapport à une cellule sauvage dans ces conditions (figure 8A), et une mort cellulaire abolie (figure 8B).

Lors d'un traitement tunicamycine, l'activation de la voie Slt2 MAPK et de la calcineurine permet une complète inhibition de la mort cellulaire programmée nécrotique (Kim et al., 2012). L'importance de l'activation de la voie calcineurine a été étudiée lors d'une exposition au GSH chez une souche HGT1. Les mutants HGT1- $\Delta cna1$ (codant pour l'une des isoformes de la calcineurine A) ou HGT1- $\Delta cch1$ (transporteur calcique à haute affinité activé lors d'une exposition à la tunicamycine) présentent une sensibilité légèrement accrue à une exposition au GSH (**figure 8C**). Une mortalité accrue est également notable pour ces mutants lors d'une exposition à 30 μ M de GSH (**figure 8D**).

Le phénotype des mutants $\Delta vma2$ et $\Delta vma4$ lors d'une réduction du RE E_{GSH} démontre que la toxicité du glutathion chez une souche HGT1 est due à la mise en place d'une mort cellulaire programmée dépendante du stress RE. L'activation dans ces conditions de la voie MAPK Slt2 permet une certaine protection face à cette mort cellulaire nécrotique.

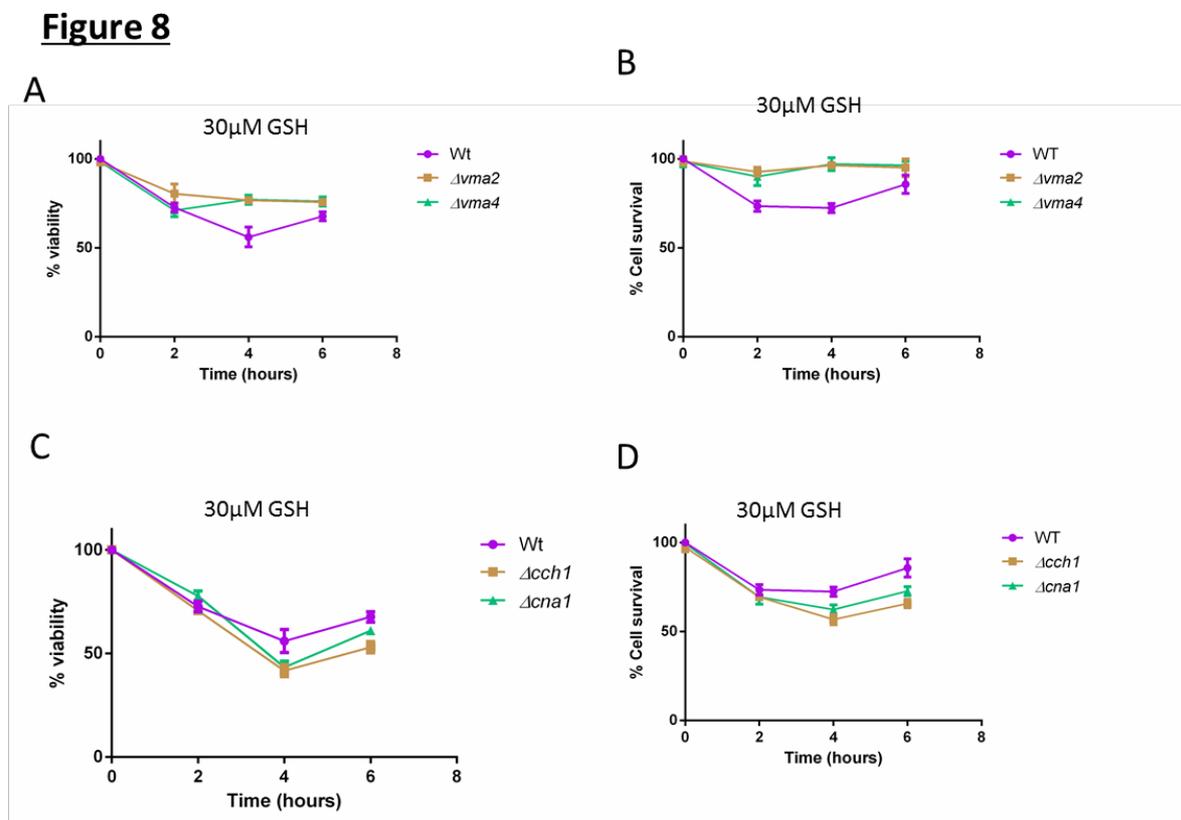


Figure 8. La mise en place d'une mort cellulaire programmée lors du stress RE explique la toxicité du GSH pour les cellules HGT1.

(A, B) Effet d'un traitement de 30 μ M de GSH sur des cellules HGT1 sauvages (Wt), HGT1- $\Delta vma2$ ($\Delta vma2$) et HGT1- $\Delta vma4$ ($\Delta vma4$). L'effet est mesuré en termes de (A) viabilité cellulaire ou de (B) survie cellulaire.

(C, D) Effet d'un traitement de 30 μ M de GSH sur des cellules HGT1 sauvages (Wt), HGT1- $\Delta cch1$ ($\Delta cch1$) et HGT1- $\Delta cna1$ ($\Delta cna1$). L'effet est mesuré en termes de (C) viabilité cellulaire ou de (D) survie cellulaire.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

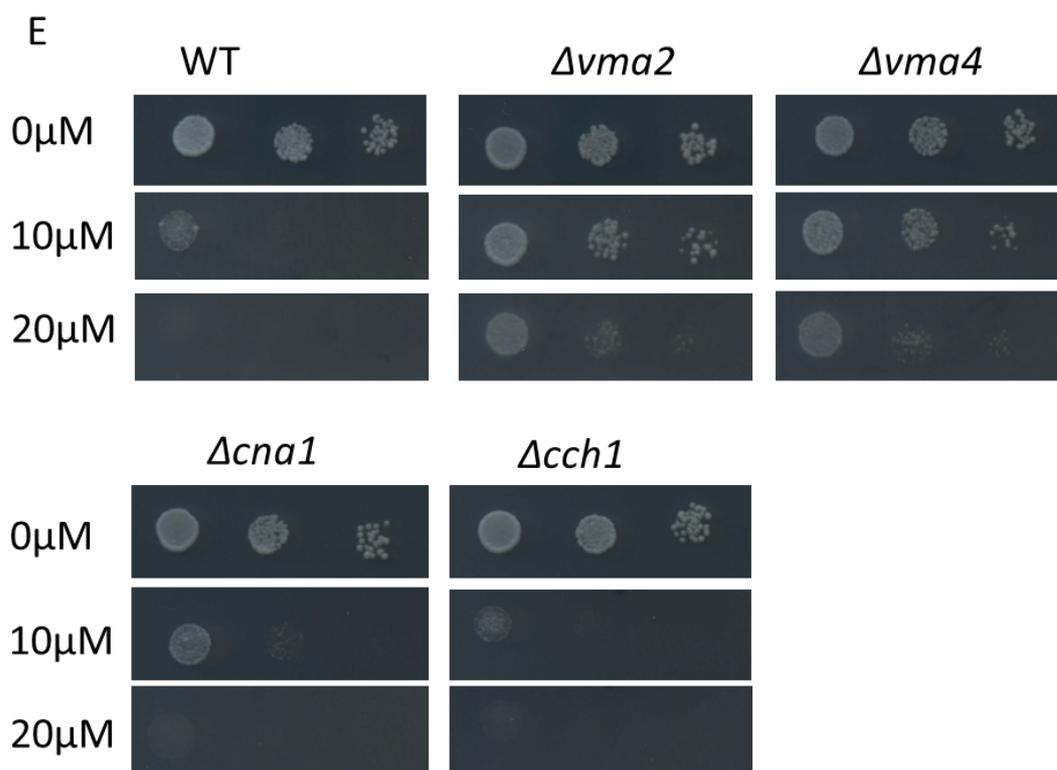


Figure 8 : La mise en place d'une mort cellulaire programmée lors du stress RE explique la toxicité du GSH pour les cellules HGT1.

(E) Tolérance au GSH lors de croissance sur milieu solide contenant la concentration indiquée de GSH. Une souche sauvage HGT1 (Wt), HGT1- $\Delta vma2$ ($\Delta vma2$), HGT1- $\Delta vma4$ ($\Delta vma4$), HGT1- $\Delta cna1$ ($\Delta cna1$) et une souche HGT1- $\Delta cch1$ ($\Delta cch1$) ont été étudiées. Les résultats présentés sont représentatifs de ce qui a été observé pour au moins deux expériences indépendantes.

a) Rôle de la signalisation mitochondriale

Une vague de ROS est observable lors de la mise en place de la mort cellulaire programmée après traitement à la tunicamycine. Cette accumulation de ROS dans les cellules est dépendante de la respiration mitochondriale (Dudgeon et al., 2008). Le rôle de cette vague d'oxydation lors d'un traitement tunicamycine reste méconnu, même si elle semble avoir un rôle pro-mort cellulaire en l'absence de la voie MAPK-calcineurine (Dudgeon et al., 2008). Nous avons cherché à évaluer le rôle de cette signalisation mitochondriale dans la réponse au stress GSH dans une souche HGT1.

Figure 9

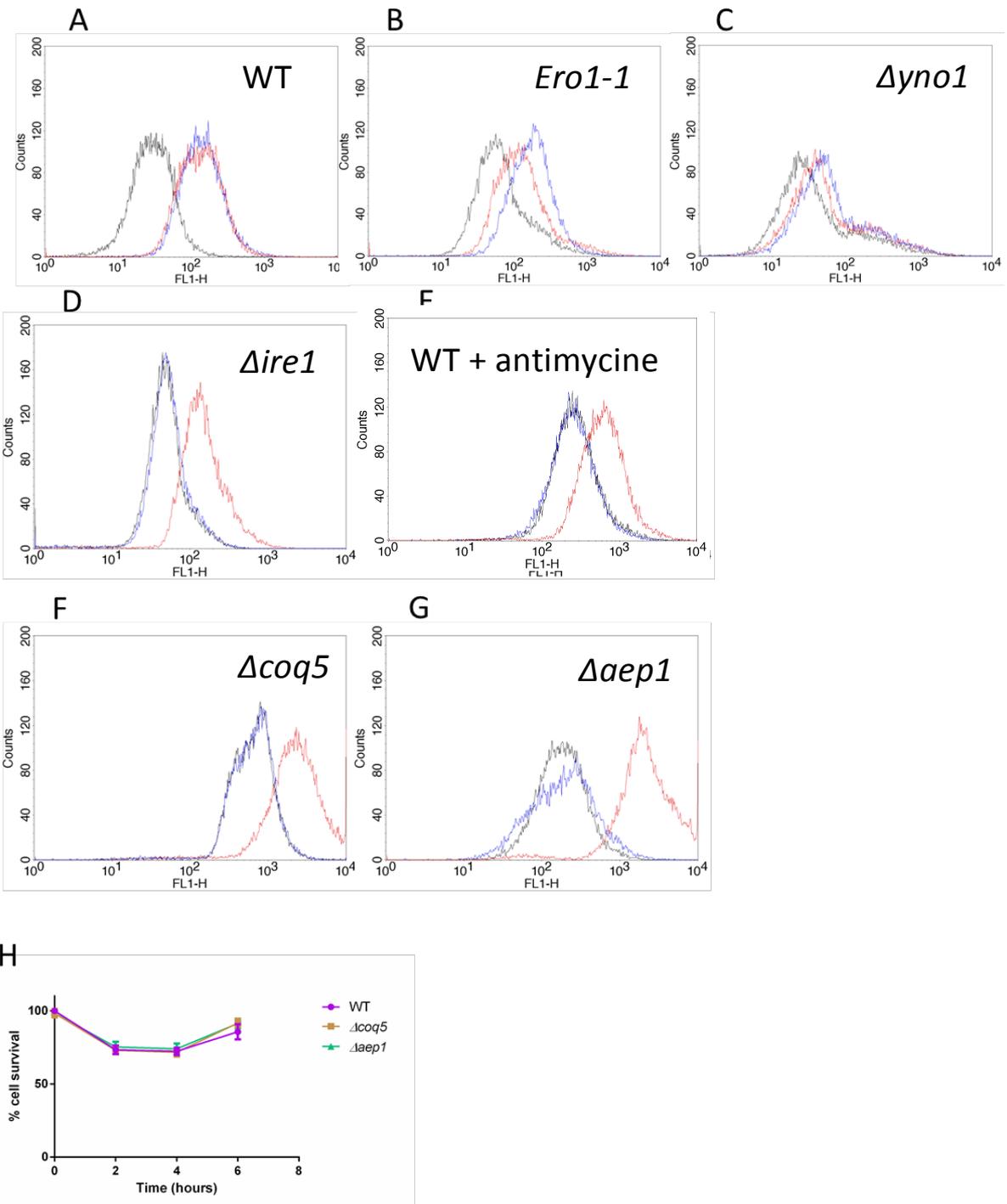


Figure 9 : Le stress RE provoque une production de ROS mitochondriaux.

(A-G) Production de ROS dans des cellules HGT1 exposées à 50 μM de GSH ou 400 μM de H_2O_2 pendant une heure. Les cellules ont été incubées une heure dans du PBS en présence de dihydrorhodamine 123 (noir) et de GSH (bleu) ou du H_2O_2 (rouge), et analysée par cytométrie en flux.

(D) Les cellules *ero1-1*, mutants thermosensibles pour le gène ERO1, ont été pré-incubés à 37°C pendant une heure avant le début de l'expérience.

(E) Les cellules HGT1 sauvages ont été traitées pendant une heure à 1 $\mu\text{g/ml}$ d'Antimycine A avant l'ajout de GSH ou d' H_2O_2

(H) Effet d'un traitement de 30 μM de GSH sur des cellules HGT1 sauvages (Wt), HGT1- Δcoq5 (Δcoq5) et HGT1- Δaep1 (Δaep1). L'effet est mesuré en termes de survie cellulaire.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

Le taux de ROS cellulaire peut être suivi par FACS après coloration au H2DCFDA. L'exposition à 30 μM GSH d'une souche HGT1 conduit à une accumulation de ROS dans la cellule dès 2 heures d'exposition (**Figure 9A**) (Kumar et al., 2011). Cette accumulation de ROS est indépendante de l'activité des oxydases connues du RE (ERO1 et YNO1) (**Figure 9B et 9C**), mais semble sous la régulation de la voie UPR car un mutant *Aire1* surexprimant HGT1 ne présente pas cette accumulation de ROS en présence de GSH (Kumar et al., 2011) (**figure 9D**). L'origine de ces ROS est mitochondriale puisqu'un traitement à l'antimycine A (**Figure 9E**) ou des mutants affectés dans leur chaîne respiratoire (ΔCoq5 ou ΔAep1) ne présentent pas cette vague d'oxydation (**Figure 9F et 9G**).

Lors d'une exposition au GSH, un mutant ΔCoq5 ou ΔAep1 surexprimant HGT1 ne présente pas une mort cellulaire accrue (**Figure 9H**), suggérant une absence de rôle de la signalisation mitochondriale dans la survie au stress GSH.

Comme ce qui est rapporté pour un stress RE provoqué par un traitement tunicamycine, nous observons une production de ROS mitochondriale chez une cellule HGT1 lors d'une exposition au GSH. Cette signalisation, dépendante de l'activation de l'UPR ne semble pas impliquée dans la survie au stress dans ces conditions, et son rôle reste à déterminer.

3. Ralentissement de croissance associée au stress réducteur du RE

Dans des conditions de stress RE, la voie Slt2 MAPK assure un arrêt du cycle cellulaire. Babour et collaborateurs rapportent en 2010 l'importance de la MAPK Slt2 dans le contrôle transmission du RE cortical (cRE) à la cellule fille. Dans des conditions de stress RE, une rétention du cRE est observé chez la cellule mère (Babour et al., 2010). Or, un délai de transmission du cRE à la cellule fille conduit à un délai dans la progression en G2, et une activation de la protéine kinase Swe1 (Loewen et al., 2007). Swe1 phosphoryle et inhibe la kinase cycline-dépendante Cdc28, bloquant la progression du cycle cellulaire entre la phase G2 et M (Mizunuma et al., 1998).

Chez une souche HGT1, l'exposition au GSH conduit à un défaut de croissance persistant (Kumar et al., 2011). Nous avons cherché à identifier les voies cellulaires responsables de ce défaut de croissance.

Figure 10

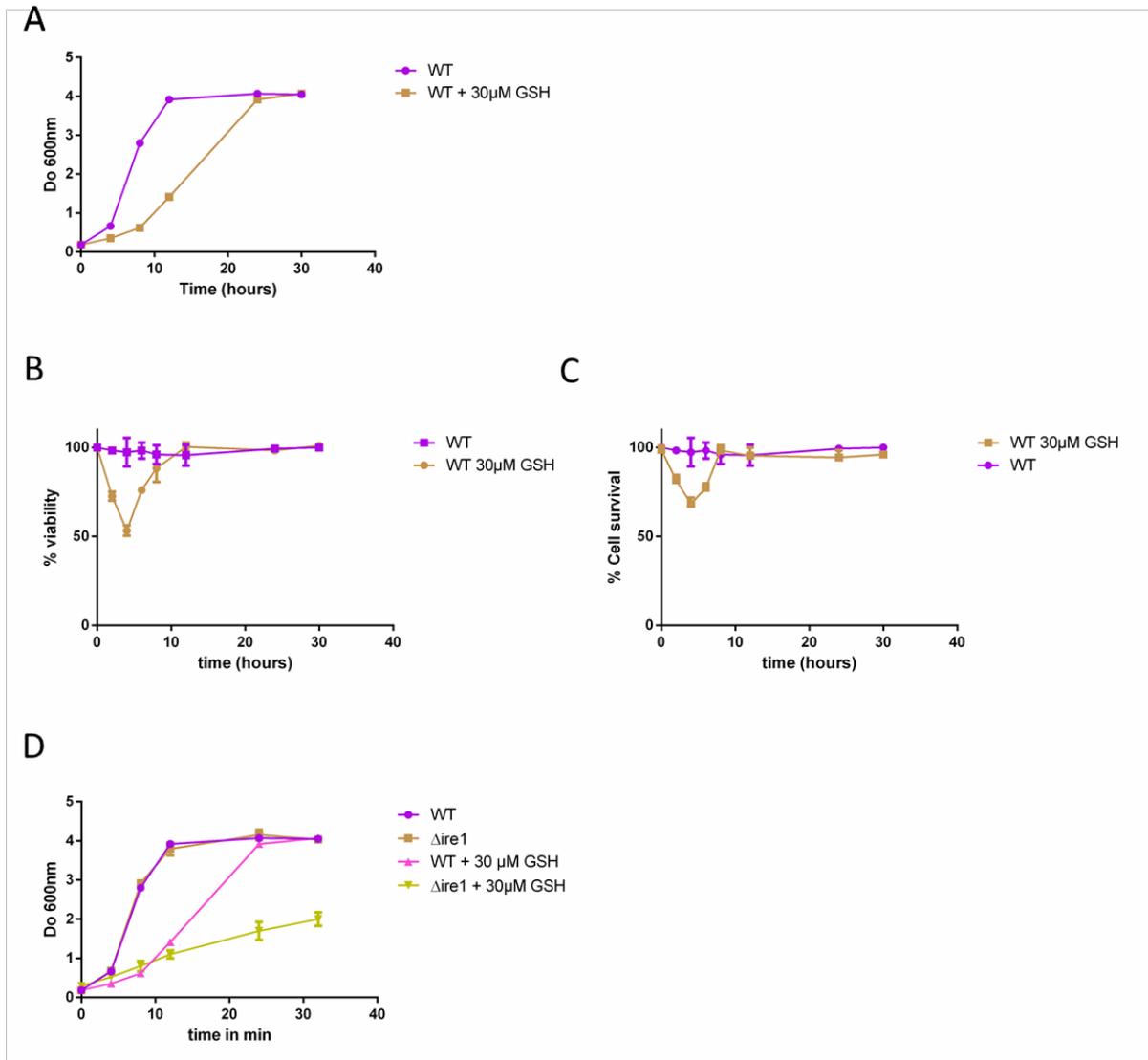


Figure 10 : Un défaut de croissance est observé lors d'une exposition au GSH d'une souche HGT1.

