

## Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes

Yannick Morel  
Robert Barouki

Les conditions redox sont une facette de l'environnement chimique intracellulaire (au même titre que le pH, la pression osmotique, etc.). La production intracellulaire de molécules réactives dérivées de l'oxygène ou « stress oxydant » peut perturber l'homéostasie redox. Les agressions sont directes ou dues à un dysfonctionnement du métabolisme affectant les macromolécules biologiques dans leurs structures ou leur activité. L'activité de certains facteurs de transcription est modifiée par la production de molécules réactives dérivées de l'oxygène. Certains sont activés (AP-1, NF- $\kappa$ B), d'autres sont inhibés (Sp-1, NFI, récepteur des glucocorticoïdes...), la plupart du temps *via* l'oxydation d'une cystéine critique pour la fonction de la protéine. De façon plus générale, le stress oxydant interfère avec la signalisation cellulaire. Aussi, des essais de thérapies antioxydantes se développent-ils dans le cas de certaines affections chroniques pour lesquelles le stress oxydant est impliqué (arthrite, SIDA, maladie d'Alzheimer...).

**L**e « potentiel redox intracellulaire » est la résultante de l'état redox des couples oxydo-réducteurs présents dans la cellule. Cette notion s'apparente à la notion de pH intracellulaire associée aux couples acido-basiques. La liaison d'un atome à des atomes d'oxygène ou d'hydrogène correspond à un état respectivement oxydé ou réduit. Plus généralement, lorsqu'une molécule comporte un atome pouvant s'entourer d'un nombre variable d'électrons (par exemple C, S, P, N et les métaux Fe, Cu, Zn...), elle est dite sous forme oxydée ou réduite si ce nombre est respectivement bas ou élevé. Ainsi, une molécule est dite « oxydante » si elle a le pouvoir de gagner un électron, la molécule fournissant ce der-

nier passant alors d'un état réduit à un état oxydé. Les deux états (réduit et oxydé) d'une même molécule forment un « couple redox » dont le « potentiel redox » (noté  $E^\bullet$ ) croît avec le pouvoir oxydant de l'espèce oxydée du couple. Un oxydant ne peut oxyder que des molécules réduites qui ont un  $E^\bullet$  inférieur au sien. En pratique, les conditions redox régnant dans la cellule sont évaluées par le rapport des concentrations des formes oxydée et réduite d'un couple redox prépondérant comme celui du glutathion. Cette mesure peut aussi se faire au moyen de sondes dites fluorochromes, dont la couleur varie selon leur état redox. Le couple glutathion réduit/glutathion oxydé (noté GSH/GSSG) agit comme un tampon redox (à l'instar

### ADRESSES

Y. Morel : ingénieur de l'armement option recherche. R. Barouki : directeur de recherche à l'Inserm. Inserm U. 490, Centre universitaire des Saints-Pères, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France.

### TIRÉS À PART

R. Barouki.

d'un tampon acido-basique). Ainsi, ce que l'on nommera par la suite le « potentiel redox » régnant dans la cellule va déterminer les proportions relatives des espèces – oxydée ou réduite – de chaque couple redox, celles-ci dépendant du  $E^\circ$  de ces derniers. Par exemple, selon le potentiel redox intracellulaire, certains facteurs de transcription seront sous forme oxydée ou réduite.

### Potentiel redox intracellulaire et stress oxydant

De par sa configuration électronique, l'oxygène est avide d'électrons (c'est-à-dire revêt un caractère oxydant). Néanmoins, un blocage cinétique limite la réactivité du dioxygène ( $O_2$ ), sinon nous nous enflammerions spontanément à l'air ! Dans le processus de la respiration, il est réduit de façon progressive et contrôlée en eau par apport de 4 électrons. En revanche, sa réduction incomplète conduit à des espèces qui ont encore un caractère oxydant et qui sont de surcroît très réactives :  $H_2O_2$  (peroxyde d'hydrogène ou « eau oxygénée »),  $OH^\bullet$  (radical hydroxyle) et, dans une moindre mesure,  $O_2^{\bullet-}$  (radical anion superoxyde). Ces espèces, appelées « dérivés réactifs de l'oxygène » (DRO), pourront oxyder des macromolécules (ADN, lipides et protéines) [1]. Leurs apparitions sont reliées entre elles par des réactions enzymatiques ou chimiques (figure 1); l'activité superoxyde dismutase (SOD) produit  $H_2O_2$  à partir de  $O_2^{\bullet-}$  et  $H_2O_2$  conduit à la formation de  $OH^\bullet$  en présence de  $Fe^{2+}$  (réaction de Fenton). Par ailleurs, certaines réactions chimiques ou photochimiques (en particulier avec les UVA) conduisent à l'excitation de la molécule de dioxygène. Cet état, noté [ $^1O_2$ ], est appelé oxygène singulet (*spin* nul). Le métabolisme normal de la cellule produit sans cesse des dérivés réactifs de l'oxygène [2]. En effet, les systèmes utilisant un transfert d'électrons – normalement étroitement contrôlé – sont parfois le lieu de fuites électroniques. Par conséquent, la chaîne respiratoire, les oxydases (xanthine, NADPH...), les réductases sont responsables d'une production permanente d'espèces oxydantes. De plus, cer-

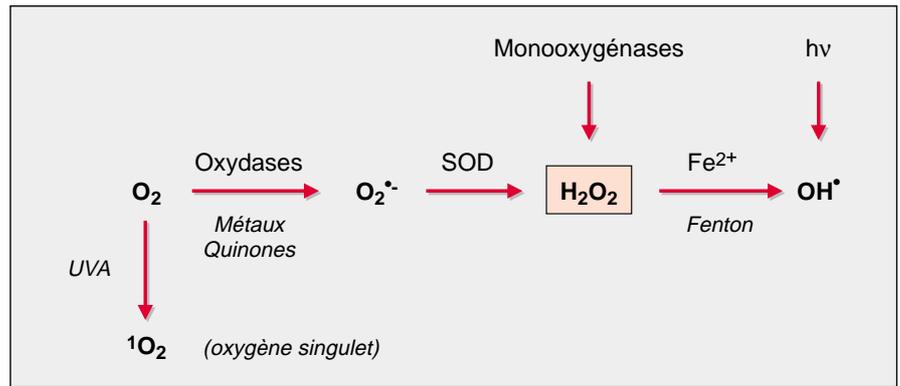
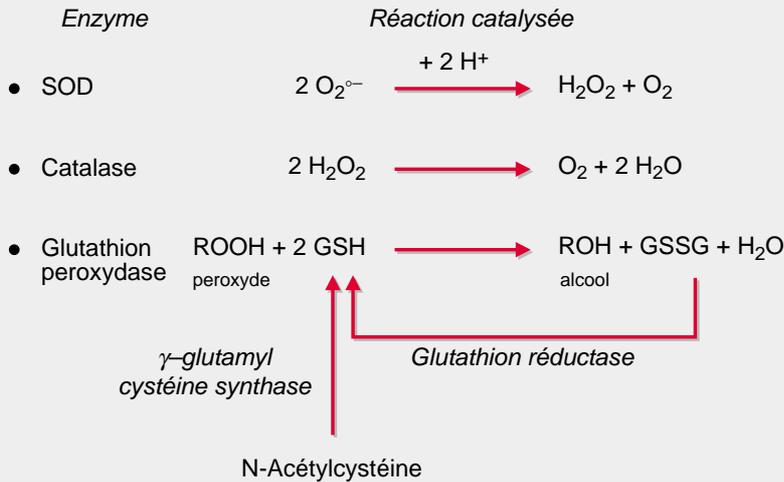