- (A) Croissance d'une souche sauvage HGT1 (Wt) en présence de 30 µM de GSH (Wt + 30 µM GSH)
 (B) viabilité cellulaire et (C) survie cellulaire observés pour une souche HGT1 dans les conditions présentées en A
 (D) Croissance d'une souche HGT1 (Wt) ou *HGT1-Δire1* (*Δire1*) en présence de 30 µM de GSH.

Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants ± l'écart type (sd)

a) Le ralentissement de croissance est indépendant de la mort cellulaire

Comme décrit précédemment, dans le système HGT1, l'exposition au GSH conduit à une réduction transitoire du RE, accompagnée d'une perte de viabilité et d'une augmentation du taux de mortalité cellulaire. L'exposition d'une souche HGT1 au GSH conduit également à un défaut de croissance persistant après un retour à une viabilité cellulaire normale et à un taux de mortalité basal (**Figure 10 A, B et C**).

Alors qu'une mutation *Δire1* n'a pas d'impact sur la mortalité et la perte de viabilité cellulaire observée lors d'un ajout de 30 μM de GSH, le défaut de croissance observé pour cette souche est significativement augmenté (**Figure 10D**).

Ces résultats suggèrent une cause pour le défaut de croissance observé distincte des voies mises en jeu dans la mortalité et la viabilité cellulaire, et soulève l'importance de l'induction de la voie UPR dans la reprise d'une croissance normale.

b) Le ralentissement de croissance est dû à un arrêt du cycle en G2

Lors de la croissance végétative, la protéine kinase Swe1 est constitutivement inhibée et dégradée (Ma et al., 1996; Tanaka and Nojima, 1996). Lorsqu'elle est accumulée, Swe1 phosphoryle et inhibe la kinase cycline-dépendante Cdc28, bloquant la progression du cycle cellulaire entre la phase G2 et M (Mizunuma et al., 1998). L'accumulation de Swe1 lors d'un stress RE a été liée à l'activation de la voie MAPK Slt2 (Harrison et al., 2001)(Babour et al., 2010). Cependant, des études suggèrent que l'arrêt du cycle cellulaire par Swe1, observé lors d'un stress RE pourrait partiellement être sous la dépendance d'acteurs encore inconnus (Bonilla and Cunningham, 2003).

Afin de montrer le rôle de Swe1 dans le ralentissement de croissance observée dans nos conditions, une culture asynchrone de souches sauvages ou *Δswe1* surexprimant HGT1 ont été traitées avec 30 μM de GSH pendant 2 heures. Après coloration au DAPI, le nombre de noyaux par cellules a été évalué. Contrairement à ce qui est observée pour une souche sauvage, on observe pour un mutant *Δswe1* presque 30% de la population binuclée ou multinuclée à 4 heures de traitement à 50 μM de GSH (**Figure 11A**). Ce résultat suggère qu'une exposition au GSH d'une souche HGT1 conduit à un arrêt du cycle cellulaire en G2 médiée par Swe1, comme cela est également observé lors d'autres stress RE comme un traitement tunicamycine ou latrunculin B (Bonilla and Cunningham, 2003).

Cet arrêt du cycle cellulaire semble important pour la survie au stress provoqué par le GSH puisqu'un mutant *Δswe1* présente une grande sensibilité au GSH, comparé à ce qui est observé pour une souche sauvage (**Figure 11B**).

Ces résultats suggèrent que le ralentissement de croissance observé chez une souche HGT1 lors d'une exposition au GSH repose sur un blocage du cycle cellulaire en G2 sous la dépendance de l'activité de Swe1.

Figure 11

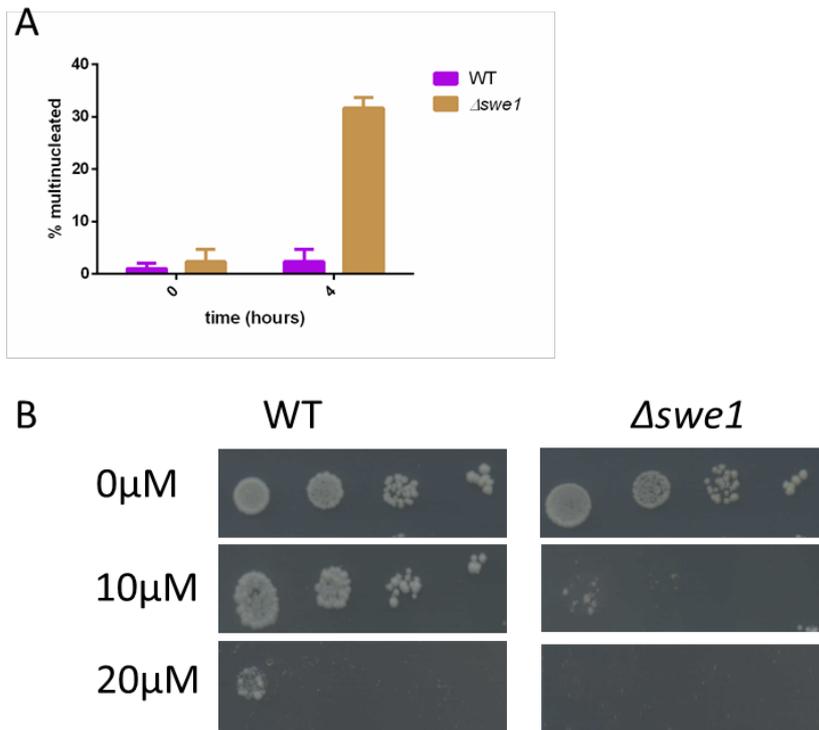


Figure 11 : Swe1 bloque le cycle cellulaire des cellules HGT1 exposées au GSH.

(A) Nombre de cellules bi-nuclées ou multinuclées. Une souche sauvage HGT1 (Wt) ou HGT1- Δ swe1 (Δ swe1) a été exposée à 30 μ M de GSH pendant 4 heures, et après coloration au dapi, le nombre de noyaux par cellules a été dénombré. Les données présentées sont la moyenne de trois répliquats biologiques indépendants \pm l'écart type (sd)

(G) Tolérance au GSH lors de croissance sur milieu solide contenant la concentration indiquée de GSH. Une souche sauvage HGT1 (Wt), HGT1- Δ swe1 (Δ swe1) a été étudiée. Les résultats présentés sont représentatifs de ce qui a été observé pour au moins deux expériences indépendantes.

C. Discussion

- **Le système HGT1 fournit de nouvelles approches permettant l'étude du rôle du glutathion dans le RE.**

Une majorité d'études se penchant sur le rôle du glutathion dans le RE et de l'homéostasie redox du lumen reposent sur des méthodes permettant la déplétion du glutathion. Elles utilisent des outils génétiques, telles que des souches incapables de synthétiser du glutathion ($\Delta Gsh1$ ou $\Delta Gsh2$) ou le traitement à la BSO, permettant une inhibition de la synthèse de glutathion. Cette méthode conduit à des résultats complexes : si une telle déplétion chez la levure ne semble pas avoir d'impact majeur sur la maturation de protéines modèles comme la CPY (Frand and Kaiser, 1998), d'autres études rapportent une accumulation de ponts disulfures non-natifs chez les cellules mammifères dans ces conditions (Chakravarthi and Bulleid, 2004; Molteni et al., 2004) et un état redox de la PDI significativement plus oxydée (Chakravarthi and Bulleid, 2004). Le taux de déplétion en glutathion dans le RE atteint dans ces conditions n'est pas clairement établi, et étant donné le rôle essentiel du glutathion pour la croissance, ces données sont peut-être masquées par le rôle du glutathion dans d'autres compartiments (Kumar et al., 2011). Une étude récente menée chez les mammifères utilise une enzyme de dégradation du glutathion, exprimée dans des conditions normale dans le cytosol, et observe l'effet de sa surexpression sur la sécrétion protéique et la physiologie du RE. De façon surprenante, aucun phénotype n'a pu être observé dans ces conditions de déplétion forte du glutathion du RE. Ainsi, aucun impact sur l'isomérisation protéique dans le lumen, la dégradation des protéines mal repliées ou l'induction de l'UPR (Tsunoda et al., 2014) n'est observé dans ces conditions.

Cependant, la surexpression de l'enzyme de dégradation Chac1 dans le lumen, bien que permettant d'établir conditions de déplétion en GSH dans le RE et dans la cellule de façon plus générale, provoque en contrepartie l'accumulation de cysteinyl-glycine, dont la fonction redox reste inexplorée.

Le système HGT1 fournit une possibilité de modifier rapidement et drastiquement l'état redox du RE et d'étudier son impact sur le fonctionnement de la machinerie de repliement oxydatif et la sécrétion protéique. À l'opposé des études utilisant une déplétion, la nôtre s'intéresse à une modification redox engendrée par une augmentation de la concentration du glutathion cellulaire et luminal, et d'une réduction du RE E_{GSH} . Kumar et collaborateurs mettent ainsi en évidence grâce à ce système que cette augmentation brutale de glutathion intracellulaire provoque un blocage de la sécrétion protéique et la mise en place d'une réponse UPR. Ici, nous montrons clairement que cette réduction du RE provoque l'induction des deux voies principales de signalisation du stress RE : la voie UPR et MAPK Slt2, et que leur induction est proportionnelle à l'intensité de réduction du RE obtenue.

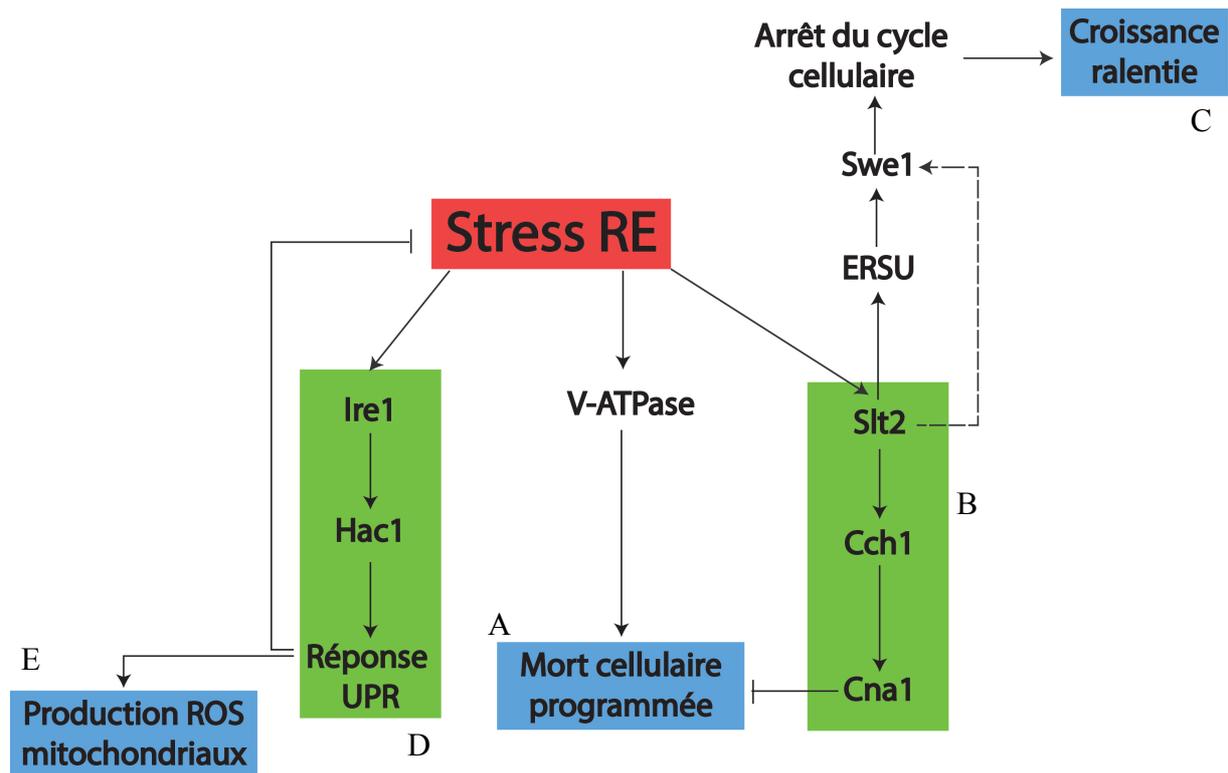


Figure 12 : Interplay des voies de réponses au stress RE lors d'une réduction du RE E_{GSH}

La réduction du RE E_{GSH} dans des cellules HGT1 conduit à un fort stress RE. (A) Une mort cellulaire programmée dépendante du stress RE est mise en place, par l'activation de l'activité de la V-ATPase. Cette mort cellulaire programmée est inhibée par l'activation de la voie MAPK Slt2 (B). L'activation de Slt2 permet également la mise en place d'un arrêt du cycle cellulaire conduisant à une croissance ralentie (C) par l'activation du régulateur Swe1.

Le stress RE réducteur provoque l'activation de la voie UPR (D), qui permet une certaine adaptation au stress et conduit à la production de ROS mitochondriaux dont le rôle reste à élucider (E).

Abréviations utilisées : ERSU = ER Surveillance Pathway ; UPR = unfolded protein response

- **Une réduction du RE E_{GSH} induit une voie de mort cellulaire programmée liée au stress RE**

Le stress RE intense lié à la réduction du RE conduit à une forte toxicité du GSH pour les cellules HGT1. Cette toxicité est observable par une perte de viabilité cellulaire, une mort cellulaire et un ralentissement de croissance. Notre étude montre que la mort cellulaire observée dans ces conditions est liée à la mise en place d'une mort cellulaire programmée non-apoptotique causée par le stress RE.

La mise en place d'une voie de mort cellulaire programmée non-apoptotique lors d'un stress RE chez *S. cerevisiae* avait été mise en évidence lors d'un traitement tunicamycine par les travaux de Cunningham et collaborateurs. Les acteurs de la mort cellulaire programmée nécrotique identifiés par

ces auteurs semblent être également mis en jeu dans le stress RE induit avec le système HGT1. Dans notre système, la mort cellulaire observée chez une souche sauvage est ainsi dépendante de l'activité de la V-ATPase provoquant l'acidification de la vacuole. Cependant, lors d'un traitement tunicamycine, cette mort cellulaire est masquée chez une souche sauvage par l'activation de la voie MAPK Slt2 et de la calcineurine. Dans notre système, ces voies ont également un rôle anti-mort cellulaire, mais cette protection n'est que partielle.

La toxicité du GSH dans une souche HGT1 semble donc être uniquement causée par son impact sur le RE, et être liée à la mise en place d'une mort cellulaire programmée. Les souches HGT1- $\Delta vma2$ ou HGT1- $\Delta vma4$ présentent une très grande résistance à l'exposition au GSH, et aucune mort cellulaire n'est observée dans ces souches lors de l'ajout de GSH. Ces mutations fournissent donc une opportunité d'étudier l'impact de l'accumulation cellulaire du GSH en s'affranchissant de la mort cellulaire programmée.

- **Le stress RE réducteur conduit à une signalisation mitochondriale au rôle indéterminé et à un ralentissement de croissance.**

La voie UPR, en plus de son rôle dans la résolution du stress RE via l'induction de ces cibles (protéines chaperons du RE...), semble important pour la mise en place d'une signalisation cellulaire impliquant la production de ROS par la mitochondrie. Le rôle de cette signalisation reste cependant inconnu, même si les études menées sur le stress RE induit par le traitement tunicamycine semblent lui attribuer un rôle de signalisation pro-mort cellulaire (Dudgeon et al., 2008).

Le ralentissement de croissance observé lors d'un traitement au GSH de cellules HGT1 semble être indépendant de la mortalité et de la perte de viabilité associée à l'exposition au GSH. Ce ralentissement de croissance qui se prolonge après une restauration totale de la viabilité cellulaire semble être dû à un blocage du cycle cellulaire en G2 médié par Swe1, et est très probablement accompagné d'un défaut de transmission du RE à la cellule fille par activation de la voie ERSU. De façon surprenante, le blocage du cycle cellulaire et le défaut de croissance observé est aggravé par une délétion *Aire1*. En effet, l'activation de la voie ERSU est indépendante de la voie UPR (Babour et al., 2010) et repose sur l'activation de la MAPK Slt2. Une absence de réponse UPR ayant pour effet d'aggraver le stress RE, il est possible de penser que l'activation de la voie MAPK Slt2 sera plus intense et prolongée dans un mutant *Aire1* lors d'un stress RE, conduisant peut être à un arrêt de croissance plus dramatique.

L'interplay des voies cellulaires impliquées dans les phénotypes observés chez une souche HGT1 traitée au GSH est présenté dans la **Figure 12**.

Discussion

IX. DISCUSSION GENERALE.....	155
A. UNE REGULATION RECIPROQUE DE L'ACTIVATION D'ERO1 ET DE L'IMPORT DE GSH DANS LE RE	155
B. INTERACTION ENTRE SECRETION ET TRADUCTION DES PROTEINES : ROLE DU GSH	160
C. MECANISME DE L'INHIBITION DE L'IMPORT DE GSH DANS LE RE PAR LA FORME OXYDEE DE KAR2	161
X. CONCLUSION	162

IX. Discussion générale

Nous avons montré au cours de cette étude que le transport de glutathion dans le RE s'effectue selon une diffusion facilitée, permettant l'équilibration de la concentration du tripeptide de part et d'autre de la membrane du RE. Nous avons également montré que son transport est assuré par le canal de translocation protéique, Sec61. Enfin, nous observons une régulation du flux de GSH dans le RE par la forme oxydée de Kar2.

Nos résultats mettent en évidence une interaction fonctionnelle majeure entre l'activité d'Ero1 et l'import du GSH dans le RE, que nous avons schématisée dans la figure 1 et qui sera discutée ici.

L'implication de Sec61 dans le transport du GSH soulève deux questions (i) Quelle est la configuration fonctionnelle du translocon permettant le transport de GSH dans le RE ? (ii) Quel est le mécanisme d'action de Kar2 permettant la régulation de l'import de GSH ? Ces deux points seront également abordés ici.

A. Une régulation réciproque de l'activation d'Ero1 et de l'import de GSH dans le RE

Nos résultats permettent d'établir l'existence d'une régulation réciproque de l'activité d'Ero1 et de l'import de GSH dans le RE. En effet, l'import de GSH dans le RE provoque une réduction indirecte d'Ero1, et son activation. Réciproquement, l'activation d'Ero1, parce qu'elle entraîne une production de peroxyde d'hydrogène, induit l'oxydation de Kar2, ce qui permet d'inhiber l'import de GSH dans le RE.

Dans des conditions de stress RE, un paramètre essentiel de cette régulation réciproque est l'induction par l'UPR d'Ero1, comme le montre de défaut d'oxydation de Kar2 dans la souche HGT1-*Δire1* exposée au GSH. La production d'H₂O₂ dans le RE à des niveaux suffisants semble en effet nécessiter non seulement la réduction d'Ero1, mais aussi l'augmentation de la synthèse de ce dernier.

Nous pensons que le fonctionnement de cette boucle de contrôle réciproque entre l'activité d'Ero1 et l'import de GSH dans le RE joue un rôle lors d'un stress RE, ce que nous discuterons ici.

a) Modèle

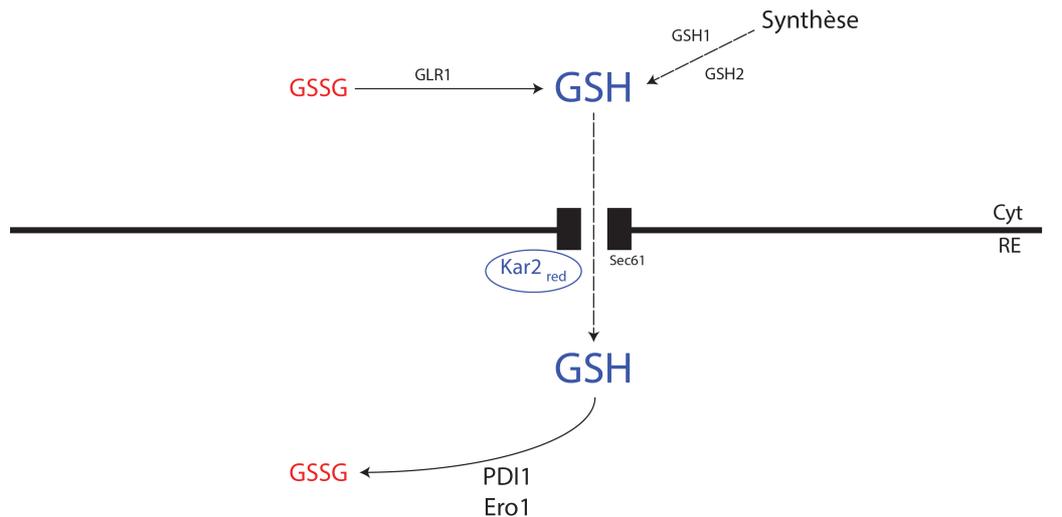
Nous avons schématisé la régulation réciproque Ero1-Transport de GSH au RE selon trois scénarii (Figure 1).

(i) Dans une cellule en croissance exponentielle, en l'absence de perturbations, les concentrations de GSH de part et d'autre de la membrane du RE sont à l'équilibre. Dans ces conditions, il existe probablement un faible transport de GSH du cytosol au RE. La nécessité d'un

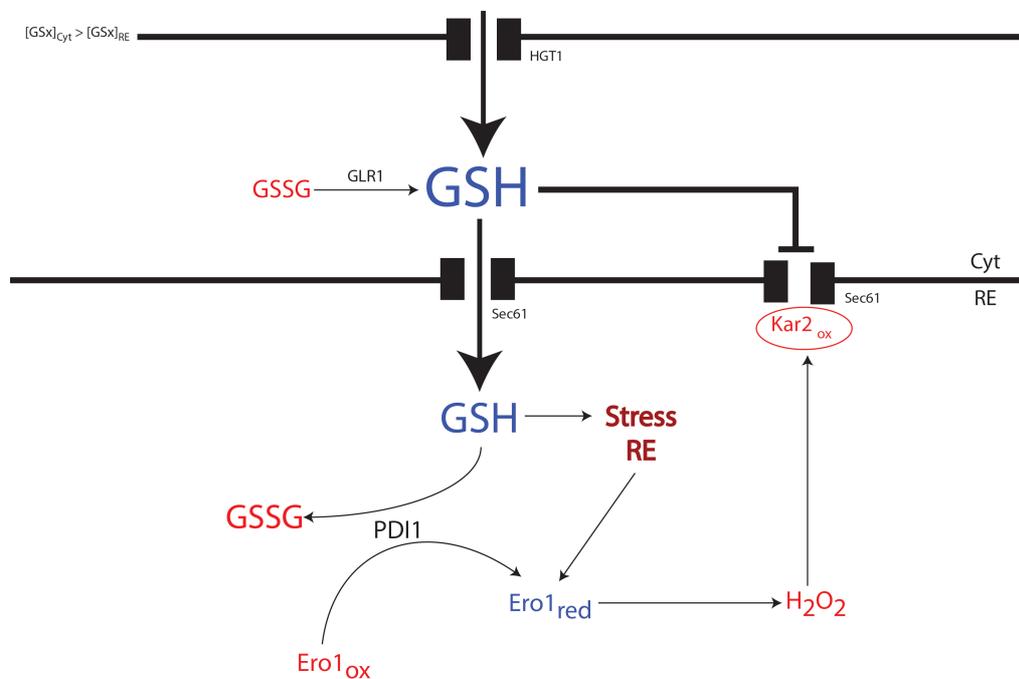
import de GSH pour le bon fonctionnement du RE lors de la croissance de base n'est pas démontrée. L'import au RE d'équivalents réducteurs peut en effet être assuré par les résidus Cys réduits des protéines nouvellement sécrétées, assurant l'isomérisation des ponts disulfures non-natifs par la PDI.

1. Conditions basales

$[GSx]_{Cyt} = [GSx]_{RE}$



2. Système HGT1



3. Stress RE

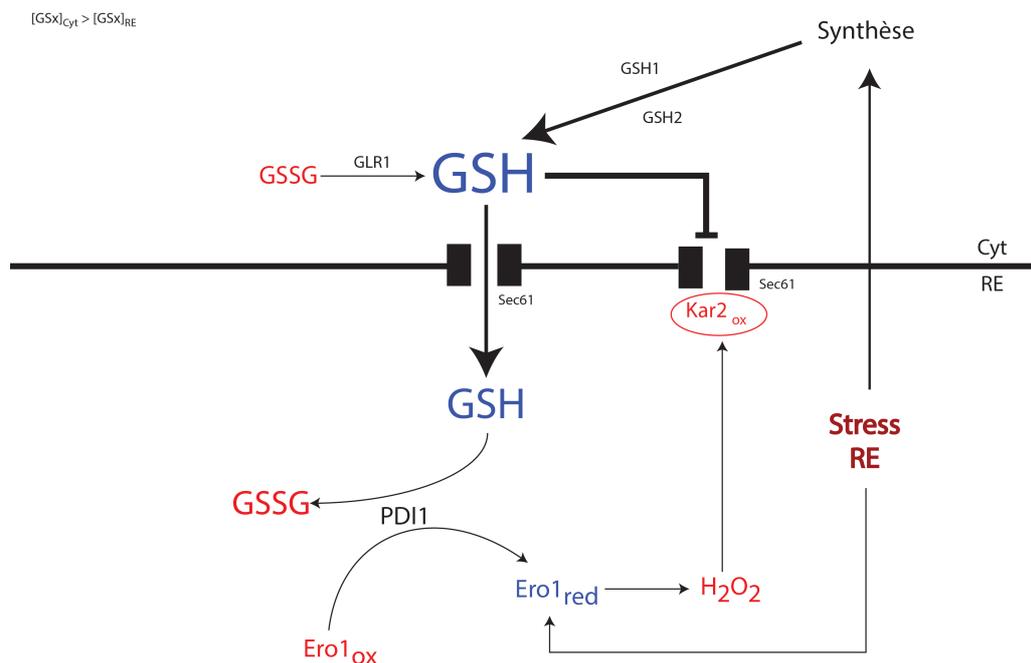


Figure 1 : Modèle de transport du GSH par Sec61

(1) En conditions basales

Dans des conditions normales de croissance, la concentration cytosolique et lumenale en glutathion s'équilibrent grâce à une diffusion facilitée du GSH à travers des complexes ribosomes-translocons inactifs. Le RE E_{GSH} est maintenu oxydé par l'activité du relai Ero1-PDI, permettant une production dans le RE en GSSG.

(2) Lors d'une augmentation de la concentration cytosolique en GSH par le système HGT1

L'accumulation cytosolique du GSH dans les cellules HGT1 provoque un flux entrant de GSH dans le RE. Les concentrations en GSH de part et d'autre de la membrane s'équilibrent par diffusion. L'augmentation de la concentration lumenale en GSH provoque une réduction du RE E_{GSH} qui cause indirectement la réduction et l'hyper-activation de l'oxydase Ero1. La modification du RE E_{GSH} provoque également l'activation des voies de réponses au stress RE, permettant une synthèse accrue de la machinerie Ero1/PDI et de la protéine chaperon Kar2. L'hyperactivité d'Ero1 dans un RE réduit conduit à une production de peroxydes d'hydrogène, oxydant l'unique cystéine de Kar2. L'oxydation de Kar2 modifie son activité chaperonne en activité holdase, et inhibe le transport de GSH entre cytosol et RE. L'activité accrue d'Ero1 dans ces conditions permet également une production importante de GSSG dont le devenir reste inconnu.

(3) Lors d'un stress RE

Lors d'un stress RE, l'induction des voies de réponses au stress permettent parallèlement l'augmentation dans le RE d'Ero1 et PDI, et de la concentration cytosolique en GSH. Ces deux paramètres provoquent une entrée de GSH dans le RE, et la réduction du RE E_{GSH} favorise l'activation d'Ero1. La production d' H_2O_2 dans ces conditions permet l'oxydation de Kar2 et l'inhibition du transport de GSH.

Les abréviations utilisées sont : GSH = glutathion réduit ; GSSG= glutathion oxydé ; Ero1_{ox} = Ero1 inactif ; Ero1_{Red} = Ero1 hyperactif ; Kar2_{Red} = Kar2 réduit ; Kar2_{Ox} = forme oxydée de Kar2 portant un acide sulfénique sur la cystéine 63.

Dans ces conditions, la vitesse de sécrétion déterminée par le métabolisme oxydatif au niveau du RE serait minimale, en accord avec l'état redox d'Ero1 qui est quasi-totalement oxydé (Sevier, 2008 ; Kumar, 2011), mais elle reste suffisante au bon fonctionnement cellulaire.

(ii) Lors d'une perturbation de la concentration cytosolique en glutathion, tel que nous l'avons observé dans les cellules HGT1. L'augmentation de la concentration cytosolique en GSH provoque un import de GSH dans le RE par diffusion facilitée. La réduction de l'état redox du GSH dans ces conditions entraîne la réduction et l'activation d'Ero1 et induit un stress RE. La voie UPR permet une synthèse accrue d'Ero1, PDI et Kar2 dans ces conditions. Cette induction de la synthèse d'Ero1 semble nécessaire pour obtenir une production d' H_2O_2 *in situ* suffisante pour oxyder Kar2. Cette oxydation de Kar2 limite l'import de GSH dans le compartiment.

(iii) Nous pouvons enfin considérer une condition de stress RE, provoqué par exemple par une exposition à la tunicamycine. Dans ces conditions, le stress RE induit la voie UPR, responsable d'une synthèse accrue de la machinerie Ero1-Pdi1. En parallèle le stress RE conduit à une synthèse de GSH dans le cytosol par une voie encore inconnue chez *S. cerevisiae*. La synthèse accrue d'Ero1 et sa réduction par l'entrée de GSH dans le RE conduit à une production d' H_2O_2 suffisante pour oxyder Kar2. Cette oxydation doit conduire à une inhibition du transport de GSH dans le compartiment.

b) La sévérité du stress RE est un paramètre critique permettant l'oxydation de Kar2

Nous suggérons une régulation réciproque entre l'activité d'Ero1 et l'import de GSH dans le RE. Or, nos données expérimentales dans les cellules HGT1 ont montré que l'inhibition de l'import de GSH survient pour des concentrations de $[GSx]_{Cyt}$ et $[GSx]_{RE}$ très importantes. Or, lors des stress observés dans cette étude, l'augmentation de glutathion cytosolique ne permet pas d'atteindre des valeurs si fortes. Ceci remet en cause la pertinence physiologique de nos observations.

Nous avons cependant montré l'importance de l'intensité de la réponse UPR dans la mise en place de la régulation du transport de GSH par Kar2. Ainsi, dans une souche HGT1-*Aire1*, le défaut de l'UPR prévient l'oxydation de Kar2, ce qui augmente le seuil de $[GSx]_{RE}$ pour lequel une inhibition du transport de GSH est observée.

Il semble donc nécessaire de considérer ici l'intensité du stress du RE, dont dépend l'amplitude de la réponse UPR. En effet, la réponse UPR détermine la quantité et la vitesse à laquelle Ero1 et Pdi1 sont néosynthétisés, ce qui impacte la quantité d' H_2O_2 produit et sa vitesse, et donc le niveau d'oxydation de Kar2. Ainsi une oxydation de Kar2 importante est observée lors d'une exposition à 1 μ g/ml de tunicamycine, alors que ces conditions ne provoquent qu'une augmentation mineure de la

concentration cytosolique en glutathion. Dans ces conditions de stress RE intense, la régulation de l'import de GSH peut donc intervenir et jouer un rôle dans la réponse au stress. Des études sont en cours dans le laboratoire pour répondre à cette problématique.

c) Stimulation de la synthèse de GSH lors du stress du RE

Nous avons observé qu'un stress du RE induisait une néosynthèse de GSH systématique.

Des observations similaires ont été faites chez *A. thaliana* (Ozgur et al., 2014). Lors d'un traitement de la plante à la tunicamycine, on observe une activation de la réponse UPR associée à l'induction de gènes antioxydants. Dans ces conditions, une augmentation de la concentration en glutathion cellulaire est également observée. Dans cet article, les auteurs concluent à l'importance de cette induction dans la protection du stress oxydant émanant du RE.

Dans des fibroblastes murins, la voie PERK, qui constitue avec Ire1 et Atf6 l'une des trois voies de réponse au stress RE chez les mammifères, induit par le biais de la phosphorylation de la sous-unité α de facteur d'initiation de la traduction (eIF2 α) une inhibition globale de la synthèse des protéines et une activation de la traduction du facteur de transcription Atf4 (Cullinan et al., 2003; Harding et al., 2003). Atf4 induit les gènes du métabolisme des acides aminés, la synthèse du GSH et des gènes de réponse au stress oxydant. Cette induction est importante face à la production d'H₂O₂ satellite du stress du RE. Chez *C. elegans*, un traitement à la tunicamycine dans des individus inactivés pour la voie PERK induit une diminution de 50% du GSH cellulaire total. Cette déplétion est récupérée par l'inactivation simultanée d'Ero1. Bien que cette étude n'ait pas montré les taux de GSH d'animaux traités par la tunicamycine, elle suggère l'importance de la néosynthèse de GSH au cours du stress RE. Cependant, ces auteurs rapportent cette consommation de GSH, non pas à l'activité d'Ero1, mais à la dégradation de l'H₂O₂ produit au cours du stress RE par l'activité d'Ero1. Le groupe de Kaufman montre chez la souris, que la surexpression du facteur de la coagulation FVIII induit un stress oxydant, et une diminution de 50% du GSH total hépatique. (Malhotra et al., 2008). Ces auteurs concluent également à une déplétion en GSH due à une dégradation des peroxydes produit par le stress RE. Chez les métazoaires, l'importance du GSH dans des conditions de stress est donc claire ; cependant, l'induction de la synthèse du glutathion dans ces conditions semble minime.

Chez *S. cerevisiae*, quel est le signal activant la néosynthèse de GSH observée dans notre étude ? Sachant que Yap1 est responsable de l'augmentation du GSH total au cours du stress thermique (Sugiyama et al., 2000), il pourrait également contrôler la néosynthèse de GSH au cours du stress du RE glutathion. Cependant, le facteur de transcription Gcn4, l'homologue d'Atf1 chez les

mammifères est également un bon candidat chez la levure au vu de son rôle au cours du stress du RE chez les mammifères.

Quelle est l'importance de cette synthèse accrue de GSH pour la survie au stress RE ? C'est en fait la question du rôle du glutathion dans le repliement oxydatif des protéines du RE qui est ici posée. La correction des ponts disulfures non natifs nécessite la réduction des ponts illégitimes pour permettre leur reformation. Le GSH interviendrait à ce niveau en permettant la réduction massive des substrats, tout en activant Ero1 pour catalyser la formation de nouveaux ponts.

Mais, en l'absence de stress RE, l'import de GSH est-il nécessaire ? Une observation tend à suggérer que c'est en effet le cas. Chez un mutant $\Delta ycf1 \Delta glr1 \Delta grx2 \Delta trx2$, pour lequel l'état redox du GSH dans le RE est très oxydé, nous observons une activation constitutive de la réponse UPR, mettant en évidence un défaut constitutif dans le repliement des protéines du RE. Dans des conditions de croissance normale, l'entrée dans le RE d'équivalents réducteurs par une entrée de GSH semble donc également nécessaire pour le repliement des protéines dans le RE.

d) Importance physiologique de la régulation du transport de GSH par Kar2

Notre travail n'a pas abordé la question de l'importance physiologique de la régulation que nous avons décrite. Une inhibition du transport du GSH dans le RE semble importante dans notre modèle pour permettre un maintien de l'homéostasie redox du RE. En effet, nous montrons un transport de GSH selon le gradient de concentration entre cytosol et RE, et la présence dans le RE d'une oxydase consommant le GSH. Une l'absence de régulation conduirait à une perpétuation de l'activation d'Ero1, entraînant un épuisement des réserves en GSH de la cellule par oxydation en GSSG. L'inhibition du transport de GSH pourrait donc limiter l'activation d'Ero1 et la consommation de GSH dans des conditions de stress RE intenses. La grande sensibilité à l'expression d'Ero1 hyperactif du mutant Kar2^{C63A} (mimant une protéine toujours réduite et ne pouvant être oxydée) semble renforcer cette hypothèse. Cependant, l'étude de l'importance de l'oxydation de Kar2 pour la survie à des stress physiologique semble aujourd'hui nécessaire.

B. Interaction entre sécrétion et traduction des protéines : rôle du GSH

Nos résultats ont montré que le GSH est importé dans le RE par le biais du canal de translocation des protéines Sec61. Nous suggérons également que seuls des translocons liés à un ribosome inactif permet le transport de GSH. Cette interaction avec le ribosome permet l'amorçage d'une configuration pré-ouverte probablement nécessaire pour l'import de GSH.

Cette configuration pose la question des liens entre l'import de GSH au RE et la vitesse de traduction cellulaire, ou même l'activité générale du transcriptome. Plusieurs études par les groupes de Nicchitta

ont tenté d'évaluer la part des ribosomes en activité au niveau du RE (Potter and Nicchitta, 2002), allant jusqu'à formuler l'hypothèse qu'après la traduction, une majeure partie des ribosomes reste en place sur le RE. Ces résultats sont cependant sujets à débat. Aucune régulation ou modulation du nombre de ribosomes vides liés au RE n'a été mise en évidence à ce jour.

C. Mécanisme de l'inhibition de l'import de GSH dans le RE par la forme oxydée de Kar2

Nos résultats montrent l'existence d'une régulation de l'import du GSH par l'accumulation de la forme oxydée de Kar2 lors d'un stress RE. Il nous est possible de poser quelques hypothèses concernant ce mécanisme d'inhibition de l'import du GSH dans le RE par la forme oxydée de Kar2. Une interaction directe de Kar2 avec le pore Sec61 est probable. En effet, chez les mammifères, l'homologue de Kar2, BiP, semble capable de moduler les transitions entre les formes ouvertes et fermées du translocon (Schäuble et al., 2012). Cette modulation passe par une interaction directe de BiP avec la boucle luminale L7 du pore. Une interaction directe entre Kar2 et Sec61 influençant l'état d'ouverture du pore est donc envisageable dans notre modèle. L'oxydation de Kar2 transforme son activité chaperon ATP-dépendante en activité holdase (Wang et al., 2014), et ce changement de fonction permettrait d'augmenter l'interaction de Kar2 avec Sec61.

Nos résultats fournissent quelques indices à cette question. En effet nous avons observé une perte de la régulation de l'import de GSH par Kar2 chez un mutant Sec61 Δ plug. Ces observations indiquent que la fermeture du plug est nécessaire pour inhiber l'import de GSH au RE. Par quel mécanisme Kar2 préviendrait-elle l'ouverture du plug ? Lorsqu'il est oxydé, Kar2 vient-il se lier directement au plug, empêchant son ouverture ? Alternativement, l'ouverture du plug est une des caractéristiques de la conformation ouverte de Sec61 ; dans ce cas, la liaison de Kar2 à la boucle 7, en prévenant le changement de conformation, préviendrait-elle l'ouverture du plug ? Malheureusement, nos résultats n'ont pas permis de conclure s'il y a nécessité de la conformation fermée pour inhiber l'import de GSH au RE. En effet si les mutations de Sec61 stabilisant la conformation fermée (N302D, Sec61 Δ I7) préviennent l'import du GSH, cet effet est peut-être secondaire à l'encombrement du pore par des polypeptides en voie de translocation.