Figure 1. **Production des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO).** La réduction incomplète de l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) conduit à la formation d'espèces chimiques oxydantes. Le gain d'un électron donne le radical anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ . Ce dernier est transformé par la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , ou « eau oxygénée ».  $H_2O_2$  est aussi produit directement par certaines enzymes (en particulier, les monoxygénases). À partir de cette molécule, et en présence d'ions du fer, la réaction de Fenton produit une espèce chimique très réactive : le radical hydroxyle  $OH^\bullet$ . L'oxygène moléculaire peut également être activé en un état plus réactif, l'oxygène singulet, par les UV.

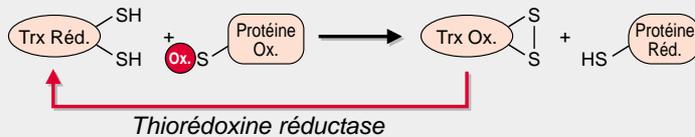
tains signaux physiologiques (cytokines, facteurs de croissance) sont relayés au niveau de la membrane plasmique par l'activation d'une NADPH oxydase et par la production résultante de DRO [3]. Comme nous le verrons plus loin, les DRO jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire [4]. Cependant, des systèmes anti-oxydants empêchent l'accumulation de ces derniers (figure 2). En particulier, le glutathion, tripeptide comportant une cystéine, agit comme un tampon anti-oxydant régissant « l'homéostasie » redox intracellulaire. La concentration intracellulaire en glutathion se situe entre 5 et 10 mM. Elle varie entre les différents compartiments. En outre, des systèmes enzymatiques détoxiquent les DRO : la catalase dismuté  $H_2O_2$  en oxygène et en eau et la SOD élimine  $O_2^{\bullet-}$  (ce qui produit  $H_2O_2$  !). La glutathion peroxydase, la quinone réductase et l'hème oxygénase sont d'autres enzymes de détoxification. Enfin, la cellule utilise de simples molécules anti-oxydantes, comme la thioredoxine, et antiradicalaires comme les vitamines C (cytosolique) et E (membranaire). On parle de « stress oxydant » lorsque cette homéostasie redox est perturbée, soit par une surproduction de DRO, soit par une défaillance des systèmes anti-oxydants. Les conséquences d'un tel stress dépendent

bien sûr du type cellulaire. Une vague oxydante peut survenir à la suite de divers stress. Les rayonnements (dont les UV) peuvent conduire à la formation de DRO à partir de la radiolyse de l'eau. L'hyperoxie, c'est-à-dire la présence excessive de dioxygène en accroît la formation naturelle. De même, l'activation du système immunitaire peut conduire à une production locale massive de dérivés réactifs de l'oxygène et de HClO (acide hypochloreux, le plus puissant oxydant physiologique) via la myéloperoxydase des phagocytes. De plus, l'induction d'enzyme de phase I (cytochrome P450 mono-oxygénases en particulier) par des xénobiotiques active le métabolisme oxydant dans la cellule, aggravant le risque de fuites électroniques et de surproduction de DRO. Enfin, certains dérivés des quinones (endogènes comme l'ubiquinone de la chaîne respiratoire, ou exogènes comme l'adryamicine, la mitomycine C...) et les molécules comportant un cation métallique (tels que Fe, Cu...) provoquent la formation de  $O_2^{\bullet-}$  en captant ou en libérant facilement un électron. Si elle n'est pas létale, une vague oxydante est détoxiquée en quelques heures, d'où la notion de stress oxydant. Néanmoins, la perturbation des systèmes anti-oxydants, principalement celui de (ré)génération du glutathion, peut produire aussi un désé-