X. Conclusion

Au cours de ce projet, nous avons établi un système permettant d'étudier les flux de glutathion entre cytosol et RE. Ce système nous a permis d'identifier un transport de GSH depuis le cytosol dans le RE selon une diffusion facilitée. Ces flux sont également observés lors de stress stimulant la synthèse de GSH chez la levure (stress thermique, arsenite...). Ce transport de GSH dans le lumen est assuré par le translocon Sec61, et une régulation de cet import par l'oxydation de la protéine chaperon luminale Kar2 est observée.

L'étude de la conservation de ces acteurs et de ces caractéristiques chez les organismes mammifères est actuellement en cours au laboratoire. Une meilleure compréhension de ces mécanismes chez les cellules humaines pourrait permettre une nouvelle approche de certaines maladies liées à des dérégulations de la sécrétion.

Cette étude pose la question du rôle du glutathion dans le RE. Si nos résultats ne permettent pas de répondre directement à cette question, ils renforcent cependant l'idée d'un rôle du tripeptide comme réductant dans le RE, participant au contrôle redox de la sécrétion protéique.

Matériel et méthodes

XI. Matériel et méthodes

1. Milieux et souches

Les souches de *S. cerevisiae* sont cultivées à 30°C. Un milieu riche non défini peut être utilisé : YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), ou un milieu défini minimum : SD (yeast nitrogen Basic without amino acids 0.67% and 2% glucose). Ce milieu minimum est supplémenté en acides aminés variés selon la souche considérée (adénine 40 mg / L, uracile 20 mg / L, leucine 60 mg / L tryptophane 40 mg / l, méthionine 20 mg / L, lysine 30 mg / l, histidine 20 mg / L tyrosine 50mg/L) {Sherman and Hicks 1986}. Il est également possible de supplémenter le milieu SD par de l'hydrolysate de caséine (0.1%), permettant d'obtenir un milieu dépourvu de tryptophane, uracile, adénine et tyrosine.

Les souches mutantes obtenues et utilisées lors de cette études ont été conservées à -80°C en présence de 15% de glycérol.

Les souches *E. coli* sont cultivées à 37°C dans un milieu riche non défini : LB (tryptone 1%, yeast extract 0.5%, 1% NaCl), supplémenté en ampicilline (100 µg/mL) si nécessaire.

2. Liste des souches utilisées

Nom	description	source
BY4742	α - his3, leu2, lys2, ura3	Euroscarf
BY4742 Δ ycf1	BY4742 ycf1::KanMX4	Morgan et al., 2012
BY4742 Δ glr1	BY4742 glr1::KanMX4	Morgan et al., 2012
BY4742 Δ ycf1 Δ glr1	BY4742 ycf1::KanMX4 glr1::KanMX4	Morgan et al., 2012
BY4742 Δ ycf1 Δ glr1 Δ grx2 Δ trx2	BY4742 ycf1::KanMX4 ycf1::KanMX4 trx2::hphNT1 grx2::natNT2	Morgan et al., 2012
BY4742 Δ ire1	BY4742 ire1::KanMX4	Euroscarf
BY4742 Δ Hac1	BY4742 hac1::KanMX4	Euroscarf
BY4742 Δ gsh1	BY4742 gsh1::KanMX4	Euroscarf
BY4742 Δ vma2	BY4742 vma2::KanMX4	Euroscarf
BY4742 Δ vma4	BY4742 vma4::KanMX4	Euroscarf
BY4742 Δ slt2	BY4742 slt2::KanMX4	Euroscarf

BY4742 Δ cch1	BY4742 cch1::KanMX4	Euroscarf
BY4742 Δ cna1	BY4742 cna1::KanMX4	Euroscarf
RSY524	alpha sec61-2, pep4-3 ade2-1, ura3-52, leu2-3,-112	Dr. Rosine TSAPIS
RSY151	alpha ura3-52 leu2-3,112 pep4-3 sec63-1	Dr. Dieter Wolf
RSY529	His4 leu2-3,112 ura3-52 sec62-1	Dr. Dieter Wolf
CKY263	a <i>GAL2 ura3-52 leu2-3,112</i>	Frand and Kaiser 1998
CKY598	a <i>GAL2 ero1-1 ura3-52 leu2-3,112</i>	Frand and Kaiser 1998
RSY1293	(<i>mata, ura3-1, leu2-3,-112, his3-11,15, trp1-1, ade2-1, can1-100, sec61::HIS3, [pDQ1]</i>)	Junne T et al., MBC, 2006
EMY101	Mata trp1-1, ade2, leu2-3 ,112, ura3, his3-11, can1 sec61 ::His3 [pEM299]	<u>Trueman et al., 2012 JCB</u>
EMY102	Mata trp1-1, ade2, leu2-3 ,112, ura3, his3-11, ssh1 ::KanMX4 sec61 ::His3 [pEM299]	<u>Trueman et al., 2012 JCB</u>
Souche sensible à la puromycine	<i>Δegr6ΔpdrlΔpd3</i>	<u>Cary et al. 2014 Yeast</u>
CKY263/CSY5	<i>MATa GAL2 ura3-52 leu2-3,112</i>	<u>Wang et al. 2014 E life</u>
CSY275	<i>MATa GAL2 ura3-52 leu2-3,112 kar2-C63A</i>	<u>Wang et al. 2014 E life</u>

Plasmides

Noms	description	source
pRS315 ER rxYFP	CEN LEU2 ERrxYFP	This study
pRS315 cyt rxYFP	CEN LEU2 cytosolic rxYFP	This study
pRS416 pTEF <i>HGT1</i>	<i>CEN URA3 TEF-HGT1</i>	Bourbouloux et al., 2000
pRS304 ERrxYFP-grx1	Integrative LEU2 ERrxYFP-grx1	This study
pTEF415 ER grx1-1cys	CEN LEU2 TEF-ER grx1-1cys	This study
pTEF415 ERroGFP-iL-grx1	CEN LEU2 ERroGFPil-grx1 derived from pTEF415 roGFPil-grx1	This study
paf112	CEN URA3 Pgal1-ERO1-myc	Sevier et al., 1007
pCS452	CEN URA3 Pgal1-ERO1*-myc	Sevier et al., 1007
pSM110	pGal <i>SRP54</i> ^{dn} (TRP1, CEN6/ARSH4)	Ogg et al., MBC 1992
pSM131	pGal- <i>SRP54</i> (TRP1, CEN6/ARSH4)	Ogg et al., MBC 1992
pEM1005	Overexpression Ssh1/Sbh1/Sss1 (2 μ , TRP)	Jiang et al., 2008 JCB
pSec61	(2 μ , LEU2) Sec61	This study
pDQ1	(<i>LEU2 CEN</i>) expression WT Sec61	Junne T et al., MBC, 2006
pYC-plac111	(<i>LEU2 CEN</i>) expression Sec61 delta-plug	Junne T et al., MBC, 2006
pEM299	pRS316 <i>URA3 SEC61-V5 (URA3, CEN)</i>	Trueman et al., 2012 JCB
pEM635	pRS315 Sec61 N302D	Trueman et al., 2012 JCB
pEM634	pRS315 Sec61 N302L	Trueman et al., 2012 JCB
pRS315 Sec61	pRS315 Sec61	Tretter et al., 2013 BMC
pRS315 <i>sec61ΔL7</i>	pRS315 Sec61DL7	Tretter et al., 2013 BMC

pCS681	<i>pRS315 KAR2 CEN LEU2</i>	Wang et al., 2014 Elife
pCS750	<i>pRS315 kar2-C63W CEN LEU2</i>	Wang et al., 2014 Elife

3. Transformation de levure

-Transformation haute efficacité

Après une croissance sur une nuit dans un milieu approprié, les cellules sont diluées à $Do=0,1$. En phase exponentielle, ($Do=0,4-0,8$), 10 unités Do sont centrifugées à 4000 rpm pendant 4 minutes à température ambiante. Le culot est lavé une fois avec 1 ml d'eau stérile puis une fois avec le buffer TEL (0.1M Acetate de lithium dans tampon TE PH 7.5)

Le culot est ensuite resuspendu dans 100 μ l de tampon TEL et incubé 30 minutes à 30°C. En parallèle, 5 μ L d'ADN de sperme de saumon simple brin et 1-2 μ g d'ADN sont mélangés et incubés sur glace pendant 30 minutes. Les cellules et l'ADN est ensuite mélangé et 300 μ L de tampon PLATE ajouté (40% PEG dans le tampon TEL). L'ensemble est mélangé à 30°C pendant une heure. Les cellules sont ensuite placées dans un bain marie pendant 25 minutes à 42°C.

L'ensemble est ensuite centrifugé à 3000rpm pendant 1 minute. Le culot est lavé 2 fois avec 1 ml d'eau stérile puis resuspendu avec 200 μ L d'eau stérile. Lors d'une transformation par un plasmide, 100 μ L de cellules sont étalés sur les milieux appropriés.

-Transformation rapide

À partir d'une culture sur une nuit, 1,5 ml de culture sont centrifugées par transformation. Le culot est repris dans 100 μ g d'ADN de sperme de saumon. 1 μ g de plasmide/insert, puis 500 μ L de tampon PLATE sont successivement ajoutés. Du DMSO est ensuite ajouté afin d'obtenir une concentration finale de 10%, et les cellules sont incubées 15 minutes à température ambiante, puis 15 minutes à 42°C. Les cellules sont centrifugées 30 secondes à 3000 rpm et lavé dans 1ml de TE. Après une centrifugation de 15 secondes à 3000 rpm, les cellules sont resuspendues dans 200 μ L de TE, avant d'être étalées sur boîtes.

4. transformation *E. coli*

Les souches Top10 ou DH5 α d'*E. coli* (compétentes chimique) utilisées pour les amplification de plasmides. Ces cellules sont transformées par ajout de 1 à 5 μ L de plasmide, incubation sur glace pendant 30 minutes et choc thermique à 42°C pendant 30 secondes. 25

ml de LB préchauffé à 37°C sont ensuite ajoutés sur les cellules, et 20 à 200 µL de cette suspension sont étalées sur LB Ampicilline.

5. Séquençage

Les réactions de séquençage ont été réalisées en utilisant le kit BigDye terminator 3.1. La réaction est ensuite mélangée à 50 µl d'éthanol absolu et 6 µl d'acétate d'ammonium 10M, vortexée et refroidie 10 minutes sur glace. L'ensemble est centrifugé à 15000 g pendant 20 minutes à 4°C et le culot est lavé à l'éthanol froid 70%, puis séché. Le culot sec est resuspendu dans du formamide déionisé. La réaction est ensuite séquencée.

Le kit BigDye® Terminator (Applied Biosystems) utilise 4 ddNTPs fluorescents qui sont incorporés séquentiellement lors des cycles PCR. Le ratio dNTPs/ddNTPs est calculé pour obtenir au moins une termination à chaque position de la séquence. Les produits de réaction sont ensuite analysés par un séquenceur automatique pour obtenir la séquence d'intérêt.

6. Dosage du glutathion intracellulaire

Le glutathion intracellulaire total et oxydé est mesuré grâce à la méthode GSSG réductase - DNTB (5,5' - dithiobis (2-nitrobenzoic acid)).

-Prélèvement des échantillons

Un compte au coulter du nombre exact de cellules ou un calcul de la survie cellulaire est réalisé afin d'effectuer une correction de la valeur obtenue lors du dosage. Environ 10 unités Do sont prélevées par centrifugation à 4000 rpm, 3 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans 10 ml d'eau stérile refroidie à 4°C, puis centrifugée à nouveau dans les mêmes conditions, avant d'être resuspendu dans 200 µL d'acide sulfosalicylique (SSA) à 1% préalablement refroidi à 4°C. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à leur analyse.

-Lyse cellulaire et mesure du taux de glutathion intracellulaire

Les cellules sont lysées de façon mécanique, par utilisation de billes de verre (0,2-0,6 µM de diamètre). Les billes sont ajoutées jusqu'à remplir le volume de suspension cellulaire, puis l'ensemble est mis à agiter sur vortex pendant une minute avant d'être refroidi sur glace pendant 1 minute. 10 cycles sont ainsi répétés, et l'efficacité de la lyse cellulaire est vérifiée par microscopie. Les billes et débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 15000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. La fraction métabolique (surnageant) est récupérée pour permettre la mesure du glutathion.

Le glutathion intracellulaire total est évalué en ajoutant 20 μL du lysat à 1 ml de la solution réactionnelle (0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2 mM NADPH, et 0.2 mM DTNB préchauffée à 30°C). L'ensemble est transféré dans une cuvette et 1 unité de GSSG réductase est ajoutée. L'évolution de l'absorbance à 405 nm est suivie sur 10 minutes.

Le glutathion oxydé est mesuré en ajoutant 2 μL de 2-vinylpyridine à 100 μL de lysat cellulaire. Ce réactif réagit avec le GSH et l'empêche de devenir le substrat de la GSSG réductase. Le pH de la solution est ajusté à 6.5 par ajout de 2 μL d'une solution de 25% triethanolamine. L'ensemble est incubé à RT pendant 1 heure. La mesure du GSSG intracellulaire est ensuite mesurée de la même façon que le glutathion total.

Les courbes étalons sont réalisées avec des concentrations connues de glutathion (entre 0 et 200 pmol) solubilisé dans une solution de 1% SSA avec ou sans 2 μL de 2-vinylpyridine.

7- Redox western-blot

-Préparation des échantillons:

À chaque temps de prélèvement, la croissance a été arrêtée par ajout d'acide trichloroacétique à une concentration finale de 20%. Puis un volume correspondant à 5 unités de DO 600 nm est prélevé et centrifugé à 4000 rpm, pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est ensuite lavé dans 1 ml de TCA 20% et transféré dans un tube de 1,5 ml puis centrifugé à 15000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite éliminé soigneusement et le culot congelé pendant 5 minutes sur de la glace sèche avant d'être conservé à -80°C jusqu'au traitement des échantillons.

-Lyse cellulaire et alkylation des protéines

Les culots sont décongelés sur glace et resuspendus dans 200 μL de TCA 20%. 100 μL de billes de verres propres sont ajoutées et les échantillons sont successivement vortexés pendant 1 minute et refroidis sur glace pendant 1 minute. 5 cycles de vortex-refroidissement sont ainsi réalisés. Le lysat est ensuite récupéré et placé dans un nouveau tube. 100 μL de TCA 5% sont ajoutés sur les billes et 5 nouveaux cycles de vortex-refroidissement sont réalisés. Le deuxième surnageant est récupéré et ajouté au premier. Les extraits sont centrifugés 10 minutes à 20 000 g et le surnageant soigneusement retiré. Le culot est lavé trois fois avec 200 μL d'acétone à 4°C puis séché au speed vac. Les culots sont alors resuspendus dans un tampon de solubilisation (SDS 1,5%, Tris-HCL pH8 100mM, un cocktail d'antiprotéase est ajouté) contenant du N-Ethylmaleimide (NEM) à 50 mM pour les sondes rxYFP, rxYFP-grx1 et roGFP, les échantillons ero1-myc sont alkylés avec du 4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-Disulfonic Acid (AMS) à 7mM.

Les échantillons alkylés au NEM sont incubés à température ambiante pendant 30 minutes sous agitation (1000 rpm) à l'obscurité, ceux alkylés à l'AMS sont incubés à 37°C pendant 2 heures à l'obscurité. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 20 000 g et le surnageant est récupéré.

Les échantillons ERgrx1-1cys et Kar2-SOH sont alkylés en NEM, puis les protéines sont précipitées par ajout de TCA 100% pour une concentration finale de 20%. Après 3 lavages à l'acétone les culots sont séchés et incubés 20 minutes à RT dans du tampon de solubilisation contenant 0,2M de DTT. Les protéines sont de nouveau précipitées par ajout de TCA (20% final), et les culots lavés 3 fois à l'acétone. Après séchage, les échantillons sont resuspendus dans du tampon de solubilisation contenant 7 mM final d'AMS (incubation 37°C pendant 1 heure) ou 10 mM de Malpeg 2kDa (incubation 23°C pendant 20 minutes).

-Redox western-blot

Les extraits sont ensuite préparés à être déposés sur un gel de polyacrylamide : les extraits mélangés à une solution de tampon de Laemmli (SDS 2%, glycerol 0,01% Bleu de bromophenol 0,01%, Tris-Cl pH8,7 62,5 mM). Du beta-mercaptoethanol 5% est ajouté ou non selon les conditions requises. Pour les échantillons nécessitant une déglycosylation (Ero1-myc), du citrate de sodium à une concentration finale de 50 mM et 250 U d'EndoH (NEB) sont ajoutés et les échantillons sont incubés 1 heure à 37°C.

Les échantillons sont enfin incubés pendant 5 minutes à 95°C puis déposés sur gel, à l'exception des échantillons alkylés au Malpeg.

Pour les ER rxYFP et ER rxYFP-grx1, les échantillons sont déposés sur un gel d'acrylamide-bis acrylamide 30;0,4 à 17,5% et migrent pendant 3 heures à 130 mV constant. Les échantillons ER roGFP et cytosolic rxYFP sont déposés sur gel gradient 4-12% (NuPAGE precasted gels, Life technologies, USA). Les échantillons Ero1-myc sont déposés sur un gel d'acrylamide-bis acrylamide 30;0,4 à 12% et migrent pendant 1h30 à 125 mV. Les échantillons ERgrx1-1cys migrent sur un gel 30;0,4 à 19% pendant 5 heures à 100 V (alkylation AMS) ou sur un gel 30;0,4 à 15% pendant 2 heures à 125 mV. Les échantillons Kar2SOH migrent sur un gel 30;0,4 10% pendant 2 heures à 125 mV. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, le blocage est réalisé dans une solution de PBS tween 0,1% , 5% lait écrémé. Puis la membrane est incubée dans une solution de PBS 0,1% tween en présence d'anticorps reconnaissant spécifiquement le tag myc (anticorps monoclonal de souris, gracieusement fourni par Christophe Créminon, Saclay, France), ou un anti-GFP (anticorps polyclonal lapin, invitrogen, France), Kar2 (Santa Cruz). Les anticorps secondaires anti-lapin

et anti-souris portant des fluorophores à 680 nm ou 800 nm sont ensuite mis en présence de la membrane puis scannée sur Li-COR, Odyssey.

Calculs des potentiels redox

Le ratio rxYFP réduite/oxydée permet de calculer E_{GSH} suivant l'équation de Nernst:

$$E_{GSH} = E^{\circ}_{GSH} - (60.1 \text{ mV}/2) \log\left[\frac{[GSH]^2}{[GSSG]}\right] = E^{\circ}_{rxYFP} - (60.1 \text{ mV}/2) \log\left(\frac{rxYFP_{red}}{rxYFP_{ox}}\right) = E_{rxYFP} \text{ (Equation 1)}$$

Avec $E^{\circ}_{GSH} = -240 \text{ mV}$ et $E^{\circ}_{rxYFP} = -265 \text{ mV}$ à pH7.

La concentration de GSSG en fonction de [GSX] ($GSX = 2GSSG + GSH$) est calculé par l'équation suivante :

$$[GSSG] = -\frac{1}{2}(e^a + 4[GSX]) - \sqrt{\left(\frac{1}{2}(e^a + 4[GSX])^2 - 2[GSX]^2\right)}$$

avec $a = \frac{(E^{\circ}_{GSH} - E_{GSH})2F}{RT}$ (équation 2)

Le ratio réduit/oxydé de la sonde ERgrx1-1cys permet de calculer le ratio $[GSH]/[GSSG]$:

$$R_{gsx} = \frac{[GSH]}{[GSSG]} = K_{ox} \frac{[grx1-1cysSH]}{[grx1-1cysSSG]}$$

avec $K_{ox} = 74 \pm 6$

La mesure d' E_{gsh} permet de calculer le $[GSH]^2/[GSSG]$, et cette valeur combinée au ratio $[GSH]/[GSSG]$ permet d'inférer la valeur de [GSX] dans un compartiment.

$$[GSX] = \left(\frac{[GSH]^2/[GSSG]}{R_{gsx}}\right) + 2 \times \left(\frac{[GSH]^2/[GSSG]}{R_{gsx}^2}\right)$$

8. Western blots

-Préparation des échantillons

À chaque temps de prélèvement, la croissance a été arrêtée par centrifugation rapide à 4°C et incubation sur glace. Un volume correspondant à 5 unités de DO 600 nm est prélevé et centrifugé à 4000 rpm, pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est ensuite lavé dans 2 ml de d'eau à 4°C et transféré dans un tube de 2 ml puis centrifugé à 4000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite éliminé soigneusement et le culot congelé pendant 5 minutes sur de la glace sèche avant d'être conservé à -80°C jusqu'au traitement des échantillons.