## A • Détoxication des DRO



## B • Cas de la thioredoxine (Trx)



La protéine Ref-1 joue le même rôle que la thioredoxine Trx

## C • Élimination des radicaux libres

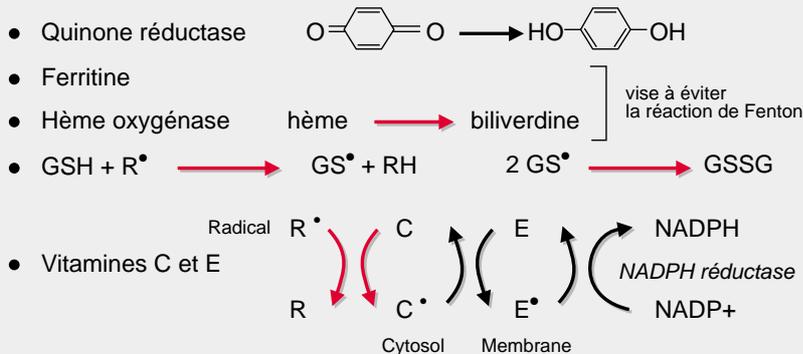


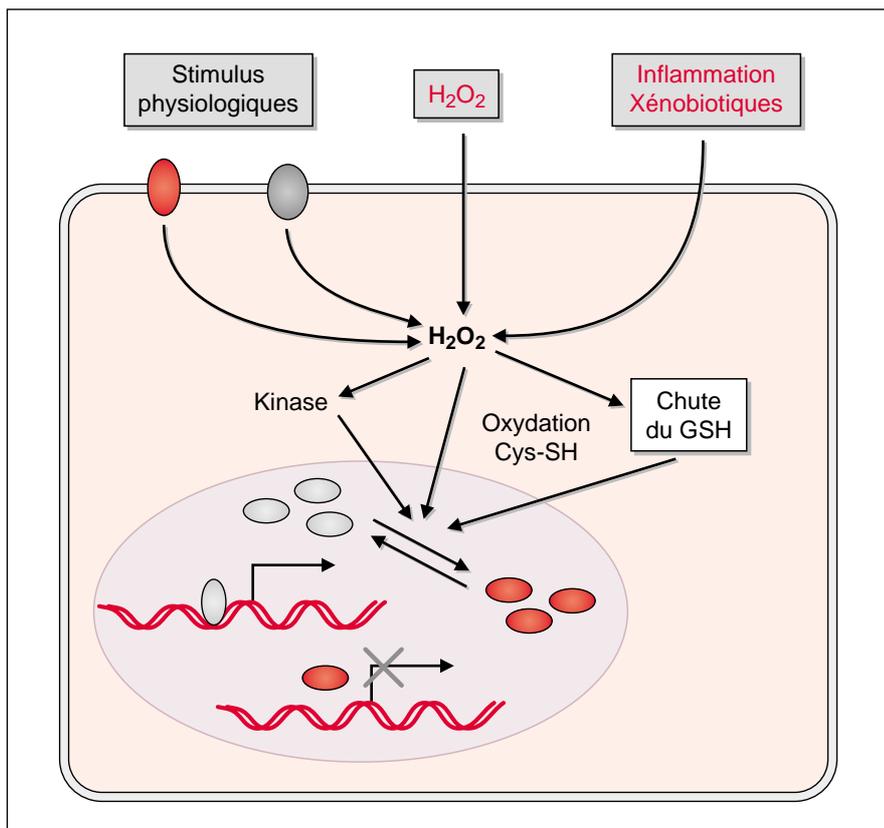
Figure 2. **Systèmes de défense anti-oxydante.** Pour lutter contre les effets néfastes du stress oxydant, les cellules sont équipées de divers systèmes anti-oxydants. **A.** Certaines enzymes dégradent les dérivés réactifs de l'oxygène: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase. **B.** Les protéines peuvent subir une oxydation au niveau d'une cystéine: le groupe thiol (-SH) de cet acide aminé est alors altéré. Des réducteurs recyclables comme le glutathion (GSH) ou la thioredoxine (Trx) sont utilisés pour réparer cette altération. **C.** Il est important de prévenir la formation des radicaux libres ( $\text{R}^\bullet$ ) qui interviennent dans le stress oxydant. Afin d'éviter la réaction de Fenton, les ions du fer sont séquestrés et les structures hémiques libres sont dégradées. De même, les quinones (potentiellement génératrices de radicaux), sont désactivées par la quinone réductase. Enfin, une chaîne de réactions chimiques, chargée de piéger les radicaux libres, fait intervenir les vitamines C et E, cette dernière étant régénérée par le  $\text{NADP}^+$ , un constituant cellulaire important.

équilibre pro-oxydant dont l'effet, bien que moins intense, est plus durable.

## Stress oxydant et régulation des facteurs de transcription

On savait que certains gènes, en particulier les gènes précoces « d'alerte » (comme *c-Jun*, *egr-1* ou *gadd153* [5]) et ceux de détoxication anti-oxydante, étaient stimulés par un stress oxydant [6]. On savait aussi qu'une protéine pouvait être sensible à l'oxydation au niveau de certains résidus, en particulier les résidus soufrés (principalement les cystéines). Une telle modification de la protéine est souvent obtenue *in vitro*. L'importance fonctionnelle de ce mécanisme *in vivo*, fut discutée. Cependant, depuis quelques années, des travaux ont montré que le potentiel redox intracellulaire pouvait moduler l'activité *in vivo* de certains facteurs de transcription. Depuis, la régulation redox de l'initiation de la transcription est apparue comme un élément important du contrôle de l'expression des gènes (figure 3). Chez *E. coli*, la régulation redox de la transcription est maintenant bien comprise. Elle passe par deux facteurs de transcription, SoxR (particulièrement sensible à  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), et OxyR (particulièrement sensible à  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) qui ne sont opérationnels que sous leur forme oxydée [7]. Ils activent en particulier les gènes de défense anti-oxydante. Chez les eucaryotes, aucun équivalent simple de ces régulateurs n'a été mis en évidence. Néanmoins, un facteur de transcription murin, activable par  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se lie à la séquence d'ADN reconnue par OxyR [8]. Comme nous le verrons plus loin, un grand nombre de facteurs de transcription eucaryotes sont sensibles aux conditions redox régnant dans la cellule. Nous possédons maintenant suffisamment de recul pour pouvoir dire que la variation de l'état redox intracellulaire règle véritablement l'activité de nombreux facteurs de transcription. Leur degré de sensibilité est variable. Il dépend de la structure de la protéine et de son aptitude à être modifiée par phosphorylation, glycosylation ou oxydation. C'est à cette dernière que nous nous intéressons particulièrement ici.

La plupart des facteurs de transcription comportent dans leur séquence



**Figure 3. Stress oxydant et régulation des gènes.** Plusieurs causes peuvent produire une altération oxydante se répercutant in fine sur l'expression génique. Des signaux extracellulaires (cytokines émises lors d'une inflammation par exemple) sont transmis au niveau membranaire par des récepteurs. Ces derniers activent des oxydases, générant ainsi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui joue le rôle de second messenger. De même, un afflux de xénobiotiques peut activer le métabolisme oxydatif et entraîner une surproduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La modification du « potentiel redox intracellulaire » qui en résulte va moduler l'activité de certains facteurs de transcription, et entraîner une modification de l'expression des gènes.

protéique des cystéines (sensibles aux variations redox par leur groupe thiol) fonctionnellement très importantes (figure 4). Premièrement, elles peuvent se situer dans le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription et assurer la reconnaissance d'un site donné par des interactions électrostatiques (en particulier des liaisons hydrogènes) avec les bases de l'ADN. Deuxièmement, elles peuvent donner naissance à des ponts disulfures inter- ou intramoléculaires essentiels pour la conformation tridimensionnelle de la protéine. Enfin, des cystéines participent à la coordination de cations métalliques (principalement Zn<sup>2+</sup>). C'est le cas des protéines dites « à doigt de zinc » dont la conformation assurée par la coordination du cation peut permettre une interaction avec le grand sillon de l'ADN.

L'oxydation d'une cystéine peut donc modifier le comportement d'un facteur de transcription. La formation anormale d'un pont disulfure va perturber la fonction de la protéine en conduisant à une mauvaise conformation (éventuellement en empêchant une dimérisation passant par un pont disulfure). Elle peut aussi empêcher ou se substituer à la formation (normale) d'un autre pont à partir de la même cystéine, ce qui peut aussi perturber la conformation globale. Ainsi, la dimérisation d'un facteur de transcription (phénomène très fréquent) ou sa faculté d'approcher l'ADN peuvent être modifiées. C'est le cas, par exemple, de USF et HoxB5 (figure 4). De même, la simple oxydation du soufre d'une cystéine par gain d'atomes d'oxygène, peut s'avérer critique. Le groupe thiol (-SH) peut être oxydé

en groupe sulfénique (-SOH), sulfonique (-SO<sub>2</sub>H) voire sulfonique (-SO<sub>3</sub>H). La conformation électronique et stérique du résidu de la cystéine est alors notablement modifiée. Si la cystéine oxydée est une cystéine critique du domaine de liaison à l'ADN, il en résultera une modification de l'aptitude du facteur de transcription à se lier à sa séquence cible [9] (cas de AP-1 ou NF-1).