-Lyse cellulaire et western blot

Le culot est resuspendu dans 100 µl de NaOH 0,1M, et incubé 5 minutes à température ambiante. Après centrifugation 2 minutes à 14000 rpm, le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 100 µL de sample buffer (0,06M de tris pH6,8 ; 5% glycerol, 2% SDS, 4% de beta-mercaptoethanol et 0,0025% de bleu de bromophenol). Les échantillons sont bouillis

5 minutes à 95°C et centrifugés 30 secondes à 14000 rpm. 20 µL de ces échantillons sont déposés sur gel d'acrylamide.

9. compte cellulaire

Lorsqu'une détermination du nombre de cellule présente dans un échantillon est nécessaire, un compte au coulter est réalisé. 100 µL à 10 µL de cultures sont ajouté à 10 ml d'isoton et passés 20 secondes au sonicateur. Le compte est ensuite réalisé sur 500 µl.

10. Mutagenèse aléatoire pour l'identification de mutations affectant le transport du GSH dans le RE

-Résumé du crible

Le crible s'appuie sur deux hypothèses principales :

- Dans une souche HGT1, l'accumulation de GSH dans le cytosol provoque une entrée de GSH dans le RE.
- Cette entrée de GSH dans le RE et la réduction subséquente du compartiment est responsable de la toxicité observé chez une souche HGT1.

En s'appuyant sur ces hypothèses il est possible de concevoir, qu'une mutation dans le transporteur de GSH dans le RE permettrait au mutant une meilleure survie à une exposition au GSH. Une approche de mutagenèse aléatoire peut donc être envisagée. Le phénotype criblé est donc une survie à une exposition à de fortes concentrations de GSH lors d'une surexpression d'HGT1. Les mutants sont donc criblés pour ce phénotype, mais afin d'écarter toutes mutations dans le transporteur HGT1 ou dans la voie de sécrétion d'HGT1, un crible secondaire est effectué.

-Crible primaire

Les souches BY4742 *hgt1::KanMX met15::kanMX* et BY4741 *hgt1::KanMX* préalablement transformées par le plasmide HGT1 ont été utilisées pour ce crible. La souche est cultivée en milieu liquide Casa contenant adénine, tryptophane et tyrosine (CAWT) jusqu'en phase exponentielle (DO 60nm comprise proche de 1). 10⁵ cellules sont ensuite étalées sur des boites fraiches de CAWT + 20 µM GSH, laissées à sécher pendant 30 minutes à 1 heure. Les boites sont ensuite irradiées 4 à 4, à une dose de 2,5 J, sur un stratalinker 2400UV. Les boites sont immédiatement placées à l'obscurité et incubées pendant 48 heures à 30°C. Les clones sont repiqués sur un milieu solide CAWT pour conservation.

-Crible secondaire

Les clones sélectionnés sont repiqués en plaques 96 puits dans 200 μ l de SD his lys leu contenant 5 μ M GSH. Les plaques sont ensuite incubées à 30°C sous agitation (180 rpm) et la croissance est observée au bout de 48 heures.

-Vérification de l'expression d'HGT1

L'expression correcte d'HGT1 est enfin vérifiée pour les clones positifs pour le crible secondaire par dosage du glutathion intracellulaire total avant et après exposition pendant 1 heure à 100 μ M GSH en milieu CAWT.

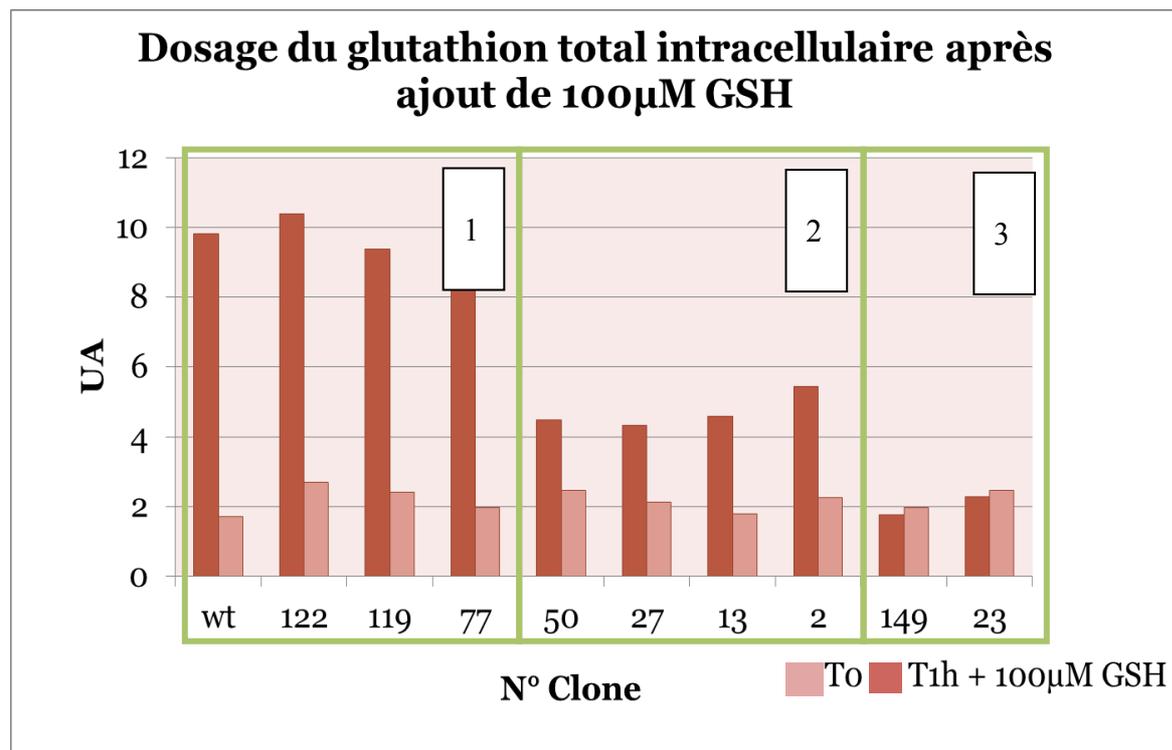


Figure 1 : Dosage du glutathion intracellulaire avant et après 1 heure d'exposition à 100 μ M de GSH de clones obtenus par le crible de mutagenèse aléatoire.

Les clones ont été obtenus par le crible de mutagenèse aléatoire. Le dosage de glutathion total a été effectué comme décrit précédemment, sur des cellules en phase exponentielle de croissance, avant et après un traitement d'une heure à 100 μ M de GSH.

Les clones du groupe 3 sont des clones éliminés par le crible secondaire utilisé. Ces clones ne montrent aucune accumulation du GSH en présence de 100 μ M pendant 1 heure. Ces clones n'expriment probablement pas un transporteur HGT1 fonctionnel.

Les clones du groupe 2 ont été sélectionnés par le crible secondaire, mais montrent une accumulation de GSH intracellulaire inférieur à celui observé pour une souche sauvage. Ces

clones possèdent probablement un transporteur HGT1 partiellement fonctionnels, et sont éliminé pour la suite de l'étude.

Les clones du groupe 1 ont été également sélectionnés par le crible secondaire, et montrent une accumulation de glutathion aussi importante que pour une souche sauvage après exposition à 100 μM de GSH. Ces clones sont conservés pour la suite de l'analyse.

11- ARNm

a. Clivage de Hac1

- Échantillonnage et extraction des ARNm

Environ 10-20u DO sont prélevées, et les cellules sont lavées à l'eau froide une fois. Les culots sont ensuite plongés dans un bain d'azote liquide et immédiatement placés à -80°C .

L'extraction des ARNm se réalise grâce au kit ARN (Macherey Nagel) et sont élués dans 30 μL d'eau. La quantification des ARNm obtenus est effectuée par nanodrop.

- RT-Mix utilisé pour un échantillon :

2 μL dNTP 10 mM

6 μg ARN

0,25 μL primer AP99 (100 μM)

4 μL buffer 5x

qsp 20 μL H₂O

Programme utilisé

70°C pendant 10 minutes

62°C pendant 2,5 minutes

après cette étape, ajouter 2 μL de DTT (0,1M) et 0,5 μL de MLVRT

42°C pendant 2 heures

à la fin de cette étape, ajouter 30 μL d'H₂O

95°C pendant 10 minutes

4°C pendant 5 minutes

Conserver les échantillons à -80°C

-PCR

Une PCR classique est ensuite effectuée sur les ADNc. Mix par échantillon :

Buffer 5x	5 μ L
dNTP 10mM	1 μ L
MgCl ₂	1,5 μ L
Primer Forward 100 μ M	0,25 μ L
Primer reverse 100 μ M	0,25 μ L
DNA	1-2 μ L
Taq	0,5 μ L
H ₂ O	38 μ L

Programme PCR :

94°C pdt 10 min

94°C pdt 30 sec

50°C pdt 30 sec

72°C pdt 1 min

72°C pdt 10 min

4°C



b. RT-qPCR classique

Préparer une série de tube PCR « RT+ » contenant 1 μ g d'ARN dans 16 μ l d'H₂O.

Préparer une série de tube PCR « RT-« contenant 250 ng d'ARN dans 4 μ L d'H₂O.

Préparer pour un échantillon:

Mix oligo

H ₂ O	21,2 μ L
Tampon RT 5x	10 μ L
Random primer dN6 1M	2 μ L
RNAsin 40u/ μ L	0,8 μ L
Vol final	34 μ L

Mix RT+ :

H2O	28 μ L
Tampon RT 5X	10 μ L
DTT 0,1M	8 μ L
dNTP 10mM	2 μ L
MMLV	2 μ L

Mix RT- :

H2O	7,5 μ L
Tampon RT 5x	2,5 μ L
DTT 0,1M	2 μ L
dNTP 10mM	0,5 μ L

-qPCR

Les ADNc obtenus par RT sont dilués au 1/10 pour les échantillons RT+ et 1/16 pour les RT-. Déposer sur la plaque dans chaque puits 17 μ L de Mix PCR oligo et 8 μ L d'ADNc dilué en triplicat pour les échantillons RT+, un seul réplicat est effectué pour les RT-.

Mix PCR oligo :

2x SYBR Green PCR mix	12,5 μ L
Fluorescéine 1/1000	0,5 μ L
H2O	2,5 μ L
Oligo up 10 μ M	0,75 μ L
Oligo down 10 μ M	0,75 μ L

Sceller la plaquer et centrifuger 1 à 2 minute à 3000 rpm. Les plaques sont ensuite lues avec un IQ5.

12. test de viabilité et de survie en condition de stress

- Viabilité

Les cultures à étudier sont amenées en phase exponentielle de croissance (Do 600 nm d'environ 0,5-0,8). Les cellules sont alors diluées à Do 0,1 et divisées en deux. Le stress est appliqué sur la moitié des cultures, les cultures non exposées au stress servant de référence dans l'expérience (placée à 100% de survie).

À chaque temps de mesure, la Do est mesurée, les cellules diluées à Do 0,1 puis au 1/1000^e. La variation de taille de cellule est prise en compte par un compte au coulter du nombre de cellule. 200 µl de cette dernière dilution est alors étalée sur une boîte. Au minimum 5 réplicats techniques et 3 biologiques sont réalisés pour chaque souche.

- Survie

Le taux de survie est mesuré par compte cellulaire au microscope (10 champs/réplicats, minimum de 20 cellules par champs) immédiatement après coloration au bleu trypan (solution à 0,1% final dans du PBS).

13. Purification de microsomes

- Sphéroplastes

Environ 100 unités de Do en phase exponentielle ont été récoltés par centrifugation. Après un lavage à l'eau stérile, les cellules sont pesées puis resuspendues dans le buffer pour sphéroplastes [Tris-HCL pH7,5 (10 mM), sorbitol (1,2 M), DTT(10 mM)] à 4ml/g de cellules. La zymolyase 50X est ensuite ajoutée [11 mg de zymolyase, 1,380 ml glycerol 50%, 10 µL NaP 1M pH7,5].

La digestion est ensuite réalisée à 30°C pendant 1 heure. La digestion est vérifiée par mesure de la Do600nm de la suspension cellulaire diluée dans de l'eau (10 µL de suspension cellulaire dans 990 µL d'eau).

10 ml de buffer 1 [Hepes pH7,4 (20 mM), sucrose (0,8M), ficoll 400 (1,5% v/v)] sont injecté sous les sphéroplastes, puis ceux-ci sont centrifugés à 1500 g à 4°C pendant 15 minutes.

Les sphéroplastes peuvent alors être congelés à -80°C dans 1ml de sorbitol 0,7M Hepes 20mM.

- lyse osmotique

Les sphéroplastes sont centrifugés à 1500 g à 4°C pendant 15 minutes, et le culot est resuspendu dans 2ml de buffer de lyse [Hepes 7,4 (20mM), sorbitol (0,2 M), KAc (50 mM), EDTA (2 mM), PMSF (1 mM), protease inhibitors]. La lyse est ensuite effectuée par 12 coups de douce homogenizer. La lyse peut ensuite être vérifiée par microscopie.

- centrifugations différentielles

- Dans des tubes Beckman centrifuge tube (ref 344059), superposer délicatement 2ml de membrane buffer 1.0 [Hepes pH7,4 (20 mM), sucrose (1 M), KAc (50 mM), EDTA (2 mM)], puis 2 ml de membrane buffer 0,5 [Hepes pH7,4 (20 mM), sucrose (0,5 M), KAc (50 mM), EDTA (2 mM)] et enfin 2 ml de sphéroplastés dans le tampon de lyse. Centrifuger 15 minutes à 4°C à 8000 rpm dans le rotor SW42-1.
- Le supernageant (80% du volume total), est prélevé et centrifugé dans le rotor Beckman Ti50 à 15000 rpm pendant 15 minutes à 4°C dans les tubes Beckman centrifuge tube (ref355630).
- Le culot est resuspendu délicatement dans le membrane buffer 0,25 [Hepes pH7,4 (20 mM), sucrose (0,25 M), KAc (50 mM)].
- Dans les Beckman centrifuge tube (ref 344059), déposer délicatement 3 ml de sucrose 1,5 M puis 3 ml de sucrose 1,2 M et enfin 3 ml de microsomes dans le tampon membrane buffer 0,25. Centrifuger 1h30 à 4°C à 40000 rpm dans le rotor SW42-1.
- Prélever les microsomes purifiés à l'interface visible entre 1,5 et 1,2M de sucrose. Centrifuger dans un eppendorf de 2 ml pendant 15 minutes à 18320 g. Les culots sont ensuite repris dans 50 µL de membrane buffer 0,25 et conservés à -80°C.

14. Test de sécrétion de la CPY

Les cellules sont mises en culture jusqu'à la phase exponentielle. 25U Do sont échantillonnées par culture. Après centrifugation 3 minutes à 4000 rpm, le culot est lavé à l'eau stérile, puis les cellules sont de nouveau centrifugées 3 minutes à 4000 rpm. Le culot est resuspendu dans 100 µL de Tris HCL 100 mM pH7,4. 100 µl de billes de verres propres sont ajoutés et les échantillons sont vortexés pendant 10 minutes en continu.

1ml de TrisHCL 100 mM pH7,4, 0,2% triton X100, 15mM BTPNA sont ajoutés et les échantillons sont incubés à 37°C pendant 30 minutes. Puis une centrifugation de 10 minutes à 14000 rpm est effectuée et la Do du supernageant est mesurée à 410 nm.

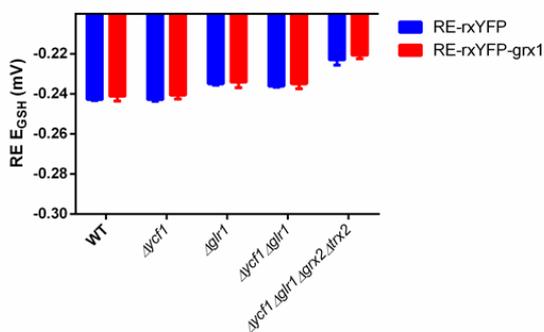
La valeur 100% est placée pour la souche WT sans traitement.

Annexes

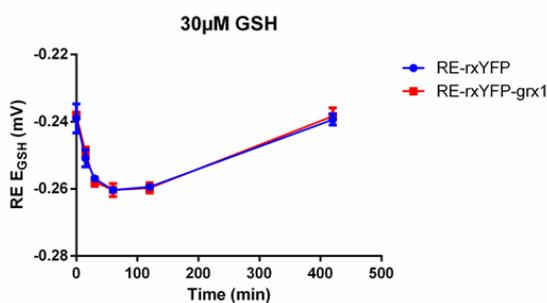
Annexe 1 : RE-rxYFP et RE-RXYFP-grx1

Afin de vérifier l'équilibration correcte de la sonde RE-rxYFP dans nos conditions, nous avons comparé les mesures de RE EGSH pour une sonde RE-rxYFP et RE-grx1-rxYFP en conditions basales dans différentes souches présentant un état redox distinct et lors de cinétiques dans des souches HGT1 en présence de GSH ou de GSSG exogène. Nous observons une parfaite identité des mesures effectuées par les deux sondes. L'expression d'un domaine Grx1 dans un domaine qui n'en comporte pas dans des conditions normale étant un biais possible, nous choisissons de poursuivre notre étude avec la sonde RE-rxYFP

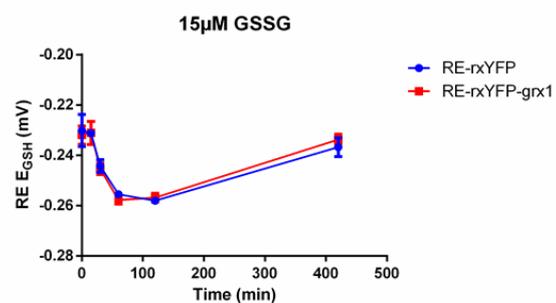
A



B



C



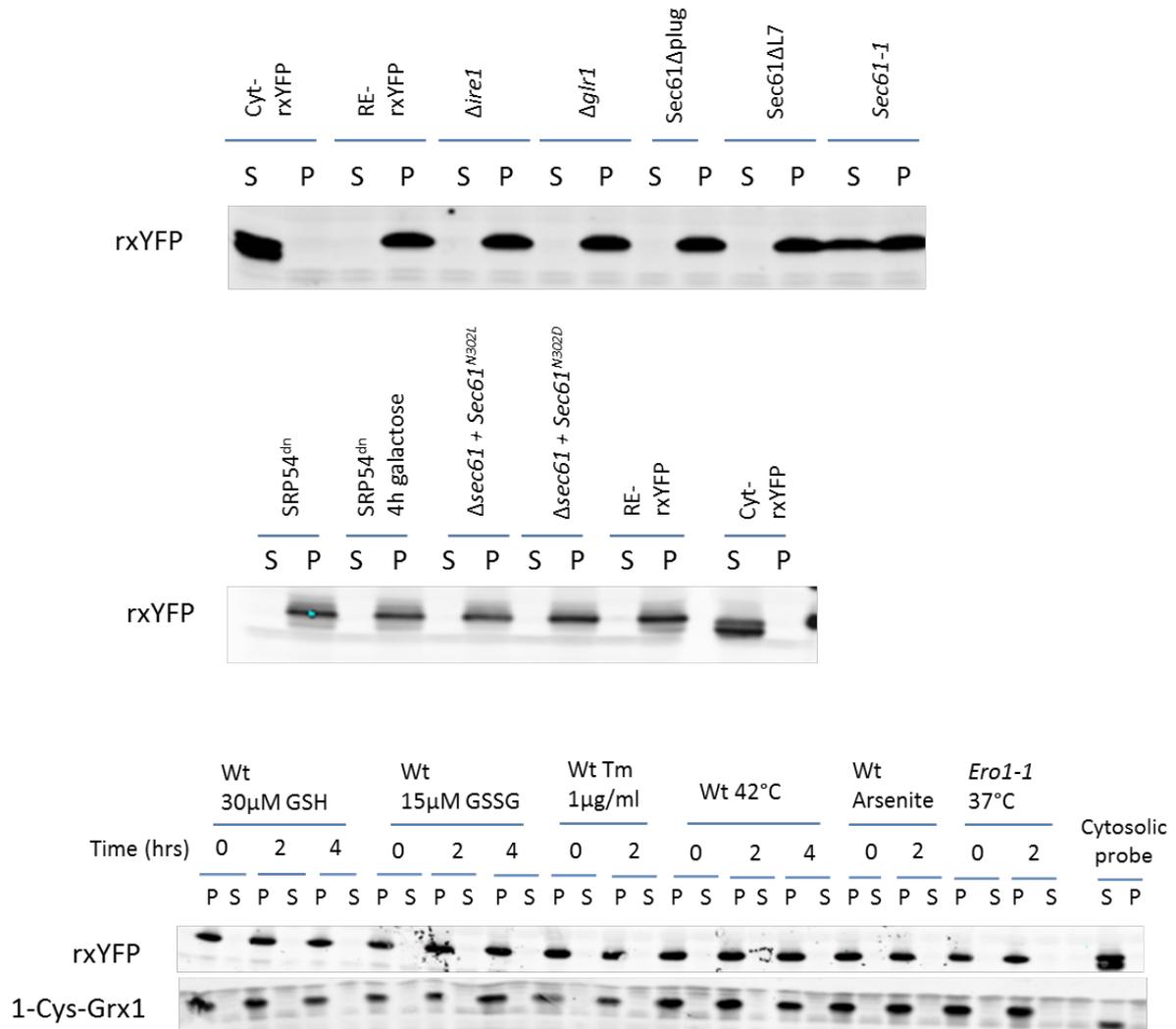
(A) État redox du glutathion dans le RE ($RE E_{GSH}$), calculé à partir de l'état d'oxydation de la sonde RE-rxYFP ou RE-rxYFP-grx1 pour des souches sauvage (Wt), $\Delta glr1$, $\Delta ycf1$, $\Delta ycf1 \Delta glr1$ et $\Delta ycf1 \Delta glr1 \Delta grx2 \Delta trx2$.