### Stress oxydant et contrôle de l'expression des gènes

Les modifications par oxydation évoquées ci-dessus sont le plus souvent réversibles. Elles s'inscrivent dans un processus dynamique : la variation du « potentiel » redox intracellulaire (localement ou globalement). Celle-ci peut modifier radicalement le rapport oxydé/réduit d'un couple redox étant donné la sensibilité redox fine de certains groupements chimiques comme les thiols. Ainsi, un stress oxydant non létal peut influencer le comportement de protéines possédant des cystéines critiques (tout comme une variation de pH pourrait le faire). Poussé trop loin, le stress oxydant entraîne la destruction du matériau vivant (peroxydation lipidique, adduits de l'ADN et des protéines...). Il induit alors apoptose [10] ou nécrose. En revanche, une production limitée et transitoire de DRO peut participer à – ou interférer avec – la signalisation de la cellule sans en affecter la viabilité. Cette production contribue à transmettre divers stimulus physiologiques (facteurs de croissance, TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ...) [2, 3]. Certaines protéines G comme Ras peuvent conduire à l'activation de la cascade des kinases *via* la production de dérivés réactifs de l'oxygène [11]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> active de même (au moins) une tyrosine phosphatase [12]. Des travaux récents montrent même que Ras pourrait activer directement AP-1 et NF- $\kappa$ B par une production de DRO sans passer par des kinases [13]. Par ailleurs, on connaît au moins une kinase (de la famille Ste20) qui n'est activée que par le stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Elle est insensible aux autres stimulus répertoriés des kinases et n'active elle-même aucune des cascades connues de MAPK (*mitogen activated protein kinase*)

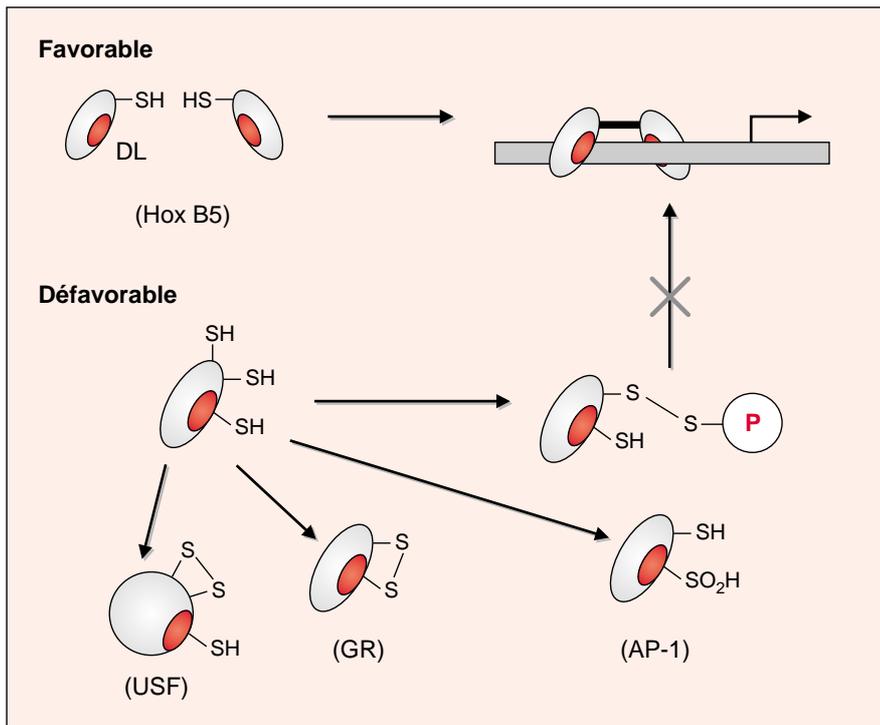


Figure 4. **Modification de la capacité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription par oxydation au niveau d'une cystéine.** Un environnement oxydant entraîne la formation de ponts disulfures au niveau des cystéines. Dans le cas du facteur Hox B5, il s'agit d'une modification favorable nécessaire pour sa dimérisation. En général, la formation d'un pont disulfure intra- ou intermoléculaire défavorise ou empêche la dimérisation et la liaison à l'ADN. Il peut s'agir d'un simple changement de conformation de la protéine (cas du facteur USF), ou d'une altération du domaine de liaison à l'ADN (cas des facteurs AP-1 et du récepteur aux glucocorticoïdes GR). DL : domaine de liaison à l'ADN ; P : autre protéine ou glutathion.

[14]. Ces deux exemples montrent qu'il pourrait exister de nouvelles voies de signalisation cellulaire utilisant spécifiquement l'oxydation. Comme les voies de signalisation évoquées ci-dessus conduisent *in fine* à l'activation de la transcription de certains gènes « précoces », la régulation redox des facteurs de transcription suscite un intérêt croissant.

Les études présentées ci-dessous concernent la modulation *in vivo* de l'activité de plusieurs facteurs de transcription par voie redox. Cette modulation est selon les cas positive ou négative.

### Les facteurs de transcription activés par le stress oxydant

#### NF-κB (nuclear factor κB)

C'est un facteur ubiquiste jouant un rôle important lors de la réponse rapide à un stress cellulaire [15]. Il a

été récemment l'objet de très nombreuses études. Nous ne résumons ici, succinctement, que l'aspect redox de son activation. *In vivo*, NF-κB peut être activé par de nombreux stimulus (voir figure 5), dont l'inflammation [16]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> semble être un messager commun à la plupart de ces voies d'activation, sinon toutes. C'est en particulier le cas du TNFα [17]. La présence d'anti-oxydants tels que la N-acétyl-cystéine (NAC), la pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), la thioredoxine ou les vitamines C et E inhibe cette activation. Certaines kinases chargées de phosphoryler I-κB, entraînant ainsi sa dégradation par le protéasome (et l'activation de NF-κB), seraient activées par les DRO [15]. Néanmoins, l'activation de la dégradation d'I-κB par le stress oxydant peut avoir lieu sans sa phosphorylation [18]. Une fois activé, NF-κB migre vers le noyau où il se lie à une séquence κB de l'ADN (GGAnnnTCC). Cependant,

NF-κB (qui comporte une cystéine dans son domaine de liaison à l'ADN) doit être sous forme réduite pour se lier à l'ADN [19]. *In vivo*, la réduction de la cystéine critique serait assurée par la thioredoxine ou une autre protéine appelée Ref-1 (redox factor 1). Il y a donc deux niveaux apparemment antagonistes de régulation redox de NF-κB : translocation nucléaire et liaison à l'ADN [20]. Cette opposition est peut-être une voie de rétrocontrôle de l'activation de NF-κB. Elle peut aussi être liée à différents niveaux d'intensité du stress oxydant. La régulation redox de NF-κB ne fait aucun doute mais elle reste complexe, d'autant plus que les résultats obtenus dépendent des lignées cellulaires.