(B, C) État redox du glutathion dans le RE ($RE E_{GSH}$), calculé à partir de l'état d'oxydation de la sonde RE-rxYFP ou RE-rxYFP-grx1 pour des souches sauvage HGT1 exposées à (B) 30 μ M de GSH ou (C) 15 μ M de GSSG

Annexe 2 : Localisation subcellulaire des sondes

Nous avons réalisé des fractionnement subcellulaires afin de vérifier l'expression et la localisation correcte des sondes RE-rxYFP et RE-1-Cys-Grx1. Ces deux paramètres ont également été vérifiés par microscopie en fluorescence pour les sondes rxYFP.

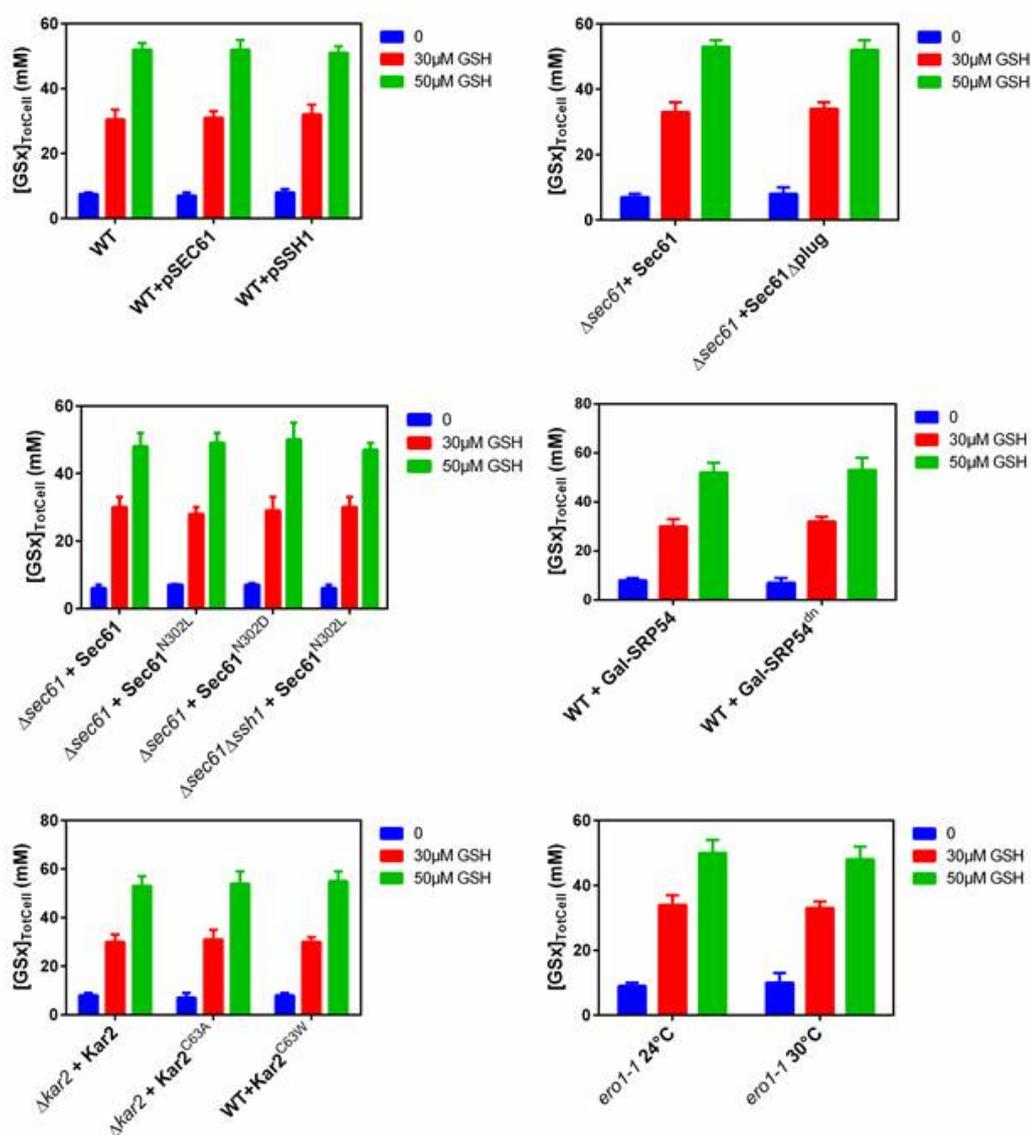
Les cellules exprimant les sondes ont été récoltées en phase exponentielle ou durant un traitement, et immédiatement traitées à la zymolyases afin de former des sphéroplastes. Les sphéroplastes ont ensuite été lysés par choc osmotique. Après une première centrifugation permettant d'éliminer les cellules non lysées, une centrifugation à 13000 rpm a permis de séparer les fractions membranaires (P) contenant les vésicules du RE et la fraction cytosolique (S). Ces deux fractions ont ensuite été déposées sur western blot et la localisation des sondes a été révélée avec un anticorps anti-GFP pour les sondes rxYFP et anti-myc pour les sondes 1-Cys-Grx1

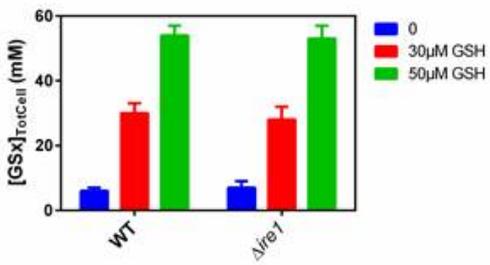
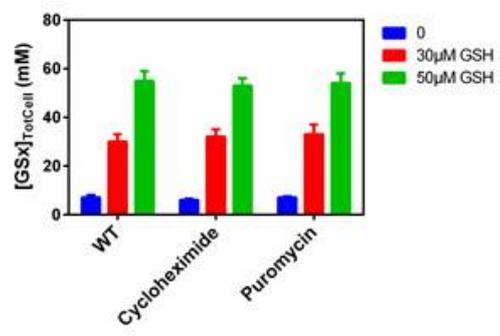
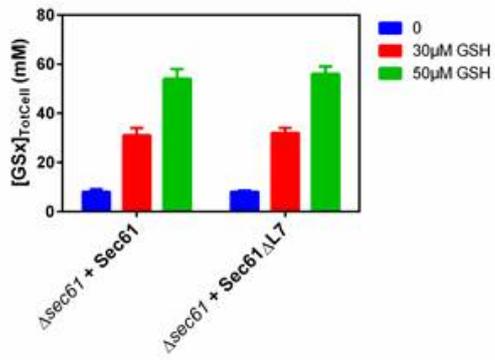


Annexe 3 : Expression du transporteur HGT1

L'expression correcte du transporteur HGT1 a été vérifiée dans les différentes souches et conditions utilisées.

Dans ce but, nous avons vérifié l'accumulation de glutathion dans les cellules lors d'un ajout de 30 ou 50 μM de GSH, après une heure d'exposition.





Bibliographie

bibliographie

- \AAslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., and Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol—disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 6161–6165.
- Adelman, M.R., Sabatini, D.D., and Blobel, G. (1973). RIBOSOME-MEMBRANE INTERACTION Nondestructive Disassembly of Rat Liver Rough Microsomes into Ribosomal and Membranous Components. *J. Cell Biol.* *56*, 206–229.
- Alanen, H.I., Salo, K.E.H., Pekkala, M., Siekkinen, H.M., Pirneskoski, A., and Ruddock, L.W. (2003). Defining the domain boundaries of the human protein disulfide isomerases. *Antioxid. Redox Signal.* *5*, 367–374.
- Alanen, H.I., Salo, K.E.H., Pirneskoski, A., and Ruddock, L.W. (2006). pH dependence of the peptide thiol-disulfide oxidase activity of six members of the human protein disulfide isomerase family. *Antioxid. Redox Signal.* *8*, 283–291.
- Albrecht, S.C., Barata, A.G., Gro's shans, J., Teleman, A.A., and Dick, T.P. (2011). In vivo mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis. *Cell Metab.* *14*, 819–829.
- Aller, I., Rouhier, N., and Meyer, A.J. (2015). Development of roGFP2-derived redox probes for measurement of the glutathione redox potential in the cytosol of severely glutathione-deficient *rml1* seedlings. *Funct. Imaging Living Plants-Cell Biol. Meets Physiol.* *43*.
- Anfinsen, C.B., and Haber, E. (1961). Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* *236*, 1361–1363.
- Ayer, A., Fellermeier, S., Fife, C., Li, S.S., Smits, G., Meyer, A.J., Dawes, I.W., and Perrone, G.G. (2012). A genome-wide screen in yeast identifies specific oxidative stress genes required for the maintenance of sub-cellular redox homeostasis. *PLoS One* *7*, e44278.
- Ayer, A., Sanwald, J., Pillay, B.A., Meyer, A.J., Perrone, G.G., and Dawes, I.W. (2013). Distinct redox regulation in sub-cellular compartments in response to various stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* *8*, e65240.
- Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C., and Toledano, M.B. (2003). Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic. Biol. Med.* *35*, 889–900.
- Babour, A., Bicknell, A.A., Tourtellotte, J., and Niwa, M. (2010). A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell* *142*, 256–269.
- Bader, M., Muse, W., Ballou, D.P., Gassner, C., and Bardwell, J.C. (1999). Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* *98*, 217–227.
- Bánhegyi, G., Lusini, L., Puskás, F., Rossi, R., Fulceri, R., Braun, L., Mile, V., di Simplicio, P., Mandl, J., and Benedetti, A. (1999). Preferential Transport of Glutathione versus Glutathione Disulfide in Rat Liver Microsomal Vesicles. *J. Biol. Chem.* *274*, 12213–12216.

- Bardwell, J., Lee, J.-O., Jander, G., Martin, N., Belin, D., and Beckwith, J. (1993). A pathway for disulfide bond formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 1038–1042.
- Bardwell, J.C., McGovern, K., and Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* *67*, 581–589.
- Bass, R., Ruddock, L.W., Klappa, P., and Freedman, R.B. (2004). A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 5257–5262.
- Baudouin-Cornu, P., Lagniel, G., Kumar, C., Huang, M.-E., and Labarre, J. (2012). Glutathione degradation is a key determinant of glutathione homeostasis. *J. Biol. Chem.* *287*, 4552–4561.
- Beckmann, R., Spahn, C.M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P.A., Sali, A., Frank, J., and Blobel, G. (2001). Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* *107*, 361–372.
- Berkmen, M., Boyd, D., and Beckwith, J. (2005). The nonconsecutive disulfide bond of *Escherichia coli* phytase (AppA) renders it dependent on the protein-disulfide isomerase, DsbC. *J. Biol. Chem.* *280*, 11387–11394.
- Berninsone, P., and Hirschberg, C.B. (1998). Nucleotide Sugars, Nucleotide Sulfate, and ATP Transporters of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *842*, 91–99.
- Bertoli, G., Simmen, T., Anelli, T., Molteni, S.N., Fesce, R., and Sitia, R. (2004). Two conserved cysteine triads in human Ero1 α cooperate for efficient disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *279*, 30047–30052.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* *2*, 326–332.
- Bessette, P.H., Cotto, J.J., Gilbert, H.F., and Georgiou, G. (1999). In Vivo and in Vitro Function of the *Escherichia coli* Periplasmic Cysteine Oxidoreductase DsbG. *J. Biol. Chem.* *274*, 7784–7792.
- Bien, M., Longen, S., Wagener, N., Chwalla, I., Herrmann, J.M., and Riemer, J. (2010). Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Mol. Cell* *37*, 516–528.
- Bihlmaier, K., Mesecke, N., Terziyska, N., Bien, M., Hell, K., and Herrmann, J.M. (2007). The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J. Cell Biol.* *179*, 389–395.
- Blobel, G., and Sabatini, D. (1971). Dissociation of mammalian polyribosomes into subunits by puromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *68*, 390–394.
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S.E., Dower, W.J., Lipshutz, R.J., Sprang, S.R., Sambrook, J.F., and Gething, M.-J.H. (1993). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* *75*, 717–728.

- Bonilla, M., and Cunningham, K.W. (2003). Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4296–4305.
- Bourbouloux, A., Shahi, P., Chakladar, A., Delrot, S., and Bachhawat, A.K. (2000). Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 13259–13265.
- Brodsky, J.L., Goeckeler, J., and Schekman, R. (1995). BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 9643–9646.
- Brown, J.D., Hann, B.C., Medzihradszky, K.F., Niwa, M., Burlingame, A.L., and Walter, P. (1994). Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression. *EMBO J.* *13*, 4390.
- Bushweller, J.H., Aaslund, F., Wuethrich, K., and Holmgren, A. (1992). Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14. fwdarw. S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry (Mosc.)* *31*, 9288–9293.
- Büttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstuhl, C., Sigrist, C., Wissing, S., Kollroser, M., Fröhlich, K.-U., et al. (2007). Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol. Cell* *25*, 233–246.
- Cabibbo, A., Pagani, M., Fabbri, M., Rocchi, M., Farmery, M.R., Bulleid, N.J., and Sitia, R. (2000). ERO1-L, a human protein that favors disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *275*, 4827–4833.
- Camier, S., Ma, E., Leroy, C., Pruvost, A., Toledano, M., and Marsolier-Kergoat, M.-C. (2007). Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. *Free Radic. Biol. Med.* *42*, 1008–1016.
- Cary, G.A., Yoon, S.H., Garmendia Torres, C., Wang, K., Hays, M., Ludlow, C., Goodlett, D.R., and Dudley, A.M. (2014). Identification and characterization of a drug-sensitive strain enables puromycin-based translational assays in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *31*, 167–178.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Szklarz, L.K.S., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* *23*, 3735–3746.
- Chakravarthi, S., and Bulleid, N.J. (2004). Glutathione is required to regulate the formation of native disulfide bonds within proteins entering the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 39872–39879.
- Chakravarthi, S., Jessop, C.E., and Bulleid, N.J. (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.* *7*, 271–275.
- Chatzi, A., and Tokatlidis, K. (2013). The mitochondrial intermembrane space: A hub for oxidative folding linked to protein biogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* *19*, 54–62.

- Chawla, A., Chakrabarti, S., Ghosh, G., and Niwa, M. (2011). Attenuation of yeast UPR is essential for survival and is mediated by IRE1 kinase. *J. Cell Biol.* *193*, 41–50.
- Chen, R.E., and Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* *1773*, 1311–1340.
- Chen, Y., Feldman, D.E., Deng, C., Brown, J.A., De Giacomo, A.F., Gaw, A.F., Shi, G., Le, Q.T., Brown, J.M., and Koong, A.C. (2005). Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cancer Res.* *3*, 669–677.
- Cox, J.S., Shamu, C.E., and Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* *73*, 1197–1206.
- Cox, J.S., Chapman, R.E., and Walter, P. (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell* *8*, 1805–1814.
- Credle, J.J., Finer-Moore, J.S., Papa, F.R., Stroud, R.M., and Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18773–18784.
- Csala, M., Fulceri, R., Mandl, J., Benedetti, A., and Bánhegyi, G. (2001). Ryanodine receptor channel-dependent glutathione transport in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *287*, 696–700.
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., and Diehl, J.A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell Biol.* *23*, 7198–7209.
- Cuozzo, J.W., and Kaiser, C.A. (1999). Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nat. Cell Biol.* *1*, 130–135.
- Dabir, D.V., Leverich, E.P., Kim, S.-K., Tsai, F.D., Hirasawa, M., Knaff, D.B., and Koehler, C.M. (2007). A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *EMBO J.* *26*, 4801–4811.
- Darby, N.J., and Creighton, T.E. (1995). Functional properties of the individual thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 11725–11735.
- Dardalhon, M., Kumar, C., Iraqui, I., Vernis, L., Kienda, G., Banach-Latapy, A., He, T., Chanet, R., Faye, G., Outten, C.E., et al. (2012). Redox-sensitive YFP sensors monitor dynamic nuclear and cytosolic glutathione redox changes. *Free Radic. Biol. Med.* *52*, 2254–2265.
- Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E., and Gustin, M.C. (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* *270*, 30157–30161.

- Deffieu, M., Bhatia-Kiššová, I., Salin, B., Galinier, A., Manon, S., and Camougrand, N. (2009). Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* *284*, 14828–14837.
- Deitermann, S., Sprie, G.S., and Koch, H.-G. (2005). A dual function for SecA in the assembly of single spanning membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *280*, 39077–39085.
- Delaunay, A., Isnard, A.-D., and Toledano, M.B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* *19*, 5157–5166.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.-B., Vinh, J., and Toledano, M.B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* *111*, 471–481.
- Delic, M., Mattanovich, D., and Gasser, B. (2010). Monitoring intracellular redox conditions in the endoplasmic reticulum of living yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* *306*, 61–66.
- Depuydt, M., Leonard, S.E., Vertommen, D., Denoncin, K., Morsomme, P., Wahni, K., Messens, J., Carroll, K.S., and Collet, J.-F. (2009). A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science* *326*, 1109–1111.
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A., and Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex.
- Dhaoui, M., Auchère, F., Blaiseau, P.-L., Lesuisse, E., Landoulsi, A., Camadro, J.-M., Haguener-Tsapis, R., and Belgareh-Touzé, N. (2011). Gex1 is a yeast glutathione exchanger that interferes with pH and redox homeostasis. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2054–2067.
- Dixon, B.M., Heath, S.-H.D., Kim, R., Suh, J.H., and Hagen, T.M. (2008). Assessment of endoplasmic reticulum glutathione redox status is confounded by extensive ex vivo oxidation. *Antioxid. Redox Signal.* *10*, 963–972.
- Dixon, D.P., van Lith, M., Edwards, R., and Benham, A. (2003). Cloning and initial characterization of the *Arabidopsis thaliana* endoplasmic reticulum oxidoreductins. *Antioxid. Redox Signal.* *5*, 389–396.
- Dong, M., Bridges, J.P., Apsley, K., Xu, Y., and Weaver, T.E. (2008). ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2620–2630.
- Dudgeon, D.D., Zhang, N., Ositelu, O.O., Kim, H., and Cunningham, K.W. (2008). Nonapoptotic death of *Saccharomyces cerevisiae* cells that is stimulated by Hsp90 and inhibited by calcineurin and Cmk2 in response to endoplasmic reticulum stresses. *Eukaryot. Cell* *7*, 2037–2051.
- Dutton, R.J., Boyd, D., Berkmen, M., and Beckwith, J. (2008). Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 11933–11938.