#### AP-1 (activator protein 1)

Le complexe AP-1 est composé d'un dimère Jun-Jun ou Fos-Jun. Il réagit rapidement à divers stress et active des gènes précoces [5] : il est activé *in vivo* par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi que par les UV, les esters de phorbol et le TNFα (via des DRO). Cependant sa liaison à sa séquence cible d'ADN (5'TGAC/GTC/AA3') est accrue *in vitro* par des agents réducteurs comme la NAC. La cystéine 252 de la protéine Jun située dans le domaine de liaison à l'ADN est critique [21]. Son oxydation empêche cette liaison [9]. *In vivo*, le facteur Ref-1 (voir ci-dessus) assure la réduction de cette cystéine. Il faut signaler que l'activation redox de AP-1 passe sans doute par des kinases. Les Jun kinases (JNK) sont en effet activées en quelques minutes par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A l'instar de NF-κB, activation et liaison à l'ADN sont deux étapes différemment sensibles à l'état redox de la cellule. La production de DRO conduit à l'activation alors que l'oxydation de la cystéine 252 inhibe la liaison. La mutation de cette cystéine en sérine supprime cette sensibilité à l'oxydation et conduit à l'activation permanente de la liaison à l'ADN [21].

#### AP-2

Ce fut un des premiers facteurs de transcription à être identifié. Ce facteur est activé par les UVA via la production d'oxygène singulet [22]. Cette activation est inhibée par l'α-tocophérol. En revanche, il n'y a pas d'activation par les autres DRO. Ce facteur active la transcription des

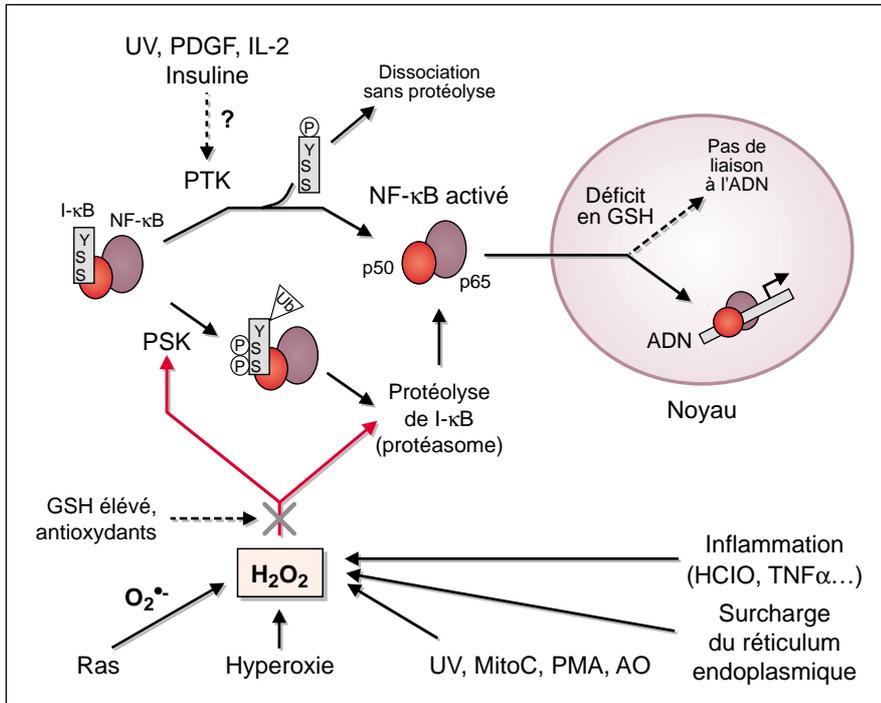


Figure 5. **La régulation redox de NF-κB s'effectue à deux niveaux.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> semble être un second messager commun à de nombreux stimulus qui induisent NF-κB (inflammation, UV, xénobiotiques et d'une manière générale stress cellulaires divers...). Un environnement cellulaire anti-oxydant, c'est-à-dire un taux de glutathion réduit (GSH) élevé, inhibe ces voies d'activation. Le stress oxydant induit l'activation cytosolique de NF-κB en conduisant à la dissociation de I-κB. D'autre part, la liaison à l'ADN de NF-κB est sous contrôle redox : l'oxydation d'une cystéine critique située dans le domaine de liaison à l'ADN empêche cette liaison. PTK : protéine-tyrosine kinase ; PSK : protéine-sérine kinase ; Ub : ubiquitine ; MitoC : mitomycine C ; AO : acide oxaïque ; PMA : ester de phorbol ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; IL-2 : interleukine-2.

gènes de la protéine d'adhérence intercellulaire ICAM-1, de l'hème oxygénase et de certaines métalloprotéases.

### Hox B5

D'abord étudié pour son rôle dans le développement de la drosophile, l'ADNc a été cloné chez l'homme sans qu'on connaisse encore la fonction de ce facteur. Des conditions oxydantes entraînent sa dimérisation (*in vivo*) par la formation d'un pont disulfure au niveau de la Cys 232 [23]. Le dimère ainsi formé se lie 100 fois mieux que le monomère à la séquence LP (GATCAATTAATT). La mutation Cys232 → Ser ou un environnement réducteur abolit la dimérisation. Ce facteur est donc clairement activé par oxydation.

### Cas de la séquence ARE

La séquence GTGACnnnTG, la première séquence d'ADN répondant

positivement au stress oxydant, fut isolée dans le promoteur de la glutathion transférase et fut appelée ARE (*antioxidant responsive element*) ou EpRE (*electrophile RE*). De nombreuses études *in vivo* ont montré qu'il s'agit d'une séquence complexe de 41 pb pouvant être reconnue par le complexe AP-1 mais aussi par une ou plusieurs autres protéines encore non identifiées [6]. Cette séquence est présente dans de nombreux promoteurs de gènes codant pour des enzymes de détoxication anti-oxydante (d'où son premier nom). C'est le cas, entre autres, de la métallothionéine, de la quinone réductase, de l'hème oxygénase et de la  $\gamma$ -glutamyl-cystéine synthétase (enzyme de synthèse du glutathion). Cette séquence est responsable de l'activation de la transcription par des molécules oxydantes ou conduisant à la production de DRO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quinones et hydroquinones, métaux lourds...) ainsi

que par une chute du taux de glutathion intracellulaire.