- Eckers, E., Bien, M., Stroobant, V., Herrmann, J.M., and Deponte, M. (2009). Biochemical Characterization of Dithiol Glutaredoxin 8 from *Saccharomyces cerevisiae*: The Catalytic Redox Mechanism Redux†. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 1410–1423.
- Edman, J.C., Ellis, L., Blacher, R.W., Roth, R.A., and Rutter, W.J. (1985). Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin.
- Elbaz-Alon, Y., Morgan, B., Clancy, A., Amoako, T.N., Zalckvar, E., Dick, T.P., Schwappach, B., and Schuldiner, M. (2014). The yeast oligopeptide transporter Opt2 is localized to peroxisomes and affects glutathione redox homeostasis. *FEMS Yeast Res.* *14*, 1055–1067.
- Ellgaard, L., and Ruddock, L.W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* *6*, 28–32.
- Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* *286*, 1882–1888.
- Erdman, S., Lin, L., Malczynski, M., and Snyder, M. (1998). Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J. Cell Biol.* *140*, 461–483.
- Fava, A., Ilceto, A., and Camera, E. (1957). Kinetics of the thiol-disulfide exchange. *J. Am. Chem. Soc.* *79*, 833–838.
- Federovitch, C.M., Ron, D., and Hampton, R.Y. (2005). The dynamic ER: experimental approaches and current questions. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 409–414.
- Ferrari, D.M., and SÖLING, H.-D. (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.* *339*, 1–10.
- Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S., and Brodsky, J.L. (2001). The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu. Rev. Genet.* *35*, 149–191.
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E., and Sommer, T. (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J.* *15*, 1482.
- Flynn, G.C., Chappell, T.G., and Rothman, J.E. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* *245*, 385–390.
- Frand, A.R., and Kaiser, C.A. (1998). The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* *1*, 161–170.
- Frand, A.R., and Kaiser, C.A. (1999). Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* *4*, 469–477.
- Frand, A.R., and Kaiser, C.A. (2000). Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* *11*, 2833–2843.
- Freedman, R.B., Hirst, T.R., and Tuite, M.F. (1994). Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* *19*, 331–336.

- Ganguli, D., Kumar, C., and Bachhawat, A.K. (2007). The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *175*, 1137–1151.
- Gerber, J., Mühlhoff, U., Hofhaus, G., Lill, R., and Lisowsky, T. (2001). Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J. Biol. Chem.* *276*, 23486–23491.
- Givol, D., Goldberger, R.F., and Anfinsen, C.B. (1964). Oxidation and disulfide interchange in the reactivation of reduced ribonuclease. *J. Biol. Chem.* *239*, PC3114–PC3116.
- Givol, D., De Lorenzo, F., Goldberger, R.F., and Anfinsen, C.B. (1965). Disulfide interchange and the three-dimensional structure of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *53*, 676–684.
- Gladyshev, V.N., Liu, A., Novoselov, S.V., Krysan, K., Sun, Q.-A., Kryukov, V.M., Kryukov, G.V., and Lou, M.F. (2001). Identification and characterization of a new mammalian glutaredoxin (thioltransferase), Grx2. *J. Biol. Chem.* *276*, 30374–30380.
- Goldberger, R.F., Epstein, C.J., and Anfinsen, C.B. (1963). Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chem.* *238*, 628–635.
- Goldberger, R.F., Epstein, C.J., and Anfinsen, C.B. (1964). Purification and properties of a microsomal enzyme system catalyzing the reactivation of reduced ribonuclease and lysozyme. *J. Biol. Chem.* *239*, 1406–1410.
- Grant, C.M., MacIver, F.H., and Dawes, I.W. (1996). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* *29*, 511–515.
- Grant, C.M., Quinn, K.A., and Dawes, I.W. (1999). Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2650–2656.
- Greetham, D., and Grant, C.M. (2009). Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3229–3240.
- Gross, E., Kastner, D.B., Kaiser, C.A., and Fass, D. (2004). Structure of Ero1p, source of disulfide bonds for oxidative protein folding in the cell. *Cell* *117*, 601–610.
- Gross, E., Sevier, C.S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C.A., Thorpe, C., and Fass, D. (2006). Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 299–304.
- Guérin, R., Arseneault, G., Dumont, S., and Rokeach, L.A. (2008). Calnexin is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in the fission yeast. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4404–4420.

- Gutscher, M., Pauleau, A.-L., Marty, L., Brach, T., Wabnitz, G.H., Samstag, Y., Meyer, A.J., and Dick, T.P. (2008). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat. Methods* 5, 553–559.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (2007). Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free Radic. Biol. Med.* 4, 187–267.
- Hamman, B.D., Hendershot, L.M., and Johnson, A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747–758.
- Hansen, R.E., Roth, D., and Winther, J.R. (2009). Quantifying the global cellular thiol–disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 422–427.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* 11, 619–633.
- Harrison, J.C., Bardes, E.S., Ohya, Y., and Lew, D.J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 3, 417–420.
- Hauptmann, P., and Lehle, L. (2008). Kex1 protease is involved in yeast cell death induced by defective N-glycosylation, acetic acid, and chronological aging. *J. Biol. Chem.* 283, 19151–19163.
- Hauptmann, P., Riel, C., Kunz-Schughart, L.A., Fröhlich, K.-U., Madeo, F., and Lehle, L. (2006). Defects in N-glycosylation induce apoptosis in yeast. *Mol. Microbiol.* 59, 765–778.
- Haynes, C.M., Titus, E.A., and Cooper, A.A. (2004). Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol. Cell* 15, 767–776.
- Heritage, D., and Wonderlin, W.F. (2001). Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to a neutral, polar molecule. *J. Biol. Chem.* 276, 22655–22662.
- Herrero, E., Ros, J., Tamarit, J., and Bellí, G. (2006). Glutaredoxins in fungi. *Photosynth. Res.* 89, 127–140.
- Hiniker, A., and Bardwell, J.C. (2004). In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* 279, 12967–12973.
- Hiniker, A., Collet, J.-F., and Bardwell, J.C. (2005). Copper stress causes an in vivo requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* 280, 33785–33791.
- Hirschberg, C.B., Robbins, P.W., and Abeijon, C. (1998). Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 49–69.
- Hogg, P.J. (2003). Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem. Sci.* 28, 210–214.

- Hu, J., Dong, L., and Outten, C.E. (2008). The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J. Biol. Chem.* *283*, 29126–29134.
- Hubbard, S.C., and Ivatt, R.J. (1981). Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* *50*, 555–583.
- Hwang, C., Sinskey, A.J., and Lodish, H.F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* *257*, 1496–1502.
- Ishida, N., and Kawakita, M. (2004). Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35). *Pflug. Arch.* *447*, 768–775.
- Jansens, A., van Duijn, E., and Braakman, I. (2002). Coordinated nonvectorial folding in a newly synthesized multidomain protein. *Science* *298*, 2401–2403.
- Jaspers, C.J., Gigot, D., and Penninckx, M.J. (1985). Pathways of glutathione degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* *24*, 703–707.
- Jermey, A.J., Willer, M., Davis, E., Wilkinson, B.M., and Stirling, C.J. (2006). The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. *J. Biol. Chem.* *281*, 7899–7906.
- Jessop, C.E., and Bulleid, N.J. (2004). Glutathione directly reduces an oxidoreductase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 55341–55347.
- Jin, Y.H., Dunlap, P.E., McBride, S.J., Al-Refai, H., Bushel, P.R., and Freedman, J.H. (2008). Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet* *4*, e1000053.
- Joly, J.C., and Swartz, J.R. (1997). In vitro and in vivo redox states of the *Escherichia coli* periplasmic oxidoreductases DsbA and DsbC. *Biochemistry (Mosc.)* *36*, 10067–10072.
- Junne, T., Schwede, T., Goder, V., and Spiess, M. (2006). The plug domain of yeast Sec61p is important for efficient protein translocation, but is not essential for cell viability. *Mol. Biol. Cell* *17*, 4063–4068.
- Junne, T., Schwede, T., Goder, V., and Spiess, M. (2007). Mutations in the Sec61p channel affecting signal sequence recognition and membrane protein topology. *J. Biol. Chem.* *282*, 33201–33209.
- Kabani, M., Beckerich, J.-M., and Gaillardin, C. (2000). Sls1p stimulates Sec63p-mediated activation of Kar2p in a conformation-dependent manner in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 6923–6934.
- Kadokura, H., Katzen, F., and Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 111–135.
- Kanai, S., Toh, H., Hayano, T., and Kikuchi, M. (1998). Molecular evolution of the domain structures of protein disulfide isomerases. *J. Mol. Evol.* *47*, 200–210.

- Katzen, F., and Beckwith, J. (2000). Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell* *103*, 769–779.
- Kaur, H., Kumar, C., Junot, C., Toledano, M.B., and Bachhawat, A.K. (2009). Dug1p is a Cys-Gly peptidase of the γ -glutamyl cycle of *Saccharomyces cerevisiae* and represents a novel family of Cys-Gly peptidases. *J. Biol. Chem.* *284*, 14493–14502.
- Kelner, M.J., and Montoya, M.A. (2000). Structural organization of the human glutathione reductase gene: determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *269*, 366–368.
- Kemmink, J., Darby, N.J., Dijkstra, K., Nilges, M., and Creighton, T.E. (1997). The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Curr. Biol.* *7*, 239–245.
- Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p Is a Potential Cell Wall Stress Sensor and Upstream Activator of the PKC1-MPK1 Cell Integrity Pathway. *J. Bacteriol.* *181*, 3330–3340.
- de Keyzer, J., Steel, G.J., Hale, S.J., Humphries, D., and Stirling, C.J. (2009). Nucleotide binding by Lhs1p is essential for its nucleotide exchange activity and for function in vivo. *J. Biol. Chem.* *284*, 31564–31571.
- Kim, A., and Cunningham, K.W. (2015). A LAPF/phafin1-like protein regulates TORC1 and lysosomal membrane permeabilization in response to endoplasmic reticulum membrane stress. *Mol. Biol. Cell* *26*, 4631–4645.
- Kim, H., Kim, A., and Cunningham, K.W. (2012). Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) Promotes Vacuolar Membrane Permeabilization and Nonapoptotic Death in Stressed Yeast. *J. Biol. Chem.* *287*, 19029–19039.
- Kim, J.H., Johannes, L., Goud, B., Antony, C., Lingwood, C.A., Daneman, R., and Grinstein, S. (1998). Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 2997–3002.
- Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., and Kohno, K. (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J. Cell Biol.* *167*, 445–456.
- Kiriya, K., Hara, K.Y., and Kondo, A. (2012). Extracellular glutathione fermentation using engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel glutathione exporter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *96*, 1021–1027.
- Klappa, P., Koivunen, P., Pirneskoski, A., Karvonen, P., Ruddock, L.W., Kivirikko, K.I., and Freedman, R.B. (2000). Mutations that destabilize the a' domain of human protein-disulfide isomerase indirectly affect peptide binding. *J. Biol. Chem.* *275*, 13213–13218.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* *26*, 239–256.
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., and Verkman, A.S. (1998). Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys. J.* *74*, 1591–1599.

- Koch, J.R., and Schmid, F.X. (2014). Mia40 Combines Thiol Oxidase and Disulfide Isomerase Activity to Efficiently Catalyze Oxidative Folding in Mitochondria. *J. Mol. Biol.* *426*, 4087–4098.
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M.J., and Mori, K. (1993). The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 877–890.
- Kojer, K., and Riemer, J. (2014). Balancing oxidative protein folding: the influences of reducing pathways on disulfide bond formation. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Proteins Proteomics* *1844*, 1383–1390.
- Kojer, K., Bien, M., Gangel, H., Morgan, B., Dick, T.P., and Riemer, J. (2012). Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state. *EMBO J.* *31*, 3169–3182.
- Kojer, K., Peleh, V., Calabrese, G., Herrmann, J.M., and Riemer, J. (2015). Kinetic control by limiting glutaredoxin amounts enables thiol oxidation in the reducing mitochondrial intermembrane space. *Mol. Biol. Cell* *26*, 195–204.
- Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* *54*, 631–664.
- Kuge, S., Jones, N., and Nomoto, A. (1997). Regulation of γ AP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* *16*, 1710–1720.
- Kuhn, K.M., DeRisi, J.L., Brown, P.O., and Sarnow, P. (2001). Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 916–927.
- Kumar, A., Tikoo, S., Maity, S., Sengupta, S., Sengupta, S., Kaur, A., and Bachhawat, A.K. (2012). Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as γ -glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. *EMBO Rep.* *13*, 1095–1101.
- Kumar, C., Sharma, R., and Bachhawat, A.K. (2003). Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of γ -glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* *219*, 187–194.
- Kumar, C., Igarria, A., D’Autreaux, B., Planson, A.-G., Junot, C., Godat, E., Bachhawat, A.K., Delaunay-Moisan, A., and Toledano, M.B. (2011). Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control: GSH crucial for iron metabolism, minor for redox. *EMBO J.* *30*, 2044–2056.
- Lang, S., Erdmann, F., Jung, M., Wagner, R., Cavalie, A., and Zimmermann, R. (2011). Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels* *5*, 228–235.
- Laurent, T.C., Moore, E.C., and Reichard, P. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* *239*, 3436–3444.

- Le Moan, N., Clement, G., Le Maout, S., Tacnet, F., and Toledano, M.B. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J. Biol. Chem.* *281*, 10420–10430.
- Lee, T.A., Jorgensen, P., Bognar, A.L., Peyraud, C., Thomas, D., and Tyers, M. (2010). Dissection of combinatorial control by the Met4 transcriptional complex. *Mol. Biol. Cell* *21*, 456–469.
- Li, Z.-S., Szczypka, M., Lu, Y.-P., Thiele, D.J., and Rea, P.A. (1996). The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* *271*, 6509–6517.
- Lisowsky, T. (1992). Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol. Gen. Genet.* *MGG 232*, 58–64.
- Liu, C.Y., Wong, H.N., Schauerte, J.A., and Kaufman, R.J. (2002). The protein kinase/endoribonuclease IRE1 α that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain. *J. Biol. Chem.* *277*, 18346–18356.
- Lizák, B., Czegle, I., Csala, M., Benedetti, A., Mandl, J., and Bánhegyi, G. (2006). Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to small anions. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *291*, 511–517.
- Loewen, C.J.R., Young, B.P., Tavassoli, S., and Levine, T.P. (2007). Inheritance of cortical ER in yeast is required for normal septin organization. *J. Cell Biol.* *179*, 467–483.
- Lohman, J.R., and Remington, S.J. (2008). Development of a Family of Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Indicators for Use in Relatively Oxidizing Subcellular Environments†‡. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 8678–8688.
- Lomax, R.B., Camello, C., Van Coppenolle, F., Petersen, O.H., and Tepikin, A.V. (2002). Basal and Physiological Ca²⁺ Leak from the Endoplasmic Reticulum of Pancreatic Acinar Cells SECOND MESSENGER–ACTIVATED CHANNELS AND TRANSLOCONS. *J. Biol. Chem.* *277*, 26479–26485.
- Lu, H., Allen, S., Wardleworth, L., Savory, P., and Tokatlidis, K. (2004). Functional TIM10 chaperone assembly is redox-regulated in vivo. *J. Biol. Chem.* *279*, 18952–18958.
- Lubkowitz, M. (2006). The OPT family functions in long-distance peptide and metal transport in plants. In *Genetic Engineering*, (Springer), pp. 35–55.
- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W., and Grant, C.M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* *9*, 1081–1091.
- Lyles, M.M., and Gilbert, H.F. (1991). Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochemistry (Mosc.)* *30*, 613–619.
- Ma, X.-J., Lu, Q., and Grunstein, M. (1996). A search for proteins that interact genetically with histone H3 and H4 amino termini uncovers novel regulators of the Swel kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *10*, 1327–1340.

- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., et al. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell* 9, 911–917.
- Malhotra, J.D., Miao, H., Zhang, K., Wolfson, A., Pennathur, S., Pipe, S.W., and Kaufman, R.J. (2008). Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 18525–18530.
- Malinouski, M., Zhou, Y., Belousov, V.V., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2011). Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments. *PLoS One* 6, e14564.
- Martin, D.C., Kim, H., Mackin, N.A., Maldonado-Baez, L., Evangelista, C.C., Beaudry, V.G., Dudgeon, D.D., Naiman, D.Q., Erdman, S.E., and Cunningham, K.W. (2011). New Regulators of a High Affinity Ca²⁺ Influx System Revealed through a Genome-wide Screen in Yeast. *J. Biol. Chem.* 286, 10744–10754.
- Martin, H., Arroyo, J., Sánchez, M., Molina, M., and Nombela, C. (1993). Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 C. *Mol. Gen. Genet.* MGG 241, 177–184.
- McCarthy, A.A., Haebel, P.W., Törrönen, A., Rybin, V., Baker, E.N., and Metcalf, P. (2000). Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 7, 196–199.
- Meister, A. (1995). [1] Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* 251, 3–7.
- Ménétret, J.-F., Neuhof, A., Morgan, D.G., Plath, K., Rademacher, M., Rapoport, T.A., and Akey, C.W. (2000). The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. *Mol. Cell* 6, 1219–1232.
- Merksamer, P.I., Trusina, A., and Papa, F.R. (2008). Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions. *Cell* 135, 933–947.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., and Herrmann, J.M. (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121, 1059–1069.
- Mesecke, N., Spang, A., Deponte, M., and Herrmann, J.M. (2008). A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance. *Mol. Biol. Cell* 19, 2673–2680.
- Meyer, A.J., and Dick, T.P. (2010). Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 621–650.
- Meyer, A.J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., and Hell, R. (2007). Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J.* 52, 973–986.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T. (1998). Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature* 392, 303–306.

- Molteni, S.N., Fassio, A., Ciriolo, M.R., Filomeni, G., Pasqualetto, E., Fagioli, C., and Sitia, R. (2004). Glutathione limits Ero1-dependent oxidation in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *279*, 32667–32673.
- Montero, D., Tachibana, C., Winther, J.R., and Appenzeller-Herzog, C. (2013). Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated. *Redox Biol.* *1*, 508–513.
- Mooz, E.D., and Meister, A. (1967). Tripeptide (Glutathione) Synthetase. Purification, Properties, and Mechanism of Action*. *Biochemistry (Mosc.)* *6*, 1722–1734.
- Morgan, B., Ezeriņa, D., Amoako, T.N., Riemer, J., Seedorf, M., and Dick, T.P. (2013). Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 119–125.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H., and Yura, T. (1996). Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* *1*, 803–817.
- Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J.R., Uzarska, M.A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., et al. (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab.* *12*, 373–385.
- Muller, E.G. (1996). A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol. Biol. Cell* *7*, 1805–1813.
- Muller, E.M., Locke, E.G., and Cunningham, K.W. (2001). Differential regulation of two Ca²⁺ influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *159*, 1527–1538.
- Mungrue, I.N., Pagnon, J., Kohanim, O., Gargalovic, P.S., and Lusic, A.J. (2009). CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J. Immunol.* *182*, 466–476.
- Mutka, S.C., and Walter, P. (2001). Multifaceted physiological response allows yeast to adapt to the loss of the signal recognition particle-dependent protein-targeting pathway. *Mol. Biol. Cell* *12*, 577–588.
- Nguyen, V.D., Saaranen, M.J., Karala, A.-R., Lappi, A.-K., Wang, L., Raykhel, I.B., Alanen, H.I., Salo, K.E., Wang, C., and Ruddock, L.W. (2011). Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *J. Mol. Biol.* *406*, 503–515.
- Nikawa, J., Akiyoshi, M., Hirata, S., and Fukuda, T. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression. *Nucleic Acids Res.* *24*, 4222–4226.
- Nishikawa, S., and Endo, T. (1997). The yeast JEM1p is a DnaJ-like protein of the endoplasmic reticulum membrane required for nuclear fusion. *J. Biol. Chem.* *272*, 12889–12892.