### MTF (*metal TF*)

Ce facteur de transcription est impliqué dans l'activation du gène de la métallothionéine [24] en présence de métaux lourds. Le facteur à «doigt de zinc» MTF reconnaît la séquence TGCACnC (MRE). Il active la transcription d'un gène rapporteur lorsque des cultures cellulaires sont traitées par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, d'autres peroxydes ou des composés métalliques tels que ZnCl<sub>2</sub>. Il faut noter que les facteurs de transcription activés par les cations métalliques comme Zn<sup>2+</sup> peuvent jouer le rôle de détecteurs du stress oxydant. En effet, l'oxydation de certaines cystéines peut conduire au relargage de ces cations par des protéines. L'élévation du taux de ces cations libres peut donc être un signal révélateur d'un stress oxydant.

### HSF (*heat shock factor*)

Cette protéine contenant trois cystéines voit sa liaison à l'ADN décroître *in vitro* dans des conditions oxydantes. *In vivo*, cette liaison est favorisée par la thioredoxine. Néanmoins, le traitement de cultures cellulaires par des doses croissantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduit à une augmentation de la liaison de ce facteur à l'ADN [25, 26]. Après NF-κB et AP-1, il s'agit donc d'un autre facteur de transcription activé par le stress oxydant mais dont la liaison à l'ADN requiert la réduction de certains résidus, vraisemblablement des cystéines.

### Facteurs de transcription inhibés par le stress oxydant

D'autres facteurs de transcription voient leur faculté de liaison à l'ADN et/ou d'activation de la transcription amoindrie voire inhibée par un choc oxydant. Rappelons qu'il s'agit d'une véritable régulation redox et non d'une simple cytotoxicité généralisée.

### Sp-1

Ce facteur de transcription ubiquitaire reconnaît la séquence GCCCGCCCC présente dans les promoteurs de nombreux gènes, en particulier ceux qui sont dépourvus

de boîte TATA. La protéine Sp-1 contient trois « doigts de zinc ». Son activité transcriptionnelle est très perturbée par le *stress oxydant in vivo* [27]. La liaison de la protéine à l'ADN est inhibée par un traitement oxydant ( $H_2O_2$ , diamide, composé favorisant l'oxydation des groupes thiols) [28]. Cet effet est réversible car une dialyse d'extraits nucléaires de cellules traitées par  $H_2O_2$  avec un agent réducteur (le dithiothréitol) permet de recouvrer la liaison dans des expériences de retard sur gel. Le traitement de cultures cellulaires par  $H_2O_2$  conduit à une inhibition de la transcription d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de séquences Sp-1. Le promoteur SV-40 contient plusieurs sites Sp-1. Nous avons vérifié qu'il était fortement inhibé par  $H_2O_2$  – aussi constitue-t-il un mauvais témoin de transfection dans les études des effets redox.

### NFI (*nuclear factor 1*)

NFI est un autre facteur de transcription ubiquitaire important se liant à la séquence TTGGCn<sub>5</sub>GCCAA (consensus). Il possède trois cystéines critiques dans son domaine de liaison à l'ADN (une mutation Cys → Ser abolit la liaison) et sa phosphorylation n'affecte pas sa liaison à l'ADN [29]. Nous avons montré que sa liaison à l'ADN était inhibée lorsque des cultures cellulaires étaient traitées par  $H_2O_2$  ou lorsque le taux de glutathion était abaissé par inhibition de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthase. L'inhibition est maximale après 30 minutes de traitement par  $H_2O_2$ , disparaît après une à deux heures et n'apparaît pas après un prétraitement par des anti-oxydants. Nous avons vérifié que cette régulation redox n'implique ni dégradation ni synthèse *de novo* de protéine NFI.

De même, l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de NFI diminue de façon dépendante de la dose lors d'un traitement des cellules par  $H_2O_2$ . La chute du glutathion ou l'inhibition de la catalase ont les mêmes conséquences. Cet effet disparaît si l'on mute le site NFI. Ce facteur de transcription joue un rôle prépondérant dans le promoteur du gène du cytochrome P450 1A1 humain (CY1A1). Nous avons observé que la transcription basale ou stimulée par la tétrachlorodiben-

zodioxine (TCDD), contrôlée par ce promoteur était fortement diminuée en cas de choc oxydant par  $H_2O_2$  (ou de chute du glutathion). Ces expériences montrent que l'activité du facteur de transcription NFI est très sensible à l'état redox intracellulaire.

### p53

Ce suppresseur de tumeur contient douze cystéines dans sa séquence protéique. Neuf d'entre elles sont dans le domaine de liaison à l'ADN dont quatre sont essentielles pour la liaison (la mutation des autres en sérine n'affecte pas l'activité). De plus, trois cystéines sont impliquées dans la coordination d'un cation Zn. La p53 possède donc une double sensibilité redox. *In vivo*, la liaison à l'ADN ainsi que la transcription d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de p53 diminuent lors d'un traitement oxydant ( $H_2O_2$ ). Dans ces expériences, la quantité de protéine n'est pas affectée. La régulation redox s'effectuerait donc bien par l'inactivation de la protéine [30]. La présence de nombreuses cystéines critiques permet d'envisager plusieurs hypothèses. L'oxydation simple d'un résidu situé dans le domaine de liaison à l'ADN peut conduire à une gêne stérique lors de l'interaction ADN-p53. De même, la formation d'un pont disulfure adventice ou la perturbation de la coordination du cation zinc pourraient produire un changement de conformation de la protéine préjudiciable à son activité. Des travaux récents montrent que p53 est réglée par des cations métalliques comme  $Cu^+$  [31].

### USF (*upstream stimulatory factor*)

Les facteurs de transcription de la famille HLH (*helix-loop-helix*) sont ubiquitaires et se lient à la séquence CAnnTG. La dimérisation de USF, Max et c-Myc est nécessaire pour activer la transcription. La liaison à l'ADN est inhibée par le *stress oxydant*. Dans le cas de USF, un pont disulfure intramoléculeire se forme entre les Cys 229 et 248, empêchant la dimérisation, vraisemblablement par un changement de conformation global de la protéine [32]. En effet, les mutations Cys → Ser n'affectent pas la formation du dimère et la liaison à l'ADN consécutive (cette dimérisation n'implique pas de pont

disulfure intermoléculeire). En revanche, la sensibilité redox est alors perdue. Contrairement aux cas exposés ci-dessus, les cystéines ne sont ici pas requises pour l'activité transcriptionnelle. Elles pourraient jouer le rôle de détecteurs redox en conduisant à l'inhibition de USF en cas de *stress oxydant*.

### Autres cas

Il existe d'autres facteurs de transcription dont les activités *in vivo* sont inhibées par le *stress oxydant*. Dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes (GR), il semblerait que la formation d'un pont disulfure intramoléculeire dans le domaine de liaison à l'ADN soit la cause de son inhibition par le *stress oxydant* [33]. De même, le *stress oxydant* inhibe la liaison à l'ADN et la fonction transactivatrice du récepteur des œstrogènes (ER) [34]. Le facteur vEts (privé d'une partie carboxy-terminale par rapport à cEts) comporte plusieurs cystéines sensibles au *stress oxydant* dont la Cys 394 située dans le domaine de liaison à l'ADN. Son oxydation serait la cause d'une inhibition de la liaison de vEts à l'ADN, ce qui n'est pas le cas de cEts [35].

## Spécificité et régulation différentielle des facteurs de transcription

Comme nous l'avons vu, de nombreux facteurs de transcription sont affectés par une variation de l'état redox intracellulaire – dont un indicateur est le rapport thiols oxydés/thiols réduits, en particulier GSSG/GSH. Il convient toutefois de noter que la sensibilité aux variations redox d'une cystéine fonctionnellement critique est très variable. Elle dépend de sa localisation dans la protéine (protégée à l'intérieur, ou exposée) et de la nature des résidus immédiatement voisins (qui influent sur son potentiel redox). Ainsi, les facteurs de transcription sont diversement sensibles au *stress oxydant*, selon son intensité. Nous avons observé sur nos modèles cellulaires que la liaison à l'ADN ainsi que l'activation de la transcription par le facteur ubiquitaire CP-1 (aussi appelé NF-Y) étaient insensibles à des doses de  $H_2O_2$  qui inhibent l'activité de NF-1 et Sp-1. D'où la possibilité d'une

régulation redox différentielle des facteurs de transcription. Cette différenciation des comportements face aux variations redox résulte aussi de l'action spécifique de certaines protéines kinases sensibles au stress oxydant [36].

## Stress oxydant, expression des gènes et maladies

La production de DRO et la variation redox consécutive sont utilisées par plusieurs voies de signalisation. Celles-ci peuvent donc être perturbées par une surproduction de DRO survenant à la suite d'un dysfonctionnement des mécanismes de régulation et de défense anti-oxydants, d'un afflux de xénobiotiques entraînant une « explosion » du métabolisme oxydant ou d'une inflammation. Rappelons que ce déséquilibre ne doit pas nécessairement avoir une intensité destructrice pour perturber la machinerie cellulaire : il s'agit alors d'une atteinte cellulaire fonctionnelle transitoire. La modification redox de l'activité de certains facteurs de transcription permet de mettre en route une réponse à divers stress *via* l'activation ou l'inhibition de l'expression génique. Ce système de régulation a l'avantage d'être très rapide (il ne passe pas par la synthèse intermédiaire d'une protéine) et réversible (réaction chimique simple). Il couvre un large spectre de stress : xénobiotique, UV, choc thermique, inflammation... En contrepartie, il n'a pas une spécificité pointue, même si nous avons vu qu'il existe des effets différentiels.

Outre cet aspect essentiel de réponse transitoire, plusieurs études sur des cultures cellulaires et des rats ont montré que l'expression des gènes était altérée lors du vieillissement. Ce phénomène serait, entre autres, corrélié à un déclin de l'activité de Sp-1 et à une suractivation de NF- $\kappa$ B chez les rats de trente mois, les concentrations de ces protéines restant constantes [28, 37]. Au cours du vieillissement, la production endogène de DRO augmente en raison de fuites électroniques produites par des systèmes enzymatiques redox émoussés. Ainsi, un décalage chronique de l'état redox intracellulaire vers un état plus oxydé pourrait avoir des

conséquences physiopathologiques. On sait déjà que ce phénomène intervient dans l'accélération du vieillissement ; il pourrait être impliqué dans la dégénérescence neurologique (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson) et l'arthrite. En outre, la perturbation chronique de l'expression des gènes *via* l'inhibition ou la stimulation de certains facteurs de transcription pourrait jouer un rôle dans les processus oncogéniques [2] (altération de la fonction de p53, perturbation du contrôle génique de la mitose, de l'apoptose ou de la différenciation, etc.). Enfin, des mutations de l'ADN surviennent après formation d'adduits par les DRO [38]. Outre les conséquences d'une altération des séquences codantes, des mutations peuvent également affecter le caractère fonctionnel des séquences régulatrices de la transcription (non-reconnaissance par les facteurs de transcription). On sait d'ores et déjà que des mécanismes redox peuvent intervenir dans la régulation cellulaire à plusieurs niveaux : transmission amont du signal, kinases-phosphatases et expression des gènes (avec des régulations transcriptionnelles voire post-transcriptionnelles). Par ailleurs, il est maintenant bien établi que le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses maladies chroniques : SIDA, maladie d'Alzheimer, arthrite, cancer... On comprend alors l'intérêt du développement d'essais de thérapies anti-oxydantes (vitamines E, C et A ; NAC ; sélénium...). Certaines études ont déjà porté sur la répllication du VIH et l'arthrose avec des résultats à confirmer [39, 40] ■

### Remerciements

Nous remercions le Dr Martin Best-Belpomme et le Dr Jacques Piette pour leur aide lors de la rédaction du manuscrit.

### RÉFÉRENCES

1. Vaughan M. Oxidative modification of macromolecules. *J Biol Chem* 1997; 272: 18513.
2. Cerruti P. Prooxidant state and tumor promotion. *Science* 1985; 227: 375-81.

3. Krieger-Brauer H, Kather H. The stimulus sensitive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system present in human fat cell plasma membranes is multi-receptor linked and under antagonist control by hormones and cytokines. *Biochem J* 1995; 307: 543-8.

4. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11: 118-24.

5. Guyton K, Xu Q, Holbrook N. Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem J* 1996; 314: 547-54.

6. Wasserman WW, Fahl WE. Functional antioxidant responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5361-6.

7. Demple B, Amabile-Cuevas CF. The control of oxidative stress responses. *Cell* 1991; 67: 837-9.

8. Duh J, Zhu H, Shertzer H, Nebert D, Puga A. The Y-box motif mediates redox-dependent transcriptional activation in mouse cell. *J Biol Chem* 1995; 270: 30499-507.