- Nojima, H., Leem, S.-H., Araki, H., Sakai, A., Nakashima, N., Kanaoka, Y., and Ono, Y. (1994). Hac1: A novel yeast bZIP protein binding to the CRE motif is a multicopy suppressor for *cdcW* mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* *22*, 5279–5288.
- Oakes, S.A., Opferman, J.T., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., and Scorrano, L. (2003). Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem. Pharmacol.* *66*, 1335–1340.
- Oka, O.B., and Bulleid, N.J. (2013). Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* *1833*, 2425–2429.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *279*, 445–450.
- Osborne, A.R., Rapoport, T.A., and van den Berg, B. (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* *21*, 529–550.
- Østergaard, H., Henriksen, A., Hansen, F.G., and Winther, J.R. (2001). Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J.* *20*, 5853–5862.
- Østergaard, H., Tachibana, C., and Winther, J.R. (2004). Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J. Cell Biol.* *166*, 337–345.
- Outten, C.E., and Culotta, V.C. (2004). Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GLR1 gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* *279*, 7785–7791.
- Ozgur, R., Turkan, I., Uzilday, B., and Sekmen, A.H. (2014). Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* *65*, 1377–1390.
- Pal, B., Chan, N.C., Helfenbaum, L., Tan, K., Tansey, W.P., and Gething, M.-J. (2007). SCFCdc4-mediated degradation of the Hac1p transcription factor regulates the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *18*, 426–440.
- Papa, F.R., Zhang, C., Shokat, K., and Walter, P. (2003). Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science* *302*, 1533–1537.
- Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J.-Åke, Wright, A.P., and Spyrou, G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *274*, 6366–6373.
- Pedrajas, J.R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J.-Åke, and Spyrou, G. (2000). Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* *275*, 16296–16301.
- Pedrajas, J.R., Porras, P., Martínez-Galisteo, E., Padilla, C.A., Miranda-Vizuete, A., and Bárcena, J.A. (2002). Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments. *Biochem. J.* *364*, 617–623.

- Penninckx, M.J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2, 295–305.
- Pincus, D., Chevalier, M.W., Aragón, T., Van Anken, E., Vidal, S.E., El-Samad, H., and Walter, P. (2010). BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol* 8, e1000415.
- Pirneskoski, A., Klappa, P., Lobell, M., Williamson, R.A., Byrne, L., Alanen, H.I., Salo, K.E., Kivirikko, K.I., Freedman, R.B., and Ruddock, L.W. (2004). Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* 279, 10374–10381.
- Plath, K., and Rapoport, T.A. (2000). Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 151, 167–178.
- Pollard, M.G., Travers, K.J., and Weissman, J.S. (1998). Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 1, 171–182.
- Poole, L.B., and Nelson, K.J. (2008). Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 18–24.
- Porras, P., Padilla, C.A., Krayl, M., Voos, W., and Bárcena, J.A. (2006). One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281, 16551–16562.
- Potter, M.D., and Nicchitta, C.V. (2002). Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 277, 23314–23320.
- Rajasekaran, A.K., Langhans-Rajasekaran, S.A., Gould, R.M., Rodriguez-Boulan, E., and Morimoto, T. (1995). A simple biochemical approach to quantitate rough endoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 268, C308–C316.
- Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450, 663–669.
- Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G., and Beckwith, J. (1997). Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J. Bacteriol.* 179, 6602–6608.
- Rothblatt, J.A., Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Daum, G., and Schekman, R. (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* 109, 2641–2652.
- Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M.K., and Jacquot, J.-P. (2010). Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* 35, 43–52.
- Roy, A., and Wonderlin, W.F. (2003). The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 4397–4403.

- Rubio, C., Pincus, D., Korennykh, A., Schuck, S., El-Samad, H., and Walter, P. (2011). Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity. *J. Cell Biol.* *193*, 171–184.
- Rüegsegger, U., Leber, J.H., and Walter, P. (2001). Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* *107*, 103–114.
- Russell, P., Moreno, S., and Reed, S.I. (1989). Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell* *57*, 295–303.
- Sadler, D.R. (1989). Formative assessment and the design of instructional systems. *Instr. Sci.* *18*, 119–144.
- Saparov, S.M., Erlandson, K., Cannon, K., Schaletzky, J., Schulman, S., Rapoport, T.A., and Pohl, P. (2007). Determining the conductance of the SecY protein translocation channel for small molecules. *Mol. Cell* *26*, 501–509.
- Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, Ö., Linxweiler, J., Dudek, J., Blum, R., Helms, V., et al. (2012). BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J.* *31*, 3282–3296.
- Schiebel, E., and Wickner, W. (1992). Preprotein translocation creates a halide anion permeability in the Escherichia coli plasma membrane. *J. Biol. Chem.* *267*, 7505–7510.
- Schlenstedt, G., Saavedra, C., Loeb, J.D., Cole, C.N., and Silver, P.A. (1995). The GTP-bound form of the yeast Ran/TC4 homologue blocks nuclear protein import and appearance of poly (A)⁺ RNA in the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 225–229.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 209–217.
- Schröder, M., Chang, J.S., and Kaufman, R.J. (2000). The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast. *Genes Dev.* *14*, 2962–2975.
- Schröder, M., Clark, R., and Kaufman, R.J. (2003). IRE1-and HAC1-independent transcriptional regulation in the unfolded protein response of yeast. *Mol. Microbiol.* *49*, 591–606.
- Schuck, S., Prinz, W.A., Thorn, K.S., Voss, C., and Walter, P. (2009). Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J. Cell Biol.* *187*, 525–536.
- Schwarzer, C., Illek, B., Suh, J.H., Remington, S.J., Fischer, H., and Machen, T.E. (2007). Organelle redox of CF and CFTR-corrected airway epithelia. *Free Radic. Biol. Med.* *43*, 300–316.
- Schwarzländer, M., Fricker, M.D., Müller, C., Marty, L., Brach, T., Novak, J., Sweetlove, L.J., Hell, R., and Meyer, A.J. (2008). Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J. Microsc.* *231*, 299–316.

- Schwarzländer, M., Dick, T.P., Meyer, A.J., and Morgan, B. (2016). Dissecting redox biology using fluorescent protein sensors. *Antioxid. Redox Signal.* *24*, 680–712.
- Scidmore, M.A., Okamura, H.H., and Rose, M.D. (1993). Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* *4*, 1145–1159.
- Scrimale, T., Didone, L., de Mesy Bentley, K.L., and Krysan, D.J. (2009). The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *20*, 164–175.
- Seiser, R.M., and Nicchitta, C.V. (2000). The fate of membrane-bound ribosomes following the termination of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* *275*, 33820–33827.
- Sevier, C.S., and Kaiser, C.A. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 836–847.
- Sevier, C.S., and Kaiser, C.A. (2006). Disulfide transfer between two conserved cysteine pairs imparts selectivity to protein oxidation by Ero1. *Mol. Biol. Cell* *17*, 2256–2266.
- Sevier, C.S., and Kaiser, C.A. (2008). Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* *1783*, 549–556.
- Sevier, C.S., Cuzzo, J.W., Vala, A., Aslund, F., and Kaiser, C.A. (2001). A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat. Cell Biol.* *3*, 874–882.
- Sevier, C.S., Qu, H., Heldman, N., Gross, E., Fass, D., and Kaiser, C.A. (2007). Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell* *129*, 333–344.
- Shamu, C.E., and Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* *15*, 3028.
- Sharma, K.G., Kaur, R., and Bachhawat, A.K. (2003). The glutathione-mediated detoxification pathway in yeast: an analysis using the red pigment that accumulates in certain adenine biosynthetic mutants of yeasts reveals the involvement of novel genes. *Arch. Microbiol.* *180*, 108–117.
- Shelton, M.D., and Mieval, J.J. (2008). Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory diseases. *Mol. Cells* *25*, 332.
- Shenton, D., and Grant, C.M. (2003). Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* *374*, 513–519.
- Sidrauski, C., Cox, J.S., and Walter, P. (1996). tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* *87*, 405–413.

- Siegel, V., Poritz, M., and Walter, P. (1987). Functional dissection of the signal recognition particle. *Mol. Biol. Rep.* *12*, 220–220.
- Silberstein, S.D., Lipton, R.B., and Goadsby, P.J. (1998). Headache in clinical practice.
- Simon, S.M., and Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* *65*, 371–380.
- Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R., and Kispal, G. (2002). Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J. Biol. Chem.* *277*, 26944–26949.
- Smith, M.A., Clemons, W.M., DeMars, C.J., and Flower, A.M. (2005). Modeling the effects of prl mutations on the Escherichia coli SecY complex. *J. Bacteriol.* *187*, 6454–6465.
- Spector, D., Labarre, J., and Toledano, M.B. (2001). A genetic investigation of the essential role of glutathione mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast. *J. Biol. Chem.* *276*, 7011–7016.
- Spiller, M.P., and Stirling, C.J. (2011). Preferential targeting of a signal recognition particle-dependent precursor to the Ssh1p translocon in yeast. *J. Biol. Chem.* *286*, 21953–21960.
- Strand, M.K., Stuart, G.R., Longley, M.J., Graziewicz, M.A., Dominick, O.C., and Copeland, W.C. (2003). POS5 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes a mitochondrial NADH kinase required for stability of mitochondrial DNA. *Eukaryot. Cell* *2*, 809–820.
- Sugiyama, K., Izawa, S., and Inoue, Y. (2000). The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* *275*, 15535–15540.
- Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* *13*, 184–190.
- Tan, S.-X., Greetham, D., Raeth, S., Grant, C.M., Dawes, I.W., and Perrone, G.G. (2010). The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function in vivo as an alternative system to reduce oxidized glutathione in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* *285*, 6118–6126.
- Tanaka, S., and Nojima, H. (1996). Nik1: a Nim1-like protein kinase of S. cerevisiae interacts with the Cdc28 complex and regulates cell cycle progression. *Genes Cells* *1*, 905–921.
- Tanaka, T., Izawa, S., and Inoue, Y. (2005). GPX2, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for an atypical 2-Cys peroxiredoxin in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* *280*, 42078–42087.
- Tavender, T.J., and Bulleid, N.J. (2010). Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H₂O₂ produced during disulphide formation. *J Cell Sci* *123*, 2672–2679.
- Terziyska, N., Grumblt, B., Kozany, C., and Hell, K. (2009). Structural and functional roles of the conserved cysteine residues of the redox-regulated import receptor Mia40 in the intermembrane space of mitochondria. *J. Biol. Chem.* *284*, 1353–1363.
- Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *61*, 503–532.

- Thorpe, C., and Coppock, D.L. (2007). Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. *J. Biol. Chem.* *282*, 13929–13933.
- Thorsen, M., Lagniel, G., Kristiansson, E., Junot, C., Nerman, O., Labarre, J., and Tamás, M.J. (2007). Quantitative transcriptome, proteome, and sulfur metabolite profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to arsenite. *Physiol. Genomics* *30*, 35–43.
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* *12*, 1812–1824.
- Toledano, M.B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D., and Tacnet, F. (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.
- Traut, R.R., and Monro, R.E. (1964). The puromycin reaction and its relation to protein synthesis. *J. Mol. Biol.* *10*, 63–72.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* *101*, 249–258.
- Tretter, T., Pereira, F.P., Ulucan, O., Helms, V., Allan, S., Kalies, K.-U., and Römisch, K. (2013). ERAD and protein import defects in a *sec61* mutant lacking ER-luminal loop 7. *BMC Cell Biol.* *14*, 1.
- Trotter, E.W., and Grant, C.M. (2005). Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* *4*, 392–400.
- Trueman, S.F., Mandon, E.C., and Gilmore, R. (2011). Translocation channel gating kinetics balances protein translocation efficiency with signal sequence recognition fidelity. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2983–2993.
- Tsunoda, S., Avezov, E., Zyryanova, A., Konno, T., Mendes-Silva, L., Melo, E.P., Harding, H.P., and Ron, D. (2014). Intact protein folding in the glutathione-depleted endoplasmic reticulum implicates alternative protein thiol reductants. *Elife* *3*, e03421.
- Tu, B.P., and Weissman, J.S. (2002). The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* *10*, 983–994.
- Tu, B.P., Ho-Schleyer, S.C., Travers, K.J., and Weissman, J.S. (2000). Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* *290*, 1571–1574.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* *427*, 36–44.
- Voorhees, R.M., and Hegde, R.S. (2016). Toward a structural understanding of co-translational protein translocation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *41*, 91–99.

- Wang, J., and Sevier, C.S. (2016). Formation and Reversibility of BiP Protein Cysteine Oxidation Facilitate Cell Survival during and post Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* *291*, 7541–7557.
- Wang, J., Pareja, K.A., Kaiser, C.A., and Sevier, C.S. (2014). Redox signaling via the molecular chaperone BiP protects cells against endoplasmic reticulum-derived oxidative stress. *Elife* *3*, e03496.
- Wang, X.-Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., and Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* *17*, 5708–5717.
- Wetlaufer, D.B., and Saxena, V.P. (1970). Formation of three-dimensional structure in proteins. I. Rapid nonenzymic reactivation of reduced lysozyme. *Biochemistry (Mosc.)* *9*, 5015–5023.
- Wheeler, G.L., Trotter, E.W., Dawes, I.W., and Grant, C.M. (2003). Coupling of the transcriptional regulation of glutathione biosynthesis to the availability of glutathione and methionine via the Met4 and Yap1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* *278*, 49920–49928.
- Wiest, D.L., Burkhardt, J.K., Hester, S., Hortsch, M., Meyer, D.I., and Argon, Y. (1990). Membrane biogenesis during B cell differentiation: most endoplasmic reticulum proteins are expressed coordinately. *J. Cell Biol.* *110*, 1501–1511.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Büttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., et al. (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* *166*, 969–974.
- Wittke, S., Dünwald, M., Albertsen, M., and Johnsson, N. (2002). Recognition of a subset of signal sequences by Ssh1p, a Sec61p-related protein in the membrane of endoplasmic reticulum of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2223–2232.
- Wolf, A.M., Nishimaki, K., Kamimura, N., and Ohta, S. (2014). Real-time monitoring of oxidative stress in live mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 1701–1709.
- Wu, A.-L., and Moye-Rowley, W.S. (1994). GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 5832–5839.
- Wu, M.M., Llopis, J., Adams, S., McCaffery, J.M., Kulomaa, M.S., Machen, T.E., Moore, H.-P.H., and Tsien, R.Y. (2000). Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein–biotin. *Chem. Biol.* *7*, 197–209.
- Yan, M., Li, J., and Sha, B. (2011). Structural analysis of the Sil1–Bip complex reveals the mechanism for Sil1 to function as a nucleotide-exchange factor. *Biochem. J.* *438*, 447–455.
- Yang, Y.F., and Wells, W.W. (1991). Catalytic mechanism of thioltransferase. *J. Biol. Chem.* *266*, 12766–12771.
- Yen, M.-R., Tseng, Y.-H., and Saier Jr, M.H. (2001). Maize Yellow Stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. *Microbiology* *147*, 2881–2883.

Yu, C.-X., Li, S., and Whorton, A.R. (2005). Redox regulation of PTEN by S-nitrosothiols. *Mol. Pharmacol.* *68*, 847–854.

Zarzov, P., Mazzone, C., and Mann, C. (1996). The SLT2 (MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* *15*, 83.

Zhang, N.-N., Dudgeon, D.D., Paliwal, S., Levchenko, A., Grote, E., and Cunningham, K.W. (2006). Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3409–3422.

Zito, E., Melo, E.P., Yang, Y., Wahlander, A.A., Neubert, T.A., and Ron, D. (2010). Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin. *Mol. Cell* *40*, 787–797.



Titre : titre (en français) : Contrôle redox de la sécrétion protéique chez *S. cerevisiae*

Mots clés : redox, sécrétion, glutathion

Résumé : Les protéines destinées à la sécrétion ou adressées à la membrane transitent par le réticulum endoplasmique (RE) où elles acquièrent leur conformation native et subissent des modifications post-traductionnelles comme la formation de ponts disulfures. Dans ce compartiment, la formation de ponts disulfures repose sur l'activité de l'oxydase Ero1 et de la Protein Disulfure Isomerase (PDI). Ero1 catalyse la formation de ponts disulfures et les transmet à la PDI qui à son tour oxyde les substrats. L'isomérisation ou la réduction terminale des ponts disulfures non-natifs repose sur un système de réduction dans le RE encore non élucidé. Des études suggèrent l'importance du glutathion réduit (GSH) dans ce système de réduction. Le GSH est un tripeptide redox exclusivement synthétisé dans le cytosol.

Nous avons établi un système permettant d'étudier les flux de glutathion entre cytosol et RE. Afin de démasquer ces flux intracellulaires, nous avons utilisé une souche de *S. cerevisiae* surexprimant le transporteur plasmique du glutathion, HGT1.

Ce système permet de modifier rapidement et drastiquement la concentration cytosolique de glutathion. Les flux intracellulaires engendrés sont ensuite suivis grâce à des sondes redox spécifiques du glutathion adressées dans le RE ou le cytoplasme.

(i) Nos résultats suggèrent que le GSH et le GSSG sont importés dans le RE depuis le cytosol. Le GSH est transporté selon un gradient de concentration via un système de transport de diffusion facilité. Ces flux sont également observés lors de stress stimulant la synthèse de GSH (stress thermique, arsenite...).

(ii) Le transport de GSH dans le lumen est assuré par le translocon Sec61, et une régulation de cet import par la chaperone luminale Kar2 est observée.

(iii) une réduction rapide de l'état redox du glutathion dans le RE conduit à une mort cellulaire programmée non apoptotique, également observée lors d'autre stress RE (traitement tunicamycine)

Title : Titre en anglais) : Redox control of protein secretion in *S. cerevisiae*

Keywords : Redox, secretion, glutathione

Abstract : The endoplasmic reticulum (ER) is the first intracellular compartment of the protein secretion pathway. Protein maturation in this compartment involves protein folding modification including formation of disulfide bonds. The formation of disulfide bonds is operated by a highly conserved redox relay made of the thiol oxidase Ero1 and the protein disulfide isomerase (PDI). Ero1 catalyzes disulfide bond formation and relays them by thiol-disulfide exchange to PDI, which in turn oxidizes substrates. Isomerization and terminal reduction of non-native disulfide bonds both rely on a reduction system that remains to be formally identified. Studies however suggest the importance of reduced glutathione in this reducing system.

We established a system to monitor the fluxes of glutathione from the cytosol to the ER in *S. cerevisiae*. To artificially increase fluxes of glutathione, we used a cell over-expressing the GSH plasma membrane transporter HGT1, which when grown in presence of glutathione import high levels of this compound.

Consequently, we monitored the intracellular relocation of imported GSH by following GSH fluxes using two specific redox probes. Our data indicate that:

(i) GSH is transported into the ER by facilitated diffusion along a concentration gradient. GSSG can also be imported into the ER. Similarly, stress conditions that stimulate GSH synthesis, such as heat shock, arsenite treatment, also triggered a GSH import in the ER.

(ii) GSH import in the ER is achieved by the translocon Sec61, and is regulated by the luminal chaperone Kar2.

(iii) A rapid reduction of glutathione ER redox state leads to the activation of a non-apoptotic programmed cell death pathway, usually observed during high ER stress.