9. Clairborne A, Miller H, Parsonage D, Ross RP. Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *FASEB J* 1993; 7: 1483-90.

10. Slater A, Stefan C, Nobel I, Orrenius. Signaling mechanism and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* 1995; 82-83: 149-53.

11. Pennesi E. Superoxides relay Ras protein's oncogenic message. *Science* 1997; 275: 1567-8.

12. Keyse SM, Emslie EA. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* 1992; 359: 644-7.

13. Irani K, Xia Y, Zweier J, et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997; 275: 1649-51.

14. Pombo C, Bonventre J, Molnar A, Kyriakis J, Forece T. Activation of human Ste20-like kinase by oxidant stress defines a novel stress response pathway. *EMBO J* 1996; 15: 4537-46.

15. Baeuerle P, Baltimore D. NF- $\kappa$ B: Ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.

16. Schoonbroodt S, Legrand-Poels S, Best-Belpomme M, Piette J. Activation of NF- $\kappa$ B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem J* 1997; 321: 777-85.

17. Schmidt K, Amstad P, Cerruti P, Baeuerle P. The role of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of nuclear factor NF- $\kappa$ B. *Chem Biol* 1995; 2: 13-22.

18. Krezt-Remy C, Bates E, Arrigo A. Amino acids analogs activate NF- $\kappa$ B through redox-dependant I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation by the proteasome without apparent phosphorylation. Consequence on HIV-1 long terminal repeat activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 3180-91.

## RÉFÉRENCES

19. Mihm S, Galter D, Dröge W. Modulation of transcription factor NF- $\kappa$ B activity by intracellular glutathione levels and by variation of the extracellular cysteine supply. *FASEB J* 1995; 9: 246-52.
20. Anderson M, Staal F, Gitler C, Herzenberg L. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF- $\kappa$ B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11527-31.
21. Abate C, Patel L, Rauscher F, Curran T. Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity *in vitro*. *Science* 1990; 249: 1157-61.
22. Grether-Beck S, Olaizola-Horn S, Schmitt H, et al. Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14586-91.
23. Galang C, Hauser C. Cooperative DNA binding of the human Hox B5 protein is under redox regulation *in vitro*. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4609-17.
24. Dalton T, Li Q, Bittel D, Liang LGKA. Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor I activity. *J Biol Chem* 1996; 271: 26233-41.
25. Jacquier-Sarlin M, Polla BS. Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: role of thioredoxin. *Biochem J* 1996; 318: 187-93.
26. Polla BS, Banzet N, Dall'Ava J, Arrigo AP, Vignola AM. Les mitochondries, carrefour entre vie et mort cellulaire: rôle des protéines de stress et conséquences sur l'inflammation. *Med Sci* 1998; 14: 18-25.
27. Wu X, Bishopric N, Disher D, Murphy B, Webster K. Physical and functional sensitivity of zinc-finger transcription factor to redox changes. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1035-46.
28. Ammendola R, Mesuraca M, Russo T, Cimino F. The DNA-binding efficiency of Sp-1 is affected by redox changes. *Eur J Biochem* 1994; 225: 483-9.
29. Bandyopadhyay S, Gronostajski RM. Identification of a conserved oxidation-sensitive cysteine residue in the NF-1 family of DNA-binding proteins. *J Biol Chem* 1994; 269: 29949-55.
30. Parks D, Bolinger R, Mann K. Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 1289-95.
31. Verhaegh G, Richard MJ, Hainaut P. Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5699-706.
32. Pogoniec P, Kato H, Roeder RG. The Helix-Loop-Helix transcription factor USF can be functionally regulated in a redox dependent manner. *J Biol Chem* 1992; 267: 24563-7.
33. Esposito F, Cuccillo F, Morra F, Russo T, Cimino F. DNA binding activity of the glucocorticoid receptor is sensitive to redox changes in intact cells. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1260: 308-14.
34. Hayashi S, Hajiro-Nakanishi K, Makino Y, Eguchi H, Yodoi J, Tanaka H. Functional modulation of estrogen receptor by redox state with reference to thioredoxin as a mediator. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4035-40.
35. Wasylyk C, Wasylyk B. Oncogenic conversion of Ets affects redox regulation *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 523-9.
36. Mendelson K, Contois L, Terosain S, Davis R, Paulson E. Independent regulation of JNK/p38 mitogen activated protein kinase by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12908-13.
37. Helenius, Hanninen M, Lehtinen SK, Salminen A. Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor  $\kappa$ B. *Biochem J* 1996; 318: 603-8.
38. Beckman K, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997; 272: 19633-6.
39. Raju P, Herzenberg L, Herzenberg L, Røederer M. Glutathione precursor and antioxidant activities of N-acetylcysteine and othiazolidine carboxylate compared in *in vitro* studies of HIV replication. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994; 10: 961-7.
40. McAlindon T, Jacques P, Zhang Y, et al. Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis? *Arthritis Rheum* 1996; 39: 648-56.

## Summary

### Gene regulation by oxidative stress

The redox status is part of the intracellular chemical environment (as well as pH, osmotic pressure, etc.). The intracellular production of reactive oxygen species may interfere with the redox status causing a so-called « oxidative stress ». This may result from either direct aggressions (exogenous stresses: xenobiotics, inflammation, UV...) or from an alteration of metabolism. Biological macromolecules may be affected in their structures or functions by a variation of the intracellular redox status. Thus, oxidative stress may alter essential cellular functions such as gene expression. Indeed, the activities of some transcription factors are modified by reactive oxygen species. Some of them such as AP-1 or NF- $\kappa$ B are activated whereas others are inhibited (Sp-1, NFI, GR...). The expressions of many genes are thus up-regulated (alert genes, detoxification enzymes...) or down-regulated (cytochrome P450 1A1). From a larger point of view, oxidative stress interferes with cell signalling in general. Antioxidant therapies are being developed in the case of chronic pathologies in which oxidative stress is involved (arthritis, AIDS, Alzheimer' disease...).

## 10<sup>e</sup> Cours Francophone de Biologie de la Peau (COBIP) Structure et fonctions. Acquisitions récentes 24-25-26 mars 1999 à Lyon

Le COBIP est un cours francophone de biologie de la peau visant à diffuser régulièrement les acquisitions récentes sur les structures et fonctions de la peau humaine. Il s'adresse aux médecins, pharmaciens, biologistes de toutes spécialités, du secteur public ou privé, aux étudiants.

### Contact :

Madame Nathalie Jacquet  
Inserm Unité 346, Clinique Dermatologique, Pavillon R,  
Hôpital Édouard-Herriot, 69437 Lyon Cedex 03, France.  
Tél. : 04 72 11 02 92 – Fax : 04 72 11 02 90